

LUCIANO HENRIQUE BARCA DE OLIVEIRA

Avaliação dos Teores de Arsênio em Tecidos de
Tilápias (*Oreochromis niloticus*) e Estudo da
Bioacumulação de As (III)

São José do Rio Preto - SP
2017

LUCIANO HENRIQUE BARCA DE OLIVEIRA

Avaliação dos Teores de Arsênio em Tecidos de
Tilápias (*Oreochromis niloticus*) e Estudo da
Bioacumulação de As (III)

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

Financiadora: CAPES (DS) – Proc.: 33004153077P8

Orientador: Prof. Dr. Mario Henrique Gonzalez

Co-Orientadora: Dra. Ana Rita de A. Nogueira

São José do Rio Preto - SP
2017

Oliveira, Luciano Henrique Barca de.

Avaliação dos teores de arsênio em tecidos de tilápias
(*Oreochromis niloticus*) e estudo da bioacumulação de As (III) /
Luciano Henrique Barca de Oliveira. -- São José do Rio Preto, 2017
81 f. : il., tab.

Orientador: Mario Henrique Gonzalez

Coorientador: Ana Rita de A. Nogueira

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

1. Química da água. 2. Toxicologia ambiental. 3. Arsênio -
Bioacumulação. 4. Tilápia-do-Nilo - Efeito da poluição da água.
5. Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado.
I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto
de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 577.4

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

LUCIANO HENRIQUE BARCA DE OLIVEIRA

Avaliação dos Teores de Arsênio em Tecidos de
Tilápias (*Oreochromis niloticus*) e Estudo da
Bioacumulação de As (III)

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

Financiadora: CAPES (DS) – Proc.: 33004153077P8

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Mario Henrique Gonzalez

(Orientador – UNESP/São José do Rio Preto)

Prof. Dra. Márcia Cristina Bisinoti

Prof. Dra. Edilene Cristina Ferreira

São José do Rio preto - SP
2017

À minha pequena esfera,

Vocês são a base de tudo que construí e a fonte de inspiração que me faz seguir em frente.

AGRADECIMENTO

Primeiramente agradeço a meus pais, Amauri e Olivia, pela compreensão e apoio incondicional em todos os momentos de dificuldade passados e vencidos, além das conquistas alcançadas. Minha eterna gratidão pela oportunidade da vida e de caminhar ao lado de vocês.

Ao Professor Mario pela orientação durante estes 3 anos de trabalho com o Grupo de Inovações em Química Analítica Verde. Sua dedicação em passar os conhecimentos foi a base para a construção deste e de todos os trabalhos que realizamos durante esses anos.

A Dra. Ana Rita de Araújo Nogueira pela ajuda no desenvolvimento do trabalho e por todo auxílio imprescindível no preparo de amostras realizado por meio da Embrapa Pecuária Sudeste em São Carlos.

Aos professores titulares e suplentes da banca examinadora por todas as dicas e conhecimento compartilhados. E a todos os professores do Programa de pós-graduação em Química por terem contribuído ao longo desses anos.

Aos meus colegas do Laboratório de Inovação em Química Analítica Verde (LIQAV) pelo companheirismo e troca de experiências durante as longas horas de trabalho no laboratório.

A toda a minha família que esteve ao meu lado em todos os momentos e experiências vividas e que me deram força para continuar. Vocês são meus exemplos.

A CAPES pela bolsa concedida. E a FAPESP processo 2015/08873-4 pelo auxílio financeiro.

A todos meus amigos, colegas e funcionários do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas que contribuíram de forma direta ou indiretamente para realização desse trabalho.

A vocês, meus sinceros agradecimentos.

" O trabalho é tudo. É tudo no relativo e é tudo no Absoluto. Eu diria: trabalho é a vida relativa de cada um e é a vida Absoluta de todos e do Todo. Sabe porquê? Porque é energia. E energia é movimento. O Universo é movimento. E quem faz o movimento é o trabalho. "

Dr. Felso Pharuri

RESUMO

O mercado de pescados no Brasil tem se expandido muito nos últimos anos e com previsão de um crescimento ainda maior. A busca crescente por essa fonte de alimento no país leva à uma preocupação associada a qualidade do pescado, principalmente se tratando de metais tóxicos presentes nas águas e sedimentos dos rios. Os peixes, assim como outros frutos do mar, têm a capacidade de bioacumular estes metais em seu organismo, seja por contato direto ou indireto. O arsênio é um destes contaminantes e está presente naturalmente em águas e sedimentos, e também advindo de atividades antropogênicas como queima de combustíveis fósseis e agrotóxicos. A concentração de arsênio total nos principais tecidos da tilápia foram determinados e uma estimativa dos riscos associados ao consumo deste peixe na região Noroeste de São Paulo foi realizada, levando em conta as diretrizes estabelecidas pela FAO/OMS. As análises foram realizadas por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) no modo de discriminação de energia cinética (KED). Materiais de referência certificados foram analisados com recuperações de 101, 110 e 80% de NIST 1640a, NIST 1566b e DORM-3, respectivamente. Na parte consumível (o tecido muscular dos peixes), a concentração média encontrada foi de $0,030 \pm 0,008 \mu\text{g g}^{-1}$, que é inferior ao valor máximo permitido de arsênio estabelecido pelas agências reguladoras nacionais e internacionais. A concentração média encontrada nas vísceras (estômago, brânquias e fígado) esteve na faixa de $0,016 - 1,170 \mu\text{g g}^{-1}$, demonstrando maior capacidade de bioacumulação de arsênio. Foram realizados ensaios de bioacumulação com As(III) (espécie mais tóxica do arsênio) com tilápias em laboratório. O ensaio foi dividido em grupo de 7 dias de exposição e 7 dias de depuração ao contaminante. Os resultados demonstraram que o estômago e fígado desempenham um papel importante na absorção e acúmulo desse semimetal presente em águas contaminadas. A estimativa dos parâmetros toxicocinéticos (constantes de absorção, depuração e fator de bioconcentração – BCF) obtidas com os testes de exposição ao As(III), permitiu avaliar a capacidade de absorção e depuração de cada órgão de interesse. A ordem de bioacumulação determinada pelo BCF foi: estômago > fígado > brânquias > filet.

