



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

Nathalia dos Santos Ferreira

**Biotransformação do arsênio inorgânico (As-i) em Tilápias do Nilo
(*Oreochromis niloticus*) e avaliação de seu antagonismo na presença de
selênio**

São José do Rio Preto - SP

2024

Nathalia dos Santos Ferreira

**Biotransformação do arsênio inorgânico (As-i) em Tilápias do Nilo
(*Oreochromis niloticus*) e avaliação de seu antagonismo na presença de
selênio**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Química, 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.

Financiadora: FAPESP – Proc. 2018/25002-0

Orientador: Prof. Dr. Mario Henrique Gonzalez

Co-orientadores: Profa. Dra. Ana Rita de Araújo Nogueira

Prof. Dr. Danilo Grünig Humberto da Silva

São José do Rio Preto - SP

2024

F383b	Ferreira, Nathalia dos Santos Biotransformação do arsênio inorgânico (As-i) em Tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) e avaliação de seu antagonismo na presença de selênio / Nathalia dos Santos Ferreira. -- São José do Rio Preto, 2024 111 p. : il., tabs., fotos Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto Orientador: Mario Henrique Gonzalez Coorientadora: Ana Rita de Araújo Nogueira 1. Bioacumulação. 2. Toxicidade aguda. 3. Arsênio inorgânico. 4. LC-ICP-MS. 5. Estresse oxidativo e biomarcadores. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Nathalia dos Santos Ferreira

**Biotransformação do arsênio inorgânico (As-i) em Tilápias do Nilo
(*Oreochromis niloticus*) e avaliação de seu antagonismo na presença de
selênio**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Química, 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.

Financiadora: FAPESP – Proc. 2018/25002-0

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Mario Henrique Gonzalez
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira
USP – Ribeirão Preto

Profa. Dra. Cassiana Seimi Nomura
USP – São Paulo

Profa. Dra. Mirian Cristina dos Santos
UNESP – Araraquara

Profa. Dra. Wladiana Oliveira Matos
UFC – Fortaleza

São José do Rio Preto - SP

12 de julho de 2024

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

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter iluminado meu caminho, me dado força e sabedoria para superar todas as dificuldades e realizar essa etapa tão importante da minha vida.

A minha mãe Dorcelina e minha avó Luzia, por todo amor e apoio incondicional. Obrigada por sempre estarem ao meu lado, apesar de todas as dificuldades, me incentivando e confiando em tudo que faço.

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

Ao meu noivo Pedro, por todo amor, apoio e paciência em todos momentos.

A todos meus familiares e amigos, pelo carinho e compreensão.

Ao Prof. Dr. Mario Henrique Gonzalez, pela orientação, confiança, amizade e compreensão. Obrigada por todo apoio e por sempre acreditar em mim, até mesmo quando pensei que não seria possível finalizar nosso trabalho.

A Profa. Dra. Ana Rita de Araújo Nogueira, pela coorientação e por possibilitar realizar as análises de especiação em seu laboratório na Embrapa. Um agradecimento especial ao seu aluno, Ívero, pela ajuda em bancada e auxílio durante as análises no LC-ICP-MS e tratamento dos dados.

Ao Prof. Dr. Danilo Grünig Humberto da Silva, pela coorientação, atenção e total disponibilidade em contribuir com o trabalho com seus conhecimentos. Um agradecimento especial as suas alunas, Victoria e Flaviene, pela ajuda nas análises bioquímicas, tratamento estatístico dos dados e escrita do artigo.

A todos do Grupo de Inovação em Química Analítica Verde (GIQAV) pela troca de experiências, ajuda, amizade e momentos de descontração.

A Embrapa Pecuária Sudeste pela infraestrutura concedida para que fosse possível realizar as análises de especiação por LC-ICP-MS e pelo estágio.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de pesquisa, sob o processo 2018/25002-0. Agradeço também ao financiamento dos projetos sob processos 2014/50945-4, 2015/08873-9, 2017/18531-3, 2018/26145-9, 2019/22113-8 e 2021/14759-5.

Ao Instituto Nacional de Tecnologias Alternativas para Detecção, Avaliação Toxicológica e Remoção de Micropoluentes e Radioativos (INCT- DATREM) por apoiar nosso trabalho.

A UNESP/IBILCE por conceder o espaço físico e ensino público de qualidade para o progresso dos meus estudos.

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

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, os meus sinceros agradecimentos!

“O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém.”

(Dalai Lama)

RESUMO

A especiação de arsênio (As) em peixes tem sido amplamente investigada, no entanto a bioacumulação e a biotransformação do As inorgânico em diferentes tecidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) não são totalmente compreendidas. O presente estudo teve como objetivo investigar a bioacumulação do As inorgânico em tilápias do Nilo, bem como avaliar a distribuição das principais espécies de arsênio no fígado, estômago, brânquias e músculo após ensaios toxicológicos controlados com As(III) e (V) em concentrações de 5,0 e 10,0 mg L⁻¹ durante períodos de exposição de 1 e 7 dias. As determinações de As total foram realizadas por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Para ambas as exposições (As(III) e As(V)), os níveis de As total após 7 dias de exposição foram maiores no fígado e estômago e menores nas brânquias e músculo. No geral, a tilápia do Nilo exposta ao As(III) apresentou concentrações mais elevadas de As após os tratamentos, em comparação à exposição ao As(V). A especiação química de As nos tecidos estudados foram realizadas por cromatografia líquida acoplada a ICP-MS (LC-ICP-MS), e revelou que a biotransformação do As pode ter acontecido pela redução do As(V) para As(III), metilação para ácido monometilarsênico (MMA) e ácido dimetilarsênico (DMA), e subsequente conversão para arsenobetaina (AsB), que é a espécie não tóxica e a forma predominante de arsênio. As interações e efeitos antagônicos do selênio (Se) nos processos de bioacumulação foram testados pela exposição combinada do As inorgânico juntamente com selênio tetravalente (Se(IV)). Os resultados indicaram uma redução de 4-6 vezes da toxicidade do arsênio na tilápia do Nilo. Também foi foco do nosso trabalho investigar a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), além da enzima de biotransformação glutathione S-transferase (GST), bem como os níveis de oxidação de biomoléculas por meio da quantificação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos tecidos estudados. Como resultado, foi observado que o tratamento com ambas as espécies de As causaram um padrão de inibição enzimática dos antioxidantes estudados, com a diminuição das atividades antioxidantes da maioria das enzimas estudadas nos diferentes tecidos da tilápia do Nilo.

Palavras-chave: Bioacumulação; toxicidade aguda; arsênio inorgânico; LC-ICP-MS; estresse oxidativo; biomarcadores.

ABSTRACT

The speciation of arsenic in fish has been widely investigated, but bioaccumulation and biotransformation of inorganic As in different tissues of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) are not fully understood. The present study aimed to investigate the bioaccumulation of As in Nile tilapia, as well as to evaluate the distribution of the main arsenic species in liver, stomach, gill, and muscle, after controlled exposures to As(III) and As(V) at concentrations of 5.0 and 10.0 mg L⁻¹ during periods of 1 and 7 days. Total As determinations were performed by inductively coupled plasma mass spectroscopy (ICP-MS). For both exposures (As(III) and As(V)), the total As levels after 7-day exposure were highest in the liver and stomach and lowest in the gills and muscle. Overall, Nile tilapia exposed to As(III) showed higher As concentrations after treatments compared to exposure to As(V). Chemical speciation of As in the studied tissues was performed by liquid chromatography coupled with ICP-MS (LC-ICP-MS), and revealed that the biotransformation of As may have occurred through the reduction of As(V) to As(III), methylation to monomethylarsonic acid (MMA) and dimethylarsinic acid (DMA), and subsequent conversion to arsenobetaine (AsB), which is the nontoxic species and the predominant form of arsenic. The interactions and antagonistic effects of selenium (Se) on bioaccumulation processes were tested by the combined exposure of inorganic As together with tetravalent selenium (Se(IV)). The results indicated a 4-6-fold reduction in arsenic toxicity in Nile tilapia. Our work also focused on investigating the activity of the antioxidant enzymes catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), and the biotransformation enzyme glutathione S-transferase (GST), as well as the oxidation levels of biomolecules by quantifying thiobarbituric acid reactive species (TBARS) in the tissues studied. As a result, it was observed that treatment with both As species caused a pattern of enzymatic inhibition of the studied antioxidants, with the decrease in the antioxidant activities of most of the enzymes studied in the different tissues of Nile tilapia.

Keywords: Bioaccumulation; acute toxicity; inorganic arsenic; LC-ICP-MS; oxidative stress; biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais espécies de arsênio.....	23
Figura 2 - Similaridade química e estrutural entre o As(V) e o íon fosfato	24
Figura 3 - Vias toxicológicas de entrada do As(III) e (V) nas células e mecanismo de biotransformação	26
Figura 4 - Sistemas antioxidantes enzimáticos: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR)	37
Figura 5 - Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	44
Figura 6 - Tanque de piscicultura da UNESP, São José do Rio Preto	44
Figura 7 - Tanques de aclimação	45
Figura 8 - Esquema do ensaio toxicológico com As(III) e (V) para avaliar a bioacumulação e biotransformação	47
Figura 9 - Coleta dos tecidos de interesse: fígado, estômago, brânquias e músculo.....	48
Figura 10 - Ensaio toxicológico de bioacumulação e biotransformação com As(III) e (V).....	53
Figura 11 - Bioacumulação de As ($\mu\text{g g}^{-1}$) nos diferentes tecidos de <i>O. niloticus</i> após exposição à As(III)	57
Figura 12 - Bioacumulação de As ($\mu\text{g g}^{-1}$) nos diferentes tecidos de <i>O. niloticus</i> após exposição à As(V)	59
Figura 13 - Separação cromatográfica das espécies de As usando 10 mmol L^{-1} $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ diluída em 1% (v v ⁻¹) de metanol como fase móvel no método LC-ICP-MS	62
Figura 14 - Cromatogramas para (a) DOLT-5, (b) DORM-4, (c) TORT-3, e (d) amostra real	63

Figura 15 - Frações de massa de AsB ($\mu\text{g g}^{-1}$) em diferentes tecidos após exposição das tilápias do Nilo ao As(III).....	69
Figura 16 - Frações de massa de AsB ($\mu\text{g g}^{-1}$) em diferentes tecidos após exposição das tilápias do Nilo ao As(V).....	70
Figura 17 - Tanque de piscicultura do Instituto da Pesca, São José do Rio Preto.....	73
Figura 18 - Esquema do ensaio de toxicidade aguda.....	74
Figura 19 - Ensaio de toxicidade aguda	77
Figura 20 - Gráfico para a LC_{50} para o selênio tetravalente.....	78
Figura 21 - Tendência de recuperação versus vazão de He utilizada nas análises de ^{78}Se para o CRM TORT-2.....	81
Figura 22 – Atividade das enzimas CAT, GPx, GST, GR e níveis de TBARS no fígado de <i>O. niloticus</i> expostos por 7 dias ao As(III) e (V).....	91
Figura 23 - Atividade das enzimas CAT, GPx, GST, GR e níveis de TBARS no estômago de <i>O. niloticus</i> expostos por 7 dias ao As(III) e (V).....	93
Figura 24 - Atividade das enzimas CAT, GPx, GST, GR e níveis de TBARS nas brânquias de <i>O. niloticus</i> expostos por 7 dias ao As(III) e (V).....	94
Figura 25 – Atividade das enzimas CAT, GPx, GST, GR e níveis de TBARS no músculo de <i>O. niloticus</i> expostos por 7 dias ao As(III) e (V).....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros operacionais e instrumentais do ICP-MS	50
Tabela 2 - Parâmetros operacionais e instrumentais do LC-ICP-MS.....	52
Tabela 3 - Peso e tamanho das tilápias utilizadas nos ensaios toxicológicos de bioacumulação e biotransformação	54
Tabela 4 - Valores certificados e determinados pelo método proposto de determinação de As em CRMs de pescados por ICP-MS	55
Tabela 5 - Concentração de As total ($\mu\text{g g}^{-1}$) nos diferentes tecidos estudados durante o ensaio de bioacumulação/biotransformação com As(III) ($n = 3, \pm \text{SD}$).....	56
Tabela 6 - Concentração de As total ($\mu\text{g g}^{-1}$) nos diferentes tecidos estudados durante o ensaio de bioacumulação/biotransformação com As(V) ($n = 3, \pm \text{SD}$).....	58
Tabela 7 - Fração de massa de As total e espécies de As ($\mu\text{g g}^{-1}$) nos materiais de referência certificados (DOLT-5, DORM-4 e TORT-3) ($n = 3; \pm \text{SD}$).....	62
Tabela 8 - Frações de massa das espécies de As ($\mu\text{g g}^{-1}$) em diferentes tecidos após exposição de tilápia do Nilo ao As(III) ($n = 3, \pm \text{SD}$)	65
Tabela 9 - Frações de massa das espécies de As ($\mu\text{g g}^{-1}$) em diferentes tecidos após exposição de tilápia do Nilo ao As(V) ($n = 3, \pm \text{SD}$)	66
Tabela 10 - Porcentagem de mortes cumulativas a cada 24 horas	77
Tabela 11 - Principais interferentes dos isótopos de selênio	79
Tabela 12 - Equações matemáticas de correção para o Se	80
Tabela 13 - Concentração de As total ($\mu\text{g g}^{-1}$) nos diferentes tecidos estudados após exposição a As(III) e Se(IV) ($n = 3, \pm \text{SD}$)	83
Tabela 14 - Concentração de Se ($\mu\text{g g}^{-1}$) nos diferentes tecidos estudados após exposição a As(III) e Se(IV) ($n = 3, \pm \text{SD}$)	84

Tabela 15 - Concentração de As total ($\mu\text{g g}^{-1}$) nos diferentes tecidos estudados após exposição a As(V) e Se(IV) ($n = 3, \pm \text{SD}$).....	85
Tabela 16 - Concentração de Se ($\mu\text{g g}^{-1}$) nos diferentes tecidos estudados após exposição a As(V) e Se(IV) ($n = 3, \pm \text{SD}$)	85
Tabela 17 - Efeitos causados pela exposição de 7 dias ao As(III) e As(V) em <i>O. niloticus</i> nos diferentes tecidos estudados.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de variância

As – Arsênio

As(III) – Arsênio trivalente

As(V) – Arsênio pentavalente

As3MT – Arsênio metil-transferase

AsB – Arsenobetaína

AsC – Arsenocolina

As^{III}(GS)₃ – Arsenotriglutationa

ATP – Trifosfato de adenosina

BSA – Albumina de soro bovino

CAT – Catalase

CEUA – Comissão de Ética no Uso dos Animais

CRM – Material de referência certificado

DMA – Ácido dimetilarsínico

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

GLM – Modelo Linear Geral

GPx – Glutationa peroxidase

GR – Glutationa redutase

GSH – Glutationa reduzida

GSSG – Glutationa dissulfeto ou glutaciona oxidada

GST – Glutationa S-transferase

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

He – Hélio

HNO₃ – Ácido nítrico

IARC – Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer

ICP-MS – Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado

KED – Discriminação por energia cinética

LC₅₀ – Concentração letal média

LC-ICP-MS – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado

LOD – Limite de detecção

LOQ – Limite de quantificação

MMA – Ácido monometilarsônico

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

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida

O₂•- – radical superóxido

OECD – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

OH• – radical hidroxila

R² – Coeficiente de determinação

ROO• – radical peroxil

SAM – S-adenosilmetionina

SD – Desvio padrão

Se – Selênio

Se(IV) – Selênio tetravalente

SEM – Erro padrão da média

TBARS – Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

TETRA – Íon tetrametilarsônico

TMAO – Óxido de trimetilarsina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1. Bioindicadores e contaminação aquática.....	19
2.2. Toxicidade e metabolismo do arsênio	21
2.3. Especiação química de As	27
2.4. Interação entre arsênio e selênio	32
2.5. Biomarcadores de contaminação aquática e estresse oxidativo	35
3. OBJETIVOS.....	41
3.1. Objetivos gerais.....	41
3.2. Objetivos específicos	41
3.2.1. Objetivos específicos da Seção 4	41
3.2.2. Objetivos específicos da Seção 5	42
3.2.3. Objetivos específicos da Seção 6	42
4. BIOACUMULAÇÃO E BIOTRANSFORMAÇÃO DE ARSÊNIO INORGÂNICO EM DIFERENTES TECIDOS DE TILÁPIA DO NILO.....	43
4.1. Materiais e métodos	43
4.1.1. Organismo-teste.....	43
4.1.2. Delineamento experimental.....	45
4.1.3. Preparo das amostras	48
4.1.4. Determinação de As total por ICP-MS.....	49
4.1.5. Extração das espécies de As	50
4.1.6. Especiação de As por LC-ICP-MS.....	51
4.2. Resultados e discussão	53
4.2.1. Ensaio toxicológicos de bioacumulação e biotransformação	53
4.2.2. Bioacumulação do As.....	54
4.2.3. Especiação de As por LC-ICP-MS.....	61

4.2.4.	Biotransformação do As	64
4.3.	Conclusão	71
5.	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTAGÔNICOS DO ARSÊNIO INORGÂNICO NA PRESENÇA DE SELÊNIO	72
5.1.	Materiais e métodos	72
5.1.1.	Ensaio de toxicidade aguda com Se(IV)	72
5.1.2.	Ensaio antagônico com As inorgânico e Se(IV).....	75
5.1.3.	Preparo das amostras	75
5.1.4.	Determinação de As total por ICP-MS.....	75
5.1.5.	Desenvolvimento e otimização do método para determinação de Se em ICP-MS	76
5.2.	Resultados e discussão	76
5.2.1.	Ensaio de toxicidade aguda com Se(IV)	76
5.2.2.	Desenvolvimento e otimização do método para a determinação de Se em ICP-MS	79
5.2.3.	Avaliação dos efeitos antagônicos entre As e Se	83
5.3.	Conclusão	86
6.	AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO EM TILÁPIAS DO NILO EXPOSTAS AO ARSÊNIO INORGÂNICO	87
6.1.	Materiais e métodos	87
6.1.1.	Análises bioquímicas	87
6.1.2.	Análises estatísticas	90
6.2.	Resultados e discussão	90
6.3.	Conclusão	99
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	100
	REFERÊNCIAS	102

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem se observado um crescimento elevado no mercado de pescados, uma vez que eles são tidos como alimentos mais saudáveis quando comparados com outros tipos de carnes, por oferecerem uma variedade de vitaminas e nutrientes, além de ser uma opção de proteína com baixo teor de gordura saturada (ERSOY; ÖZEREN, 2009; MORALES; HIGUCHI, 2018). Além da importância nutricional, os pescados desempenham uma função econômica e social, pois a sua cadeia produtiva gera empregos e renda para o pequeno e grande produtor (PEIXE BR, 2023).

A tilápia está no topo dos peixes mais cultivados e consumidos no Brasil, com destaque para a região Sul e Sudeste, em especial o noroeste do estado de São Paulo. De acordo com o Anuário 2023, publicado pela Associação Brasileira de Piscicultura (Peixe BR), a produção de tilápias atingiu 550.060 toneladas, o que representou 63,9 % de toda piscicultura brasileira em 2022. Com esse resultado, o Brasil consolidou-se na 4ª posição entre os maiores produtores de Tilápia no mundo, e por essa razão, ela foi escolhida como objeto de estudo do nosso trabalho.

Apesar dos inúmeros benefícios, os peixes podem estar expostos a inúmeros contaminantes inorgânicos tóxicos presentes nas águas, como por exemplo, o arsênio (As), desencadeando processos de bioacumulação e biotransformação nas espécies aquáticas por meio da cadeia alimentar. Na maioria das vezes a determinação total de um elemento não é suficiente para fornecer informações a respeito de sua toxicidade, biodisponibilidade e função bioquímica, sendo necessários estudos de fracionamento e/ou especiação química para complementação das informações. A determinação de arsênio em peixes é de grande interesse analítico devido à sua toxicidade, uma vez que os efeitos tóxicos do arsênio estão relacionados às suas formas químicas e seus estados de oxidação, sendo as formas inorgânicas As(III) e (V) mais tóxicas que as formas orgânicas (ácido monometilarsênico (MMA), ácido dimetilarsínico (DMA) e arsenobetaina (AsB)) (MARTINEZ et al., 2011; CHEN et al., 2020).

Este trabalho teve como objetivo principal a investigação da biotransformação do arsênio inorgânico para espécies metiladas em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), assim como a avaliação da distribuição das espécies de arsênio (As(III), As(V), MMA, DMA e AsB) nos tecidos de fígado, estômago, brânquias e músculo pela hifenação das

técnicas de cromatografia líquida e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (LC-ICP-MS), após os ensaios ecotoxicológicos com tilápias do Nilo expostas à As(III) e (V) em concentrações definidas. Também foi avaliado os efeitos antagônicos que o selênio pode causar sobre a toxicidade do As inorgânico nas tilápias do Nilo durante o processo de bioacumulação.

Outro foco do nosso trabalho foi investigar a atividade de enzimas que estão envolvidas nos mecanismos de defesa antioxidante, biotransformação e desintoxicação do As nos tecidos envolvidos. As enzimas glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) foram estudadas. Além disso, foi realizada a quantificação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Esses resultados trarão dados adicionais e importantes sobre a distribuição das diferentes espécies químicas do As durante o processo de bioacumulação, informações bioquímicas que ocorrem durante o processo de bioacumulação/biotransformação e os efeitos antagônicos do selênio sobre a toxicidade do As. Assim esse trabalho vem para contemplar, dar continuidade e contribuir com maiores informações e dados sobre o ciclo do As inorgânico em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linha de pesquisa estudada pelo nosso grupo de pesquisa (Grupo de Inovação em Química Analítica Verde – GIQAV).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Bioindicadores e contaminação aquática

A presença de metais e/ou contaminantes inorgânicos na água possui uma enorme relevância toxicológica, uma vez que estes compostos em ambientes aquáticos podem desencadear processos de bioacumulação em peixes e em outros organismos ao longo da cadeia alimentar, o que pode ser prejudicial para os peixes e, conseqüentemente para a população que se alimenta destas espécies contaminadas (AZIZUR RAHMAN; HASEGAWA; PETER LIM, 2012; CHIARELLI; ROCCHERI, 2014). Estes contaminantes inorgânicos presentes nas águas podem ser inseridos/lançados no ambiente aquático por deposição atmosférica, por erosão da matriz geológica, ou ainda por fontes antropogênicas, como por exemplo, atividades agrícolas, industriais, de mineração e/ou domésticas, e causam inúmeros malefícios por conta de sua toxicidade e longa persistência nestes ambientes (ALAM et al., 2002; RADOMYSKI et al., 2018).

Os peixes estão no topo da cadeia alimentar de água doce e podem acumular grandes quantidades de contaminantes da água, e tais padrões de acumulação dependem de fatores biológicos e ambientais, como por exemplo, tipo da espécie, tamanho corporal, idade dos organismos, taxa de ingestão e ambiente intestinal, bem como, pH, densidade, salinidade e matéria orgânica dissolvida (MANSOUR; SIDKY, 2002; ZHANG et al., 2022).

Nos últimos anos, a contaminação por metais e/ou contaminantes inorgânicos em ecossistemas aquáticos, como por exemplo, arsênio, cádmio, cromo, mercúrio e chumbo tem recebido grande atenção, pois os processos de bioacumulação e biomagnificação envolvem várias formas e mecanismos ainda não totalmente elucidados (VENTURA-LIMA; BOGO; MONSERRAT, 2011; GRECH et al., 2017; ZHANG et al., 2022).

Os modelos biocinéticos e mecânicos fornecem informações importantes para a compreensão dos principais processos que controlam a bioacumulação de metais, o que explica os padrões de acumulação em diferentes espécies estudadas (RADOMYSKI et al., 2018). O contaminante é absorvido pelo tecido de acordo com a taxa de absorção e é eliminado de acordo com sua taxa de eliminação ou depuração. Os modelos podem ser distinguidos em unicompartmentais, onde a concentração do contaminante é a mesma em todo organismo, ou ainda em modelos multicompartmentais, pressupondo que a

concentração do contaminante é diferente entre os vários órgãos e tecidos (GRECH et al., 2017).

No ambiente aquático, os peixes são amplamente utilizados como bioindicadores de contaminação aquática, pois acumulam concentrações elevadas de contaminantes inorgânicos em seus tecidos, transferindo-os para diferentes níveis tróficos (CUNNINGHAM et al., 2019). As primeiras respostas são dadas a partir do acúmulo do contaminante nos órgãos e tecidos, seguida de alterações subcelulares devido à sua ação deletéria contínua (HEDAYATI, 2018).

Os bioindicadores são organismos ou comunidades de organismos, onde podem ser observadas alterações que permitam avaliar uma mudança ou situação específica no ambiente, apresentando importante relevância biológica, uma vez que informa sobre um possível problema de contaminação no ecossistema. Assim, os bioindicadores geralmente são utilizados em ensaios para reproduzir e demonstrar o ambiente natural frente aos impactos causados pelas atividades antropogênicas (ŁUCZYŃSKA; PASZCZYK; ŁUCZYŃSKI, 2018).

A principal razão do emprego de peixes em estudos de contaminação aquática é porque eles são capazes de gerar inúmeras respostas biológicas, como por exemplo, a bioacumulação de contaminantes em seus tecidos e a capacidade de sofrerem variações fisiológicas e morfológicas, além de apresentarem características específicas, como tamanho relativamente grande, longo ciclo de vida e facilidade de crescimento (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; ZHOU et al., 2008). Além disso, o monitoramento da contaminação aquática em peixes é de vital importância para a saúde humana, pois eles estão localizados no final da cadeia alimentar aquática (LOMARTIRE; MARQUES; GONÇALVES, 2021).

O tipo de peixe a ser utilizado nesses estudos de avaliação de contaminação aquática é muito importante, pois ele deve ser resistente a variações ambientais bruscas. Assim, a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma boa espécie para ser utilizada e foi escolhida como objeto de estudo do nosso trabalho. A tilápia do Nilo é pertencente à família Cichlidae (ciclídeos) e é originária da Bacia do rio Nilo, na África. Foi introduzida no Brasil desde a década de 1950 e atualmente é a espécie de peixe mais importante da aquicultura nacional (AYROZA, 2009).

As características que tornam a tilápia do Nilo tão adequada para a piscicultura são a alta resistência às doenças e ambientes com baixa concentração de oxigênio dissolvido na água, facilidade de reprodução, rápida taxa de crescimento e a alta qualidade da carne, com textura firme, saborosa, baixo teor de gordura e alto rendimento do filé. Apresenta quatro etapas ao longo do ciclo de produção, sendo alevinagem, cria, recria e engorda, no qual todo o ciclo dura entre 6 a 12 meses (KUBITZA; KUBITZA, 2000)

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) tem sido utilizada em diversos estudos ecotoxicológicos de contaminação aquática, tanto para contaminantes orgânicos como inorgânicos. Nogueira et al. (2011) avaliaram biomarcadores bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo em tilápia do Nilo expostas à combustíveis fósseis (diesel, biodiesel e mistura de biodiesel em diferentes concentrações) e seus efeitos tóxicos. Carvalho et al. (2012) investigaram diversos parâmetros de estresse oxidativo (atividades enzimáticas, metalotioneína e peroxidação lipídica) em tilápias do Nilo coletadas do Rio Monjolinho, na cidade de São Carlos (São Paulo), e os resultados mostraram que a exposição a diversos metais (Cu, Zn, Mn e Fe) causou danos oxidativos aos tecidos. Hamed et al. (2019) analisaram a influência e os impactos dos microplásticos nos parâmetros hematológicos e bioquímicos em juvenis de tilápia do Nilo. Covantes-Rosales et al. (2019) avaliaram o efeito do pesticida organofosforado diazinon (DNZ) nos parâmetros fagocitários dos leucócitos sanguíneos de tilápias do Nilo. Ferreira et al. (2019) realizaram ensaios toxicológicos com As (III) e (V) em tilápia do Nilo em condições definidas, a fim de avaliar os efeitos de bioacumulação em diferentes tecidos (fígado, estômago, brânquias e músculo). Wang et al. (2020) estudaram os efeitos do acúmulo de Cu e Zn sobre as enzimas antioxidantes e expressões transcricionais de genes relacionados à defesa e imunidade em tilápias do Nilo.

Assim, a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é um ótimo bioindicador para contaminação de ambientes aquáticos e ocupa um importante lugar na aquicultura mundial, sendo utilizada como um bom modelo biológico para os estudos toxicológicos, além de ser cultivada no Noroeste do Estado de São Paulo, e muito consumida no Brasil.