Palavras-chave: Bioacumulação; Arsênio; ICP-MS; Pescados.

ABSTRACT

Seafood market in Brazil has expanded greatly in recent years and is expected to grow even more. The search for this food source in the country leads to a concern associated with the quality of the fish, mainly by the treatment of toxic metals in the waters and sediments of the rivers. Fish, like other seafood, have the ability to bioaccumulate these metals in your body by direct or indirect contact. Arsenic is one of these contaminants and is naturally present in waters and sediments, as well as from anthropogenic activities such as the burning of fossil fuels and agrochemicals. The concentration of total arsenic in the main tissues of tilapia were evaluated and an estimation of the risks associated with the consumption of this fish was done, taking into account the guidelines established by FAO/WHO. The analyses were performed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) in kinetic energy discrimination mode (KED). Certified reference materials were analyzed with recoveries of 101, 110, and 80% from NIST 1640a, NIST 1566b, and DORM-3 respectively. In the consumable portion (the muscle fish tissue), the average concentration found was $0,030 \pm 0,008 \mu\text{g g}^{-1}$ which it is below the arsenic maximum level established by international regulatory agencies. The mean concentration found in the viscera (stomach, gills and liver) was in the range of $0,016 - 1,170 \mu\text{g g}^{-1}$, demonstrating a higher bioaccumulation capacity of arsenic. Bioaccumulation tests were performed with As(III) (most toxic arsenic species) with laboratory grown tilapia. The assay was divided into 7 days of exposure and 7 days of clearance to the contaminant. The results demonstrated that the stomach and liver play an important role in the absorption and accumulation of this semimetal present in contaminated water. The estimation of the toxicokinetic parameters (absorption, depuration and Bioconcentration factors - BCF) obtained with the exposure tests to As (III) allowed to evaluate the absorption and depuration capacity of each organ of interest. The order of bioaccumulation determined by the BCF was stomach > liver > gills > filet.

Keywords: Bioaccumulation; Arsenic; ICP-MS; Seafood.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Sistemas de cultivo praticados na piscicultura: viveiro escavado (esquerda), tanques-rede (direita sup.), represa pública (direita inf.).....	22
Figura 2.2 - Produção de pescado nacional em 2009 e 2010 por estados brasileiros.	23
Figura 2.3 - Diagrama de bloco dos principais componentes de um ICP-MS.	27
Figura 4.1 - Pontos de coleta dos peixes, destacando os principais corpos d'água da região Noroeste do Estado de São Paulo	36
Figura 4.2 - Principais componentes do NexION 300X utilizado.....	38
Figura 4.3 - Esquema do ensaio de bioacumulação	44
Figura 5.1 - Curvas analíticas dos parâmetros de otimização instrumental.	47
Figura 5.2 - Porcentagem de recuperação das concentrações certificadas nos diferentes métodos empregados na análise dos MRC's.	50
Figura 5.3 - Distribuição da concentração de As total em diferentes amostras de tecido analisadas por ICP-UCT-MS de tilápias cultivadas em diferentes condições.	55
Figura 5.4 - Crescimento do consumo de peixes pela população brasileira (MPA; MDIC e IBGE, 2013).	57
Figura 5.5 - Estimativa de ingestão semanal de arsênio levando em consideração o crescimento do consumo por parte da população brasileira.....	58
Figura 5.6 - Distribuição de As pelos órgãos de interesse durante os períodos de exposição e depuração	60
Figura 5.7 – Modelo de análise por regressão não-linear.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Principais espécies de arsênio relatadas pela literatura, abreviaturas, fórmulas moleculares e estrutural	18
Tabela 2.2 - Interferências espectrais e os íons afetados.....	29
Tabela 2.3 - Resolução necessária para resolver interferências espectrais	31
Tabela 4.1 - Programa de aquecimento do micro-ondas para digestão das amostras de tecidos de tilápia.....	37
Tabela 4.2 - Configuração instrumental e parâmetros de aquisição de dados	39
Tabela 4.3 - Percentagem de recuperação aceitável dependendo da concentração de analito	42
Tabela 5.1 - Parâmetros de otimização do método (modo padrão e KED) de análise por ICP-MS.....	46
Tabela 5.2 - Parâmetros de desempenho dos diferentes métodos de detecção por ICP-MS.....	49
Tabela 5.3 - Concentrações de As determinadas nos MRC's (Média $\pm$ SD (Rec.%)).....	51
Tabela 5.4 - Concentração total de arsênio determinada por ICP-MS no músculo, brânquias, fígados e estômagos das amostras de tilápias, além da média determinadas nas águas coletadas em cada meio ($n = 3$, $\pm$ SD).....	52
Tabela 5.5 - Características físicas dos peixes utilizados nos ensaios de bioacumulação.....	59
Tabela 5.6 – Estimativas das constantes da taxa de absorção (k_a), depuração (k_d), fator de bioconcentração (BCF) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para órgãos específicos de tilápias durante um período de 7 dias de exposição a As.	61
Tabela 5.7 – Dados comparativos dos parâmetros de bioacumulação de As obtidos na literatura	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATP – Adenosina trifosfato

AsB – Arsenobetaína

AsC – Arsenocolina

AsLip – Arsenolipídio

AsSug – “*Arsenosugar*” - Arsenoaçúcar

BCF – “*Bioconcentration factor*” – Fator de bioconcentração

BMDL – “*Benchmark dose lower limit*” – Limite inferior da dose de referência

CEUA – Comissão de Ética no Uso Animal

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CONTAM PANEL – “*Panel on Contaminants in the Food Chain*” – Painel dos Contaminantes da Cadeia Alimentar

CRO – “*Cell Rod Offset*” – Voltagem da haste da célula

CV – Coeficiente de Variação

DMA – “*Dimethylarsinic Acid*” – Ácido dimetilarsínico

EFSA – “*European Food Safety Authority*” – Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar

FAAS – “*Flame Atomic Absorption Spectrometry*” – Espectrometria de absorção atômica em chama

FAO – “*Food and Agriculture Organization of the United Nations*” – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

GFAAS – “*Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*” – Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite

IARC – “*International Agency for Research on Cancer*” – Agência Internacional de Pesquisa em Câncer

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICP OES – “*Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*” – Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado

ICP-MS – “*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*” – Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

JECFA – “*Joint Expert Committee on Food Additives*” – Comitê de Especialistas em Aditivos Alimentares

KED – “*Kinect energy discrimination*” – Discriminação por energia cinética

LOD – “*Limit of detection*” – Limite de detecção

LOQ – “*Limit of quantification*” – Limite de quantificação

MMA – “*Monomethylarsonic Acid*” – Ácido monometilarsônico

MPA – Ministério da Pesca e Aquicultura

MRC – Material de referência certificado

MW-AD – “*Microwave Acid Digestion*” – Digestão ácida por micro-ondas

NIST – “*National Institute of Standards and Technology*” – Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia

NRCC – “*National Research Council Canada*” – Conselho Nacional de Pesquisa do Canada

OECD – “*Organization for Economic Co-operation and Development*” – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico

OMS – Organização Mundial de Saúde

PET – Polietileno Tereftalato

PTFE – Politetrafluoretileno

PTWI – “*Provisional tolerable weekly intake*” – Ingestão semanal tolerável provisória

PUFAS – “*Polyunsaturated fatty acids*” – Ácidos graxos poli-insaturados

QRO – “*Quadrupole Rod Offset*” – Voltagem na haste do Quadrupolo

RF - Radiofrequência

RSD – “*Relative Standard Deviation*” – Desvio padrão relativo

UCT – “Universal Cell Technology” – Tecnologia de Célula Universal

WHO – “World Health Organization” – Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1.	Arsênio no ambiente.....	16
2.2.	Bioacumulação de elementos tóxicos.....	20
2.3.	Criação e consumo de tilápia no Brasil.....	21
2.4.	Digestão de amostra por radiação micro-ondas	24
2.5.	Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS).....	26
3.	OBJETIVOS	33
4.	PARTE EXPERIMENTAL	34
4.1	Reagentes e soluções	34
4.2	Coleta e preparo de amostras	35
4.3	Instrumentação	38
4.4	Estimativa de ingestão diária de arsênio	39
4.5	Validação do método proposto	40
4.6	Ensaio de bioacumulação com As(III).....	42
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1	Otimização do método de análise	46
5.2	Determinação do teor total de As nos tecidos de tilápias	52
5.3	Estimativa da ingestão de As pela população do Noroeste Paulista 56	
5.4	Bioacumulação de As(III) em tilápias.....	59
6.	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1. INTRODUÇÃO

A aquacultura ou aquícultura é a prática do cultivo de seres cujo ciclo de vida se dá total ou parcialmente em meio aquático. Essa forma de cultivo é praticada pelo ser humano desde a antiguidade se iniciando séculos atrás com os chineses que já possuíam conhecimentos sobre essas técnicas, e os egípcios que criavam tilápias no rio Nilo (BRASIL, MINISTÉRIO DA PESCA E AGRICULTURA MPA, s.d.). Nos últimos 56 anos o consumo global de pescados dobrou devido a mudança de hábitos na alimentação que vêm ocorrendo com o passar dos anos. A busca por fontes de proteínas mais saudáveis e com menor teor de gordura saturada têm levado a um aumento significativo na demanda por carne de peixe e outros frutos do mar (FIGUEIREDO JUNIOR; VALENTE JUNIOR, 2008).