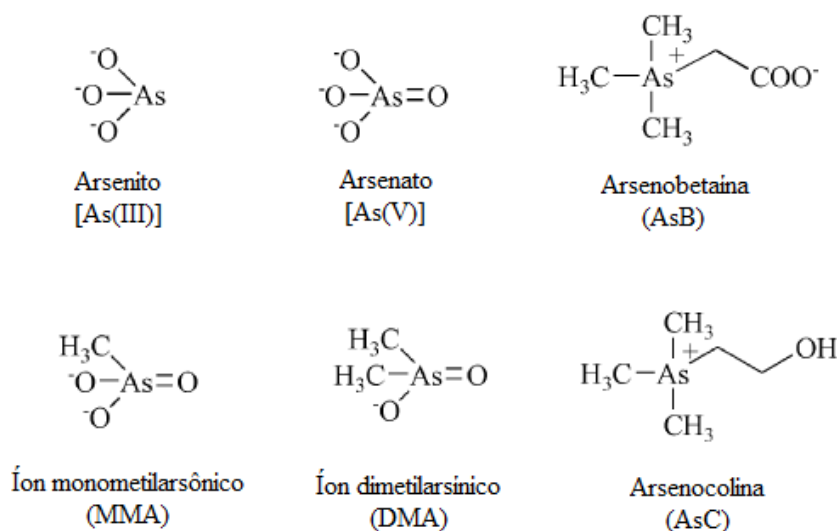
2.2. Toxicidade e metabolismo do arsênio

O arsênio (As) é um desses contaminantes inorgânicos que pode estar presente em ambiente aquático através de fontes naturais, pela erosão de solos e rochas e atividade

vulcânica, ou ainda por atividades antrópicas, como a combustão de combustíveis fósseis, atividades mineradoras, aplicações industriais e na agricultura pelo uso de agrotóxicos que podem ser lixiviados para corpos d'água (FOWLER et al., 2007; GREANI et al., 2017). Segundo a Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC), o As é um elemento altamente tóxico e cancerígeno para os seres humanos, no entanto, para os modelos animais os efeitos observados são diferentes, o que dificulta a elucidação da maneira exata com que os efeitos tóxicos ocorrem e quanto à sua carcinogenicidade (MARTINEZ et al., 2011).

O grau de toxicidade das espécies do arsênio varia com a forma química e seu estado de oxidação. As formas inorgânicas (As-i), representadas pelas espécies trivalente (As(III)) e pentavalente (As(V)) são consideradas mais tóxicas comparadas às espécies orgânicas. A forma trivalente apresenta toxicidade aproximadamente 60 vezes maior quando comparada com a forma pentavalente. No entanto, quando se compara a toxicidade das formas inorgânicas com as formas orgânicas, o grau de toxicidade das formas inorgânicas é em torno de 100 vezes maior do que as formas orgânicas (MARTINEZ et al., 2011; SUN; LIU; CAI, 2016).

As espécies orgânicas mais comuns são o íon monometilarsônico (MMA), íon dimetilarsínico (DMA), arsenocolina (AsC) e arsenobetaína (AsB), que estão apresentadas abaixo na Figura 1. A AsB é a principal espécie orgânica encontrada nos pescados e constitui a maior fonte de arsênio na dieta, sendo esta forma não tóxica e considerada o produto final do metabolismo do arsênio na cadeia alimentar marinha (BARRA et al., 2000; ZHANG et al., 2022). Alguns estudos indicam que a concentração de AsB em peixes é tida como a concentração total de As, por ser a espécie encontrada em maior quantidade em determinações quantitativas (KALANTZI et al., 2017).

Figura 1 - Principais espécies de arsênio

Fonte: adaptado (FRANCESCONI; KUEHNELT, 2004).

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 compreendidos, uma vez que o arsênio pode sofrer várias conversões metabólicas *in vivo* e seus metabólitos interagem com as macromoléculas intra e extracelulares (MOLIN et al., 2015).

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 As. Embora as extensões e interações desses mecanismos ainda não estejam completamente entendidas, existem evidências que indicam que o As é capaz de inativar mais de 200 enzimas, principalmente aquelas envolvidas nas vias de obtenção de energia celular e na replicação e reparo do DNA. Dessa forma, mudanças na expressão gênica podem influenciar a transcrição ou tradução do DNA (YOSIM; BAILEY; FRY, 2015; ROY; MURPHY; COSTA, 2020).

Tanto as espécies inorgânicas quanto as espécies metiladas (MMA e DMA) do As inibem a respiração celular, o que ocasiona a formação das espécies reativas de oxigênio (ERO), como o radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila ($\text{OH}^{\bullet}$), o radical peroxil ($\text{ROO}^{\bullet}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o que conseqüentemente gera o estresse oxidativo, e é tido como uma das principais teorias postuladas para a carcinogenicidade

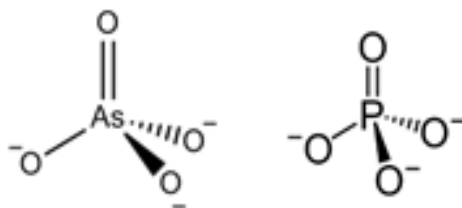
do As (VENTURA-LIMA; BOGO; MONSERRAT, 2011). Bhattacharya e Bhattacharya (2007) descreveram picos de produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas células após o peixe *Clarias batrachus* (bagre asiático, também conhecido como *walking catfish*) ser exposto ao As(III).

Outro efeito tóxico que o As pode causar é a peroxidação lipídica, que tem sido amplamente aceita como um mecanismo de lesão celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015), e estudos conduzidos por Nandi, Patra e Swarup (2005) demonstraram aumento na extensão da peroxidação lipídica em fígado e rins de ratos expostos ao As(III).

O As(III) causa a inibição do complexo piruvato desidrogenase a partir da ligação do As aos grupamentos tiol da dihidrolipoamida impedindo a regeneração da lipoamida, que é um cofator essencial para a transformação do piruvato à acetil coenzima A (acetil-CoA). Com isso, ocorre a diminuição nos níveis de ATP (adenosina trifosfato) afetando diversas funções celulares dependentes do consumo de energia (COLASSO; FRANÇA, 2014; NURCHI et al., 2020).

O As(V) é semelhante química e estruturalmente com o íon fosfato, como pode ser visto na Figura 2, podendo substituir o fosfato em inúmeras reações bioquímicas. Em um dos passos da via glicolítica, o fosfato liga-se enzimaticamente ao D-gliceraldeído-3-fosfato para formar o 1,3-bifosfato-D-glicerato. O arsenato pode substituir o fosfato, assim formando o anidrido-1-arsenato-3-fosfo-D-glicerato que é instável e hidrolisa em arsenato e 3-fosfo-glicerato. Assim, somente na presença do fosfato que o ATP é gerado na glicólise. O arsenato também é um desacoplador da fosforilação oxidativa, pois em sua presença é formado o complexo ADP-arsenato, que é instável e hidrolisa facilmente comparado ao ADP-fosfato (ATP) (HUGHES, 2002).

Figura 2 - Similaridade química e estrutural entre o As(V) e o íon fosfato



Fonte: adaptado (HUGHES, 2002).

Apesar da toxicidade exercida pelas espécies inorgânicas, o metabolismo de alguns organismos aquáticos possui a capacidade de transformar essas espécies mais tóxicas em espécies orgânicas de menor toxicidade. Esse processo é conhecido como biotransformação e pode ocorrer de três modos diferentes: (1) transformação redox entre As(III) e As(V); (2) redução de As(V) à As(III) catalisado pelas enzimas arsenato-redutase e glutathione S-transferase (GST), que atuam como doadores de elétrons; e (3) metilação do As, com a formação dos metabólitos, ácido monometilarsônico (MMA) e ácido dimetilarsônico (DMA), e subsequente conversão para arsenobetaina (KUMARI et al., 2017).

Em estudos conduzidos por Zhang, Huang e Wang (2012) foi discutido a biotransformação das duas espécies inorgânicas de As [As(III) e (V)] em *Terapon jarbua* após exposições por 10 dias, e de acordo com os resultados, ambas as espécies foram biotransformadas para arsenobetaina (89-97%), a espécie considerada menos tóxica.

A entrada de arsênio inorgânico na célula é regulado por dois mecanismos toxicológicos distintos, sendo as aquaporinas e/ou transporte da hexose permease pela entrada de As(III) e o transporte/sistema de fosfato responsável pela entrada do As(V) (SHINKAI et al., 2009; ALLEVATO et al., 2019)

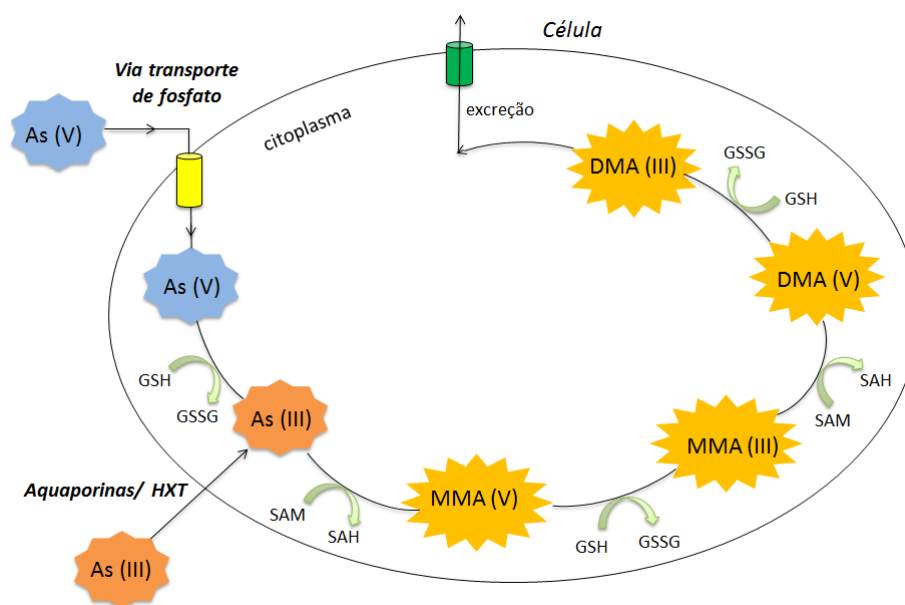
As aquaporinas são uma classe de proteínas de membranas que servem como um canal de transferência de água e solutos para as células, sendo no fígado seu principal local de expressão (SHINKAI et al., 2009). Diversos estudos sugerem que o As(III) é levado para dentro das células através das aquaporinas facilitando sua absorção (VENTURA-LIMA; BOGO; MONSERRAT, 2011; GARBINSKI; ROSEN; CHEN, 2019). O transporte pela via da hexose permease (HXT) é um outro mecanismo encontrado para o arsenito entrar nas células, uma vez que essas proteínas modulam e catalisam a absorção de As(III) pelas células (SUN, 2010; GARBINSKI; ROSEN; CHEN, 2019). Assim, ambas as vias desempenham um papel significativo na captação de arsenito para dentro das células (VENTURA-LIMA; BOGO; MONSERRAT, 2011).

A principal via de desintoxicação de arsênio inorgânico envolve reações enzimáticas de redução e metilação oxidativa, utilizando a glutathione reduzida (GSH) como cofator e S-adenosilmetionina (SAM), como doador de grupo metil (LIAO et al., 2022).

Challenger (1947) foi primeiro a fornecer um esquema quimicamente aceitável para a metilação do arsênio inorgânico. O As(V) por conta de sua similaridade química com o

íon fosfato adentra nas células via sistema de fosfato, e então é reduzido enzimaticamente à As(III) com a oxidação concomitante da glutathione (GSH) em dissulfeto de glutathione (GSSG) por uma reação catalisada pela arsenato redutase. Uma vez formado o As(III), ele pode sofrer processos de metilação por meio da enzima As-metil-transferase (As3MT), que é responsável pelo metabolismo e biotransformação do arsênio inorgânico, o qual é mostrado na Figura 3 (ALLEVATO et al., 2019; SODHI et al., 2019). Essa redução de As(V) à As(III) é um mecanismo de bioativação ou toxificação, uma vez que o metabólito gerado se torna mais tóxico e ativo que o seu precursor, e isso pode ser uma das razões que torna o As(III) mais tóxico que o As(V) (DOPP et al., 2004; DA SILVA; BARRIO; MOREIRA, 2014).

Figura 3 - Vias toxicológicas de entrada do As(III) e (V) nas células e mecanismo de biotransformação



Fonte: adaptado (VENTURA-LIMA; BOGO; MONSERRAT, 2011; SODHI et al., 2019).

O As(III) é biotransformado por metilação oxidativa pela adição do grupo metil do S-adenosilmetionina (SAM) - grupo doador de metil - para formar o MMA(V). O MMA(V) é reduzido enzimaticamente à MMA(III), para em seguida ser adicionado um segundo grupo metil por reação oxidativa para produzir o DMA(V). O DMA(V) é então reduzido

enzimaticamente à DMA(III), no entanto essa etapa não é totalmente clara, uma vez que o DMA(III) é extremamente instável e de difícil detecção. Por fim, a biometilação ocorre para que a arsenobetaina seja formada (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2009; VENTURA-LIMA; BOGO; MONSERRAT, 2011). De acordo com estudos, esse processo de biotransformação ocorre nos fígados e os metabólitos de As são excretados pelos rins (MOLIN et al., 2015).

As reações de redução ocorrem no citosol das células e são mediadas pela glutatona (GSH), que atua como um cofator essencial para a biotransformação e fonte de elétrons para a redução do As (MOLIN et al., 2015). Quando ocorre a redução do As(V) para As(III) pela GSH há a formação de arsenotriglutatona ($\text{As}^{\text{III}}(\text{GS})_3$), um complexo em que o As(III) é ligado as porções tiol dos resíduos cisteínicos de três moléculas de GSH (VENTURA-LIMA; BOGO; MONSERRAT, 2011).

O metabolismo do As implica em uma série de reações de redução e oxidação, na qual as espécies pentavalentes são reduzidas às espécies trivalentes, e a metilação oxidativa ocorre para produzir metabólitos tri- e pentavalentes metilados. No entanto, mais do que um mecanismo de desintoxicação, foi proposto que a metilação pode ativar o potencial tóxico e carcinogênico do As, uma vez que os intermediários e produtos formados nessa via podem ser mais reativos e tóxicos que os inorgânicos, podendo afetar a transcrição de genes e são potentes inibidores enzimáticos e citotóxicos mais que as espécies não metiladas (MARTINEZ et al., 2011; ROY; MURPHY; COSTA, 2020). As formas dimetiladas (DMA) são os produtos finais do processo, e a maior presença dessas formas indica um progresso adequado do processo metabólico. Ao contrário, o acúmulo de espécies monometiladas (MMA) e metabólitos intermediários de As inorgânico indicam uma menor taxa no metabolismo, afetando a distribuição e excreção de As (RAHMAN et al., 2019).

2.3. Especiação química de As

O desenvolvimento de métodos analíticos para a análise elementar em pescados tem ganhado grande importância, uma vez que 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. Assim, técnicas

espectrométricas tem ganhado grande destaque para a quantificação de elementos tóxicos e essenciais (RATHER et al., 2017).

A espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) é uma técnica multi-elementar e com ampla faixa linear, apresenta alta sensibilidade, o que possibilita a determinação de elementos presentes em níveis traço e também a possibilidade de análise isotópica (MEERMANN; NISCHWITZ, 2018). No entanto, é uma técnica voltada para a determinação das concentrações totais dos analitos e a análise total de um elemento químico em uma amostra nem sempre é suficiente para fornecer informações sobre toxicidade, biodisponibilidade, função bioquímica e mobilidade de elementos inorgânicos, pois a determinação total não traz dados a respeito das diferentes formas químicas de um elemento (MATOS, 2011).

Como apresentado, o As pode existir tanto na forma orgânica como inorgânica, com diferentes níveis de toxicidade. Assim métodos analíticos que envolvam a separação e quantificação das diferentes espécies, como a especiação química são fundamentais para o conhecimento e entendimento deste processo de biotransformação de As em peixes e é refletida pelo número crescente de publicações a esse respeito. O progresso alcançado pelo desenvolvimento de técnicas de separação e quantificação permite a detecção das diferentes espécies químicas em baixas concentrações.

A especiação química pode ser considerada como a determinação da concentração das várias formas químicas de um elemento em uma matriz, e estas espécies, juntas, constituem a concentração total do elemento em uma amostra (TEMPLETON et al., 2000). Estudos de especiação química de As em peixes são menos conhecidos quando comparados com estudos de especiação de água do mar, no entanto no contexto de segurança alimentar, a determinação das espécies de arsênio em alimentos, principalmente as formas inorgânicas (As(III) e (V)) e orgânicas (MMA e DMA) são essenciais (KOMOROWICZ; SAJNÓG; BARAŁKIEWICZ, 2019). O desenvolvimento de técnicas analíticas para a determinação seletiva das espécies de As em pescados é de extrema importância para avaliar os efeitos e para a introdução de regulamentos associados com o consumo de peixes (REIS; DUARTE, 2018).

Os métodos disponíveis para a especiação química combinam técnicas de separação e de detecção, e de acordos com os trabalhos mais recentes, o método analítico mais utilizado para a especiação de As em pescados é a técnica de cromatografia líquida de

alta eficiência (HPLC) acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). O acoplamento HPLC-ICP-MS é uma estratégia que alia um método de separação com alta seletividade e uma técnica de detecção extremamente sensível (AZIZUR RAHMAN; HASEGAWA; PETER LIM, 2012; KALANTZI et al., 2017; NOGUEIRA et al., 2018; KOMOROWICZ; SAJNÓG; BARAŁKIEWICZ, 2019).

Geralmente, os estudos de especiação química envolvem três etapas: a extração, a separação e a detecção dos analitos. A combinação de técnicas analíticas deve ser utilizada para obtenção de boa sensibilidade e seletividade, e a concentração e as proporções das espécies presentes na amostra devem manter-se inalteradas durante as etapas de preparo da amostra e extração, sendo de extrema importância desenvolver e otimizar todo o procedimento analítico (ÖZCAN; BAKIRDERE; ATAMAN, 2016).

A etapa mais crucial na análise de especiação é a extração, sendo necessário atingir uma boa eficiência, pois lidamos com análise de traços e o equilíbrio das espécies deve ser mantido, assim cuidados devem ser tomados para que não ocorra a interconversão das espécies químicas. Assim, uma extração branda deve ser realizada, com a aplicação de reagentes menos agressivos, processos com temperaturas mais baixas e de menor tempo, empregando uma fonte de energia como o ultrassom, radiação micro-ondas ou aquecimento convencional. Dessa forma, para que o método seja considerado ideal, além da extração total das espécies químicas sem a interconversão das espécies, os meios extratores utilizados não podem interferir na etapa posterior de identificação e/ou quantificação das espécies químicas. Sendo assim, o solvente extrator, a fonte de energia, temperatura e tempo são alguns dos parâmetros que devem ser considerados na etapa de extração, a fim de manter a estabilidade das espécies químicas (KOMOROWICZ; SAJNÓG; BARAŁKIEWICZ, 2019).

A eficiência da extração depende de vários parâmetros, como por exemplo, a matriz da amostra, o tipo de solvente utilizado, as espécies químicas a serem extraídas, o tempo de extração e a temperatura. Em geral, não há procedimento universal para extração das espécies químicas na análise de especiação, assim é necessário investigar e otimizar as condições de extração para cada tipo de amostra (SANTOS et al., 2013).

A maioria das espécies de As presentes nos tecidos biológicos é solúvel em meio aquoso e pode ser extraída apenas com água ou com uma solução de água e metanol em diferentes proporções (1:1, 1:2 e 1:3). A mistura água e metanol é frequentemente

empregada para extração das espécies de As, devido ao metanol garantir a integridade das espécies durante o procedimento de extração, além de ser um solvente facilmente removido através de evaporação. Ácidos diluídos também têm sido utilizados para melhorar a eficiência da extração, assim como o uso de enzimas biológicas. Os métodos mais comuns de extração são a extração de Soxlet, extração por agitação mecânica, por ultrassom ou assistida por radiação micro-ondas (SANTOS et al., 2013; KOMOROWICZ; SAJNÓG; BARAŁKIEWICZ, 2019).

Para a determinação das espécies de arsênio presentes em peixes, Ciardullo et al. (2010) realizaram a extração dos compostos solúveis em água utilizando a mistura de água e metanol, na proporção 1:1 (v/v) sob agitação mecânica. Método similar de preparo de amostra também foi utilizado por Gao et al. (2018) que empregou solução de água e metanol na proporção 1:1 (v/v), sendo avaliado a extração assistida por radiação micro-ondas e por ultrassom. Kalantzi et al. (2017) extraíram as espécies de As com solução tampão de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 10 mmol L⁻¹ em pH 7,9, onde a amostra foi agitada em temperatura ambiente em vórtex por 1 minuto e colocada no banho ultrassônico a 40 °C por 50 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 3700 rpm e o sobrenadante foi filtrado e analisado por HPLC-ICP-MS. Juncos et al. (2019) utilizaram uma solução de ácido nítrico 1% (v/v) e de peróxido de hidrogênio 1% (v/v) como meio extrator. A amostra foi colocada em contato com a solução, agitada em vórtex brevemente, mantida em repouso à temperatura ambiente durante a noite (“*overnight*”) e posteriormente as espécies de As foram extraídas em banho ultrassônico a 55 °C por 2 horas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas à 4500 rpm por 20 minutos e o sobrenadante filtrado e diluído em água ultrapura para análise em HPLC-ICP-MS.

Jia et al. (2018) realizaram um estudo comparativo entre métodos de extração assistido por radiação micro-ondas e ultrassom para extrair as espécies de As utilizando diferentes extratores (água, mistura de água e metanol e ácido nítrico diluído) e como resultado, o método de extração assistido por radiação micro-ondas apresentou maior eficiência de extração quando comparado com o ultrassom, principalmente empregando solução de HNO₃ diluído como meio extrator.

O uso de soluções ácidas diluídas para a extração de espécies de As foi relatado em trabalhos anteriores que mencionam boa eficiência de extração sem comprometer a estabilidade das espécies. Goessler e Pavkov (2003) conduziram um estudo sobre a estabilidade química de espécies de As quando expostas ao ácido nítrico, altas

temperaturas e diferentes pressões, e de acordo com os estudos, o ácido dimetilarsínico (DMA), o óxido de trimetilarsina (TMAO) e o íon tetrametilarsônico (TETRA) foram todos estáveis a 200 °C; o ácido metilarsônico (MA) começou a se degradar em arsenato (As(V)) em torno de 140 °C; a arsenobetaina (AsB) foi estável em torno de 100 °C; enquanto a arsenocolina (AsC) começou a se degradar em TMAO e TETRA em temperaturas mais baixas, com 60% do AsC não degradado a 100 °C. Assim, ao usar extratores relativamente agressivos, como o ácido nítrico, as principais formas de As, com exceção do As(III), que seria esperado que oxidasse para As(V), não iram transformar-se durante as extrações usando condições ácidas e temperaturas relativamente baixas (<100 °C). Foster et al. (2007) realizaram extração quantitativa de As em tecidos vegetais e animais marinhos utilizando diferentes métodos (água, ácido ortofosfórico, metanol-água e ácido nítrico diluído), e as melhores recuperações foram usando HNO₃ 2% (v/v) em forno de micro-ondas a 95 °C por 6 minutos. Schmidt et al. (2018) propuseram um método simples usando solução de HNO₃ 0,03 mol L⁻¹ a uma temperatura de 100 °C por 30 minutos em um bloco de aquecimento para a extração de espécies de As em amostras de frutos do mar, com recuperação entre 94 e 103% dos CRMs e boa precisão para AsB, As(III), DMA, MMA e As(V).

Uma vez otimizado o método de extração, é importante a análise de materiais de referência certificado (CRMs) para garantia da exatidão e da precisão dos resultados. No entanto, a maior dificuldade em estabelecer um método analítico de especiação química está relacionada à falta de CRMs para as diferentes espécies químicas de um elemento (CERVEIRA, 2015).

A separação e identificação das espécies de arsênio em peixes podem ser realizadas por meio do acoplamento das técnicas HPLC-ICP-MS. A otimização de parâmetros cromatográficos, como por exemplo, reagente de pareamento iônico e fase estacionária, concentração e vazão da fase móvel e pH, devem ser realizados. O pH exerce enorme influência sobre a separação das espécies, pois em determinado pH, a espécie pode estar na forma de cátion, ânion, zwitterion ou na forma não carregada, afetando o tempo de retenção dos analitos (ÖZCAN; BAKIRDERE; ATAMAN, 2016).

2.4. Interação entre arsênio e selênio

O selênio (Se) é um metaloide que pertence ao grupo 16 (família do oxigênio) da tabela periódica e ocorre naturalmente em diferentes estados de oxidação +6, +4, 0 e -2 formando selenato (SeO_4^{2-}), selenito (SeO_3^{2-}), selênio elementar (Se^0) e seleneto (Se^{2-}), respectivamente. Além disso, pode-se encontrar na forma orgânica, como compostos selenometilados, selenoaminoácidos e selenoproteínas (GUPTA; GUPTA, 2017).

Diferentemente do arsênio, o selênio é um elemento que apresenta grande importância fisiológica e ecotoxicológica, pois é um micronutriente essencial para a maioria dos organismos e oferece proteção contra a toxicidade de diferentes metais, no entanto pode se tornar tóxico em elevadas concentrações (BODNAR; KONIECZKA; NAMIESNIK, 2012). O Se participa e regula várias funções biológicas e bioquímicas, como por exemplo, proteção das membranas contra danos oxidativos e está presente no sítio ativo de selenoproteínas que possuem função antioxidante, como as GPx (TOPPO et al., 2009).

Os alimentos, principal fonte de Se, apresentam concentração variável e de acordo com estudos, qualquer modificação significativa na quantidade de selênio presente na dieta, resulta na diminuição da atividade da GPx e tem consequências importantes quanto à suscetibilidade dos tecidos e estresse oxidativo (MONTEIRO; RANTIN; KALININ, 2009). Em estudos conduzidos por Toufektsian et al. (2000) em ratos indicou que o nível de suplementação de selênio deve ser selecionado cuidadosamente para que forneça efeitos benéficos e não cause consequências negativas, pois à medida que as concentrações de Se na dieta e nos tecidos aumentaram, ocorreu aumento das atividades plasmáticas e hepáticas da GPx. Dessa forma, o Se possui um papel protetor dependendo da dose e do biomarcador considerado (ATENCIO et al., 2009).

A literatura aponta que o selênio apresenta efeito protetor sobre diversos contaminantes em meio aquático. Atencio et al. (2009) investigaram o papel da suplementação de Se(IV) na toxicidade induzida por células de cianobactérias contendo microcistinas em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), e os resultados mostraram que o Se apresentou um efeito protetor, pois as alterações teciduais induzidas pelas células cianobacterianas no fígado, rim, coração e trato gastrointestinal foram melhoradas pela dose mais alta de Se testada. Cabezas-Sanchez et al. (2019) avaliaram o efeito protetor da co-administração do Se(IV) contra a bioacumulação e toxicidade do metil-mercúrio (MeHg) em peixe zebra (*Danio rerio*), e observaram uma diminuição significativa no

fator de bioacumulação e estresse oxidativo do MeHg e a ativação de diferentes mecanismos de defesa induzidos pela co-administração do Se(IV).

Estudos envolvendo a exposição simultânea de arsênio e selênio, em diferentes espécies animais e vegetais, apontam uma interação antagonista entre eles, uma vez que o selênio possui a capacidade de diminuir os efeitos tóxicos causados pelo As. Essa interação pode ocorrer direta ou indiretamente, dependendo das formas químicas e a dose utilizada de cada um dos elementos (MALIK et al., 2012; MELGAR; NÚÑEZ; GARCÍA, 2019; POKHREL et al., 2020).

A relação antagônica entre Se e As foi relatada a primeira vez em 1939, quando Moxon e DuBois relataram que uma baixa exposição a As(III) reverteu completamente a toxicidade do Se(IV) em fígado de ratos. Posteriormente, verificou-se que o Se(IV) diminuiu significativamente as malformações induzidas por As(III) em ratas grávidas (RAHMAN et al., 2019). Em estudo semelhantes, Chen et al. (2007) relataram que pessoas que apresentavam concentrações sanguíneas de Se abaixo da média estavam mais susceptíveis a lesões cutâneas causada por exposição à As. Dados obtidos em modelos animais confirmam que a deficiência em Se contribui para o acúmulo de As principalmente no fígado (JANASIK et al., 2017).

Diversos mecanismos responsáveis pelas interações entre Se e As são sugeridos, no entanto um dos mais aceitos é a pela formação do complexo arsênio-glutationa (íons seleno-bis-(S-glutationil)-arsínio). O Se(IV) é rapidamente absorvido e convertido em seleneto de hidrogênio (HSe^-), enquanto na presença de As(III) e GSH reduzido, o íon seleno-bis(S-glutationil) arsínio ($[(\text{GS})_2\text{AsSe}]^-$) é formado. Estudos identificaram esse complexo na bile de animais de laboratório co-tratados com As(III) e Se(IV), conforme confirmado por espectroscopia de raios X, fornecendo uma base molecular para a interação antagônica entre essas duas espécies (GAILER et al., 2000; GAILER, 2009; GEORGE et al., 2016).

Existem inúmeros trabalhos que reportam a interação entre Se e As, no entanto a grande maioria se diz respeito as interações que ocorrem em humanos ou em animais, especialmente em ratos e coelhos. No estudo de Adedara et al. (2020), ratos foram expostos a As(III) e concomitantemente foi administrado selênio inorgânico e orgânico, e os resultados mostraram que o Se reduziu a neurotoxicidade do As, assim como inibiu a

lesão oxidativa no cerebelo, cérebro e fígado dos ratos, indicando o efeito antagônico do selênio na acumulação de As.

Como citado anteriormente, o selênio é um elemento essencial para todos os organismos vivos, e apresenta uma faixa muito estreita entre sua essencialidade e toxicidade. No entanto, os efeitos da suplementação de selênio em peixes são bem conhecidos, uma vez que os peixes que recebem selênio pela dieta apresentam melhores perfis nutricionais e maior capacidade em suportar o estresse (KOUBA et al., 2014).

A maioria dos estudos utiliza a suplementação de Se para investigar o efeito protetor desse elemento quando peixes são expostos a contaminantes, no entanto Hauser-Davis et al. (2016) investigaram os efeitos da exposição aguda ao selênio nos biomarcadores do estresse oxidativo em peixe-zebra (*Danio rerio*). Os peixes foram expostos ao selenito (Se(IV)) a uma concentração de 1 mg L^{-1} , e de acordo com os resultados essa concentração não causou a mortalidade dos peixes, no entanto alterou enzimas antioxidantes, indicando que o selênio causou uma ruptura na homeostase do organismo dos peixes. Ranzani-Paiva et al. (2011) avaliaram as concentrações letais medianas $\text{LC}_{50-96\text{h}}$ das formas inorgânicas de Se (selenito (Se(IV)) e selenato (Se(VI))) em alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e como resultado obtiveram o valor de $\text{LC}_{50-96\text{h}}$ para o selenito de $4,42 \text{ mg L}^{-1}$ e $14,67 \text{ mg L}^{-1}$ para o selenato, indicando que a toxicidade do selenito foi maior quando comparado ao selenato. Gobi et al. (2018) estudaram o mecanismo de toxicidade do selênio (Se(IV)) e avaliaram o impacto de diversas concentrações (5, 10, 25, 50 e $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) na acumulação nas brânquias, fígado e cérebro de *Oreochromis mossambicus* em um período de 96 horas. Também foi relatado os efeitos nas enzimas antioxidantes e na peroxidação lipídica e proteica, e os resultados mostraram um aumento significativo nas atividades enzimáticas após 96 horas de exposição nas concentrações mais altas de Se(IV) no tecido hepático e branquial.

Estudos conduzidos por Hopper e Parker (1999) relataram que o selenito (Se(IV)) é rapidamente convertido em formas orgânicas de Se, as quais são incorporadas em proteínas em substituição ao enxofre, uma vez que por conta de suas características químicas semelhantes competem pelos mesmos sítios de absorção. Assim, a toxicidade do selenito é maior quando comparado ao selenato. Dessa forma, percebe-se que é de fundamental importância realizar estudos ecotoxicológicos com o Se, especialmente com a espécie mais tóxica (Se(IV)), tanto estudos independentes de toxicidade aguda e concomitantemente com contaminantes, como o As, mostrando assim a relevância do

nosso trabalho em avaliar o efeito protetor do Se na toxicidade do arsênio (As(III) e (V)) em tilápias do Nilo em condições pré-definidas.

2.5. Biomarcadores de contaminação aquática e estresse oxidativo

O monitoramento ambiental tem como objetivo identificar e avaliar condições dos recursos ambientais de um determinado local, permitindo a adoção de medidas preventivas e/ou precautivas adequadas. No entanto, não se devem utilizar somente parâmetros químicos e físicos para determinar a qualidade das águas, e consequentemente o grau de contaminação aquática, pois esses métodos isolados não fornecem informações a respeito de alterações que os contaminantes causam nos organismos vivos que habitam esse sistema, propiciando informações parciais sobre a qualidade das águas. Assim, ferramentas biológicas devem ser incluídas a fim de fornecer respostas quanto aos efeitos que esses contaminantes possam vir causar nos diferentes organismos aquáticos (DE ALMEIDA; DE OLIVEIRA RIBEIRO, 2014). Nesse sentido, é crescente o uso de biomarcadores, que podem ser definidos como tais ferramentas, capazes de identificar e quantificar alterações biológicas em nível molecular, celular e fisiológico relacionadas à exposição ou efeitos tóxicos de um contaminante aos organismos e ao ecossistema (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

O efeito de um contaminante se inicia em nível molecular e em seguida progride para os níveis bioquímicos, subcelular, celular, de tecido, órgão, indivíduo e por fim de população. Assim, a compreensão dos efeitos tóxicos de um contaminante em nível molecular ou bioquímico fornecem sinais antecipados de alerta, em oposição aos efeitos adversos de nível mais alto que podem ocorrer posteriormente nessa cadeia de progressão (LEE et al., 2015). Existem diferentes tipos de biomarcadores, entre eles, os bioquímicos, que são ferramentas que fornecem informações à respeito de alterações nos sistemas enzimáticos do metabolismo de detoxificação de contaminantes nos organismos dos seres aquáticos (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Os organismos aquáticos apresentam alta capacidade em acumular As em diferentes tecidos do corpo, mostrando a necessidade do estudo da capacidade de acumulação nestes diferentes órgãos (LIAO et al., 2003; TAWHEEL; SHUHAIMI-OTHMAN; AHMAD, 2013; SCHENONE; VACKOVA; FERNANDEZ CIRELLI, 2014; OLIVEIRA et al.,

2017; FERREIRA et al., 2019; NAWROCKA et al., 2022). Os principais tecidos escolhidos para o estudo de biomarcadores são as brânquias, o fígado e o músculo. As brânquias constituem a interface tecido/meio aquático, permanecendo em contato direto com água, o que resulta em uma maior sensibilidade à presença de contaminantes no corpo aquático (BERVOETS; BLUST, 2003). O fígado por conta de suas características fisiológicas e anatômicas, como o grande volume de sangue recebido, sua composição lipídica e a intensa atividade metabólica é um dos órgãos que mais acumulam contaminantes (SQUADRONE et al., 2013). Já o músculo possui uma relação direta com a população humana, pois devido à sua composição nutricional é amplamente consumido pelos seres humanos (PEIXE BR, 2023).

Os organismos possuem sistemas capazes de detoxificar substâncias exógenas, eliminando esses contaminantes por excreção através de reações catalisadas por enzimas capazes de biotransformar esses contaminantes em compostos mais solúveis e menos tóxicos (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). A atividade dessas enzimas que realizam a biotransformação do contaminante aliada ao consumo de oxigênio para a produção de energia pela mitocôndria e aumento das reações de oxirredução que ocorrem nas células, geram espécies reativas de oxigênio (ERO) (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). As principais ERO são o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o radical hidroxila ($HO^{\cdot}$), que podem possuir um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital mais externo e possuem a característica de serem altamente reativos, podendo atacar e provocar danos no DNA, lipídios e proteínas, causando sua oxidação e até a morte celular (VENTURA-LIMA; BOGO; MONSERRAT, 2011).

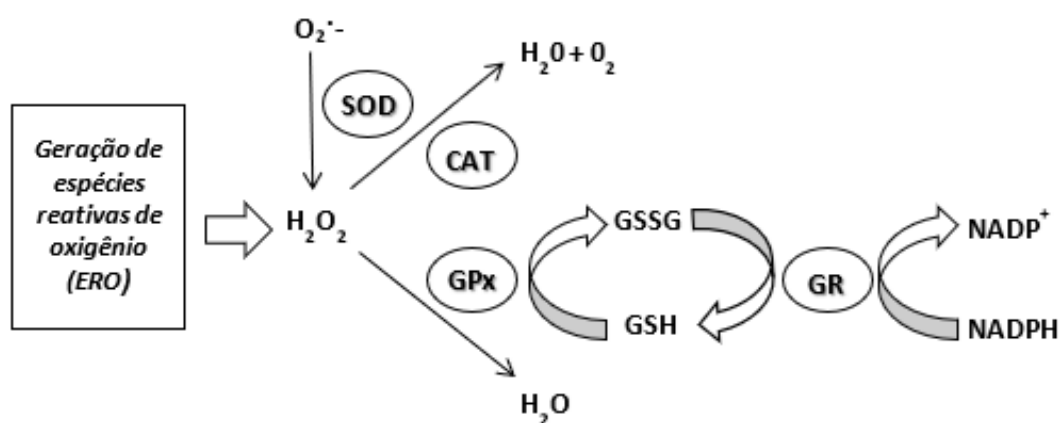
A oxidação de biomoléculas (lipídios, proteínas, carboidratos e DNA) resulta em compostos como aldeídos e cetonas, como por exemplo, o malondialdeído (MDA), que é considerado um bom biomarcador de contaminação aquática e pode ser quantificado e utilizado como um indicativo de estresse oxidativo (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

O sistema antioxidante é um sistema de defesa do organismo com o objetivo de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria das ERO e é formado por enzimas específicas que catalisam as reações, transformando os radicais reativos em moléculas não reativas, sendo um importante mecanismo de detoxificação (VAN DER OOST;

BEYER; VERMEULEN, 2003). O desequilíbrio entre a produção de ERO e a atuação de enzimas antioxidantes produz o chamado estresse oxidativo (JAVED et al., 2016).

As principais enzimas que atuam no sistema de defesa antioxidantes contra as ERO são a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e a glutathiona redutase (GR), que inativam as ERO em intermediários de fácil excreção e constituem os sistemas antioxidantes enzimáticos (Figura 4), os quais desempenham um papel importante na neutralização e/ou desintoxicação do estresse oxidativo causado pelas ERO (BARBOSA et al., 2010).

Figura 4 - Sistemas antioxidantes enzimáticos: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR)

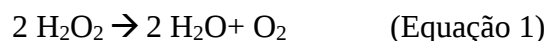


Fonte: adaptado (VILLANUEVA; KROSS, 2012).

De acordo com estudos, o estresse oxidativo é muito sensível a baixos níveis de contaminação, e quando o nível de poluição for alto, ocorrerá genotoxicidade (alterações no DNA) e histopatologia (alterações nas células e tecidos) (JAVED et al., 2016).

Diversos estudos relacionam a exposição a metais com a produção de ERO, levando a danos celulares, peroxidação lipídica e danos ao DNA. Assim, para prevenir estas lesões, a CAT é uma das enzimas que atua como uma defesa primária contra o dano oxidativo, aumentando a tolerância e persistência dos organismos em ambientes poluídos (FREITAS et al., 2012).

A CAT é uma enzima antioxidante que contém hematina, um grupamento que facilita a oxidação do Fe(II) à Fe(III), e está localizada nos peroxissomos das células, promovendo a redução do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água (Equação 1) (KAUSHAL et al., 2018).



Estudos recentes têm demonstrado que a CAT está presente em todos os tecidos, no entanto é observado que a sua atividade é mais elevada nos fígados, como visto no trabalho de Kumar et al. (2019), em que o peixe *Pangasius (Pangasianodon hypophthalmus)* foi exposto à As(III). Cui et al. (2020) obtiveram resultados semelhantes, em que os níveis de CAT foram maiores nos fígados, no entanto as maiores atividades foram nos peixes *Carassius auratus* expostos à As(V) quando comparado as exposições de As(III).

A GPx pertence ao grupo das peroxidases, que são enzimas antioxidantes responsáveis pela redução do peróxido de hidrogênio à água e de peróxidos lipídicos à álcoois, envolvendo a transferência de elétrons por meio da oxidação da glutathiona (GSH) reduzida à sua forma oxidada, a glutathiona dissulfeto (GSSG) (Equação 2) (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).



Dentre as GPx existem as dependentes e não dependentes de selênio. As GPx dependentes de selênio constituem as principais peroxidases em peixes, com papel fundamental na proteção contra os danos oxidativos, especialmente nos danos que podem atingir as membranas biológicas relacionadas à peroxidação lipídica (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

A GSSG pode ser reduzida a GSH pela ação da glutathiona redutase (GR), que utiliza elétrons da molécula nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida (NADPH). Assim, a GR é considerada uma enzima antioxidante secundária, não agindo diretamente sob as ERO, mas atuando no ciclo metabólico da glutathiona (Figura 4) (VILLANUEVA; KROSS, 2012).

Os peixes, assim como todos os animais, possuem um grupo de enzimas de biotransformação, cuja principal função é transformar contaminantes, que geralmente são lipossolúveis em compostos mais hidrossolúveis e de fácil excreção (IBOR et al., 2019). O processo de biotransformação de contaminantes envolve inúmeras reações mediadas enzimaticamente, tornando esses compostos mais passíveis de serem excretados pelo organismo. Geralmente esse processo ocorre no fígado, que é o principal órgão de metabolização, embora todos os tecidos biológicos possuam alguma capacidade de metabolizá-los. Esse processo ocorre em três fases: na fase I ocorre reações de oxidação, redução e hidrólise; na fase II, ocorre reações de conjugação; e na fase III ocorre a excreção (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

A fase I é caracterizada pela exposição ou adição de grupos funcionais, como por exemplo, -OH, -COOH, -NH₂ por reações de oxidação, redução ou hidrólise. Assim, ocorre a transformação do composto original, que é lipofílico em produtos mais solúveis em água, facilitando sua excreção. As reações de fase I são catalisadas pelas enzimas microsomais de monooxigenases, que também são conhecidas como sistema oxidase de função mista (MFO) ou ainda sistema citocromo P450 (CYP450), constituído pelo citocromo P450, o citocromo b5 e o NADPH citocromo P450 redutase. As enzimas CYP compreendem uma família grande de heme-proteínas, que são proteínas ligadas à membrana e estão localizadas predominantemente no retículo endoplasmático das células do fígado. O citocromo P450 abrange uma família com inúmeras enzimas, que apresentam diversas isoformas. Dentre elas, podemos citar a subfamília P450 1A (CYP1A) e a subfamília P450 3A (CYP3A), que são biomarcadores muito utilizados em estudos ambientais (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

A fase II envolve reações de conjugação do composto ou seus metabólitos com um ligante endógeno, geralmente um grupo polar, como por exemplo, o ácido glucurônico ou a glutathione (GSH). O conjugado formado é altamente solúvel em água, e assim pode ser facilmente excretado. Dentre as enzimas mais importantes neste processo, está a glutathione S-transferase (GST), estando entre as mais abundantes classes de enzimas do fígado (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Por fim, na fase III o substrato mais solúvel em água, formado durante as fases I e II é excretado para fora das células pelas proteínas transportadoras de membrana.

A enzima GST desempenha um papel importante na detoxificação e eliminação de contaminantes, na proteção da célula contra danos oxidativos, além de catalisar a

conjugação do contaminante, seja ele modificado ou não pela fase I, com a GSH (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Resumindo, tanto as enzimas de defesa antioxidantes como as enzimas de biotransformação são empregadas como biomarcadores de contaminação aquática, e análises e medições dessas diferentes enzimas e consequentemente suas alterações servem como parâmetros de efeitos adversos na saúde dos seres aquáticos expostos a diversos contaminantes, como no caso a exposição à As(III) e (V). Assim, é de extrema importância a determinação de todas as possíveis espécies de arsênio nos diferentes tecidos para avaliação criteriosa de suas participações nas diferentes etapas metabólicas de defesa antioxidante e de biotransformação.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Este trabalho teve como objetivo principal desenvolver ensaios toxicológicos com As(III) e (V) em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em condições controladas a fim de avaliar a bioacumulação e biotransformação do As inorgânico para espécies metiladas em diferentes tecidos biológicos (fígado, estômago, brânquias e músculo) por meio da técnica de cromatografia líquida hifenada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (LC-ICP-MS). Também foram investigados os efeitos antagônicos que o selênio tetravalente (Se(IV)) pode causar sobre a toxicidade do As inorgânico nas tilápias do Nilo durante o processo de bioacumulação, a fim de verificar interações e novos parâmetros toxicocinéticos. Por fim, avaliou-se os parâmetros de estresse oxidativo nos tecidos estudados, com análise de enzimas envolvidas nos mecanismos de defesa antioxidante, biotransformação e desintoxicação do As.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Objetivos específicos da Seção 4

- Realização de ensaios de bioacumulação/biotransformação sob condições laboratoriais controladas com tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas ao As(III) e (V), separadamente;
- Determinação do As total nos tecidos de interesse (fígado, estômago, brânquias e músculo) por ICP-MS;
- Avaliação da distribuição das espécies de arsênio (As(III), As(V), MMA, DMA e AsB) nos tecidos de interesse (fígado, estômago, brânquias e músculo) por LC-ICP-MS.

3.2.2. Objetivos específicos da Seção 5

- Realização do ensaio de toxicidade aguda sob condições laboratoriais controladas com tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas em diferentes concentrações de Se(IV);
- Realização de ensaios toxicológicos com As e Se concomitantemente para a avaliação dos efeitos antagônicos do Se(IV) sobre a toxicidade do As inorgânico nas tilápias do Nilo;
- Desenvolvimento e otimização do método para a determinação do Se por ICP-MS.

3.2.3. Objetivos específicos da Seção 6

- Avaliação dos efeitos da exposição à As(III) e (V) nas respostas de parâmetros de estresse oxidativo por meio da atividade de enzimas antioxidantes (CAT, GPx e GR) e da enzima de biotransformação GST, bem como os níveis de biomoléculas oxidadas pela quantificação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

4. BIOACUMULAÇÃO E BIOTRANSFORMAÇÃO DE ARSÊNIO INORGÂNICO EM DIFERENTES TECIDOS DE TILÁPIA DO NILO

Nesta seção é apresentado o estudo de bioacumulação de As inorgânico nos diferentes tecidos de tilápia do Nilo, assim como a avaliação da distribuição das principais espécies de arsênio (As(III), As(V), MMA, DMA e AsB) após exposições controladas a As(III) e As(V) em diferentes concentrações durante os períodos de 1 e 7 dias. A partir desses estudos foi publicado o seguinte trabalho:

FERREIRA, N. DOS S. et al. Arsenic bioaccumulation and biotransformation in different tissues of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): A comparative study between As(III) and As(V) exposure and evaluation of antagonistic effects of selenium. *Chemosphere*, v. 359, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.142289>

4.1. Materiais e métodos

4.1.1. Organismo-teste

Os organismos utilizados neste trabalho foram peixes da espécie *Oreochromis niloticus*, popularmente conhecidos como tilápia do Nilo, com 15 a 20 cm de comprimento (Figura 5). A escolha por indivíduos juvenis foi em decorrência da maior quantidade de tecido (fígado, estômago, brânquias e músculo) para a realização dos diversos estudos e otimizações experimentais. Os ensaios foram realizados após a aprovação do projeto “*Biotransformação do arsênio inorgânico (As-i) em Tilápias do Nilo (Oreochromis niloticus)*” pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da UNESP (Protocolo CEUA nº. 204/2019).

Figura 5 - Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)



Fonte: autoria própria.

As tilápias do Nilo utilizadas nos ensaios toxicológicos foram adquiridas com o responsável pelos tanques de piscicultura da UNESP, Câmpus de São José do Rio Preto (Figura 6), e estavam livres de lesões, deformidades ou doenças, em conformidade com estudos de Ohki et al. (2002), que relata que os indivíduos utilizados em bioensaios devem estar saudáveis.

Figura 6 - Tanque de piscicultura da UNESP, São José do Rio Preto



Fonte: autoria própria.

Os peixes foram selecionados aleatoriamente e aclimatados por 14 dias antes dos ensaios toxicológicos em tanques de 500 litros (aproximadamente 50 tilápias por tanque) com aeração constante, temperatura controlada (27 ± 2 °C), fotoperíodo de 12:12 horas e conectados a filtros externos (Figura 7). Os animais foram alimentados diariamente até a saciedade com ração comercial (Guabi-Pirá, Brasil).

Figura 7 - Tanques de aclimação



Fonte: autoria própria.

Após o período de aclimação, os peixes foram alocados individualmente em aquários retangulares de plástico de 10 L com seus parâmetros físico-químicos controlados, visando a não mortalidade da população de peixes em estudo.

4.1.2. Delineamento experimental

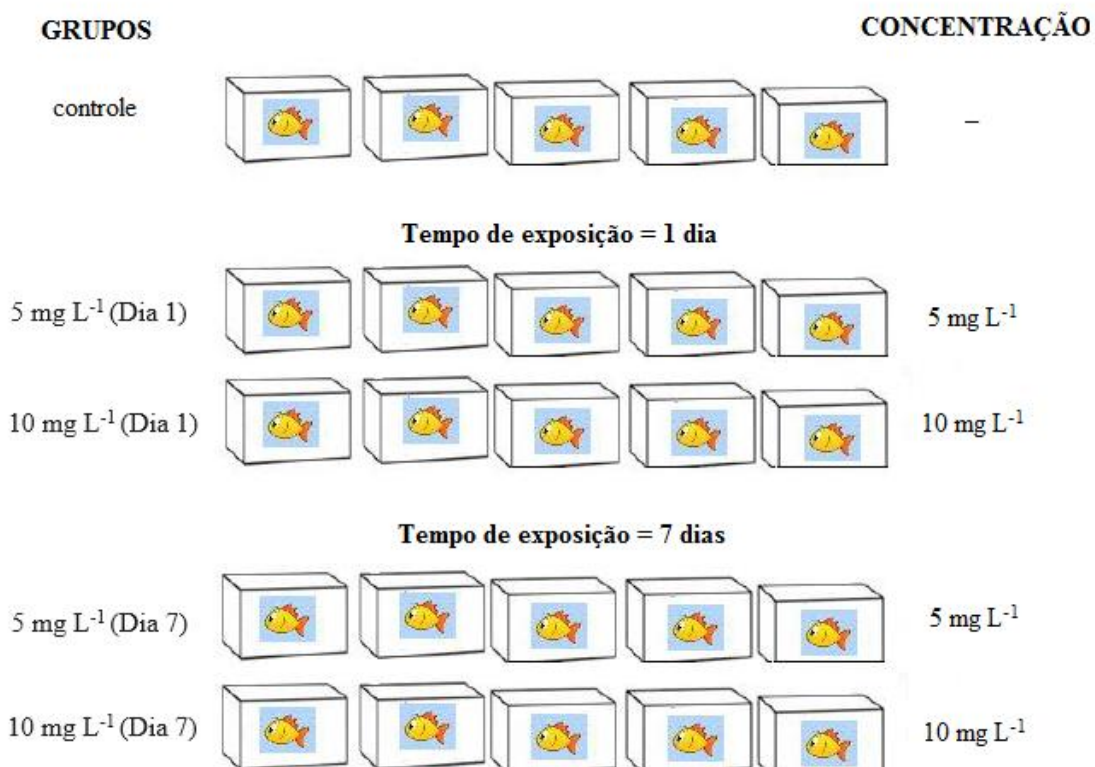
Os ensaios toxicológicos foram desenvolvidos de acordo com as metodologias propostas por Liao et al. (2003), Tsai and Liao (2006), Chen et al. (2018) e Ferreira et al. (2019), além de seguir a diretriz de teste nº 203 publicada pela Organization for Economic Co-operation and Development (OECD, 1992).

O ensaio toxicológico para avaliar a bioacumulação e biotransformação do As foi realizado durante 1 e 7 dias em duas concentrações distintas (5 e 10 mg L⁻¹), a fim de verificar a toxicidade aguda. As tilápias foram divididas em cinco grupos e cada grupo era composto por 5 peixes (n=5) expostos individualmente ao tratamento em aquários plásticos de 10 L.

Foram preparadas soluções de As(III) e (V) dissolvendo uma quantidade calculada dos sais de arsenito de sódio (AsNaO₂) e arseniato de sódio heptahidratado (HAsNa₂O₄.7H₂O), respectivamente, em água deionizada, que em seguida, foram diluídas em água de torneira, a fim de obter as concentrações nominais de 5 e 10 mg L⁻¹ utilizadas nos ensaios. Pequenas alíquotas foram coletadas ao início do ensaio para posterior análise em ICP-MS para verificar se as concentrações de As estavam de acordo com os valores nominais.

O grupo controle não foi exposto à As, enquanto os grupos 5 mg L⁻¹ (Dia 1) e 10 mg L⁻¹ (Dia 1) foram expostos a uma concentração de 5 e 10 mg L⁻¹, respectivamente durante um período de exposição de um dia. Já os grupos 5 mg L⁻¹ (Dia 7) e 10 mg L⁻¹ (Dia 7), também foram expostos as mesmas concentrações de 5 e 10 mg L⁻¹, respectivamente, no entanto por um período de exposição de sete dias. Os ensaios toxicológicos de bioacumulação e biotransformação com As(III) e (V) são esquematizados na Figura 8 e foram realizados separadamente, inicialmente com o As(III) e em seguida com o As(V), e de maneira estática, ou seja, sem renovação da solução de teste durante o período de exposição.

Figura 8 - Esquema do ensaio toxicológico com As(III) e (V) para avaliar a bioacumulação e biotransformação



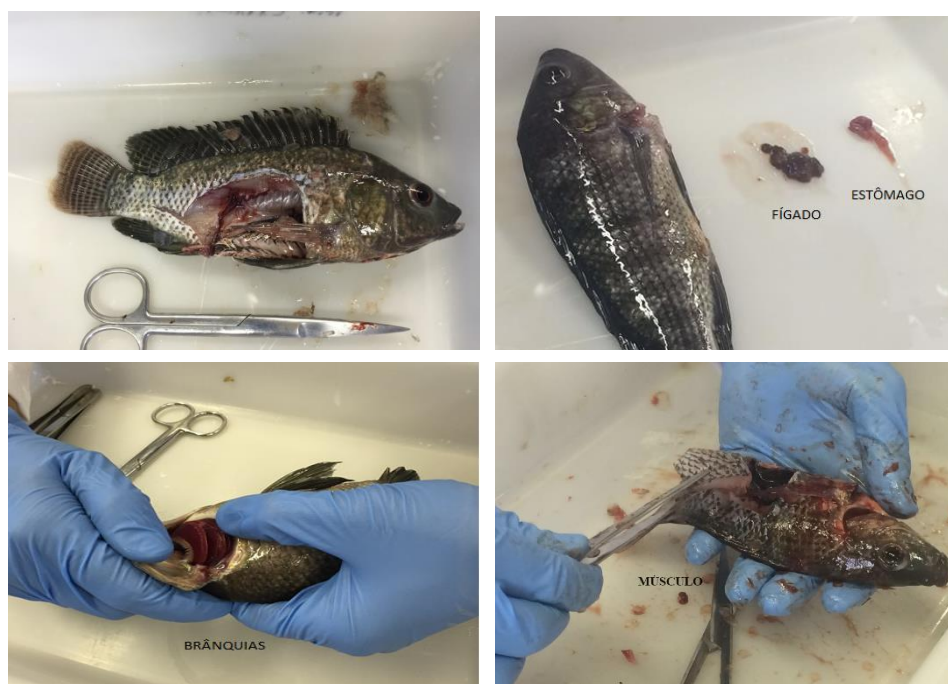
Fonte: autoria própria.

As concentrações de As foram 20–50 vezes maiores do que aquelas encontradas naturalmente, a fim de causar altos níveis de As nos tecidos estudados. A concentração de 5 e 10 mg L⁻¹ foram escolhidas por serem um valor considerado abaixo da dose letal (LC₅₀) que leva a mortalidade de 50% da população para o As(III) de acordo com estudos anteriores do grupo (FERREIRA et al., 2019). Os valores de LC₅₀ indicaram mortalidade de peixes em concentrações acima de 30 mg L⁻¹. O mesmo valor de concentração foi adotado para o ensaio com o As(V), pois o intuito do estudo foi verificar a acumulação e a biotransformação das espécies de As, minimizando a quantidade de reagentes empregados e a redução dos resíduos químicos gerados.

No final de cada dia de experimento, os indivíduos de cada grupo foram coletados e anestesiados em uma solução de benzocaína a 28 mg L⁻¹, e assim induzidos à morte por overdose. Em seguida, com auxílio de tesoura e pinça cirúrgica, os tecidos de interesse

(fígado, estômago, brânquias e músculo) foram coletados (Figura 9) e congelados à - 80°C para análises posteriores em ICP-MS.

Figura 9 - Coleta dos tecidos de interesse: fígado, estômago, brânquias e músculo



Fonte: autoria própria.