Apesar de todo benefício da carne de peixe e outros frutos do mar, estes seres aquáticos estão sujeitos à exposição por contaminantes tóxicos presentes nas águas naturalmente ou através de ação antropogênica. Os metais tóxicos como arsênio (As), mercúrio (Hg), cádmio (Cd) e chumbo (Pb) são um exemplo desses contaminantes, e quando presentes no meio podem desencadear processos de bioacumulação nas espécies através da cadeia alimentar.

O arsênio é um elemento que ocorre naturalmente no ambiente aquático principalmente associado a minerais como cobre, chumbo, cobalto e ouro, e também de forma antropogênica por meio da mineração, agrotóxicos e combustão de carvão e madeira (COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2014). Em águas naturais o arsênio pode estar presente na forma orgânica (ex. arsenobetaína) menos tóxica, ou em sua forma inorgânica (As (III), As (V)) tóxicas aos seres humanos. O valor recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) foi de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ por muitos anos, porém a entidade sugeriu um valor-guia de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ para arsênio em águas potáveis atualmente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016; CARABANTES; FERNICOLA, 2003). Quanto aos

níveis permitidos do contaminante em peixes para a alimentação o Decreto nº 55871 de 1965 já estabelecia um limite máximo de tolerância (LMT) de $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de arsênio em alimentos, valor que se manteve com a resolução RDC nº 42 de 2013 da ANVISA quanto aos limites máximos de contaminantes inorgânicos em alimentos no regulamento técnico MERCOSUL.

Os pescados são uma das fontes de ingestão de arsênio devido a sua participação na dieta do ser humano, entretanto a maior parte desse contaminante presente nos tecidos dos peixes envolve composto orgânicos de baixa toxicidade e fácil metabolização no organismo. O maior desafio se encontra na quantificação de baixas concentrações deste semimetal, sendo que diversos estudos relatam o uso da técnica de espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) juntamente com digestão ácida assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados (MW-AD) como as melhores alternativas para a garantia de resultados confiáveis (WU et al., 2014; FONTCUBERTA et al., 2011; PÉTURSDÓTTIR et al., 2012).

O peixe escolhido os estudos de bioacumulação de arsênio foi a tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*) da família Cichlidae. Essa espécie é originária da bacia do rio Nilo, no Egito, e foi amplamente difundida no Brasil devido às condições climáticas favoráveis à sua criação (AYROZA, 2009). A boa aceitação da espécie no mercado e na produção intensiva deve-se à algumas características como: facilidade de reprodução e rápido desenvolvimento em cultivo intensivo, tendo um crescimento de 5 a 500 g de 4 a 5 meses, à capacidade de adaptação a ambientes com baixos teores de oxigênio dissolvido na água e alta resistência a doenças, à carne branca e saborosa com baixo teor de gordura ($0,9 \text{ g/100 g}^{-1}$ de carne) e alto rendimento de filé (35 a 40%), juntamente com a boa aceitação no mercado consumidor (AYROZA, 2009; KUBITZA F., KUBITZA L., 2000).

Tendo em vista os limites restritivos deste contaminante e o crescimento acelerado do mercado de pescados, o presente trabalho teve

como objetivos principais a determinação do teor de arsênio total em tilápias comerciais (mercado), do rio e pesqueiro, assim como o estudo da bioacumulação desse contaminante em espécies criadas em cativeiro no laboratório. As análises foram realizadas pela técnica de espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) e o preparo de amostras por radiação micro-ondas em frascos fechados (MW-AD).

Os resultados obtidos no trabalho permitiram avaliar a estimativa da ingestão de arsênio pela população, principalmente na região Noroeste do Estado de São Paulo, aferindo características sobre a qualidade no consumo de pescados em uma das principais regiões produtoras do país. Além disso, os estudos realizados possibilitaram verificar a interação deste contaminante com o organismo do peixe e entender os processos de bioacumulação em seus tecidos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Arsênio no ambiente

O arsênio (As) está presente na natureza em diversas formas químicas, incluindo espécies inorgânicas e orgânicas. Encontra-se o arsênio em quantidades variáveis no solo, água e vegetais, proveniente tanto de fontes naturais quanto antrópicas. O arsênio pode ser acumulado por organismos marinhos em rochas sedimentares ou ainda liberado como gás volátil (AsH_3 , arsina) pela atividade de fungos arsenófilos ou agentes redutores presentes em águas naturalmente contaminadas com arsênio (GONTIJO; BITTENCOURT, 2005).

As fontes antrópicas de arsênio incluem atividades industriais, como a manufatura de vidros, conservantes de madeira, materiais semicondutores e fotocondutores. Compostos contendo arsênio também são utilizados na agricultura, pois encontra-se presente em herbicidas, inseticidas e desfolhantes, e também provenientes do processamento e queima de combustíveis fósseis (MATSCHULLAT, 2000).

Em águas naturais, o arsênio está presente principalmente nas formas inorgânicas, trivalente e pentavalente (As(III) e As(V)). A toxicidade das espécies de arsênio decresce na seguinte ordem: As(III) inorgânico > As(V) inorgânico > ácidos alquil-arsênicos (MMA e DMA) > arsênio elementar (USEPA, 2000; BARRA et al. 2000). Em termos de toxicidade, o As(III) (arsenito) é 60 vezes mais tóxico do que a forma oxidada As(V) (arseniato), e ambos os compostos inorgânicos são 100 vezes mais tóxicos do que as formas parcialmente metiladas, ácidos monometilarsênico (MMA) e dimetilarsínico (DMA) (CHATTERJEE et al., 1995).