4.1.3. Preparo das amostras

Os tecidos de interesse após serem congelados, foram liofilizados para seguir a etapa de moagem. Foi realizado a moagem criogênica (MA 775, Marconi) e os tecidos foram digeridos com ácido nítrico diluído em forno micro-ondas (MW-AD), segundo a metodologia proposta por Oliveira et al. (2017).

Vale ressaltar que foi necessário realizar um pool de amostra com os tecidos dos indivíduos de cada grupo do experimento (n=5) para obtenção de massa seca suficiente para empregar nas etapas de preparo de amostra e determinação de As total por ICP-MS,

e posteriormente para os procedimentos de extração das espécies de As para o método de especiação química.

Na digestão ácida assistida por radiação micro-ondas, as amostras foram pesadas e digeridas em frascos fechados com 6 mL de solução de ácido nítrico 7 mol L⁻¹ subdestilado e 2 mL de peróxido de hidrogênio (30% v/v). O programa utilizado para a digestão ácida assistida por radiação micro-ondas foi uma rampa de aquecimento durante 20 minutos até a temperatura de 190 °C, a qual foi mantida por mais 40 minutos e em seguida, uma etapa de resfriamento por 10 minutos. Após a digestão, as amostras e os brancos foram transferidos para balões volumétricos, e tiveram seus volumes ajustados quantitativamente para 25 mL com água deionizada.

4.1.4. Determinação de As total por ICP-MS

As determinações de arsênio total foram realizadas empregando um espectrômetro de massa acoplado ao plasma induzido (ICP-MS) NexION 300 ICP-MS (PerkinElmer), instrumento disponível no câmpus de São José do Rio Preto, equipado com a tecnologia da célula universal (Universal Cell Technology™ - UCT). O modelo NexION 300 é equipado com a ferramenta de cela de colisão a base de gás hélio que reduz o sinal de interferência poliatômica de arsênio Ar⁴⁰Cl³⁵ através da discriminação por energia cinética (KED).

Os parâmetros operacionais e instrumentais do equipamento utilizado durante as análises foram otimizados de acordo com a otimização proposta por Oliveira et al. (2017), e são descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - 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
Isótopo monitorado	⁷⁵ As

A curva de calibração para a determinação de As foi preparada em HNO₃ 1% (v/v) a partir de uma solução estoque de arsênio 1000 ± 2 mg L⁻¹ (Fluka® Analytical traceCERT® CRMs for ICP-MS). Para a avaliação da exatidão do método de As total por ICP-MS, dois materiais de referência certificado (CRMs) foram utilizados: DOLT-5 (fígado de cação) e DORM-4 (proteína de peixe).

4.1.5. Extração das espécies de As

O procedimento de extração das espécies de As foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Sá et al. (2023). Foram pesados 100 mg de amostra diretamente no frasco de digestão PFA com boca rosqueável e tampa de PFA. Em seguida, foram adicionados 5 mL de HNO₃ 0,03 mol L⁻¹. As amostras foram agitadas em vórtex por 30 segundos e levadas ao aquecimento em bloco digestor por 40 minutos em temperatura de 90°C. Após o resfriamento, o extrato foi centrifugado a 3200 rpm por 5 min e 1 mL do sobrenadante foi transferido a outro frasco e diluído 5 vezes com a fase móvel (10 mM

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ + 1% (v v⁻¹) metanol, pH 8,0). Por fim, filtrado com filtro de seringa 0,22 µm de PTFE (Analítica) e transferido ao amostrador do LC-ICP-MS para análise de especiação de As.

4.1.6. Especiação de As por LC-ICP-MS

As análises de especiação de As foram realizadas em um sistema de cromatografia líquida (1260 series Infinity II, Agilent Technologies), com bomba quaternária (G7111A, Agilent Technologies) e um auto amostrador (G129A, Agilent Technologies) com 100 posições para frascos de 2 mL. Foram utilizadas colunas de troca aniônica para a separação das espécies de arsênio (G3288-80000, 4,6 mm x 150 mm, Agilent Technologies). A eluição foi realizada em modo isocrático e o fluxo da fase móvel foi mantida em 1,0 mL min⁻¹. O sistema foi acoplado ao ICP-MS por meio de um capilar PEEK da saída da coluna do HPLC ao nebulizador concêntrico do sistema de introdução do ICP-MS. O método de configuração integrado e controle sequencial do sistema combinado LC-ICP-MS foi realizado a partir do software ICP-MS MassHunter (MH) (Agilent Technologies). Os parâmetros instrumentais e operacionais são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros operacionais e instrumentais do LC-ICP-MS

Análise de especiação química de As (LC)	
Fase móvel	10 mM (NH ₄) ₂ HPO ₄ + 1% (v v ⁻¹) metanol pH 8,0
Vazão da fase móvel	1,0 mL min ⁻¹
Modo de eluição	Isocrático
Volume injetado	50 µL
Tempo de análise	720 s
ICP-MS	
Potência de RF	1550 W
Profundidade de amostragem	8 mm
Vazão do gás de nebulização	1,1 L min ⁻¹
Vazão do gás He	4,5 mL min ⁻¹
Nebulizador	Micromist
Câmara de nebulização	Tipo Scott , duplo passo
Isótopo monitorado	⁷⁵ As

A fase móvel contendo (NH₄)₂HPO₄ 10 mmol L⁻¹ (pH 8,0) foi preparada diariamente pela dissolução do sal (NH₄)₂HPO₄ (Synth) em água contendo 1% (v/v) de metanol grau HPLC (Sigma-Aldrich), e o pH ajustado com uma solução de NH₃ saturada em água (Synth). As soluções de calibração de As(III), As(V), AsB, DMA e MMA (0,1 a 20 µg L⁻¹) foram preparadas diariamente a partir das soluções estoque de 1000 mg L⁻¹ de As(III), As(V), AsB, DMA e MMA, que foram previamente preparadas a partir da dissolução dos sais de NaAsO₂ (Sigma-Aldrich), KH₂AsO₄ (Sigma-Aldrich), C₅H₁₁AsO₂ (Sigma-Aldrich), (CH₃)₂AsO₂Na · 3H₂O (Sigma-Aldrich) e CH₃AsO(ONa)₂ · 6H₂O (Sigma-Aldrich), em água, respectivamente.

Para o desenvolvimento do método de especiação de As, três materiais de referência certificado (CRMs) foram utilizados: DOLT-5 (fígado de cação), DORM-4 (proteína de peixe) e TORT-3 (hepatopâncreas de lagosta).

4.2. Resultados e discussão

4.2.1. Ensaio toxicológicos de bioacumulação e biotransformação

Os ensaios toxicológicos para avaliar a bioacumulação e a biotransformação do arsênio inorgânico foram realizados para verificar a toxicidade aguda durante 1 e 7 dias em duas concentrações distintas de As(III) e (V) (5 e 10 mg L⁻¹). Os ensaios foram executados de maneira independente, ou seja, primeiramente com a exposição ao As(III), e em seguida, o ensaio com exposição à As(V), separadamente (Figura 10).

Figura 10 - Ensaio toxicológicos de bioacumulação e biotransformação com As(III) e (V)



Fonte: autoria própria.

A Tabela 3 apresenta o peso e tamanho das tilápias que foram utilizadas nos ensaios toxicológicos de bioacumulação e biotransformação.

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

As(III)					
	Controle	5 mg L⁻¹ (Dia 1)	10 mg L⁻¹ (Dia 1)	5 mg L⁻¹ (Dia 7)	10 mg L⁻¹ (Dia 7)
Peso (g)	148,9 ± 18,9	119,2 ± 19,9	102,0 ± 8,7	125,6 ± 6,1	115,4 ± 14,8
Tamanho (cm)	17,2 ± 1,1	16,9 ± 0,5	15,3 ± 0,4	16,4 ± 0,4	15,8 ± 0,7
As(V)					
	Controle	5 mg L⁻¹ (Dia 1)	10 mg L⁻¹ (Dia 1)	5 mg L⁻¹ (Dia 7)	10 mg L⁻¹ (Dia 7)
Peso (g)	147, 2 ± 20,1	120,6 ± 19,9	110,7 ± 23,6	85,1 ± 15,8	127,7 ± 14,0
Tamanho (cm)	17,9 ± 0,2	16,2 ± 0,8	15,9 ± 0,9	15,2 ± 0,7	16,5 ± 0,7

Os tecidos foram coletados ao final de cada dia do ensaio conforme recomendado no protocolo e congelados à -80 °C para análises posteriores.

4.2.2. Bioacumulação do As

A fim de avaliar a veracidade do método proposto para a determinação de As total por ICP-MS, amostras de materiais de referência certificados (CRMs) foram analisadas. Os CRMs escolhidos foram: DOLT-5 (fígado de cação) e DORM-4 (proteína de peixe). Na Tabela 4 são apresentados os valores certificados, os valores determinados pelo método proposto e suas respectivas recuperações.

Tabela 4 - Valores certificados e determinados pelo método proposto de determinação de As em CRMs de pescados por ICP-MS

CRMs	Valor (mg kg ⁻¹)		Recuperação (%)
	Certificado	Determinado	
DOLT-5	34,6 ± 2,4	37,3 ± 0,8	108
DORM-4	6,8 ± 0,6	5,5 ± 0,2	81

As recuperações dos CRMs ficaram na faixa do que seria considerado aceitável (80 - 120 %), e os resultados estão de acordo com os valores certificados de As, para um intervalo de confiança de 95%. Assim, as amostras dos ensaios toxicológicos de bioacumulação e biotransformação foram analisadas seguindo o método proposto.

Os estudos de bioacumulação e biotransformação em diferentes tecidos podem fornecer uma melhor compreensão da capacidade de metabolização e do potencial toxicológico do As em organismos aquáticos, em especial nas tilápias do Nilo, um dos peixes mais cultivados e consumidos no Brasil. As concentrações de As total nos diferentes tecidos após as exposições a As(III) e As(V) são apresentadas na Tabela 5 e 6. A análise descritiva mostrou claramente um padrão crescente de bioacumulação de As nos grupos expostos a As(III) e As(V) nas concentrações de 5 e 10 mg L⁻¹, em comparação ao grupo controle.

O monitoramento e a determinação das concentrações de As foram realizados por meio da coleta de pequenas alíquotas de água dos aquários no início dos ensaios, as quais foram diluídas para análise por ICP-MS. No ensaio realizado com As(III), as concentrações médias na água foram de 5,09 ± 0,19 mg L⁻¹ e 10,1 ± 0,16 mg L⁻¹, enquanto no ensaio realizado com As(V), as concentrações médias foram de 5,19 ± 0,12 mg L⁻¹ e 10,2 ± 0,15 mg L⁻¹. Para ambos os ensaios, as concentrações na água do grupo controle ficaram abaixo do limite de quantificação para determinação por ICP-MS (2,2 × 10⁻⁴ mg L⁻¹).

A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos na determinação da concentração de As total em cada tecido das tilápias do ensaio de bioacumulação e biotransformação com As(III).

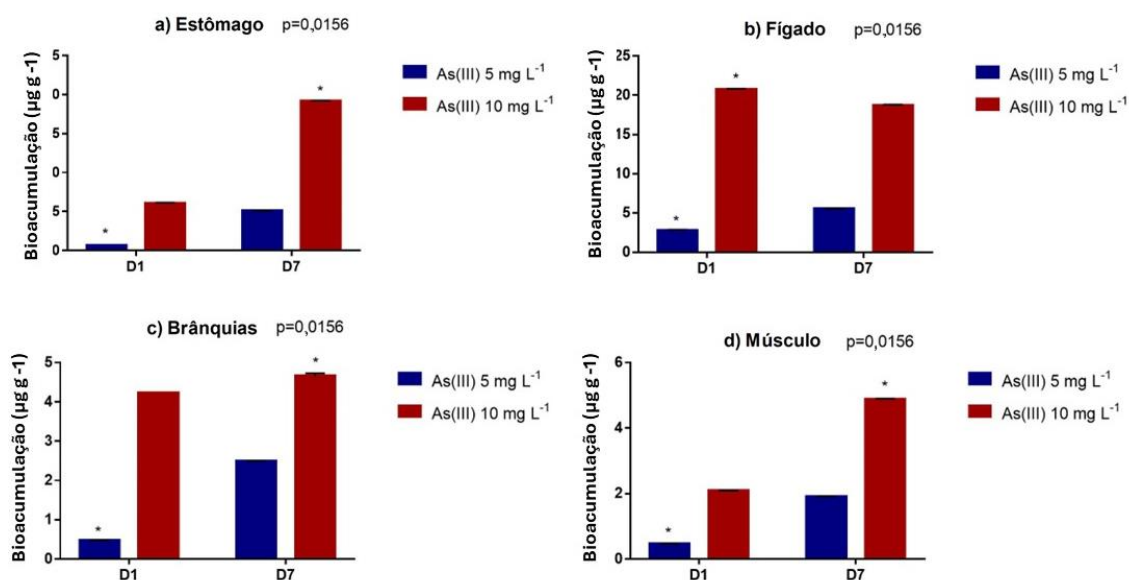
Tabela 5 - Concentração de As total ($\mu\text{g g}^{-1}$) nos diferentes tecidos estudados durante o ensaio de bioacumulação/biotransformação com As(III) (n = 3, $\pm$ SD)

Grupos	Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$)			
	Fígado	Estômago	Brânquias	Músculo
Controle	0,04 $\pm$ 0,002	< LOQ	0,15 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,001
5 mg L⁻¹ (Dia 1)	2,80 $\pm$ 0,14	0,69 $\pm$ 0,005	0,47 $\pm$ 0,01	0,46 $\pm$ 0,01
10 mg L⁻¹ (Dia 1)	20,70 $\pm$ 0,14	6,10 $\pm$ 0,10	4,23 $\pm$ 0,001	2,08 $\pm$ 0,01
5 mg L⁻¹ (Dia 7)	5,55 $\pm$ 0,03	5,09 $\pm$ 0,04	2,49 $\pm$ 0,01	1,91 $\pm$ 0,01
10 mg L⁻¹ (Dia 7)	18,70 $\pm$ 0,15	19,10 $\pm$ 0,17	4,66 $\pm$ 0,12	4,88 $\pm$ 0,03

* LOQ = 0,005 $\mu\text{g g}^{-1}$

Após o primeiro dia de exposição, houve uma concentração significativamente maior no fígado na concentração de 10 mg L⁻¹, quando comparado a concentração de 5 mg L⁻¹ (Figura 11b). Embora não estatisticamente significativo, o mesmo padrão foi observado para todas as situações experimentais. Os grupos expostos à 10 mg L⁻¹ apresentaram os maiores níveis de bioacumulação para todos os tecidos (Figura 11). Os menores e maiores níveis de bioacumulação de As para todos os tecidos foram observados para o dia 1 na concentração de 5 mg L⁻¹ e no dia 7 na concentração de 10 mg L⁻¹, respectivamente, exceto para o fígado, no qual a maior concentração foi observada no dia 1 na concentração de 10 mg L⁻¹.

Figura 11 - Bioacumulação de As ($\mu\text{g g}^{-1}$) nos diferentes tecidos de *O. niloticus* após exposição à As(III)



D1 = Dia 1 de exposição; D7 = Dia 7 de exposição. * Diferença estatisticamente significativa entre os grupos indicados. Os valores representativos das três réplicas foram expressos como média com desvio padrão ($\pm$ SD). Testes realizados: Kruskal-Wallis complementado pelo teste post-hoc de Dunn; $p < 0,05$ foi estatisticamente significativo.

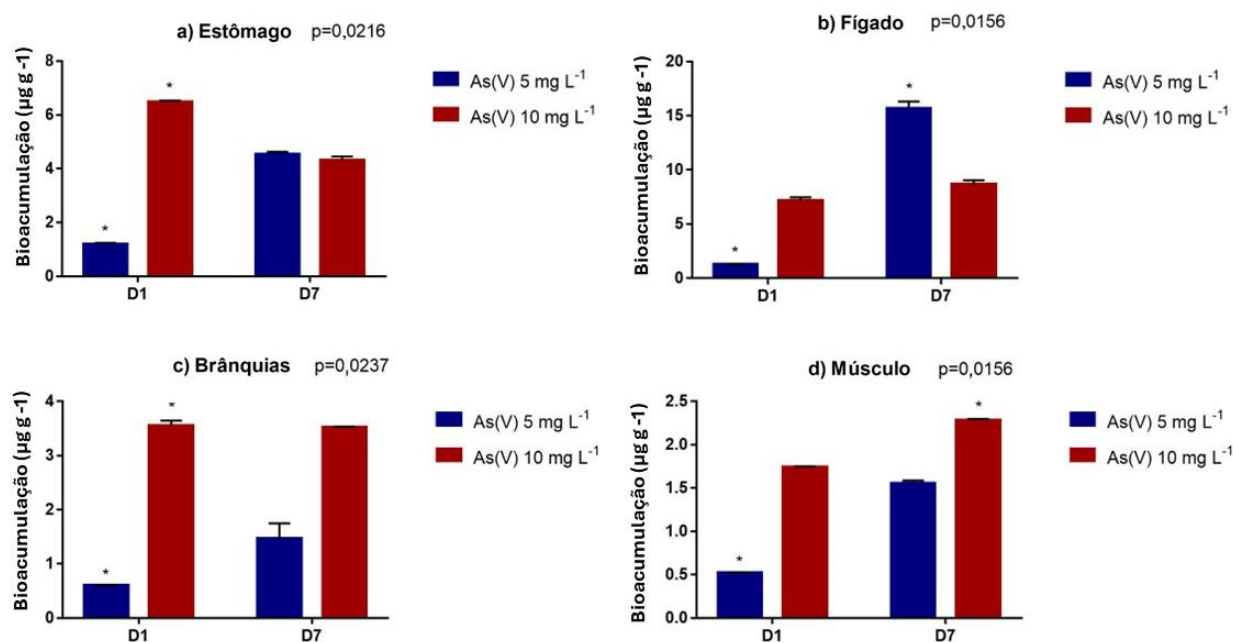
A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos na determinação da concentração de As total em cada tecido das tilápias do ensaio de bioacumulação e biotransformação com As(V).

Tabela 6 - Concentração de As total ($\mu\text{g g}^{-1}$) nos diferentes tecidos estudados durante o ensaio de bioacumulação/biotransformação com As(V) ($n = 3, \pm \text{SD}$)

Grupos	Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$)			
	Fígado	Estômago	Brânquias	Músculo
Controle	$0,09 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,004$	$0,27 \pm 0,01$
5 mg L⁻¹ (Dia 1)	$1,27 \pm 0,06$	$1,19 \pm 0,10$	$0,61 \pm 0,01$	$0,52 \pm 0,01$
10 mg L⁻¹ (Dia 1)	$7,15 \pm 0,56$	$6,48 \pm 0,09$	$3,55 \pm 0,16$	$1,74 \pm 0,02$
5 mg L⁻¹ (Dia 7)	$15,70 \pm 1,08$	$4,53 \pm 0,17$	$1,47 \pm 0,49$	$1,55 \pm 0,06$
10 mg L⁻¹ (Dia 7)	$8,66 \pm 0,66$	$4,32 \pm 0,24$	$3,52 \pm 0,02$	$2,28 \pm 0,02$

A análise estatística para a exposição à As(V) revelou que semelhante ao tratamento com As(III), os menores níveis de bioacumulação de As(V) para todos os tecidos foram observados no dia 1 na concentração de 5 mg L⁻¹. Por outro lado, a maior concentração de As variou entre os tecidos avaliados; para o estômago e brânquias, os maiores valores foram no dia 1 na concentração de 10 mg L⁻¹ (Figura. 12a e 12c), enquanto para o músculo e fígado, os maiores valores foram no dia 7 na concentração de 10 mg L⁻¹ (Figura 12d) e no dia 7 na concentração de 5 mg L⁻¹ (Figura 12b), respectivamente.

Figura 12 - Bioacumulação de As ($\mu\text{g g}^{-1}$) nos diferentes tecidos de *O. niloticus* após exposição à As(V)



D1 = Dia 1 de exposição; D7 = Dia 7 de exposição. * Diferença estatisticamente significativa entre os grupos indicados. Os valores representativos das três réplicas foram expressos como média com desvio padrão ($\pm$ SD). Testes realizados: Kruskal-Wallis complementado pelo teste post-hoc de Dunn; $p < 0,05$ foi estatisticamente significativo.

Na análise descritiva, para ambos os tratamentos de exposição ao As(III) e As(V), os níveis de bioacumulação de As estavam na seguinte ordem: fígado > estômago > brânquias > músculo. Essa tendência também foi observada em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa (FERREIRA et al., 2019). 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.

O fígado é o tecido mais recomendado para realizar um estudo de poluição de um ambiente aquático, pois nele estão presentes as maiores concentrações de contaminantes, sendo o principal órgão para o metabolismo e toxicidade do As (LICATA et al., 2005). Devido às características anatômicas e fisiológicas, como composição lipídica, alta

atividade metabólica e grande quantidade de sangue recebido, o fígado é um órgão que acumula As em grande quantidade (SQUADRONE et al., 2013; FERREIRA et al., 2019).

Os resultados descritivos obtidos para ambos os ensaios de bioacumulação mostraram que as brânquias e o músculo apresentaram as menores concentrações de As, o que está de acordo com diversos trabalhos encontrados na literatura. Em estudos de Tsai e Liao (2006), as menores concentrações de As também foram encontradas nas brânquias e músculo da tilápia (*Oreochromis mossambicus*) expostas à As na concentração de 1 mg L⁻¹ durante o período de 7 dias. Ferreira et al. (2019) desenvolveram ensaios de bioacumulação com As(III) e (V) com tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) na concentração fixa de 1 mg L⁻¹ durante 1, 4 e 7 dias, e em ambos ensaios e tempos de exposição, as menores concentrações de As também foram observadas nas brânquias e músculo. Cui et al. (2020) realizaram ensaios com exposição dietética com As (na concentração de 50 e 100 µg g⁻¹, peso seco) no peixe *Carassius auratus* durante o período de 10 e 20 dias, e os resultados demonstraram que as menores concentrações encontradas foram no músculo, em comparação com os tecidos de fígado, rim, baço e intestino.

No trabalho de Schlechtriem, Fliedner e Schäfers (2012) foi encontrado uma correlação positiva significativa entre o acúmulo de contaminantes e o conteúdo lipídico dos tecidos. Sendo assim, o teor de gordura do fígado poderia explicar a maior concentração de As, em comparação com os tecidos musculares, que apresentam um baixo teor de gordura, consequentemente bioacumulando menores quantidades de As.

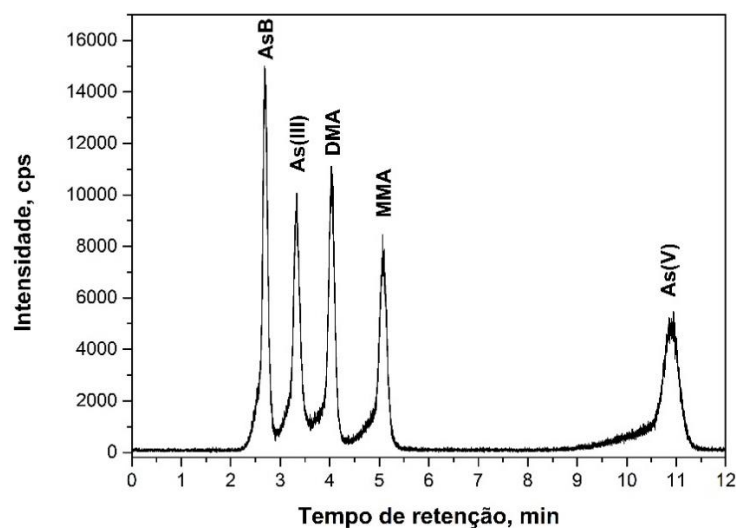
A bioacumulação de As nos diferentes tecidos de tilápia do Nilo foi maior quando os peixes foram expostos a As(III), em comparação com As(V), o que pode ser atribuído aos diferentes processos de absorção de As(III) e As(V). Os resultados sugeriram que As(III) permeou mais facilmente através do epitélio e/ou foi mais prontamente metabolizado nos tecidos, em comparação com As(V), quando os peixes foram expostos a altas concentrações de As. Resultados semelhantes foram relatadas por Zhang et al. (2015), onde As(III) foi mais biodisponível do que As(V) em ostras de Bombaim (*Saccostrea cucullata*) após exposições aquáticas.

4.2.3. Especiação de As por LC-ICP-MS

Os materiais de referência certificados foram utilizados para confirmar a precisão dos métodos propostos de preparo de amostras e análise. É importante mencionar que a especiação de As em matrizes sólidas é um desafio, pois a integridade das espécies deve ser mantida em todas as etapas da análise, então a escolha do método de extração é uma das etapas mais importantes durante a análise de especiação. A estabilidade das espécies de As em solução após a preparação da amostra deve ser garantida para evitar a sub ou superestimação das espécies alvo (BATISTA et al., 2012; SCHMIDT et al., 2018).

A Figura 13 mostra um cromatograma dos cinco padrões de espécies de As, incluindo AsB, As(III), DMA, MMA e As(V), obtidos utilizando o método LC-ICP-MS. As condições operacionais de LC e ICP-MS permitiram que as diferentes espécies de As fossem satisfatoriamente separadas em um tempo de 12 minutos. A determinação das espécies de As foram realizadas por calibração externa, com faixa de trabalho entre 0,1 a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, integrando a área do sinal analítico de cada espécie e correlacionando com a concentração. A curva de calibração apresentou uma boa correlação linear, $R^2 > 0,9998$, para todas as espécies de As. Os limites de determinação (LOD) e quantificação (LOQ) foram obtidos a partir de $LOD=3\times EP/S$ e $LOQ=10\times EP/S$, respectivamente, na qual EP e S correspondem ao erro padrão e a inclinação da regressão linear, respectivamente.

Figura 13 - Separação cromatográfica das espécies de As usando 10 mmol L⁻¹ (NH₄)₂HPO₄ diluída em 1% (v v⁻¹) de metanol como fase móvel no método LC-ICP-MS



Tempo de retenção das espécies de As (min): 2,681 (AsB); 3,334 (As(III)); 4,052 (DMA); 5,019 (MMA) e 10,95 (As(V)). Fonte: autoria própria.

Os resultados da análise de especiação nos CRMs são apresentados e comparados com valores certificados na Tabela 7.

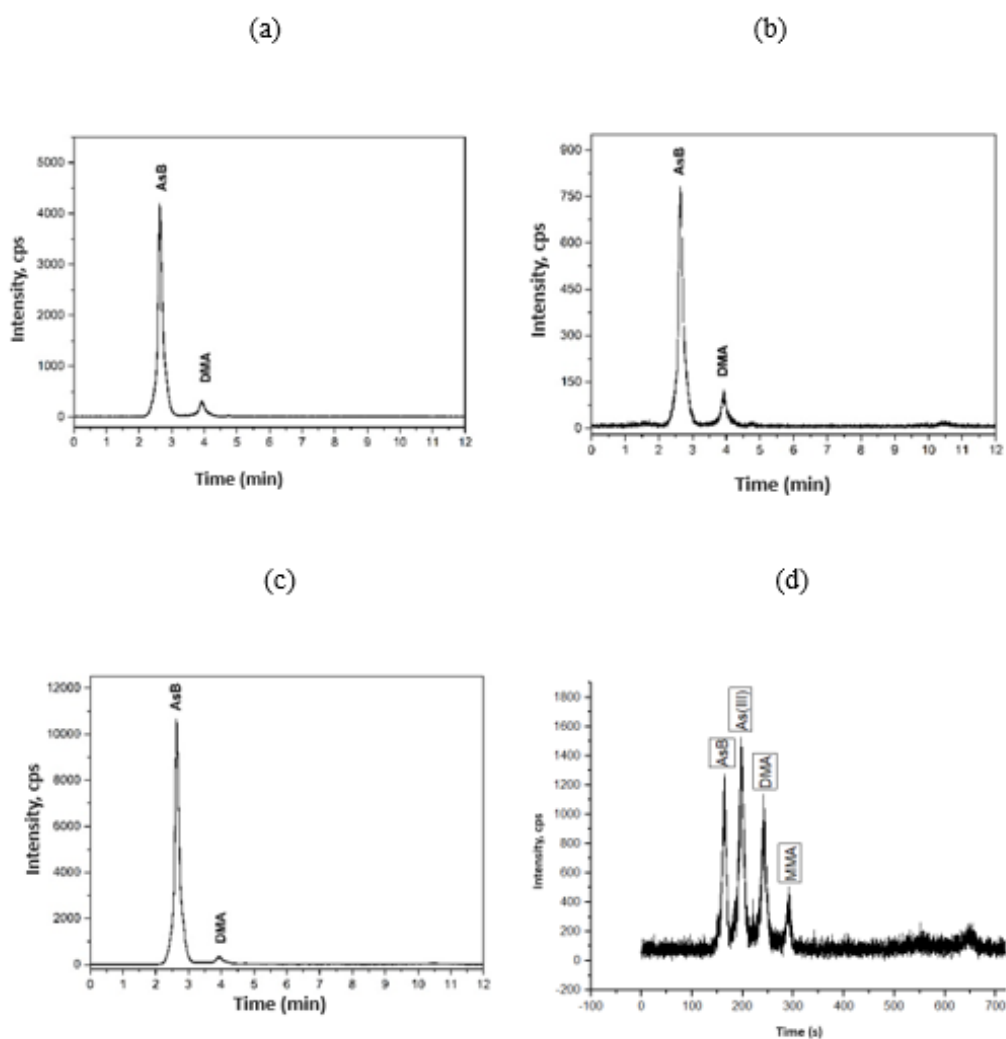
Tabela 7 - Fração de massa de As total e espécies de As (µg g⁻¹) nos materiais de referência certificados (DOLT-5, DORM-4 e TORT-3) (n = 3; ± SD)

CRM	AsB	As(III)	DMA	MMA	As(V)	Σ espécies As	As total	R (%)
DOLT-5	30,03 ± 2,52	< LOQ	0,03 ± 0,02	< LOQ	< LOQ	30,06 ± 2,54	32,02 ± 2,75	94
DORM-4	5,63 ± 0,43	< LOQ	0,01 ± 0,01	< LOQ	< LOQ	5,64 ± 0,44	6,34 ± 0,54	89
TORT-3	55,4 ± 1,9	< LOQ	0,05 ± 0,01	< LOQ	< LOQ	55,4 ± 1,9	58,75 ± 3,03	94

Valores certificados: DOLT-5 = 34,6 ± 2,4 µg g⁻¹; DORM-4 = 6,80 ± 0,64 µg g⁻¹; TORT-3 = 59,5 ± 3,8 µg g⁻¹.

A exatidão do método de análise foi avaliada pela análise dos CRMs (DOLT-5, DORM-4 e TORT-3). Um balanço de massa de As foi realizado comparando a soma das frações das espécies extraídas com as concentrações de As total determinadas nos extratos por ICP-MS. Os resultados (Tabela 7) foram consistentes com os valores certificados de As, para um intervalo de confiança de 95%. Os limites de quantificação para AsB, As(III), DMA, MMA e As(V) foram 14,6, 76,4, 98,4, 68,5 e 23,7 ng g⁻¹, respectivamente. Cromatogramas para todos os CRMs e uma amostra real após a extração são mostrados na Figura 14.

Figura 14 - Cromatogramas para (a) DOLT-5, (b) DORM-4, (c) TORT-3, e (d) amostra real



Fonte: autoria própria.

Os cromatogramas (Figura 14) obtidos para análise de especiação de As nas amostras dos CRMs revelaram a predominância da espécie AsB em DOLT-5, DORM-4 e TORT-3. A presença de DMA foi observada, enquanto As(III), MMA e As(V) estavam abaixo dos limites de quantificação (LOQ). Os valores médios de concentração obtidos nos CRMs mostram que o método de preparo de amostra aplicado é aceitável e pode ser usado para análise de amostras reais, como mostrado na Figura 14d. A extração usando HNO_3 diluído ($0,03 \text{ mol L}^{-1}$) a 90°C por 40 minutos forneceu valores médios de recuperação entre 89 e 94% dos CRMs, portanto foi escolhido como método de preparo de amostras para os tecidos biológicos.

Portanto, os resultados descritos acima demonstraram que a metodologia de extração e LC-ICP-MS desenvolvida neste estudo tem ampla aplicabilidade, excelente exatidão para matrizes de amostras complexas, tornando-a adequada para determinar com precisão espécies de As em peixes.

4.2.4. Biotransformação do As

A biotransformação é um processo pelo qual uma substância dentro do organismo sofre reações químicas, geralmente mediadas por enzimas, que a convertem em um composto diferente do original e geralmente com menor toxicidade. O presente estudo fornece novos esclarecimentos sobre a biotransformação de As em diferentes tecidos de tilápia do Nilo. As Tabelas 8 e 9 mostram as frações de massa das cinco espécies de As nos tecidos dos peixes expostos a As(III) e As(V), respectivamente.

Tabela 8 - Frações de massa das espécies de As ($\mu\text{g g}^{-1}$) em diferentes tecidos após exposição de tilápia do Nilo ao As(III) (n = 3, $\pm$ SD)

		Espécies As					
Tratamento	Tecido	AsB	As(III)	DMA	MMA	As(V)	Σ espécies As
Exposição As(III)	Controle	Fígado	0,04 $\pm$ 0,002	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,04 $\pm$ 0,002
		Estômago	0,003 $\pm$ 0,002	0,05 $\pm$ 0,002	< LOQ	< LOQ	0,053 $\pm$ 0,004
		Brânquias	0,075 $\pm$ 0,0004	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,075 $\pm$ 0,0004
		Músculo	0,07 $\pm$ 0,001	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,07 $\pm$ 0,001
	5 mg L ⁻¹ (Dia 1)	Fígado	2,28 $\pm$ 0,12	0,20 $\pm$ 0,03	0,04 $\pm$ 0,02	0,05 $\pm$ 0,003	2,84 $\pm$ 0,18
		Estômago	0,24 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01	< LOQ	0,57 $\pm$ 0,03
		Brânquias	0,21 $\pm$ 0,02	0,09 $\pm$ 0,001	0,01 $\pm$ 0,001	0,03 $\pm$ 0,001	0,46 $\pm$ 0,02
		Músculo	0,25 $\pm$ 0,002	0,11 $\pm$ 0,02	0,08 $\pm$ 0,02	< LOQ	0,44 $\pm$ 0,04
	10 mg L ⁻¹ (Dia 1)	Fígado	5,36 $\pm$ 0,08	2,41 $\pm$ 0,002	3,13 $\pm$ 0,16	7,01 $\pm$ 0,04	19,3 $\pm$ 0,29
		Estômago	2,35 $\pm$ 0,05	1,12 $\pm$ 0,11	1,05 $\pm$ 0,05	1,26 $\pm$ 0,13	6,03 $\pm$ 0,36
		Brânquias	0,83 $\pm$ 0,003	0,76 $\pm$ 0,02	2,08 $\pm$ 0,02	0,28 $\pm$ 0,01	4,21 $\pm$ 0,07
		Músculo	0,27 $\pm$ 0,16	0,14 $\pm$ 0,003	1,17 $\pm$ 0,003	0,16 $\pm$ 0,01	1,97 $\pm$ 0,19
	5 mg L ⁻¹ (Dia 7)	Fígado	4,82 $\pm$ 0,69	0,34 $\pm$ 0,02	0,06 $\pm$ 0,02	0,34 $\pm$ 0,04	6,01 $\pm$ 0,76
		Estômago	1,02 $\pm$ 0,008	1,51 $\pm$ 0,08	1,60 $\pm$ 0,14	0,66 $\pm$ 0,004	5,17 $\pm$ 0,24
		Brânquias	0,46 $\pm$ 0,10	0,28 $\pm$ 0,06	0,70 $\pm$ 0,001	0,41 $\pm$ 0,05	2,12 $\pm$ 0,24
		Músculo	1,11 $\pm$ 0,02	0,10 $\pm$ 0,001	0,54 $\pm$ 0,06	0,01 $\pm$ 0,01	1,86 $\pm$ 0,09
	10 mg L ⁻¹ (Dia 7)	Fígado	10,8 $\pm$ 0,17	1,80 $\pm$ 0,07	1,26 $\pm$ 0,06	1,13 $\pm$ 0,01	16,8 $\pm$ 0,60
		Estômago	2,46 $\pm$ 0,14	7,03 $\pm$ 0,05	4,82 $\pm$ 0,13	2,13 $\pm$ 0,14	17,8 $\pm$ 0,48
		Brânquias	1,08 $\pm$ 0,06	0,73 $\pm$ 0,02	1,31 $\pm$ 0,01	0,93 $\pm$ 0,03	4,89 $\pm$ 0,14
		Músculo	1,12 $\pm$ 0,04	0,39 $\pm$ 0,01	0,88 $\pm$ 0,01	1,24 $\pm$ 0,04	4,84 $\pm$ 0,12

Tabela 9 - Frações de massa das espécies de As ($\mu\text{g g}^{-1}$) em diferentes tecidos após exposição de tilápia do Nilo ao As(V) (n = 3, $\pm$ SD)

		Espécies As					
Tratamento	Tecido	AsB	As(III)	DMA	MMA	As(V)	Σ espécies As
Exposição As(V)	Controle	Fígado	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,001 $\pm$ 0,001	0,09 $\pm$ 0,003
		Estômago	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,004 $\pm$ 0,0005	0,09 $\pm$ 0,009
		Brânquias	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,001 $\pm$ 0,001	0,11 $\pm$ 0,001
		Músculo	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,003 $\pm$ 0,002	0,23 $\pm$ 0,014
	5 mg L ⁻¹ (Dia 1)	Fígado	0,51 $\pm$ 0,07	0,08 $\pm$ 0,02	0,48 $\pm$ 0,12	0,01 $\pm$ 0,001	1,15 $\pm$ 0,21
		Estômago	0,21 $\pm$ 0,07	0,60 $\pm$ 0,21	0,01 $\pm$ 0,004	0,04 $\pm$ 0,01	1,04 $\pm$ 0,31
		Brânquias	0,12 $\pm$ 0,07	< LOQ	0,15 $\pm$ 0,08	0,01 $\pm$ 0,003	0,65 $\pm$ 0,18
		Músculo	0,25 $\pm$ 0,05	< LOQ	0,09 $\pm$ 0,003	0,01 $\pm$ 0,002	0,53 $\pm$ 0,06
	10 mg L ⁻¹ (Dia 1)	Fígado	1,38 $\pm$ 0,03	1,03 $\pm$ 0,02	3,56 $\pm$ 0,16	0,37 $\pm$ 0,02	6,71 $\pm$ 0,23
		Estômago	3,20 $\pm$ 0,001	1,16 $\pm$ 0,07	1,94 $\pm$ 0,24	0,70 $\pm$ 0,15	7,34 $\pm$ 0,47
		Brânquias	0,35 $\pm$ 0,06	0,73 $\pm$ 0,20	1,77 $\pm$ 0,40	0,23 $\pm$ 0,05	3,25 $\pm$ 0,71
		Músculo	0,49 $\pm$ 0,09	0,30 $\pm$ 0,14	0,84 $\pm$ 0,12	0,07 $\pm$ 0,02	1,96 $\pm$ 0,51
	5 mg L ⁻¹ (Dia 7)	Fígado	10,8 $\pm$ 0,18	1,11 $\pm$ 0,12	2,15 $\pm$ 0,14	0,77 $\pm$ 0,17	15,2 $\pm$ 0,61
		Estômago	0,69 $\pm$ 0,11	1,97 $\pm$ 0,23	0,68 $\pm$ 0,01	0,63 $\pm$ 0,02	4,40 $\pm$ 0,55
		Brânquias	0,78 $\pm$ 0,02	< LOQ	0,52 $\pm$ 0,001	0,07 $\pm$ 0,03	1,55 $\pm$ 0,05
		Músculo	1,13 $\pm$ 0,19	< LOQ	0,38 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,01	1,71 $\pm$ 0,21
	10 mg L ⁻¹ (Dia 7)	Fígado	4,02 $\pm$ 0,35	2,48 $\pm$ 0,26	1,27 $\pm$ 0,07	0,87 $\pm$ 0,13	8,99 $\pm$ 0,82
		Estômago	1,32 $\pm$ 0,006	0,65 $\pm$ 0,001	1,21 $\pm$ 0,06	0,32 $\pm$ 0,02	4,15 $\pm$ 0,11
		Brânquias	1,28 $\pm$ 0,20	0,22 $\pm$ 0,01	1,48 $\pm$ 0,02	0,19 $\pm$ 0,06	3,46 $\pm$ 0,30
		Músculo	0,88 $\pm$ 0,04	0,18 $\pm$ 0,01	0,49 $\pm$ 0,006	0,61 $\pm$ 0,01	2,30 $\pm$ 0,08

Após a exposição das tilápias do Nilo ao As(III) (Tabela 8), a presença de As(V) foi detectada em todos os tecidos, indicando que o As(III) poderia ser oxidado para As(V). A oxidação de As(III) para As(V) foi observada anteriormente em microrganismos, mas raramente em peixes. Rahman e Hassler (2014) relataram que os mecanismos de oxidação de As(III) por microrganismos incluem o metabolismo quimiolitotrófico, onde o As(III) é utilizado como fonte de energia e a oxidação extracelular de As(III) é mediada pela arsenito oxidase. No entanto, os mecanismos de oxidação de As(III) em peixes não são claros e precisam de mais estudos.

Quando as tilápias do Nilo foram expostas ao As(V) (Tabela 9), a espécie As(III) foi posteriormente encontrada em todos os tecidos, sugerindo que a redução de As(V) para As(III) ocorreu no organismo. Devido às semelhanças físico-químicas entre As(V) e o íon fosfato, o As(V) entra nas células por meio do sistema de fosfato e é então reduzido enzimaticamente para As(III), com a oxidação concomitante de glutathione (GSH) para dissulfeto de glutathione (GSSG) em uma reação catalisada pela arsenato redutase (ALLEVATO et al., 2019; SODHI et al., 2019). A redução de As(V) foi reconhecida como um processo de desintoxicação, porque embora As(III) seja mais tóxico que As(V), vários processos atuam contra a toxicidade de As(III) em organismos, incluindo a expulsão de As das células e sua transformação em As orgânico (RAHMAN; HASSLER, 2014).

A biotransformação e distribuição de As em peixes pode ser influenciada pelas funções metabólicas dos tecidos e pelas diferentes relações de assimilação/eliminação de As entre eles. O fígado é considerado o órgão mais importante e responsável pela biotransformação de As. É provavelmente o primeiro local envolvido neste processo, antes que as espécies de As sejam translocadas para outros tecidos ou sejam excretadas na bile (CUI et al., 2020). De acordo com os resultados, entre todos os tecidos, a maior proporção de As metilado (MMA e DMA) foi encontrado no fígado. Comparado ao MMA, o DMA representou uma proporção maior do As total, sugerindo que o DMA era uma forma mais estável nos tecidos.

Na análise descritiva, as maiores frações de AsB no fígado foram observadas para o ensaio toxicológico com As(III). A comparação dos resultados obtidos usando diferentes concentrações (5 e 10 mg L⁻¹), para o mesmo tempo de exposição, revelou um padrão de efeito dose-resposta, com o valor de AsB aumentando 2 vezes quando a concentração de exposição também foi dobrada. Esses resultados sugeriram que AsB é provavelmente o

produto final da biotransformação de As e poderia ser acumulado no corpo em vez de ser excretado.

Após a metilação, o organismo tem diferentes estratégias para desintoxicação do As. Neste estudo, após exposição à As(III) e As(V) nas concentrações de 5 e 10 mg L⁻¹ durante 1 e 7 dias, AsB foi a espécie predominante em todos os tecidos e para todas as condições experimentais, com frações variando de 13% a 80%, indicando que a tilápia do Nilo poderia converter MMA e DMA em AsB, que é uma das espécies de As menos reativas e tóxicas.

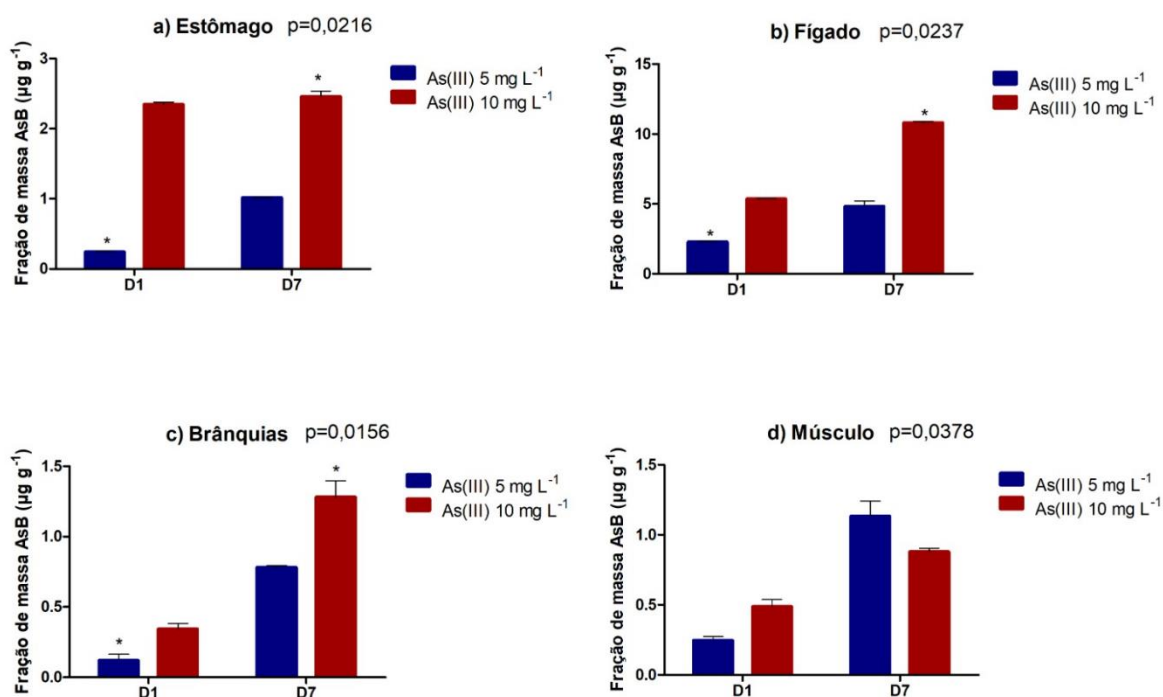
Os mecanismos de síntese de AsB não são completamente compreendidos, com os modelos atuais para sua formação sendo baseados principalmente nos potenciais precursores biossintéticos e na detecção de intermediários. Conforme relatado por Zhang et al. (2022), existem várias vias possíveis para a síntese de AsB. A hipótese primária é a degradação de arsenosaçúcares dimetilados/trimetilados seguida pela formação de AsB via metilação e oxidação. Outras vias, como a oxidação da arsenocolina (AsC) para AsB e a metilação de DMA, são descritas. De acordo com estudos, microrganismos e organismos em níveis tróficos baixos estão envolvidos na formação de AsB, e que o AsB detectado em organismos em níveis tróficos mais altos é principalmente devido ao acúmulo trófico ao longo da cadeia alimentar (POPOWICH; ZHANG; LE, 2016).

Existem estudos que descrevem que a microbiota intestinal está correlacionada com o acúmulo de AsB. Foster e Maher (2016) sugeriram que bactérias presentes no intestino de herbívoros podem sintetizar AsB por meio de vias ainda não caracterizadas. Zhang et al. (2020) demonstraram que a síntese de AsB é mediada pela microbiota intestinal em medaka marinho (*Oryzias melastigma*) e que contribui para a alta bioacumulação de As. Song et al. (2022) confirmaram que a microbiota intestinal promove a bioacumulação e biotransformação de As em tilápia (*Oreochromis mossambicus*) e pode transformar As(V) em organoarsenicais.

Como os dados descritivos indicaram que a tilápia poderia converter MMA e DMA em AsB, uma análise estatística desses dados foi realizada para entender melhor a influência do AsB para cada tecido. Estatisticamente, os valores de AsB obtidos após a exposição da tilápia ao As(III) apresentaram o mesmo padrão para todos os tecidos, exceto o músculo (Figura 15d), com os níveis mais baixos e mais altos de AsB sendo observados para exposição de 5 mg L⁻¹ no dia 1 e exposição de 10 mg L⁻¹ no dia 7,

respectivamente (Figura 15a-c). No músculo, a maior concentração foi observada para exposição de 5 mg L⁻¹ no dia 7, embora isso não tenha sido estatisticamente significativo. Vale ressaltar que o fígado apresentou os maiores níveis de biotransformação para AsB (Figura 15b), como também mostrado na análise descritiva, com esses níveis sendo mais altos na concentração de 10 mg L⁻¹.

Figura 15 - Frações de massa de AsB (µg g⁻¹) em diferentes tecidos após exposição das tilápias do Nilo ao As(III)

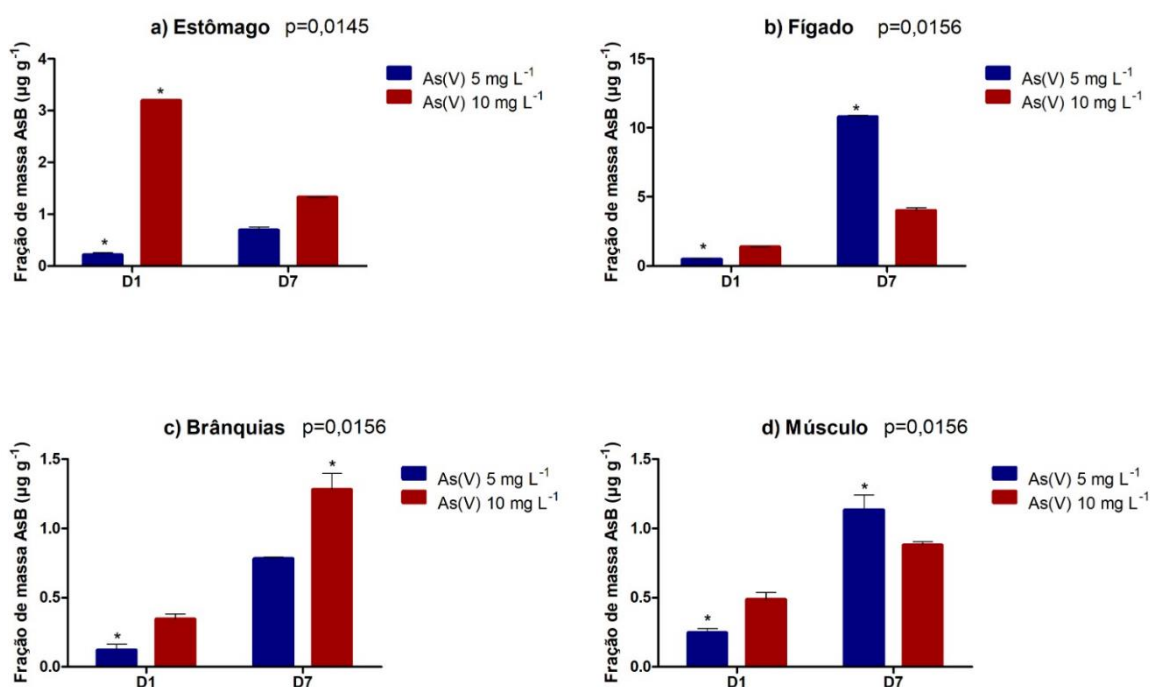


D1 = Dia 1 de exposição; D7 = Dia 7 de exposição. * Diferença estatisticamente significativa entre os grupos indicados. Os valores representativos das três réplicas foram expressos como média com desvio padrão ($\pm$ SD). Testes realizados: Kruskal-Wallis complementado pelo teste post-hoc de Dunn; $p < 0,05$ foi estatisticamente significativo.

Entretanto, considerando os valores de AsB após a exposição das tilápias do Nilo ao As(V), apenas as brânquias (Figura 16c) apresentou o padrão descrito acima. Entre os outros tecidos, tanto para o fígado quanto para o músculo (Figura 16b e 16d), a exposição

a 5 mg L⁻¹ levou aos menores (dia 1) e maiores (dia 7) valores, apesar de apenas o fígado apresentar um aumento drástico (~10 vezes) entre essas situações experimentais. Diferentemente dos outros tecidos, que apresentaram as maiores taxas de biotransformação no dia 7, o estômago (Fig. 16a) apresentou o maior nível no dia 1, para exposição a 10 mg L⁻¹.

Figura 16 - Frações de massa de AsB (µg g⁻¹) em diferentes tecidos após exposição das tilápias do Nilo ao As(V)



D1 = Dia 1 de exposição; D7 = Dia 7 de exposição. * Diferença estatisticamente significativa entre os grupos indicados. Os valores representativos das três réplicas foram expressos como média com desvio padrão ($\pm$ SD). Testes realizados: Kruskal-Wallis complementado pelo teste post-hoc de Dunn; $p < 0,05$ foi estatisticamente significativo.

Sob as condições experimentais, as tilápias do Nilo foram expostas ao As inorgânico, então o AsB detectado nos tecidos foi devido à biotransformação por metilação do As inorgânico e subsequente conversão para AsB. No presente experimento, a análise

descritiva indicou que a fração de AsB foi maior para o tratamento com As(III), em comparação ao tratamento com As(V), durante todo o período de exposição.

4.3. Conclusão

Nesta seção foi proposta a investigação da bioacumulação e biotransformação de As inorgânico para espécies metiladas em diferentes tecidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas à As(III) e As(V) em diferentes concentrações (5,0 e 10,0 mg L⁻¹) e por diferentes períodos de exposição (1 e 7 dias). A capacidade da tilápia do Nilo de bioacumular As inorgânico variou dependendo da espécie de As. Os peixes expostos a As(III) apresentaram níveis mais altos de As em todos os tecidos estudados, em comparação com a exposição à As(V). Para ambos os tratamentos, as maiores concentrações de As foram encontradas no fígado e no estômago, seguidos das brânquias e músculo. As espécies inorgânicas de As foram biotransformadas em formas orgânicas metiladas (MMA e DMA), com subsequente conversão para AsB, a espécie predominante e não tóxica.

5. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTAGÔNICOS DO ARSÊNIO INORGÂNICO NA PRESENÇA DE SELÊNIO

Nesta seção é apresentado um estudo comparativo entre os ensaios toxicológicos com As(III) e (V) nas tilápias do Nilo, apresentado na seção 4, com os ensaios antagônicos com As(III) e (V) concomitante a uma dose de Se(IV) pré-estabelecida, a fim de verificar a influência que o selênio tem sobre a toxicidade do As inorgânico durante o processo de bioacumulação nas tilápias do Nilo. A partir desses estudos foi publicado o seguinte trabalho:

FERREIRA, N. DOS S. et al. Arsenic bioaccumulation and biotransformation in different tissues of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): A comparative study between As(III) and As(V) exposure and evaluation of antagonistic effects of selenium. *Chemosphere*, v. 359, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.142289>.

5.1. Materiais e métodos

5.1.1. Ensaios de toxicidade aguda com Se(IV)

Foram realizados ensaios de toxicidade aguda com selênio tetravalente (Se(IV)) após aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais do IBILCE/UNESP com o projeto “Ensaios de toxicidade aguda e de bioacumulação de selênio inorgânico em Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)”, protocolo CEUA nº. 227/2020, em colaboração com o aluno de iniciação científica do nosso grupo de pesquisa, Pedro Henrique da Costa (Processo FAPESP 2020/08066-4).

As tilápias do Nilo utilizadas nesses ensaios de toxicidade aguda foram adquiridas com o Prof. Dr. Giovani Sampaio Gonçalves, pesquisador científico do Centro Avançado de Pesquisa do Pescado Continental – Instituto da Pesca, de São José do Rio Preto (Figura 17).

Figura 17 - Tanque de piscicultura do Instituto da Pesca, São José do Rio Preto



Fonte: autoria própria.

As tilápias coletadas foram acomodadas em sacos plásticos com água/oxigênio e transportadas até o Laboratório de Ecotoxicologia do câmpus da UNESP/IBILCE, as quais foram distribuídas em tanques de 500 litros com oxigenação constante e temperatura controlada (27 ± 2 °C). As tilápias coletadas não apresentavam tamanho adequado para a realização dos ensaios, assim elas permaneceram por um período de aclimação de 2 meses aproximadamente, quando alcançaram o tamanho desejado.

Os ensaios de toxicidade aguda foram iniciados a partir de um pré-teste para a determinação da concentração da dose letal capaz de provocar a morte de metade da população em estudo (LC_{50}). A diretriz de teste nº 203 publicada pela Organization for Economic Co-operation and Development (OECD, 1992) sugere que seja realizado um pré-teste com sete indivíduos em uma concentração de 100 mg L^{-1} do contaminante, assim dependendo da mortalidade do grupo de estudo sabe-se se a LC_{50} será acima ou abaixo de 100 mg L^{-1} , ou seja, se nenhuma morte for constatada durante este ensaio será possível constatar que a LC_{50} para o contaminante é superior a concentração utilizada para a realização do pré-teste, e caso ocorra a morte de todos os indivíduos sabe-se que a LC_{50} será inferior à 100 mg L^{-1} . Foram realizados pré-testes com concentrações limites de soluções nominais de 100, 50 e 10 mg L^{-1} de selênio tetravalente, e em todos os casos, houveram mortes dos indivíduos, o que indica que a LC_{50} tem valor abaixo de 10 mg L^{-1} .