O alto potencial de toxicidade do arsênio para os seres humanos é bem conhecido devido a facilidade com que estes compostos são absorvidos, seja por via oral ou por inalação. A intoxicação por As pode

resultar em efeitos agudos ou crônicos, relativos a exposições curtas ou longas, respectivamente, resultando em diferentes patologias (BORBA et al., 2004). A exposição a longo prazo à compostos inorgânicos podem levar a várias doenças, tais como câncer do trato respiratório e de pele, hiperqueratose, hiperpigmentação, doença cardiovascular e perturbações dos sistemas vascular periférico e nervoso (FARMER; JOHNSON, 1990).

No corpo humano, o As inorgânico passa por reações de metilação, processo de desintoxicação que ocorre nos rins, e que reduz a afinidade do composto para com o tecido. As etapas de metilação são: As(V) – As(III) – MMA(V) – MMA(III) – DMA(V), logo, quando arsênio inorgânico é ingerido através de alimento ou água contaminada, a principal via de eliminação é pela urina (BARRA et al., 2000). Um processo similar ao que ocorre nos seres humanos é a biometilação realizada pelos organismos marinhos, os quais transformam os compostos de As inorgânico adquiridos por meio da cadeia alimentar em arsenobetaina (AsB), outro composto arseno-orgânico (OCHSENKÜHN-PETROPULU; VARSAMIS; PARISSAKIS, 1997).

No ambiente aquático os produtores primários tais como micro-organismos, fitoplânctons e zooplânctons, assim como algas e outros seres de estágio de evolução trófico mais baixo, desintoxicam arseniato pela produção de substâncias metiladas, arseno-açúcares solúveis em água e arseno-fosfolipídios solúveis em gordura (BALLIN et al., 1994). A Tabela 2.1 descreve as principais espécies de arsênio frequentemente relatadas na literatura, suas respectivas fórmulas estruturais e abreviaturas.

Um exemplo bem conhecido da exposição ao arsênio pelo consumo de água contaminada ocorreu em Bangladesh por volta do ano de 1970. Na tentativa de mitigar casos de cólera ocorridos no país pelo consumo de água superficial microbiologicamente inseguras, diversos poços artesianos foram perfurados sem o conhecimento prévio da composição do solo e das águas subterrâneas ali presentes (AHSAN; VALLS, 2011). Infelizmente uma vasta área do subsolo de Bangladesh é naturalmente contaminada por arsênio, o que resultou na exposição de milhões de pessoas. Após este

episódio, a preocupação concernente aos níveis de segurança para arsênio em água só aumentou.

Tabela 2.1 - Principais espécies de arsênio relatadas pela literatura, abreviaturas, fórmulas moleculares e estrutural

Composto	Abrev.	Fórmula molecular	Fórmula estrutural
Arsina	AsH ₃	AsH ₃	
Ácido Arsenioso	As ³⁺	H ₃ AsO ₃	
Ácido Arsênico	As ⁵⁺	H ₃ AsO ₄	
Ácido Monometilarsônico	MMA ⁵⁺	(CH ₃) ₂ HAsO ₂	
Ácido Dimetilarsínico	DMA ⁵⁺	(CH ₃) ₂ HAsO ₃	
Arsenobetaína	AsB	(CH ₃) ₃ As ⁺ CH ₂ COO ⁻	
Arsenocolina	AsC	(CH ₃) ₃ As ⁺ (CH ₂) ₂ OH	
Arseno-açúcares	AsSug	-	
Arseno-lipídios	AsLip	(CH ₃) ₂ AsO(CH ₂) _n COOH	

Fonte: adaptado (SOUZA et al., 2014).

Os mecanismos de toxicidade e carcinogenicidade são influenciados pela espécie química e pela biotransformação dos compostos de arsênio. Por exemplo, o As(III) é considerado um tiol reativo, e pode interagir com sítios de proteínas e enzimas alterando processos bioquímicos essenciais para o organismo humano (SOUZA et al., 2014). O As(V) por sua vez, age como desacoplador da fosforilação oxidativa devido à sua semelhança com o fosfato inorgânico, substituindo-o na produção da adenosina trifosfato (ATP) (NRC, 2011). Exposições oral e/ou crônica aos compostos MMA e DMA podem resultar em danos gastrointestinais, além de efeitos na bexiga e rins (TOX GUIDE FOR ARSENIC, 2007).

Os compostos de arsênio têm sido estudados e avaliados pela IARC (do inglês, *International Agency for Research on Cancer*) órgão governamental francês pertencente a Organização Mundial de Saúde (OMS), com classificação de grupo 1 das substâncias que apresentam carcinogenicidade humana (IARC, 2016). As espécies MMA e DMA foram classificados como grupo 2B – possivelmente carcinogênico para humanos – e os compostos organometálicos (ex. AsB) como grupo 3, quando não há classificação quanto à sua carcinogenicidade para os seres humanos (IARC, 2016).

A resolução CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) nº 357 de 2005 (BRASIL, 2005) estabeleceu no Brasil o mesmo valor orientado pela OMS ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) para concentração total de arsênio em águas salinas e doces de classe 1. Já para as mesmas águas onde haja pesca ou cultivo de seres para consumo intensivo, o valor permitido passa a ser $0,14 \mu\text{g L}^{-1}$. Em termos de alimentação, o limite máximo de 1 mg kg^{-1} de As em peixes crus, congelados ou refrigerados foi estabelecido no Brasil pela resolução nº 42 de 2013 da ANVISA (BRASIL, 2013).