Para o ensaio de toxicidade aguda, as tilápias foram alocadas individualmente em aquários retangulares de plástico com volume de solução de 10 litros, com seus parâmetros físico-químicos controlados. Foi preparada uma solução de selênio tetravalente dissolvendo uma quantidade calculada do sal de selenito de sódio (Na_2SeO_3) em água deionizada. Em seguida, foram realizadas diluições dessa solução com água de torneira, a fim de se obter a concentração nominal desejada em cada aquário, conforme esquema mostrado na Figura 18.

Figura 18 - Esquema do ensaio de toxicidade aguda



Fonte: autoria própria.

Durante o experimento, a mortalidade dos peixes foi registrada a cada 24 h, até 7 dias de exposição. Os cálculos da LC_{50} foram baseados no método gráfico, pelo logaritmo da concentração (eixo x) *versus* a porcentagem cumulativa de mortes (eixo y).

5.1.2. Ensaios antagônicos com As inorgânico e Se(IV)

O ensaio antagônico foi realizado utilizando as espécies inorgânicas de As (As(III) e (V)), separadamente, com o Se(IV) em concentrações predefinidas (abaixo da LC_{50}) a fim de avaliar o efeito protetor do selênio contra a toxicidade do arsênio.

As tilápias do Nilo foram divididas em 5 grupos: controle, 5 mg L⁻¹ (Dia 1), 10 mg L⁻¹ (Dia 1), 5 mg L⁻¹ (Dia 7) e 10 mg L⁻¹ (Dia 7), conforme descritos na seção “Bioacumulação e biotransformação de arsênio inorgânico em diferentes tecidos de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)” (Seção 4.1.2 – Delineamento experimental). Os grupos, exceto o grupo controle, receberam uma dose de Se(IV) na concentração de 1 mg L⁻¹. Cada grupo foi composto por 5 peixes expostos individualmente aos tratamentos em aquários plásticos de 10 L (n = 5), com seus parâmetros físico-químicos controlados. Após 1 e 7 dias de exposição, os indivíduos de cada grupo foram coletados e anestesiados com benzocaína (28 mg L⁻¹ em solução aquosa), antes da remoção dos tecidos biológicos (fígado, estômago, brânquias e músculo). As amostras foram armazenadas em frascos de polipropileno, a -80 °C, até a etapa de preparo da amostra ser realizada de acordo com o método proposto por Oliveira et al. (2017), seguida da determinação de Se e As total.

5.1.3. Preparo das amostras

O preparo das amostras, cujo procedimento foi descrito na seção “Bioacumulação e biotransformação de arsênio inorgânico em diferentes tecidos de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)” (Seção 4.1.3) foi empregado na presente Seção.

5.1.4. Determinação de As total por ICP-MS

A determinação de As total, cujo procedimento foi descrito na seção “Bioacumulação e biotransformação de arsênio inorgânico em diferentes tecidos de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)” (Seção 4.1.4) foi empregado na presente Seção.

5.1.5. Desenvolvimento e otimização do método para determinação de Se em ICP-MS

Para o desenvolvimento e otimização do método de determinação de Se em ICP-MS foi realizado a digestão ácida assistida por radiação micro-ondas (MW-AD) de alguns materiais de referência certificados (CRMs). Os CRMs escolhidos foram: TORT-2 (hepatopâncreas de lagosta), DORM-4 (proteína de peixe) e DOLT-5 (fígado de cação).

Na digestão ácida assistida por radiação micro-ondas, as amostras dos CRMs foram pesadas (200 mg) e digeridas, em triplicata, em frascos fechados com 6 mL de solução de ácido nítrico 7 mol L^{-1} subdestilado e 2 mL de peróxido de hidrogênio (30% v v⁻¹), empregando o mesmo programa de aquecimento mostrado na Seção 5.1.3. Após a digestão, as amostras e os brancos foram transferidos para balões volumétricos, e seus volumes ajustados quantitativamente para 25 mL com água deionizada, conforme metodologia proposta por Gonzalez et al. (2009).

Foram avaliados os parâmetros de desempenho linearidade, faixa de trabalho, limite de detecção e quantificação, vazão de gás hélio na cela de colisão, recuperação e precisão, e assim por meio da análise dos materiais de referência certificado foi possível determinar o melhor parâmetro de operação do ICP-MS para as determinações de selênio nas amostras biológicas.

5.2. Resultados e discussão

5.2.1. Ensaios de toxicidade aguda com Se(IV)

O ensaio de toxicidade aguda foi de fundamental importância para o nosso trabalho, pois a partir do valor da LC₅₀ os ensaios antagônicos entre as espécies inorgânicas de As e a espécie de selênio tetravalente foram realizados, com um valor inferior ao determinado pela LC₅₀.

Inicialmente foram realizados pré-testes com concentrações limites de soluções nominais de 100, 50 e 10 mg L⁻¹ de selênio tetravalente a fim de avaliar se a concentração letal média (LC₅₀), isto é, a concentração da dose letal capaz de provocar a morte de

metade da população em estudo. Como resultado dos pré-testes, houve a morte de todos os indivíduos expostos, pode-se concluir que a LC_{50} seria inferior à 10 mg L^{-1} , o que já era esperado pelos estudos de Ranzani-Paiva et. al (2011).

Após a realização dos pré-testes, o ensaio de toxicidade aguda foi conduzido. O ensaio teve a duração de 7 dias, e as primeiras mortes ocorreram somente após as 72 horas iniciais. O ensaio está mostrado na Figura 19 e a porcentagem cumulativa de morte em cada grupo está representada na Tabela 10.

Figura 19 - Ensaio de toxicidade aguda



Fonte: autoria própria.

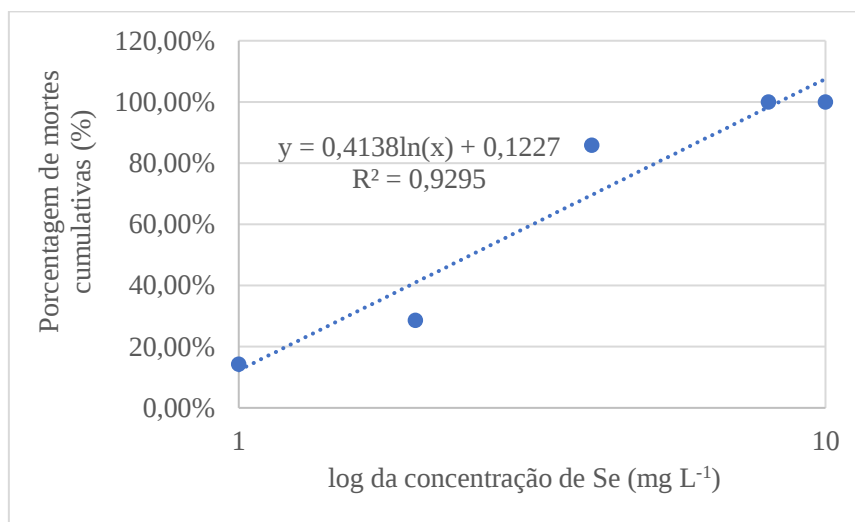
Tabela 10 - Porcentagem de mortes cumulativas a cada 24 horas

	24 h	48h	72h	96h	120h	144h	168h
Controle (%)	-	-	-	-	-	-	-
1 mg L⁻¹ (%)	-	-	-	-	-	-	14,3
2 mg L⁻¹ (%)	-	-	-	14,3	28,6	28,6	28,6
4 mg L⁻¹ (%)	-	-	-	14,3	71,5	85,8	85,8
8 mg L⁻¹ (%)	-	-	28,6	57,2	71,5	100	100
10 mg L⁻¹ (%)	-	-	28,6	28,6	42,9	85,8	100

Ao final do ensaio de toxicidade aguda a quantidade de tilápias mortas foram contabilizadas e os dados da porcentagem de mortes cumulativas e as concentrações

foram utilizadas para o cálculo da LC_{50} pelo método gráfico. Para a determinação da LC_{50} foi plotado o logaritmo da concentração (eixo x) pela porcentagem cumulativa de mortes (eixo y), onde, através da equação da reta, foi possível encontrar o valor da concentração quando for constatada a morte de 50% da população estudada, conforme mostrado na Figura 20.

Figura 20 - Gráfico para a LC_{50} para o selênio tetravalente



Fonte: autoria própria.

Substituindo o valor de y como 50%, o valor da LC_{50} pode ser obtido isolando o x, como mostrado na Equação 3, onde o valor de 50% representa metade da população, que é substituído por $\frac{1}{2}$.

$$x = e^{\frac{50\% - 0,1227}{0,4138}} = e^{\frac{(1/2) - 0,1227}{0,4138}} = 2,49 \text{ mg L}^{-1} \quad (\text{Equação 3})$$

A concentração letal de selênio tetravalente capaz de causar a morte de metade da população em estudo após 168 horas (7 dias) de exposição foi $2,49 \text{ mg L}^{-1}$. Assim, foi utilizada uma dose de 1 mg L^{-1} de Se(IV) nos ensaios antagônicos, o que não causaria a morte da população de tilápia do Nilo durante o ensaio.

Na literatura existem poucos trabalhos que relatam a toxicidade aguda do Se em peixes, especialmente em tilápias do Nilo. Ranzani-Paiva et al. (2011), determinaram a

LC₅₀ de selênio tetravalente em alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e como resultado obtiveram o valor de 4,42 mg L⁻¹ para um período de exposição de 96 horas.

5.2.2. Desenvolvimento e otimização do método para a determinação de Se em ICP-MS

Para a determinação do Se, a utilização da célula de colisão é de extrema importância por conta da presença de interferentes, principalmente a do gás argônio ($\text{Ar}^{40}\text{-Ar}^{40} - m/z = 80$), que é utilizado como gás de formação do plasma e de introdução de amostra. O selênio apresenta 6 isótopos estáveis (74, 76, 77, 78, 80 e 82), enquanto o argônio apenas 3 (36, 38 e 40), sendo o isótopo 40 o mais abundante (99,6%). O isótopo 80 do selênio sofre grande interferência do gás argônio, uma vez que possuem a mesma relação massa/carga do interferente $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$. Os outros isótopos do selênio também sofrem diversas interferências, as quais podem ser vistas na Tabela 11.

Tabela 11 - Principais interferentes dos isótopos de selênio

Isótopos	Abundância (%)	Principais interferentes
⁷⁴ Se	0,89	³⁷ Cl ³⁷ Cl ⁺ , ³⁶ Ar ³⁸ Ar ⁺ , ³⁸ Ar ³⁶ S ⁺ , ⁴⁰ Ar ³⁴ S ⁺
⁷⁶ Se	9,37	⁴⁰ Ar ³⁶ Ar ⁺ , ³⁸ Ar ³⁸ Ar ⁺
⁷⁷ Se	7,63	⁴⁰ Ar ³⁷ Cl ⁺ , ³⁶ Ar ⁴⁰ Ar ¹ H ⁺ , ³⁸ Ar ² 1H ⁺ , ¹² C ¹⁹ F ¹⁴ N ¹⁶ O ² +
⁷⁸ Se	23,77	⁴⁰ Ar ³⁸ Ar ⁺ , ³⁸ Ar ⁴⁰ Ca ⁺
⁸⁰ Se	49,61	⁴⁰ Ar ² , ³² S ¹⁶ O ³ +
⁸² Se	8,73	¹² C ³⁵ Cl ² +, ³⁴ S ¹⁶ O ³ +, ⁴⁰ Ar ² 1H ² +

Fonte: Adaptado de Batista, 2009.

Uma outra possibilidade para reduzir interferências isobáricas ou poliatômicas é a utilização de equações matemáticas pré-definidas pelo próprio software do equipamento ou o analista pode inserir a equação desejada para a análise (DENADAI, 2019).

O desenvolvimento da metodologia foi iniciado com a digestão ácida assistida por radiação micro-ondas dos materiais de referência certificados TORT-2 (hepatopâncreas de lagosta), DORM-4 (proteína de peixe) e DOLT-5 (fígado de cão) para avaliação da exatidão do método analítico. Os valores certificados para o selênio nos CRMs digeridos são $5,63 \pm 0,67$; $3,56 \pm 0,34$ e $8,3 \pm 1,8$ mg kg⁻¹, respectivamente.

A otimização do método de análise em ICP-MS foi realizada pela determinação da concentração de selênio total dos três CRMs nos dois modos de operação do equipamento (modo padrão e KED), a fim de se obter os resultados mais exatos possíveis dentro da faixa de desvio padrão dos CRMs. No modo padrão foram testadas três equações matemáticas (Tabela 12) com intuito de se avaliar a correção dos possíveis interferentes presentes nas amostras, além do modo padrão sem correções. No modo KED foram testadas diferentes vazões de gás hélio (2 – 5 mL min⁻¹) na cela de colisão para avaliar os níveis de correção e a perda de sensibilidade.

Tabela 12 - Equações matemáticas de correção para o Se

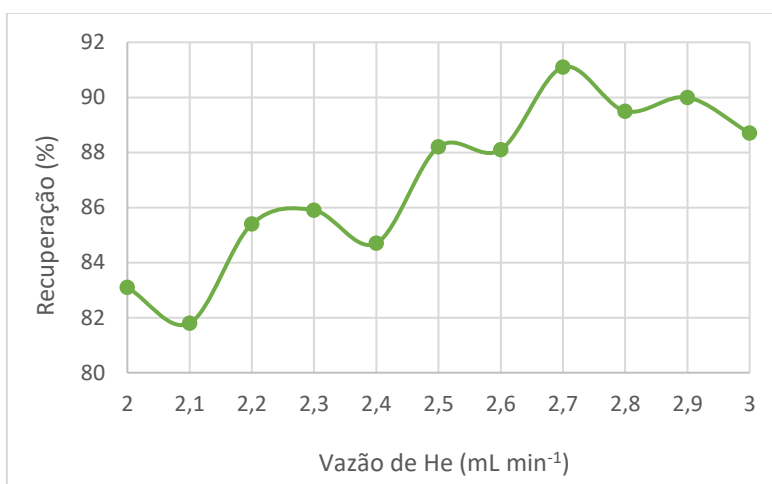
Isótopos	Equações matemáticas de correção
⁷⁸ Se	$-0,198433.Kr^{83}$
⁸⁰ Se	$-1,007833.Kr^{83}$
⁸² Se	$-0,030461.Kr^{83}$

Foi preparada uma curva analítica com 8 concentrações crescentes de selênio (0,5 – 50 µg L⁻¹) em meio de HNO₃ 1% (v v⁻¹) e cada condição instrumental foi testada. Inicialmente foi realizado a análise no modo padrão sem o uso das equações matemáticas e um estudo preliminar com a célula de colisão (KED), na qual foi variado o fluxo de gás hélio de 2 a 5 mL min⁻¹ em intervalos de 0,5 mL min⁻¹, para o ⁷⁸Se, ⁸⁰Se e ⁸²Se. No modo padrão foi possível observar que as curvas analíticas de todos os isótopos estudados não obtiveram um coeficiente de determinação satisfatório ($R^2 \geq 0,99$), o que refletiu em valores de recuperação dos CRMs muito abaixo ou acima do que seria considerado aceitável (80 e 120%).

No modo KED, para o isótopo ^{82}Se , todas as vazões testadas obtiveram coeficientes de determinação menores que 0,99. Para os isótopos ^{78}Se e ^{80}Se foram obtidas curvas analíticas com coeficientes de determinação aceitáveis ($R^2 \geq 0,99$) entre as vazões de hélio 2 – 3 mL min $^{-1}$ e 4 – 4,5 mL min $^{-1}$, respectivamente. Assim, um estudo adicional foi realizado reduzindo o intervalo da vazão de gás hélio para 0,1 mL min $^{-1}$.

Para o ^{78}Se , todas as curvas analíticas obtiveram $R^2 \geq 0,99$ e também foi observado uma tendência de aumento no valor da recuperação dos CRMs com o aumento do fluxo de gás hélio, conforme pode ser visto na Figura 21, que mostra a tendência de recuperação *versus* a vazão do gás hélio utilizada durante as análises para o CRM TORT-2.

Figura 21 - Tendência de recuperação versus vazão de He utilizada nas análises de ^{78}Se para o CRM TORT-2



Fonte: Autoria própria.

Para o ^{80}Se , apenas as vazões de 4,0 e 4,2 mL min $^{-1}$ de gás hélio obtiveram $R^2 \geq 0,99$, no entanto as recuperações dos CRMs foram abaixo de 60%.

Como citado anteriormente, para o ^{82}Se , as vazões testadas entre 2,0 a 5,0 mL min $^{-1}$ de hélio obtiveram curvas de calibração com coeficientes de determinação menores que 0,99, então um segundo estudo foi realizado, onde variou-se a vazão de hélio entre 5,0 a 7,0 mL min $^{-1}$, com um intervalo de 0,5 mL min $^{-1}$, sendo 7,0 mL min $^{-1}$ de He a vazão máxima que pode ser utilizada no equipamento. No entanto, nenhuma vazão se mostrou

eficiente para a determinação de selênio, tanto para os coeficientes de determinação, quanto para os valores de recuperação dos CRMs.

Em um outro momento da etapa de otimização da metodologia, um novo estudo foi conduzido, abrangendo todas as possibilidades, com o modo padrão e KED, utilizando ou não o uso das equações matemáticas. No modo KED, a vazão de hélio utilizada variou de 0,5 até 5 mL min⁻¹, com variação de 0,5 mL min⁻¹.

Para o ⁷⁸Se, no modo padrão, em ambas condições, foram obtidas curvas de calibração com coeficientes de determinação maiores que 0,99, no entanto as recuperações dos CRMs foram abaixo de 70%. No modo KED, em ambas as condições, foram obtidas curvas analíticas com $R^2 \geq 0,99$, entretanto as recuperações dos materiais de referência ficaram muito abaixo ou acima do que é considerado aceitável (80-120%).

Para o ⁸⁰Se no modo padrão, em ambas condições, as interferências do dímero de argônio ($m/z = 80$), foram suficientes para que as curvas analíticas não apresentassem coeficientes de determinação satisfatórios, bem como as recuperações dos materiais de referência. No modo KED, com o uso ou não da equação matemática, algumas vazões apresentaram coeficientes de determinação aceitáveis, porém as recuperações dos CRMs estavam fora dos parâmetros aceitáveis.

Para o ⁸²Se no modo padrão, em ambas as condições foram obtidas curvas analíticas com $R^2 \geq 0,99$ e recuperação dos CRMs aceitáveis, variando na faixa de 76 a 92%. No modo KED, em ambas condições, os coeficientes de determinação foram maiores que 0,99 até a vazão de 3 mL min⁻¹, entretanto as recuperações dos materiais de referência foram satisfatórias entre 1 e 1,5 mL min⁻¹, utilizando o modo KED com equação de correção (106 a 120% de recuperação). Assim, um ajuste fino com variações menores nos fluxos de gás hélio (de 0,1 mL min⁻¹) foi aplicado para o ⁸²Se entre as vazões 1,0 e 1,5 mL min⁻¹ com o uso de equação de correção para a otimização do último parâmetro instrumental para a determinação de Se em ICP-MS.

Por fim, os resultados mostraram uma tendência de aumento no valor da recuperação dos CRMs com o aumento do fluxo de gás hélio, e, portanto, a vazão de 1,5 mL min⁻¹ para o ⁸²Se, com o uso de equação de correção, foi escolhida para realizar a análise de determinação de Se nas amostras biológicas provenientes dos ensaios antagônicos.

5.2.3. Avaliação dos efeitos antagônicos entre As e Se

Os ensaios antagônicos entre as espécies inorgânicas de As e a espécie tetravalente de Se com tilápias do Nilo em concentrações pré-definidas avaliaram o efeito protetor do Se sobre a toxicidade do As nos processos de bioacumulação.

As concentrações de As e Se no início dos ensaios foram determinadas pela coleta de pequenas alíquotas de água para análise em ICP-MS. As concentrações médias de As foram $5,20 \pm 0,07 \text{ mg L}^{-1}$ e $10,1 \pm 0,03 \text{ mg L}^{-1}$, enquanto a concentração média de Se foi $1,11 \pm 0,15 \text{ mg L}^{-1}$. As concentrações de As e Se na água dos grupos controles estavam abaixo dos limites de quantificação para determinação por ICP-MS ($1,6 \times 10^{-4} \text{ mg L}^{-1}$ e $1,2 \times 10^{-4} \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente).

As concentrações de arsênio e selênio nos diferentes tecidos estudados após o ensaio antagônico com As(III) e Se(IV) são apresentadas nas Tabelas 13 e 14, respectivamente.

Tabela 13 - Concentração de As total ($\mu\text{g g}^{-1}$) nos diferentes tecidos estudados após exposição a As(III) e Se(IV) (n = 3, $\pm$ SD)

Grupos	Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$)			
	Fígado	Estômago	Brânquias	Músculo
Controle	$0,02 \pm 0,005$	$0,10 \pm 0,035$	$0,11 \pm 0,007$	$0,05 \pm 0,003$
5 mg L⁻¹ (Dia 1)	$2,12 \pm 0,03$	$2,50 \pm 0,002$	$0,83 \pm 0,03$	$0,73 \pm 0,02$
10 mg L⁻¹ (Dia 1)	$3,14 \pm 0,007$	$2,64 \pm 0,001$	$0,95 \pm 0,1$	$0,89 \pm 0,007$
5 mg L⁻¹ (Dia 7)	$3,22 \pm 0,001$	$3,01 \pm 0,24$	$1,34 \pm 0,008$	$0,95 \pm 0,02$
10 mg L⁻¹ (Dia 7)	$5,55 \pm 0,48$	$11,7 \pm 0,004$	$3,43 \pm 0,45$	$3,03 \pm 0,05$

Tabela 14 - Concentração de Se ($\mu\text{g g}^{-1}$) nos diferentes tecidos estudados após exposição a As(III) e Se(IV) ($n = 3, \pm \text{SD}$)

Grupos	Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$)			
	Fígado	Estômago	Brânquias	Músculo
Controle	$0,02 \pm 0,0004$	$0,11 \pm 0,03$	$0,06 \pm 0,007$	$0,02 \pm 0,005$
5 mg L⁻¹ (Dia 1)	$1,79 \pm 0,003$	$3,07 \pm 0,001$	$2,10 \pm 0,104$	$0,35 \pm 0,002$
10 mg L⁻¹ (Dia 1)	$1,53 \pm 0,03$	$2,17 \pm 0,001$	$1,97 \pm 0,180$	$0,28 \pm 0,12$
5 mg L⁻¹ (Dia 7)	$4,22 \pm 0,01$	$3,90 \pm 0,08$	$3,00 \pm 0,004$	$1,36 \pm 0,02$
10 mg L⁻¹ (Dia 7)	$3,55 \pm 0,16$	$7,39 \pm 0,001$	$3,70 \pm 0,295$	$1,57 \pm 0,03$

Comparando os resultados obtidos no ensaio controlado com As(III) (Tabela 5) com os dados obtidos no ensaio antagônico com As(III) e Se(IV) (Tabela 13), ficou evidente que os valores de As diminuíram em todos os tecidos estudados, para as diferentes concentrações e períodos de exposição. O maior efeito observado foi no fígado, principal órgão metabolizador de As, para exposição a 10 mg L^{-1} durante 1 e 7 dias, com reduções de concentração de aproximadamente 6 e 4 vezes, respectivamente, indicando o efeito protetor do selênio contra a toxicidade do arsênio.

As concentrações de arsênio e selênio nos diferentes tecidos estudados após o ensaio antagônico com As(V) e Se(IV) são apresentadas nas Tabelas 15 e 16, respectivamente.

Tabela 15 - Concentração de As total ($\mu\text{g g}^{-1}$) nos diferentes tecidos estudados após exposição a As(V) e Se(IV) ($n = 3, \pm \text{SD}$)

Grupos	Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$)			
	Fígado	Estômago	Brânquias	Músculo
Controle	$0,02 \pm 0,005$	$0,10 \pm 0,03$	$0,11 \pm 0,006$	$0,05 \pm 0,0004$
5 mg L⁻¹ (Dia 1)	$0,68 \pm 0,01$	$1,11 \pm 0,001$	$0,81 \pm 0,03$	$0,30 \pm 0,02$
10 mg L⁻¹ (Dia 1)	$2,21 \pm 0,11$	$2,63 \pm 0,0002$	$0,95 \pm 0,01$	$0,89 \pm 0,005$
5 mg L⁻¹ (Dia 7)	$3,22 \pm 0,02$	$3,02 \pm 0,23$	$1,34 \pm 0,01$	$0,91 \pm 0,02$
10 mg L⁻¹ (Dia 7)	$5,54 \pm 0,47$	$9,48 \pm 0,0003$	$3,43 \pm 0,45$	$3,03 \pm 0,07$

Tabela 16 - Concentração de Se ($\mu\text{g g}^{-1}$) nos diferentes tecidos estudados após exposição a As(V) e Se(IV) ($n = 3, \pm \text{SD}$)

Grupos	Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$)			
	Fígado	Estômago	Brânquias	Músculo
Controle	$0,02 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,01$
5 mg L⁻¹ (Dia 1)	$2,74 \pm 0,02$	$3,08 \pm 0,001$	$2,11 \pm 0,04$	$0,36 \pm 0,01$
10 mg L⁻¹ (Dia 1)	$1,57 \pm 0,02$	$2,21 \pm 0,002$	$1,95 \pm 0,13$	$0,31 \pm 0,01$
5 mg L⁻¹ (Dia 7)	$4,38 \pm 0,07$	$3,98 \pm 0,11$	$3,09 \pm 0,07$	$1,40 \pm 0,02$
10 mg L⁻¹ (Dia 7)	$3,72 \pm 0,15$	$6,12 \pm 0,002$	$3,86 \pm 0,39$	$1,61 \pm 0,002$

Comparando os resultados obtidos no ensaio controlado com As(V) (Tabela 6) com os dados obtidos no ensaio antagonístico com As(V) e Se(IV) (Tabela 15), observou-se também a redução da concentração de As total nos diferentes tecidos estudados, em diferentes concentrações e períodos de exposição. O maior efeito observado também foi no fígado, assim como no ensaio antagonístico com As(III) e Se(IV), com redução da concentração em aproximadamente 5 vezes para a exposição de 5 mg L⁻¹ durante 7 dias.

Pela análise descritiva, para ambos os ensaios antagonísticos com As inorgânico e Se(IV), os níveis de bioacumulação de Se estavam na seguinte ordem: estômago > fígado

> brânquias > músculo. Não há relatos na literatura científica que explique o motivo pelo qual o selênio se acumula majoritariamente no estômago, ao invés do fígado, que é reconhecidamente como o tecido que mais bioacumula contaminantes.

Vários mecanismos responsáveis pelas interações entre Se e As foram sugeridos. Um mecanismo direto para sua desintoxicação mútua é pela formação do complexo arsênio-glutationa. O Se(IV) é rapidamente absorvido e convertido em seleneto de hidrogênio (HSe^-), enquanto na presença de As(III) e GSH reduzido, o íon seleno-bis(S-glutationil) arsínio ($[(\text{GS})_2\text{AsSe}]^-$) é formado. Estudos identificaram esse complexo na bile de animais de laboratório co-tratados com As(III) e Se(IV), conforme confirmado por espectroscopia de raios X, fornecendo uma base molecular para a interação antagônica entre essas duas espécies (GAILER et al., 2000; GAILER, 2009; GEORGE et al., 2016).

5.3. Conclusão

Nesta seção foi proposta a realização de ensaios antagônicos com o As inorgânico e o selênio tetravalente (Se(IV)), a fim de verificar os efeitos protetores do selênio sobre a toxicidade do As durante o processo de bioacumulação nas tilápias do Nilo. A adição da dose de 1 mg L^{-1} de Se(IV) as tilápias do Nilo expostas ao As(III) e (V), nas concentrações de 5 e 10 mg L^{-1} mostrou uma redução de 4-6 vezes na acumulação de As nos diferentes tecidos estudados. Sendo assim, o selênio atua como um químico do As.

6. AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO EM TILÁPIAS DO NILO EXPOSTAS AO ARSÊNIO INORGÂNICO

Nesta seção é apresentada a avaliação dos efeitos no fígado, estômago, brânquias e músculo da tilápia do Nilo (*O. niloticus*) em termos de estresse oxidativo, por meio das análises das atividades enzimáticas de CAT, GPx, GST, GR e também os níveis de biomoléculas oxidadas (TBARS), nas amostras provenientes dos ensaios de bioacumulação e biotransformação com As(III) e (V) em diferentes concentrações (5,0 e 10 mg L⁻¹) no tempo de exposição de 7 dias. Vale destacar, que os resultados apresentados nessa Seção foram redesenhados, por meio de análises univariadas, para o melhor entendimento e avaliação das respostas dos diferentes biomarcadores utilizados no estudo, para que no futuro esses dados sejam publicados em uma revista científica. Essa etapa do trabalho contou com a colaboração da Profa. Dra. Juliane Silberschmidt Freitas, da UNESP, câmpus de Bauru.