2.2. Bioacumulação de elementos tóxicos

A bioacumulação ou bioconcentração segundo a OECD – *Organization for Economic and Co-Operation Development* (s.d., apud GUIMARÃES, 1987) é um processo que ocorre por dois mecanismos: A bioacumulação direta, processo através do qual uma substância química acumula-se pela retirada direta do meio ambiente através das vias oral, percutânea e respiratória. E a bioacumulação indireta, processo através do qual um produto químico acumula-se em organismos vivos pela ingestão de alimentos que contém estas substâncias.

Os seres aquáticos têm a capacidade de bioacumular uma quantidade relativamente alta de arsênio de modo mais eficiente que os organismos terrestres (BARRA et al., 2000) seja por contato direto ou se alimentando de organismos já contaminados. Agah et al. (2010) avaliaram a concentração de elementos traços nos músculos e fígados de duas espécies de peixes e determinaram maiores concentrações no fígado. Os peixes e outros seres aquáticos que ocupam níveis mais altos na cadeia alimentar têm tendência a concentrar metais tóxicos em certas partes do seu corpo, e evidencia a importância de se estudar a capacidade de acumulação nas mesmas (TAWHEEL; SHUAIMI; AHMAD, 2013).

O processo de acumulação de metais em seres aquáticos como peixes através de rotas que não fazem parte da dieta desses animais é definido como bioconcentração, e o que relaciona a concentração desses metais na água e em seus organismos (no equilíbrio) é denominado fator de bioconcentração (BCF), utilizado para estimar a tendência em acumular metal em seus tecidos (LIAO, 2003). O BCF pode ser calculado pela concentração determinada nos tecidos de peixes (C_f , $\mu\text{g g}^{-1}$) e nas águas em que os organismos estão expostos (C_w , $\mu\text{g g}^{-1}$), como mostra a equação: $BCF = \frac{C_f}{C_w}$

Attar et al. (1992) avaliaram os níveis de arsênio total nos tecidos musculares de 13 espécies de peixes do Golfo Árabe e determinaram concentrações na faixa de 0,16 a 32,3 $\mu\text{g g}^{-1}$. Liao et al. (2003) obtiveram concentrações de arsênio total nas vísceras de tilápias (12,65 $\mu\text{g g}^{-1}$) e nos músculos (3,55 $\mu\text{g g}^{-1}$) e sugeriram o cozimento dos peixes como uma forma simples de reduzir a quantidade de arsênio ingerido.

2.3. Criação e consumo de tilápia no Brasil

A aquicultura brasileira está baseada principalmente em sistemas semi-intensivos de produção de pescados, sustentada por pequenos produtores, característica comum na maioria dos casos de países com grande potencial produtor (VALENTI et al., 2000). Dentre os seres aquáticos que são produzidos no Brasil, a tilápia é o maior destaque. A expansão do cultivo da tilápia do Nilo deve-se, principalmente, ao alto desempenho na produção, alta rusticidade, adaptabilidade aos mais diversos sistemas de criação, aceitação no mercado de lazer (pesque-pague) e alimentício, pela qualidade organoléptica e nutritiva do seu filé (MEURER et al., 2003).

O regime semi-intensivo está baseado no uso de viveiros-berçário e viveiros escavados, de ração comercial, aeradores e controle básico da qualidade da água (OSTRENSKY et al., 2008). O cultivo de tilápias em tanque-rede é o exemplo mais claro de sistemas intensivos de criação, praticado e popularizado devido ao fácil manejo, rápido retorno financeiro, e à alta produtividade proporcionada pelo sistema (CAMPOS et al., 2007). O regime intensivo, restringido antigamente às regiões serranas, são agora realizados em grandes reservatórios da União, como é o caso do Rio São Francisco, na região Nordeste, e do Rio Tietê, na região Sudeste do Brasil (OSTRENSKY et al., 2008). A Figura 2.1 mostra as formas de piscicultura praticadas no país.

Outra forma de produção é o regime extensivo, realizado por pequenos produtores em represas públicas, sendo que posteriormente os peixes são capturados por pescadores que vivem no entorno dessas represas (Figura 2.1). Nestes casos raramente usa-se ração comercial e os peixes são alimentados, geralmente, com subprodutos agrícolas ou dejetos animais (OSTRENSKY et al., 2008).

Figura 2.1 - Sistemas de cultivo praticados na piscicultura: viveiro escavado (esquerda), tanques-rede (direita sup.), represa pública (direita inf.)



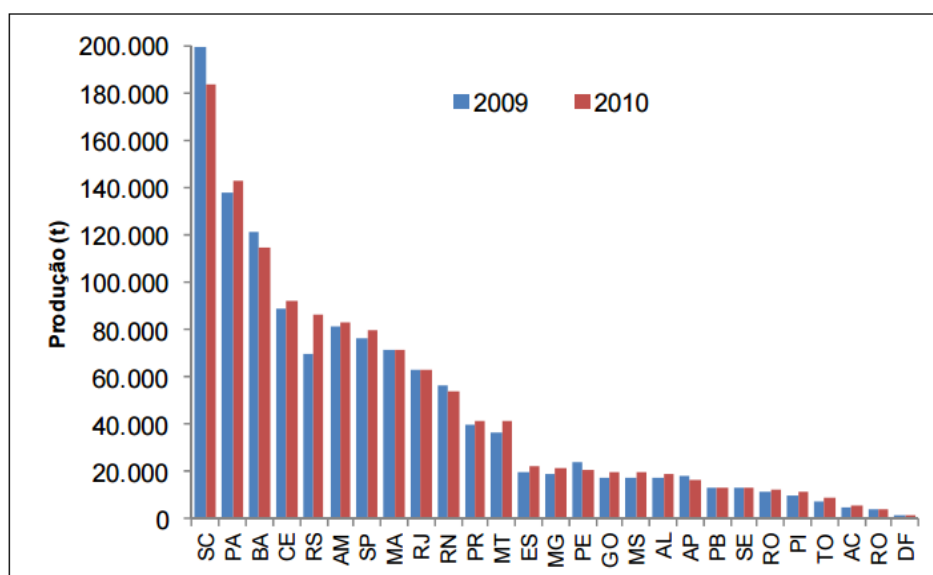
Fonte: (autoria própria; BRASIL, 2012, 2013).

A tilápia do Nilo tem se destacado na produção intensiva em regiões de clima quente devido ao fato de que a maioria das espécies são oriundas do continente africano. Características como o rápido crescimento, capacidade de adaptação a ambientes com baixos níveis de oxigenação e resistência às doenças, carne branca, sem espinhos e de sabor pouco acentuado, colocaram as tilápias no pódio das principais espécies cultivadas comercialmente (KUBTIZA F., 2000). Os peixes machos dessa

espécie crescem mais que as fêmeas e, por esse motivo, os cultivos intensivos buscam a manipulação hormonal para obtenção da reversão sexual (BRITO et al., 2014).

No Brasil o consumo de pescado teve um crescimento de pouco mais de 23% nos anos de 2010 e 2011, um aumento muito maior que nos dois anos anteriores (7,9%), levando o país a alcançar um consumo médio de 11,17 kg por habitante no ano de 2011 (BRASIL, MPA, 2013). De acordo com levantamentos feitos em 2013 o consumo de peixes já atingiu 14,5 kg/habitante ao ano (BRASIL, 2015). Esse crescimento pode ser explicado pela melhoria nas condições de vida em termos financeiros da população, aumentando assim seu poder de compra e possibilitando a procura por alimentos mais saudáveis. Nos anos de 2009 e 2010 o Brasil já ocupava o 18º lugar no ranking mundial de produção de pescado, sendo que em termos de produção nacional, o estado de São Paulo nestes mesmos anos, figurava como 7º maior produtor no país (BRASIL, MPA, 2010) como pode-se observar na Figura 2.2.

Figura 2.2 - Produção de pescado nacional em 2009 e 2010 por estados brasileiros.



Fonte: (BRASIL, MPA, 2010, p.21)

Segundo Fitzsimmons (2008) as tilápias ocupam a segunda colocação em termos de peixes consumidos no mundo, atrás apenas das carpas. O potencial de crescimento da “tilapicultura” se deve ao fato do mesmo possuir uma demanda global, favorecendo ao desenvolvimento de novos sistemas de criação. O Brasil já ocupa o quinto lugar no ranking mundial de produção de tilápias, atrás da China, Egito, Indonésia e Filipinas.

A qualidade da água é fundamental para a manutenção e criação adequada das tilápias, podendo causar estresse aos peixes e consequente perda de apetite, maior suscetibilidade a doenças e parasitas, até a morte (HERMES et al., 2009). Segundo Kubitza F. (2000), valores de pH abaixo de 4,5 e acima de 10,5 levam a uma mortalidade significativa dos peixes, devendo ser mantido entre 6,0 e 8,5. A temperatura é uma das variáveis mais importantes para qualquer organismo aquático, pois influencia a concentração de oxigênio na água e, no caso das tilápias, deve ser mantida entre 27 a 32 °C (ALZIEU C., 1990; KUBITZA F., 2000).

2.4. Digestão de amostra por radiação micro-ondas

A técnica de análise de elementos traços por ICP-MS geralmente requer que a amostra esteja na forma líquida, sendo necessário uma etapa a mais em seu preparo no caso de amostras sólidas. Dependendo das características do analito de interesse como volatilidade e reatividade, os reagentes e o métodos utilizado nesta conversão da amostra é de grande importância.

Levando em consideração que o preparo de amostra é a etapa mais crítica de um processo analítico por tomar mais tempo e reagentes, a busca por um método que favoreça melhorias nestes aspectos, além de evitar contaminações e perdas do analito, promoveu um desenvolvimento em técnicas como a digestão por radiação micro-ondas em frascos fechados.

As micro-ondas são ondas eletromagnéticas que possuem comprimento de onda maiores que o infravermelho, variando numa faixa de frequência do espectro eletromagnético que vai de 0.3 a 300 GHz (OLIVEIRA, 2003).

A interação da radiação micro-ondas com a amostra e reagentes causam dois processos conhecidos como migração iônica e rotação de dipolo, resultando no aumento considerável da temperatura da mistura e consequente decomposição (OLIVEIRA, 2003). Estes dois processos que ocorrem quando as micro-ondas interagem com a solução de um ácido (ou ácidos) empregados na digestão da amostra, resulta também em um movimento molecular, contribuindo para o aquecimento do mesmo (NOGUEIRA, 2003).