6.1. Materiais e métodos

6.1.1. Análises bioquímicas

6.1.1.1. Preparo das amostras para a análise das enzimas CAT, GPx, GST e GR

Os tecidos de interesse (fígado, estômago, brânquias e músculo) foram pesados e homogeneizados em uma proporção 1:4 (massa: volume) empregando solução tampão de Tris-HCl 0,2 mmol L⁻¹ de pH 7,5 (20 mmol L⁻¹ de Tris-HCL; 1 mmol L⁻¹ de EDTA; 1 mmol L⁻¹ de DL-Ditiotreitol (DTT); 0,5 mol L⁻¹ de sacarose; 0,15 mol L⁻¹ de KCl contendo 1 mmol L⁻¹ de inibidor de protease (PMSF). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 20 minutos a 2 °C, e a porção sobrenadante foi coletada e submetida a uma nova etapa de centrifugação por uma hora a 50.000 g a 1 °C para obter a fração citosólica e microssomal. O sobrenadante foi coletado, separado em pequenas alíquotas e congelado à -80 °C para as análises das enzimas CAT, GPx, GST e GR.

6.1.1.2. Análise da atividade da CAT

A atividade da CAT foi determinada pelo método proposto por Beutler (1975), quantificando a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima, por meio do decréscimo de absorbância em 240 nm a 30°C. A diminuição na absorbância foi medida utilizando uma cubeta contendo o meio reacional (H_2O_2 10 mmol L⁻¹, Tris 1 mol L⁻¹ e EDTA 5 mmol L⁻¹ em pH 8,0) e a amostra (homogeneizado) preparada conforme o item 6.1.1.1.

6.1.1.3. Análise da atividade da GPx

A atividade da GPx foi determinada pelo método proposto por Sies et al. (1979) por meio do decréscimo da absorbância em 340 nm durante a redução da glutatona oxidada (GSSG), catalisada pela glutatona redutase (GR) na presença de NADPH à 30 °C. O meio de reação utilizado continha a solução tampão de fosfato 0,1 mol L⁻¹, EDTA 5 mmol L⁻¹, pH 7,0, NADPH 20 mmol L⁻¹, GR 0,1 U mL⁻¹ e glutatona reduzida 0,1 mol L⁻¹.

6.1.1.4. Análise da atividade da GST

A atividade da GST foi determinada pelo método proposto por Keen, Habig e Jakoby (1976), que mede a atividade da GST através da conjugação de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com a glutatona reduzida (GSH), que produz um tioéter de dinitrofenilo que é detectado espectrofotometricamente em 340 nm e a taxa de aumento da absorbância é diretamente proporcional à atividade de GST. A amostra foi adicionada a um meio reacional contendo tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 6,5, CDBN 100 mmol L⁻¹ e GSH 100 mmol L⁻¹.

6.1.1.5. Análise da atividade da GR

A atividade de GR foi determinada pelo método proposto por Carlberg e Mannervik (1985), na qual o consumo do NADPH é estimado através da variação de absorbância no

comprimento de onda em 340 nm a 30 °C, na presença da glutathiona oxidada (GSSG). A GSSG é reduzida à GSH pela glutathiona redutase por meio da oxidação do NADPH e o ensaio enzimático foi realizado em solução tampão fosfato de potássio 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0, EDTA 5 mmol L⁻¹, NADPH e GSSG 2 mol L⁻¹.

6.1.1.6. Análise das proteínas totais

Para o cálculo das atividades enzimáticas (CAT, GPx, GST e GR) foi necessário realizar a quantificação de proteína em cada amostra, que foi determinada pelo método proposto por Bradford (1976), que utiliza albumina de soro bovino (BSA) como padrão. Foi preparada uma curva de calibração, de concentração entre 0 - 25 µg de proteína, com o BSA e o reagente de Bradford. Cada ponto da curva de calibração foi incubado no escuro durante 10 minutos, e em seguida, foram analisados no espectrômetro no comprimento de onda em 595 nm. Para a quantificação de proteínas nas amostras foram adicionados 495 µL de reagente de Bradford em um eppendorf e 5 µL da amostra, os quais também foram incubados no escuro por 10 minutos antes da leitura.

6.1.1.7. Quantificação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Os níveis de biomoléculas oxidadas foram determinados medindo o produto a partir da combinação do malondialdeído (MDA) com o ácido tiobarbitúrico (TBA) de acordo com o método adaptado por Almeida et al. (2004), em que 50 mg de tecido foi homogeneizado em 300 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0. Em seguida, 400 µL de ácido fosfórico (0,1%) e 100 µL de TBA foram adicionados à amostra. A mistura reacional foi aquecida a 90 °C por 40 minutos e o derivado colorido foi então extraído com 1 mL de butanol e quantificado espectrofotometricamente em 532 nm, em função de uma curva de calibração padrão de MDA previamente preparada com o mesmo procedimento utilizado para as amostras.

6.1.2. Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada em grupos de cinco animais usando o software *Statistica 12.0* (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA), enquanto os gráficos foram realizados usando *GraphPad Prism* versão 5.01 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). A normalidade dos dados foi avaliada por Normal Probability Plots of Residuals. Foi adotado os modelos lineares gerais (GLM) com teste ANOVA one-way, seguido pelo post hoc Tukey HSD. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM) de seus valores biológicos e consideramos $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

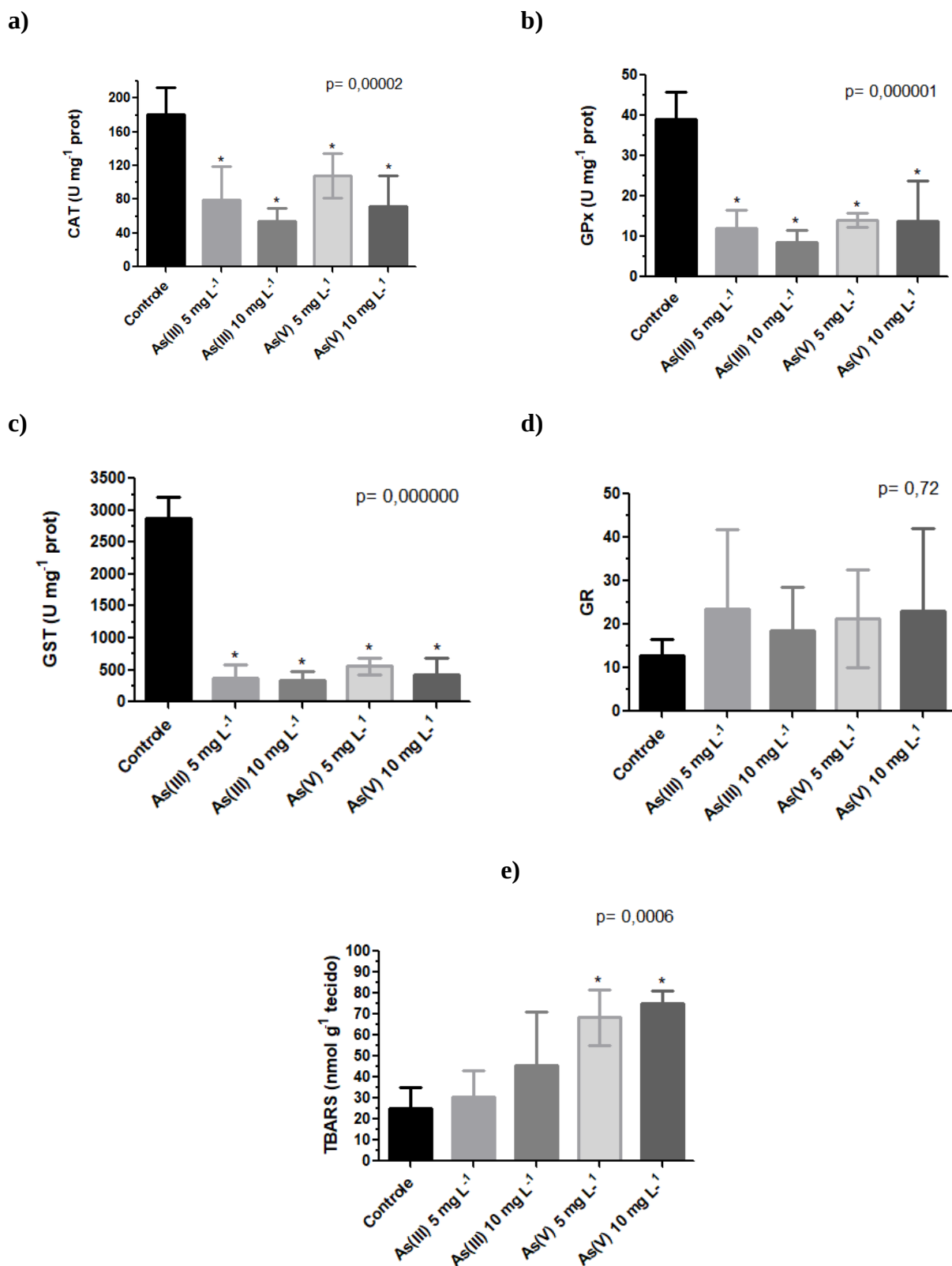
6.2. Resultados e discussão

As enzimas CAT, GPx, GST e GR são biomarcadores bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo, que é gerado quando o indivíduo é exposto a algum tipo de contaminante. No caso, quando as tilápias do Nilo são expostas ao arsênio (As (III) e (V)), espera-se que este seja metabolizado, e então ocorra um escape de espécies reativas, gerando intermediários oxidantes que por sua vez, geram uma cascata oxidativa refletindo na indução das enzimas antioxidantes, e por consequência ocorra um aumento na oxidação de biomoléculas.

De acordo com os resultados obtidos nas análises bioquímicas, no geral, todos os tecidos estudados exibiram alterações nas atividades de suas enzimas quando expostos ao As(III) e/ou As(V) após sete dias.

No fígado das tilápias do Nilo, foi observado uma redução na atividade das enzimas CAT ($p < 0,0001$), GPx ($p < 0,0001$) e GST ($p < 0,0001$), em ambos os tratamentos com As(III) e As(V) após 7 dias de exposição, como pode ser visto na Figura 22. A atividade da GR não foi alterada por nenhum dos tratamentos ($p = 0,72$). Nos tratamentos com As(V) ($p = 0,0016$), mas não com As(III) ($p = 0,23$), foi observado ainda um aumento nos níveis de TBARS, o que pode indicar a ocorrência de oxidação de biomoléculas no tecido hepático dos animais expostos ao As(V).

Figura 22 – Atividade das enzimas CAT, GPx, GST, GR e níveis de TBARS no fígado de *O. niloticus* expostos por 7 dias ao As(III) e (V)



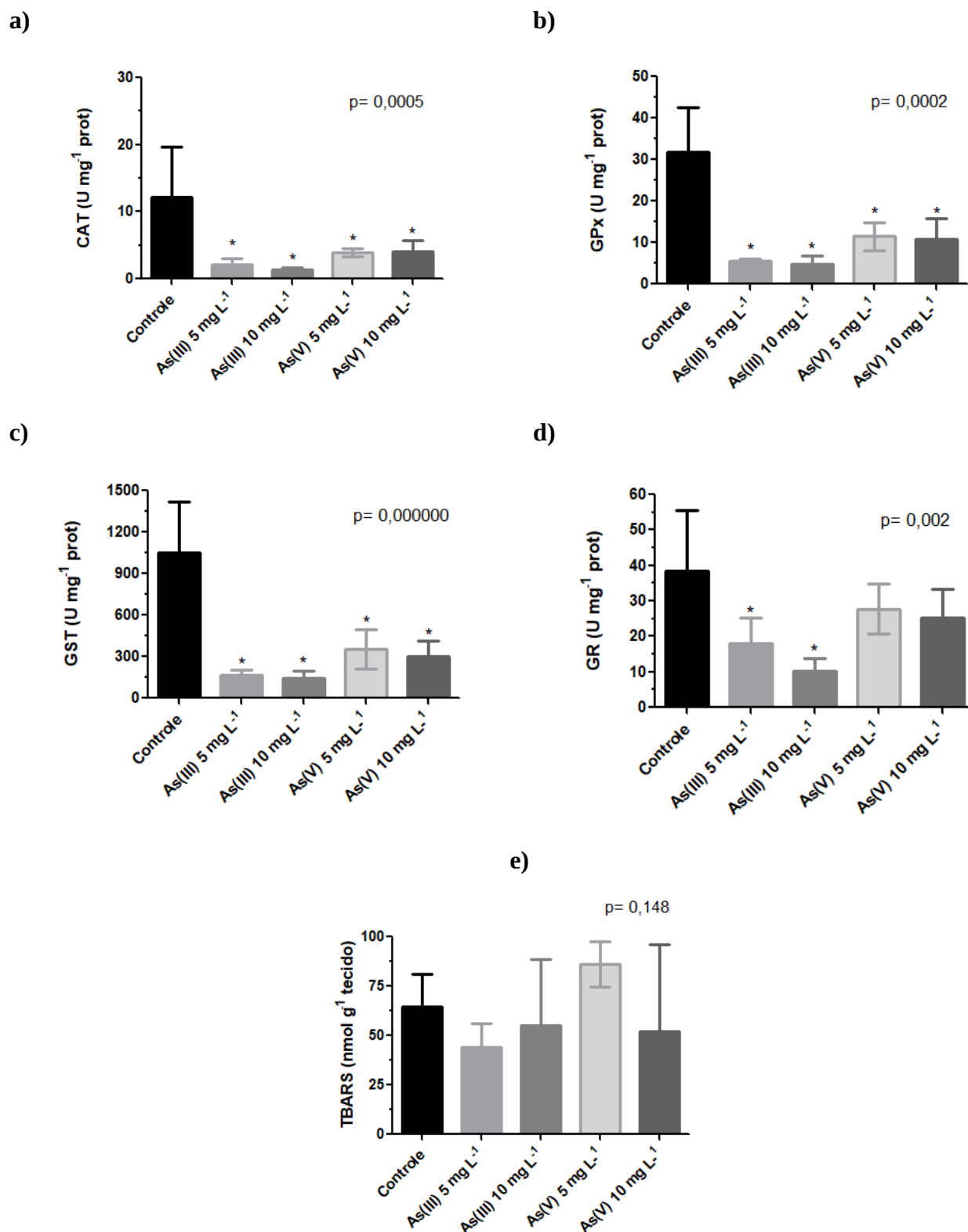
a) CAT; b) GPx; c) GST; d) GR; e) TBARS. Os valores foram expressos em média $\pm$ SEM; n=5. Modelos lineares gerais (GLM). (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

Os resultados apontam que os tratamentos com As(III) em ambas as concentrações, 5 e 10 mg L⁻¹, reduziram as atividades de todas as enzimas antioxidantes CAT (p=0,0005), GPx (p=0,0002), GST (p<0,0001) e GR (p=0,002) no estômago das tilápias do Nilo. Os tratamentos com As(V) também diminuíram as atividades enzimáticas antioxidantes, com exceção da GR, que não teve alteração em relação ao grupo controle. A atividade da enzima de biotransformação GST foi reduzida por ambos tratamentos com As(III) e As(V) no estômago dos animais (p<0,0001). Observamos que embora todas as enzimas antioxidantes tenham sido reduzidas, incluindo a atividade da GST, não houve sinais de oxidação das biomoléculas no estômago, já que os níveis de TBARS não foram aumentados no órgão (p=0,148), como pode ser visto na Figura 23.

Nas brânquias, foi observado uma redução na atividade da GPx em todos os tratamentos com As(III) e As(V) (p<0,0001), além de uma redução na CAT nos tratamentos com As(III) 10 mg L⁻¹ (p=0,031) e As(V) 5mg L⁻¹ (p=0,048), conforme visto na Figura 24. As enzimas GST (p=0,29) e GR (p=0,13) não foram modificados pelos tratamentos com As(III) e As(V) neste tecido, para o período de exposição estudado.

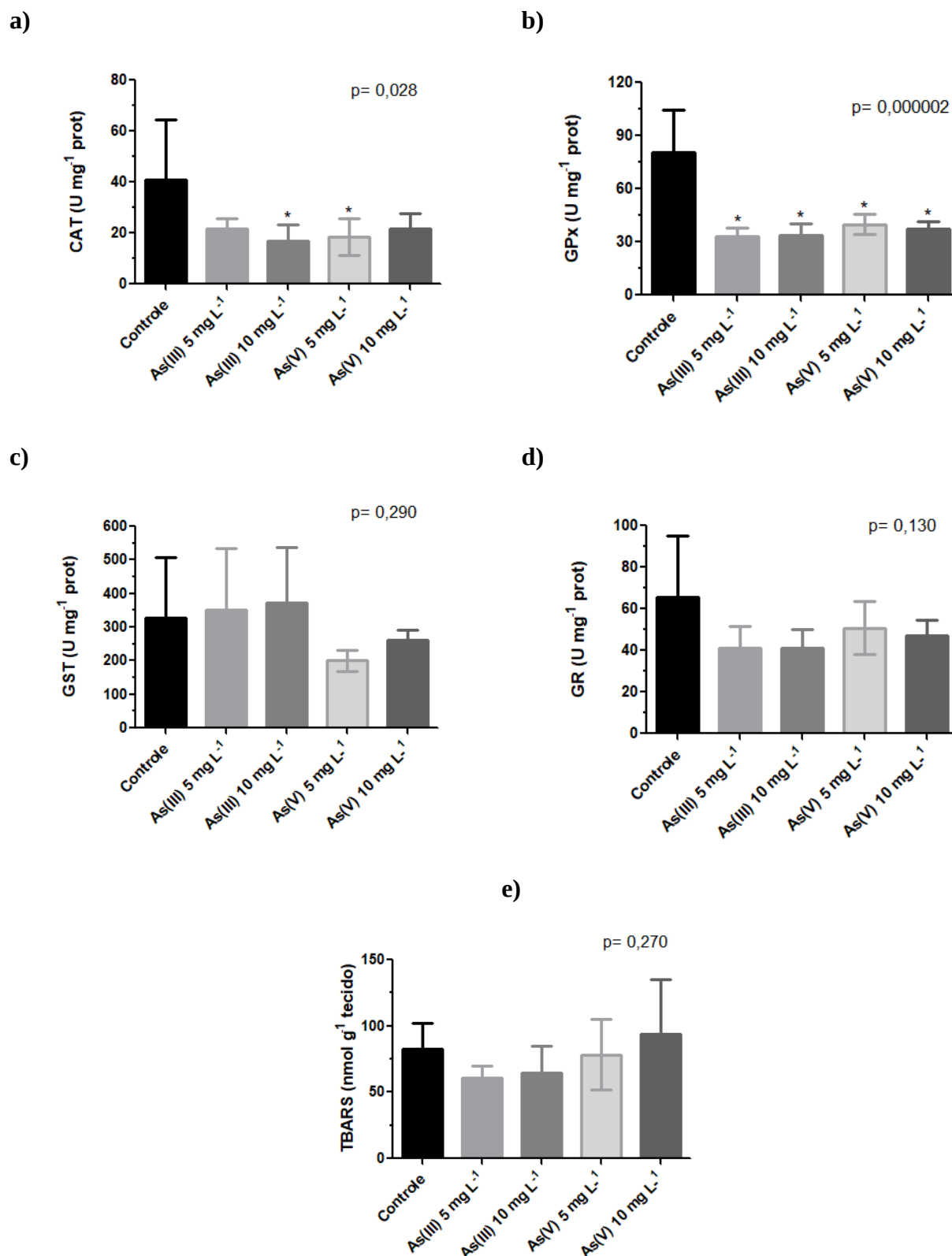
Por fim, o músculo das tilápias do Nilo apresentou um padrão diferente de resposta quando comparado aos demais tecidos. Apenas a enzima antioxidante CAT foi aumentada no tratamento com As(III) 5 mg L⁻¹ (p=0,009). A enzima de biotransformação GST foi reduzida em ambos os tratamentos com As(V), 5 mg L⁻¹ (p=0,011) e 10 mg L⁻¹ (p=0,001), mas não com As(III) (p=0,95). Um aumento na concentração de TBARS também foi observado nas tilápias expostas ao As(V) 5mg L⁻¹ (p=0,0001), que pode ser visto na Figura 25.

Figura 23 - Atividade das enzimas CAT, GPx, GST, GR e níveis de TBARS no estômago de *O. niloticus* expostos por 7 dias ao As(III) e (V)



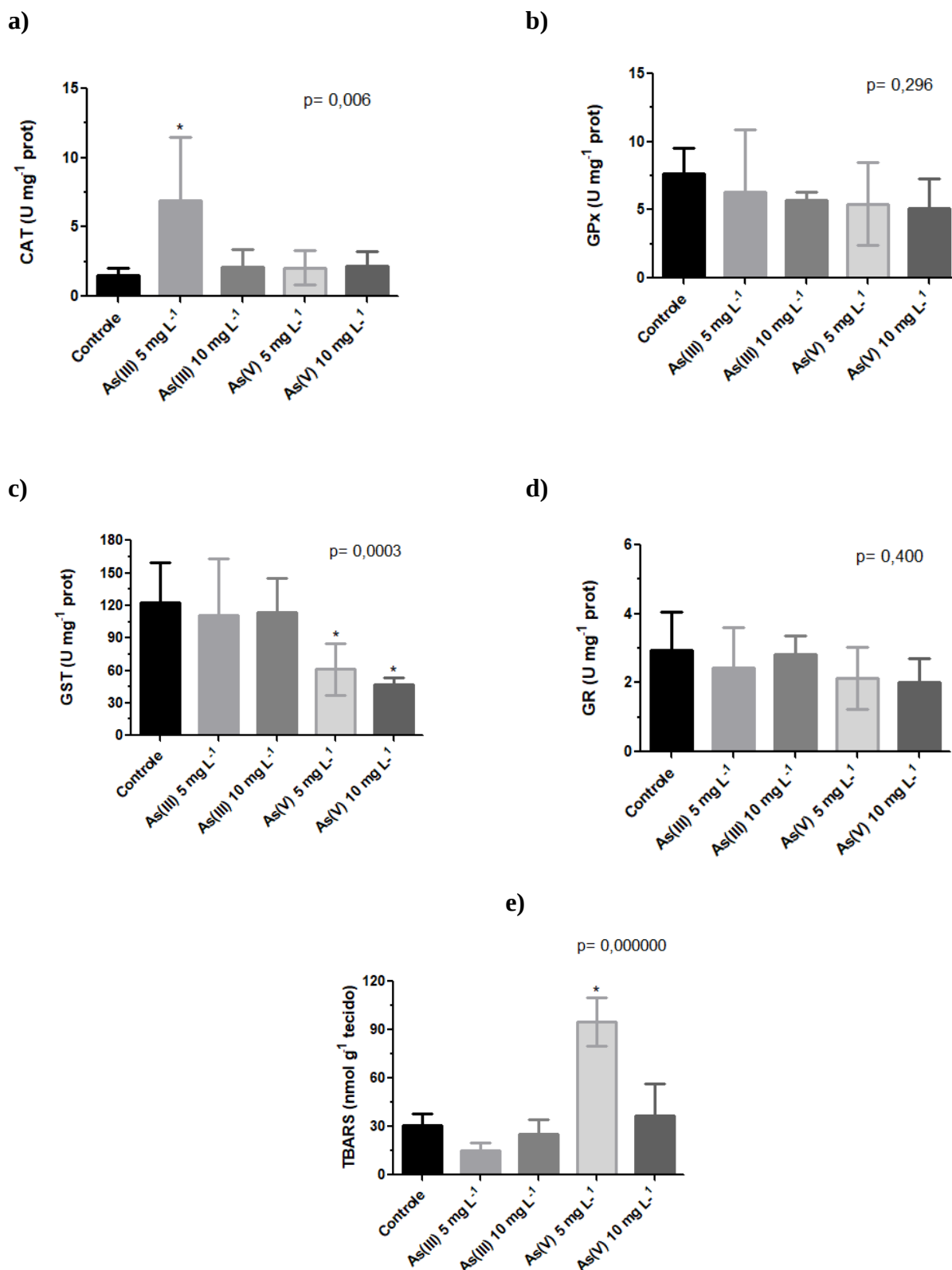
a) CAT; b) GPx; c) GST; d) GR; e) TBARS. Os valores foram expressos em média $\pm$ SEM; n=5. Modelos lineares gerais (GLM). (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

Figura 24 - Atividade das enzimas CAT, GPx, GST, GR e níveis de TBARS nas brânquias de *O. niloticus* expostos por 7 dias ao As(III) e (V)



a) CAT; b) GPx; c) GST; d) GR; e) TBARS. Os valores foram expressos em média $\pm$ SEM; n=5. Modelos lineares gerais (GLM). (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

Figura 25 – Atividade das enzimas CAT, GPx, GST, GR e níveis de TBARS no músculo de *O. niloticus* expostos por 7 dias ao As(III) e (V)



a) CAT; b) GPx; c) GST; d) GR; e) TBARS. Os valores foram expressos em média $\pm$ SEM; $n=5$. Modelos lineares gerais (GLM). (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

Os biomarcadores oxidativos mostraram diferentes respostas no fígado, estômago, brânquias e músculo, demonstrando a especificidade do tecido e a sensibilidade tanto dos mecanismos pró-oxidantes quanto das defesas antioxidantes, conforme pode ser observado na Tabela 17.

Tabela 17 - Efeitos causados pela exposição de 7 dias ao As(III) e As(V) em *O. niloticus* nos diferentes tecidos estudados

Tecido	Biomarcadores	As(III) 5mg L ⁻¹	As(III) 10 mg L ⁻¹	As(V) 5mg L ⁻¹	As(V) 10 mg L ⁻¹
Fígado	TBARS	-	-	▲	▲
	CAT	▼	▼	▼	▼
	GPx	▼	▼	▼	▼
	GST	▼	▼	▼	▼
	GR	-	-	-	-
Estômago	TBARS	-	-	-	-
	CAT	▼	▼	▼	▼
	GPx	▼	▼	▼	▼
	GST	▼	▼	▼	▼
	GR	▼	▼	-	-
Brânquias	TBARS	-	-	-	-
	CAT	-	▼	▼	-
	GPx	▼	▼	▼	▼
	GST	-	-	-	-
	GR	-	-	-	-
Músculo	TBARS	-	-	▲	-
	CAT	▲	-	-	-
	GPx	-	-	-	-
	GST	-	-	▼	▼
	GR	-	-	-	-

O símbolo ▲ indica aumento da resposta do biomarcador em relação ao grupo controle, e ▼ indica a diminuição na resposta do biomarcador em relação ao grupo controle. Os resultados foram baseados na análise GLM ($p < 0.05$). Resultados que tiveram ausência de mudança em relação ao grupo controle estão representados por “-”.

Quando aplicada uma visão geral a respeito dos efeitos bioquímicos causados pelos tratamentos com As(III) e (V) nos diferentes tecidos da tilápia do Nilo, observamos um evidente declínio das atividades antioxidantes da maioria das enzimas estudadas, exceto pela GR, que mostrou uma menor sensibilidade ao As (III) e (V) se comparada às demais vias de defesa antioxidante. Provavelmente, as particularidades fisiológicas e funcionais

apresentadas por cada tecido, bem como o nível de atividade das enzimas disponível em cada um deles, pode ter influenciado o tipo de resposta mais evidente para cada tratamento, quando considerado os biomarcadores estudados.

De acordo com os resultados, observou-se que para a GR, não se obteve efeito significativo com relação ao grupo controle, exceto para o estômago na exposição de As(III) em ambas concentrações, diferentemente dos estudos encontrados na literatura, como por exemplo, no trabalho de Ventura-Lima (2009), que houve diminuição da atividade do GR no fígado de *Cyprinus carpio*, após 2 dias de exposição ao As(III) e (V). A inibição da atividade do GR também foi descrita para o fígado do bagre *Clarias batrachus* após 2 dias de exposição ao As(III) (BHATTACHARYA; BHATTACHARYA, 2007).

Os tecidos com maior atividade da GST (com base nos níveis encontrados nos grupos controles), o fígado e o estômago, apresentaram alta responsividade desta enzima em tilápias do Nilo expostas aos As(III) e (V), com relação ao grupo controle. A GST participa de reações importantes da fase II da biotransformação de compostos químicos, conjugando a glutatona reduzida (GSH) com o xenobiótico ao qual o animal é exposto, tornando-o assim mais solúvel e mais facilmente excretável pelo organismo (DI GIULIO et al., 1989). Um comprometimento das atividades de biotransformação do animal, principalmente em órgãos com grande atividade metabólica e energética, como é o caso do fígado e estômago, pode acarretar tanto em um comprometimento da metabolização de produtos indesejáveis, como o As(III) e (V), quanto no processamento de substâncias com valor nutricional e energético importantes para manutenção das condições vitais dos organismos. Isto pode prejudicar não só aspectos fisiológicos básicos, como a manutenção das condições da homeostase, como também aqueles mais complexos, que dizem respeito à ecologia dos organismos aquáticos, como a busca por presas, fuga de predadores e comportamentos reprodutivos. Algumas isoformas da GST também apresentam atividades de peroxidases, atribuindo a elas funções antioxidantes junto ao sistema de defesa do organismo (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

A atividade da GST tem sido utilizada para avaliar a capacidade de um tecido em metabolizar e biotransformar As e é considerada um bom biomarcador de contaminação aquática (VASKEN APOSHIAN et al., 2004). Nos estudos de Ventura-Lima et al. (2009), os autores investigaram o padrão de acúmulo e metabolismo de As(III) e (V) em

brânquias e fígado de carpa (*Cyprinus carpio*) após um curto período de exposição e realizaram a determinação da atividade de GST. Em outro trabalho, Zhang et al. (2015) avaliaram a biotransformação e desintoxicação de As em ostra (*Saccostrea cucullata*) por um período de exposição de 30 dias, e como resultado, as concentrações de As total e As(III) e (V) foram positivamente correlacionadas com as atividades de glutathione-S-transferase, sugerindo que a GST desempenhou um papel fundamental no processo de biotransformação e desintoxicação do As. No presente estudo, obteve-se níveis reduzidos de GST no fígado e estômago. Essa diminuição relativa na atividade de GST pode estar relacionada a níveis diminuídos de GSH suscetível a ser conjugado.

As enzimas CAT, GPx e GST também tem sido amplamente aplicadas em estudos ambientais, avaliando a toxicidade de diversos contaminantes em organismos aquáticos, incluindo peixes. De forma geral, estas enzimas atuam neutralizando os efeitos das espécies reativas de oxigênio (ERO) produzidas em organismos aeróbicos, especialmente quando os animais são submetidos a condições de estresse. A CAT catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em H_2O e O_2 , neutralizando os efeitos prejudiciais do aumento da produção do peróxido nos organismos (ALMEIDA et al., 2011). Junto à CAT, a GPx também é encarregada de detoxificar os efeitos do H_2O_2 nos tecidos animais, no entanto, utilizando rotas bioquímicas distintas. A atividade GPx depende dos níveis de GSH, que é oxidada, gerando então a GSSG. Para garantir a continuidade das ações enzimáticas antioxidantes dependentes dos níveis de GSH, a GR atua reciclando este importante substrato endógeno, reduzindo a GSSG em GSH a partir da oxidação do NADPH proveniente do ciclo das pentoses.

Nossos resultados mostram que ambas as enzimas CAT e GPx tiveram suas atividades reduzidas nas brânquias, estômago e fígado de *Oreochromis niloticus* expostos ao As(III) e (V) nas concentrações estudadas, indicando um comprometimento na via antioxidante encarregada da degradação do H_2O_2 no organismo. Além disso, a baixa sensibilidade da GR ao As(III) e (V), paralela às diminuições da CAT e GPx, poderia interferir na rota de renovação dos estoques celulares de GSH, um importante peptídeo antioxidante dos animais.

Por fim, observamos que os níveis de TBARS foram aumentados nos tratamentos com As(V), mas não com As(III), podendo indicar uma interação mais agressiva do arsênio pentavalente nos tecidos dos animais (fígado e músculo) quando comparado à forma trivalente. O efeito proeminente observado para ambas as concentrações de As(V)

no fígado também deve indicar um comprometimento funcional neste tecido, que é o principal órgão de metabolização animal. A oxidação de biomoléculas é considerada o maior efeito prejudicial consequente da produção excessiva de ERO (OJHA et al., 2011), uma vez que os danos celulares nas membranas são irreparáveis, levando à injúria celular. O aumento do TBARS no fígado dos animais é consistente com a redução das atividades da CAT, GST, GPx neste órgão, já que a diminuição da ação destas importantes enzimas antioxidantes deve proporcionar um acúmulo de ERO nos peixes sob condições de exposição ao As(V).

Diversos estudos demonstraram aumento nos níveis de oxidação de biomoléculas em organismos aquáticos, os quais foram expostos em altas concentrações de metais. Quando a produção de radicais livres e/ou espécies reativas supera a capacidade de ação dos antioxidantes, isso favorece a oxidação de biomoléculas (lipídios, proteínas e ácido desoxirribonucleico (DNA)), com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático (BARBOSA et al., 2010).

Assim, nossos resultados denotaram diferentes padrões de resposta enzimática antioxidante, sugerindo que o As pode interferir em diferentes vias metabólicas e assim induzir diferentes respostas celulares.

6.3. Conclusão

Nesta seção foi proposta a avaliação dos efeitos agudos no fígado, estômago, brânquias e músculo da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em termos de estresse oxidativo, monitorando as atividades enzimáticas de CAT, GPx, GST, GR e também os níveis de biomoléculas oxidadas, após os ensaios controlados com As (III) e (V) em diferentes concentrações (5,0 e 10 mg L⁻¹) no tempo de exposição de 7 dias. Podemos concluir que os tecidos estudados apresentam diferentes padrões de resposta enzimática, sugerindo que o As pode induzir diferentes respostas em termos de estresse oxidativo e defesas antioxidantes. Em termos gerais, a exposição ao As inorgânico causou um padrão de inibição enzimática, com o declínio das atividades antioxidantes da maioria das enzimas estudadas nos diferentes tecidos da tilápia do Nilo.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) mostrou-se eficiente na determinação de As em tecidos biológicos, apresentando boa exatidão e precisão. A exatidão do método foi confirmada por meio da análise dos CRMs, que apresentaram valores de recuperação na faixa de 81 a 107%. O uso do ICP-MS foi uma boa ferramenta analítica para a determinação de As 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). De acordo com os ensaios toxicológicos com As(III) e (V) nas concentrações de 5 e 10 mg L⁻¹ e tempos de exposição de 1 e 7 dias, as maiores concentrações de As foram determinadas no fígado e estômago, seguidas das brânquias e músculo. As tilápias do Nilo expostas à As(III) apresentaram níveis mais altos de As em todos os tecidos estudados, em comparação com a exposição à As(V).

A combinação das técnicas de cromatografia líquida e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (LC-ICP-MS) foi empregada no método otimizado para especiação de As nas amostras provenientes dos ensaios toxicológicos com As(III) e (V). O método proposto apresentou bons parâmetros analíticos, caracterizado por sua ótima sensibilidade, linearidade e seletividade. Como resultado dos ensaios de biotransformação, as espécies inorgânicas de As foram biotransformadas em formas orgânicas metiladas (MMA e DMA), com subsequente conversão para AsB, espécie predominante de As.

Os ensaios antagônicos entre as espécies inorgânicas de As e a espécie tetravalente de selênio (Se(IV)) com as tilápias do Nilo em concentrações pré-definidas (abaixo do valor da LC₅₀) avaliou o efeito protetor do selênio na toxicidade do As, e mostrou uma redução da toxicidade em 4-6 vezes, indicando que o Se atua como antagonista químico do As. A metodologia para a determinação do Se por ICP-MS para ser aplicada nas amostras provenientes dos ensaios antagônicos foi desenvolvida e otimizada, e as análises foram realizadas no modo KED com a vazão de 1,5 mL min⁻¹ de He para ⁸²Se, com o uso de equação de correção. O método apresentou boa exatidão e precisão, que foi confirmada pela análise dos CRMs, com valores de recuperação na faixa de 76 a 92%.

Por fim, pela avaliação dos biomarcadores de contaminação aquática, podemos concluir que os tecidos estudados apresentam diferentes padrões de resposta enzimática, sugerindo que o As pode induzir diferentes respostas em termos de estresse oxidativo e defesas antioxidantes.

REFERÊNCIAS

- ADEDARA, I. A. et al. Neuroprotective mechanisms of selenium against arsenic-induced behavioral impairments in rats. **NeuroToxicology**, v. 76, p. 99–110, 2020.
- 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**, v. 53, n. 3, p. 348–354, 2002.
- ALLEVATO, E. et al. Mechanisms of arsenic assimilation by plants and countermeasures to attenuate its accumulation in crops other than rice. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 185, p. 109701, 2019.
- ALMEIDA, E. A. et al. Protective effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna* exposed to different metals. **Marine Pollution Bulletin**, v. 49, n. 5-6, p. 386-392, 2004.
- ATENCIO, L. et al. Effects of dietary selenium on the oxidative stress and pathological changes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to a microcystin-producing cyanobacterial water bloom. **Toxicon**, v. 53, n. 2, p. 269–282, 2009.
- AZIZUR RAHMAN, M.; HASEGAWA, H.; PETER LIM, R. Bioaccumulation, biotransformation and trophic transfer of arsenic in the aquatic food chain. **Environmental Research**, v. 116, p. 118–135, 2012.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BARRA, C. M. et al. Especificação de arsênio - Uma revisão. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 58–70, 2000.
- BATISTA, B. L. et al. Rapid sample preparation procedure for As speciation in food samples by LC-ICP-MS. **Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment**, v. 29, n. 5, p. 780–788, 2012.
- BELIAEFF, B.; BURGEOT, T. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 21, n. 6, p. 1316-1322, 2002.
- BERVOETS, L.; BLUST, R. Metal concentrations in water, sediment and gudgeon (*Gobio gobio*) from a pollution gradient: Relationship with fish condition factor. **Environmental Pollution**, v. 126, n. 1, p. 9–19, 2003.
- BEUTLER, E. A manual of biochemical methods. **New York**, p. 62-94, 1975.
- BHATTACHARYA, A.; BHATTACHARYA, S. Induction of oxidative stress by arsenic in *Clarias batrachus*: Involvement of peroxisomes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, n. 2, p. 178–187, 2007.

BODNAR, M.; KONIECZKA, P.; NAMIESNIK, J. The Properties, Functions, and Use of Selenium Compounds in Living Organisms. **Journal of Environmental Science and Health, Part C**, v. 30, n. 3, p. 225–252, 2012.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–54, 1976.

CABEZAS-SANCHEZ, P. et al. Impact of selenium co-administration on methylmercury exposed eleutheroembryos and adult zebrafish (*Danio rerio*): Changes in bioaccumulation and gene expression. **Chemosphere**, v. 236, p. 124295, 2019.

CARLBERG, I. ; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. In: **Methods in enzymology**. Academic press, 1985. p. 484-490.

CARVALHO, C. DOS S. et al. Biomarker responses as indication of contaminant effects in *Oreochromis niloticus*. **Chemosphere**, v. 89, n. 1, p. 60–69, 2012.

CERVEIRA, C. Especificação química de arsênio inorgânico em arroz por espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos. 2015.

CHALLENGER, F. Biological methylation. **Science progress**, v. 35, n. 139, p. 396–416, 1947.

CHEN, J. et al. Organoarsenical compounds: Occurrence, toxicology and biotransformation. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 50, n. 3, p. 217–243, 2020.

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

CHEN, Y. et al. A Prospective Study of Blood Selenium Levels and the Risk of Arsenic-Related Premalignant Skin Lesions. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 16, n. 2, p. 207–213, 2007.

CHIARELLI, R.; ROCCHERI, M. C. Marine Invertebrates as Bioindicators of Heavy Metal Pollution. **Open Journal of Metal**, 2014.

CIARDULLO, S. et al. Arsenic speciation in freshwater fish: Focus on extraction and mass balance. **Talanta**, v. 81, n. 1–2, p. 213–221, 2010.

COLASSO, C. G.; FRANÇA, T. C. Agentes Vesicantes. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 3, p. 724-743, 2014.

COVANTES-ROSALES, C. E. et al. Phagocytosis and ROS production as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) leukocytes by exposure to organophosphorus pesticides. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 84, p. 189–195, 2019.

CUI, D. et al. Biotransformation of dietary inorganic arsenic in a freshwater fish *Carassius auratus* and the unique association between arsenic dimethylation and oxidative damage. **Journal of Hazardous Materials**, v. 391, p. 122153, 2020.

CUNNINGHAM, P. A. et al. Assessment of metal contamination in Arabian/Persian Gulf fish: A review. **Marine Pollution Bulletin**, 2019.

DA SILVA, J. M. B.; BARRIO, R. J.; MOREIRA, J. C. Arsênico-saúde: uma relação que exige vigilância. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 2, n. 1, p. 57-63, 2014.

DE ALMEIDA, E. A.; DE OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. (Ed.). **Pollution and fish health in tropical ecosystems**. CRC Press, 2014.

DI GIULIO, R. T. et al. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 8, n. 12, p. 1103-1123, 1989.

DOPP, E. et al. Uptake of inorganic and organic derivatives of arsenic associated with induced cytotoxic and genotoxic effects in Chinese hamster ovary (CHO) cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 201, n. 2, p. 156–165, 2004.

ERSOY, B.; ÖZEREN, A. The effect of cooking methods on mineral and vitamin contents of African catfish. **Food Chemistry**, 2009.

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

FERREIRA, N. S. et al. Bioaccumulation and acute toxicity of As(III) and As(V) in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Chemosphere**, p. 349–354, 2019.

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

FOSTER, S.; MAHER, W. Arsenobetaine and thio-arsenic species in marine macroalgae and herbivorous animals: Accumulated through trophic transfer or produced in situ? **Journal of environmental sciences (China)**, v. 49, p. 131–139, 2016.

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

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

FREITAS, R. et al. Looking for suitable biomarkers in benthic macroinvertebrates inhabiting coastal areas with low metal contamination: Comparison between the bivalve *Cerastoderma edule* and the Polychaete *Diopatra neapolitana*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 75, n. 1, p. 109–118, 1 jan. 2012.

GAILER, J. Chronic toxicity of AsIII in mammals: The role of (GS)₂AsSe⁻. **Biochimie**, v. 91, n. 10, p. 1268–1272, 2009.

GAILER, J. et al. A Metabolic Link between Arsenite and Selenite: The Seleno-bis(S - glutathionyl) Arsinium Ion. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, n. 19, p. 4637–4639, 2000.

GAO, Y. et al. Arsenic speciation in fish and shellfish from the North Sea (Southern bight) and Açu Port area (Brazil) and health risks related to seafood consumption. **Chemosphere**, v. 191, p. 89–96, 2018.

GAO, Y. et al. Arsenic speciation in fish and shellfish from the North Sea (Southern bight) and Açu Port area (Brazil) and health risks related to seafood consumption. **Chemosphere**, v. 191, p. 89–96, 2018.

GARBINSKI, L. D.; ROSEN, B. P.; CHEN, J. Pathways of arsenic uptake and efflux. **Environment International**, v. 126, p. 585-597, 2019.

GEORGE, G. N. et al. Observation of the seleno bis-(S-glutathionyl) arsinium anion in rat bile. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 158, p. 24–29, 2016.

GOBI, N. et al. Bioaccumulation, cytotoxicity and oxidative stress of the acute exposure selenium in *Oreochromis mossambicus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 162, p. 147–159, 2018.

GOESSLER, W.; PAVKOV, M. Accurate quantification and transformation of arsenic compounds during wet ashing with nitric acid and microwave assisted heating. **The Analyst**, v. 128, n. 6, p. 796, 2003.

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

GREANI, S. et al. Effect of chronic arsenic exposure under environmental conditions on bioaccumulation, oxidative stress, and antioxidant enzymatic defenses in wild trout *Salmo trutta* (Pisces, Teleostei). **Ecotoxicology**, v. 26, n. 7, p. 930–941, 2017.

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

HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John MC. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press, USA, 2015.

HAMED, M. et al. Assessment the effect of exposure to microplastics in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) early juvenile: I. blood biomarkers. **Chemosphere**, v. 228, p. 345–350, 2019.

HAUSER-DAVIS, R. A. et al. Acute selenium selenite exposure effects on oxidative stress biomarkers and essential metals and trace-elements in the model organism zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 33, p. 68–72, 2016.

HEDAYATI, A. Fish biomarkers, suitable tools for water quality monitoring. **International Journal of Veterinary and Animal Research**, v. 1, n. 3, p. 63-69, 2018.

HOPPER, J. L.; PARKER, D. R. Plant availability of selenite and selenate as influenced by the competing ions phosphate and sulfate. **Plant and Soil**, v. 210, p. 199-207, 1999.

HUGHES, M. F. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. **Toxicology Letters**, v. 133, n. 1, p. 1-16, 2002.

IBOR, O. R. et al. Xenobiotic biotransformation, oxidative stress and obesogenic molecular biomarker responses in *Tilapia guineensis* from Eleyele Lake, Nigeria. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 169, p. 255-265, 2019.

JANASIK, B. et al. Relationship between arsenic and selenium in workers occupationally exposed to inorganic arsenic. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 42, p. 76-80, 2017.

JAVED, M. et al. Studies on biomarkers of oxidative stress and associated genotoxicity and histopathology in *Channa punctatus* from heavy metal polluted canal. **Chemosphere**, v. 151, p. 210-219, 2016.

JIA, Y. et al. Speciation analysis of six arsenic species in marketed shellfish: Extraction optimization and health risk assessment. **Food Chemistry**, v. 244, p. 311-316, 2018.

JUNCOS, R. et al. Interspecific differences in the bioaccumulation of arsenic of three Patagonian top predator fish: Organ distribution and arsenic speciation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2019.

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

KAUSHAL, J. et al. Catalase enzyme: Application in bioremediation and food industry. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 192-199, 2018.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 20, p. 6183-6188, 1976.

KOMOROWICZ, I.; SAJNÓG, A.; BARAŁKIEWICZ, D. Total arsenic and arsenic species determination in freshwater fish by ICP-DRC-MS and HPLC/ICP-DRC-MS techniques. **Molecules**, v. 24, n. 3, p. 607, 2019.

KOUBA, A. et al. Supplementation with sodium selenite and selenium-enriched microalgae biomass show varying effects on blood enzymes activities, antioxidant response, and accumulation in common barbel (*Barbus barbus*). **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

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

KUMAR, N. et al. Impacts of acute toxicity of arsenic (III) alone and with high temperature on stress biomarkers, immunological status and cellular metabolism in fish. **Aquatic Toxicology**, v. 214, p. 105233, 2019.

- KUMARI, B. et al. Toxicology of arsenic in fish and aquatic systems. **Environmental Chemistry Letters**, v. 15, n. 1, p. 43-64, 2017.
- LEE, J. W. et al. Significance of adverse outcome pathways in biomarker-based environmental risk assessment in aquatic organisms. **Journal of Environmental Sciences**, v. 35, p. 115-127, 2015.
- LIAO, C. M. et al. Acute toxicity and bioaccumulation of arsenic in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) from a blackfoot disease area in Taiwan. **Environmental Toxicology**, v. 18, n. 4, p. 252–259, 2003.
- LIAO, Z. H. et al. Bioaccumulation of arsenic and immunotoxic effect in white shrimp (*Penaeus vannamei*) exposed to trivalent arsenic. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 122, p. 376–385, 2022.
- LOMARTIRE, S.; MARQUES, J. C.; GONÇALVES, A. M. M. Biomarkers based tools to assess environmental and chemical stressors in aquatic systems. **Ecological Indicators**, v. 122, p. 107207, 2021.
- ŁUCZYŃSKA, J.; PASZCZYK, B.; ŁUCZYŃSKI, M. J. Fish as a bioindicator of heavy metals pollution in aquatic ecosystem of Pluszne Lake, Poland, and risk assessment for consumer's health. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 153, p. 60–67, 2018.
- MALIK, J. A. et al. Selenium antagonises the toxic effects of arsenic on mungbean (*Phaseolus aureus* Roxb.) plants by restricting its uptake and enhancing the antioxidative and detoxification mechanisms. **Environmental and Experimental Botany**, v. 77, p. 242–248, 2012.
- MANSOUR, S. A.; SIDKY, M. M. Ecotoxicological studies. 3. Heavy metals contaminating water and fish from Fayoum Governorate, Egypt. **Food Chemistry**, v. 78, n. 1, p. 15–22, 2002.
- MARTINEZ, V. D. et al. Arsenic exposure and the induction of human cancers. **Journal of Toxicology**, 2011.
- MATOS, W. O. **Desenvolvimento de procedimentos de digestão e especiação para amostras biológicas**. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Ciências – Química Analítica) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP. 2011.
- MEERMANN, B.; NISCHWITZ, V. ICP-MS for the analysis at the nanoscale-a tutorial review. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 33, n. 9, p. 1432–1468, 2018.
- MELGAR, M. J.; NÚÑEZ, R.; GARCÍA, M. Á. Selenium intake from tuna in Galicia (Spain): Health risk assessment and protective role against exposure to mercury and inorganic arsenic. **Science of the Total Environment**, v. 694, 2019.
- 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**, v. 31, p. 249–259, 2015.

- MONTEIRO, D. A.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. The effects of selenium on oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) exposed to organophosphate insecticide Folisuper 600 BR® (methyl parathion). **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 149, n. 1, p. 40–49, 2009.
- MORALES, L. E.; HIGUCHI, A. Is fish worth more than meat? – How consumers' beliefs about health and nutrition affect their willingness to pay more for fish than meat. **Food Quality and Preference**, v. 65, p. 101–109, 2018.
- MOXON, A. L.; DUBOIS, K. P. The influence of arsenic and certain other elements on the toxicity of seleniferous grains: three figures. **The Journal of Nutrition**, v. 18, n. 5, p. 447–457, 1939.
- 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**, v. 211, n. 1–2, p. 26–35, 2005.
- NAWROCKA, A. et al. Simple and reliable determination of total arsenic and its species in seafood by ICP-MS and HPLC-ICP-MS. **Food Chemistry**, v. 379, p. 132045, 2022.
- NOGUEIRA, L. et al. Biochemical biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after short-term exposure to diesel oil, pure biodiesel and biodiesel blends. **Chemosphere**, v. 85, n. 1, p. 97–105, 2011.
- NOGUEIRA, R. et al. Arsenic Speciation in Fish and Rice by HPLC-ICP-MS using Salt Gradient Elution. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 29, n. 8, p. 1593–1600, 2018.
- NURCHI, V. M. et al. Arsenic Toxicity: Molecular Targets and Therapeutic Agents. **Biomolecules**, v. 10, n. 2, 2020.
- OHKI, A. et al. Studies on the accumulation and transformation of arsenic in freshwater organisms I. Accumulation, transformation and toxicity of arsenic compounds on the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. **Chemosphere**, v. 46, n. 2, p. 319–324, 2002.
- 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**, v. 28, n. 12, p. 2455–2463, 2017.
- 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.
- OSAWA, C. C. et al. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química Nova**, v. 28, p. 655–663, 2005.
- ÖZCAN, Ş.; BAKIRDERE, S.; ATAMAN, O. Y. Speciation of Arsenic in Fish by High-Performance Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry. **Analytical Letters**, v. 49, n. 15, p. 2501–2512, 2016.

PADMINI, E.; RANI, M. U. Evaluation of oxidative stress biomarkers in hepatocytes of grey mullet inhabiting natural and polluted estuaries. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 15, p. 4533-4541, 2009.

PEIXE BR. Anuário brasileiro da piscicultura Peixe BR 2023. Associação brasileira da piscicultura, 2023.

POKHREL, G. R. et al. Effect of selenium in soil on the toxicity and uptake of arsenic in rice plant. **Chemosphere**, v. 239, 2020.

POPOWICH, A.; ZHANG, Q.; LE, X. C. Arsenobetaine: the ongoing mystery. **National science review**, v. 3, n. 4, p. 451–458, 2016.

RADOMYSKI, A. et al. Bioaccumulation of trace metals in aquatic food web. A case study, Liaodong Bay, NE China. **Marine Pollution Bulletin**, v. 137, p. 555–565, 2018.

RAHMAN, M. A.; HASSLER, C. Is arsenic biotransformation a detoxification mechanism for microorganisms? **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 146, p. 212–219, 2014.

RAHMAN, M. M. et al. Selenium and zinc protections against metal-(loids)-induced toxicity and disease manifestations: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 168, p. 146-163, 2019.

RANZANI-PAIVA, M. J. T. et al. Acute toxicity of sodium selenite and sodium selenate to tilapia, *Oreochromis niloticus*, fingerlings. **Boletim do Instituto de Pesca São Paulo**, v. 37, n. 2, p. 191-197, 2011.

RATHER, I. A. et al. The sources of chemical contaminants in food and their health implications. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, p. 830, 2017.

REIS, V. A. T.; DUARTE, A. C. Analytical methodologies for arsenic speciation in macroalgae: A critical review. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 102, p. 170–184, 2018.

ROY, N. K.; MURPHY, A.; COSTA, M. Arsenic Methyltransferase and Methylation of Inorganic Arsenic. **Biomolecules**, v. 10, n. 9, p. 1–13, 2020.

SÁ, Ívero Pita; DA SILVA, Carlos Alberto; NOGUEIRA, Ana Rita A. Chemical Speciation of Arsenic and Chromium in Seafood by LC-ICP-MS. **Braz. J. Anal. Chem.** 13, p. 1-19, 2023.

SANTOS, C. M. M. et al. Evaluation of microwave and ultrasound extraction procedures for arsenic speciation in bivalve mollusks by liquid chromatography–inductively coupled plasma-mass spectrometry. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 86, p. 108–114, 2013.

SANTOS, C. M. M. et al. Evaluation of microwave and ultrasound extraction procedures for arsenic speciation in bivalve mollusks by liquid chromatography–inductively coupled plasma-mass spectrometry. **Spectrochimica acta. Part B: Atomic spectroscopy**, v. 86, p. 108–114, 2013.

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, 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**, v. 24, n. 1, p. 1-7, 2012.

SCHMIDT, L. et al. A feasible method for As speciation in several types of seafood by LC-ICP-MS/MS. **Food chemistry**, v. 255, p. 340–347, 2018.

SHINKAI, Y. et al. Role of aquaporin 9 in cellular accumulation of arsenic and its cytotoxicity in primary mouse hepatocytes. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 237, n. 2, p. 232–236, 2009.

SIES, H. et al. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. **Febs Letters**, v. 103, n. 2, p. 287-290, 1979.

SODHI, K. K. et al. Perspectives on arsenic toxicity, carcinogenicity and its systemic remediation strategies. **Environmental Technology and Innovation**, p. 100462, 2019.

SONG, D. et al. Gut microbiota promote biotransformation and bioaccumulation of arsenic in tilapia. **Environmental pollution (Barking, Essex: 1987)**, v. 305, n. 119321, p. 119321, 2022.

SQUADRONE, S. et al. Heavy metals distribution in muscle, liver, kidney and gill of European catfish (*Silurus glanis*) from Italian Rivers. **Chemosphere**, v. 90, n. 2, p. 358–365, 2013.

SUN, H. (Ed.). **Biological chemistry of arsenic, antimony and bismuth**. John Wiley & Sons, 2010.

SUN, Y.; LIU, G.; CAI, Y. Thiolated arsenicals in arsenic metabolism: Occurrence, formation, and biological implications. **Journal of Environmental Sciences**, v. 49, p. 59–73, 2016.

Taweel, 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**, 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**, v. 72, n. 8, p. 1453-1470, 2000.

TOPPO, S. et al. Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: Variations of a basic scheme. **BBA - General Subjects**, v. 1790, p. 1486–1500, 2009.

TOUFEKTSIAN, M. C. et al. Effects of selenium deficiency on the response of cardiac tissue to ischemia and reperfusion. **Toxicology**, v. 148, n. 2–3, p. 125–32, 2000.

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

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

VASKEN APOSHIAN, H. et al. A review of the enzymology of arsenic metabolism and a new potential role of hydrogen peroxide in the detoxication of the trivalent arsenic species. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 198, n. 3, p. 327–335, 2004.

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**, 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**, v. 74, n. 3, p. 211–218, 2011.

VILLANUEVA, C.; KROSS, R. D. Antioxidant-induced stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 2, p. 2091-2109, 2012.

WANG, J. et al. Effects of dietary Cu and Zn on the accumulation, oxidative stress and the expressions of immune-related genes in the livers of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 100, p. 198–207, 2020.

YOSIM, A.; BAILEY, K.; FRY, R. C. Arsenic, the "King of Poisons," in: Food and Water. **American Scientist**, v. 103, n. 1, p. 34, 2015.

ZHANG, W. et al. Arsenic bioaccumulation and biotransformation in aquatic organisms. **Environment International**, v. 163, p. 107221, 2022.

ZHANG, W. et al. Biotransformation and detoxification of inorganic arsenic in Bombay oyster *Saccostrea cucullata*. **Aquatic Toxicology**, v. 158, p. 33–40, 2015.

ZHANG, W. et al. Physiologically based pharmacokinetic model for the biotransportation of arsenic in marine medaka (*Oryzias melastigma*). **Environmental science & technology**, v. 54, n. 12, p. 7485–7493, 2020.

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