O forno micro-ondas utilizado neste projeto foi o convencional em sistema fechado do tipo cavidade, constituído basicamente de um gerador de micro-ondas (magnetron), um guia de ondas, uma cavidade ressoante, um rotor e os vasos fechados de digestão. Além disso deve-se levar em consideração que o material dos vasos seja transparente às radiações micro-ondas, geralmente de politetrafluoretileno (PTFE), e que o sistema possua um sensor interno de temperatura e pressão e dispositivos de segurança.

As digestões em fornos micro-ondas operando com recipientes fechados apresentam vantagens em relação a outros métodos de aquecimento (chapa aquecedora, bloco digestor, forno tipo mufla, etc.). Além de possibilitarem maior eficiência nas dissoluções pela alta temperatura, os fornos micro-ondas em sistema fechado reduzem os riscos de perda de analitos voláteis e contaminações cruzadas provenientes do ambiente de trabalho, e também diminuem significativamente a quantidade de reagentes necessários para a digestão.

Na digestão de amostras orgânicas o ácido mais comumente empregado é o nítrico (HNO_3) concentrado. O HNO_3 é um forte agente oxidante e a maioria dos analitos são solúveis no final da digestão e, apesar

da temperatura de ebulição relativamente baixa (121 °C), o uso de frascos fechados possibilita o aumento do ponto de ebulição da mistura e melhora a eficiência da digestão (FLORES, 2014).

Bocca e Forte (2011) chamaram atenção para o fato de que a adição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) aumenta o potencial de oxidação do ácido nítrico, reoxidando as espécies formadas NO_x em NO_3^- e assim evitando a formação de óxidos nitrosos amarelados. Gonzalez et al. (2011) destacaram a eficiência da digestão quando empregado pequenas quantidades de H_2O_2 principalmente em amostras biológicas, avaliando o teor de carbono residual por ICP OES.

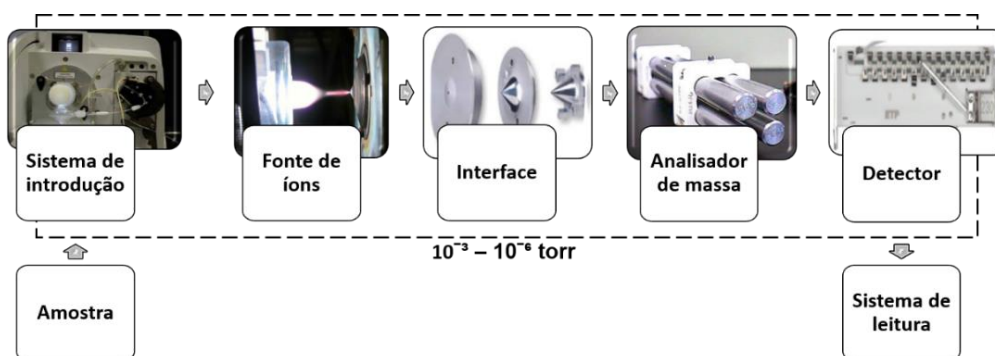
Mketo et al. (2016) avaliaram a eficiência da extração de elementos traços em carvão através da digestão assistida por radiação micro-ondas e estabeleceram uma concentração ótima de HNO_3 em 7 mol L^{-1} , sendo que o programa de aquecimento foi otimizado por meio da análise de materiais de referência certificados obtendo resultados satisfatórios em uma temperatura de 200 °C e adição de H_2O_2 na concentração de 3 mol L^{-1} .

2.5. Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS)

A determinação de arsênio em baixas concentrações com exatidão ainda é um desafio em química analítica. A avaliação dos impactos no meio ambiente e na saúde, juntamente com as respectivas legislações que restringem os limites permitidos de contaminantes inorgânicos em diferentes produtos, têm aumentado a preocupação quanto ao aperfeiçoamento na análise instrumental. Além disso, as evoluções no preparo de amostras e técnicas instrumentais de análise têm contribuído na mitigação de interferências espectrais e matriciais, possibilitando a determinação de As em níveis traços (sub-microgramas ou nanogramas).

A técnica empregada nesse trabalho foi a espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) e analisador de massa quadrupolar. A Figura 2.3 mostra os principais componentes de um ICP-MS. O ICP-MS é constituído de três regiões: o sistema de introdução de amostras, a interface e o analisador de massas. Em geral, as aplicações do ICP-MS requerem que a amostra esteja na forma líquida, embora já existam no mercado sistemas como a ablação a laser para amostras sólidas, e sistemas de vaporização para inserção de gases (ETV).

Figura 2.3 - Diagrama de bloco dos principais componentes de um ICP-MS.



Fonte: Autoria própria; imagens retiradas de: PerkinElmer SCIEX, introducing the NexION 300 ICP-MS; University of Texas, <http://www.jsu.utexas.edu/icp-ms/icp-ms/>; e School of Earth and Environmental Sciences, University of Manchester.

As primeiras experiências com ICP-MS levaram os pesquisadores a acreditarem ser um “método livre de interferências”, principalmente devido a simplicidade do espectro de massas comparado aos da espectrometria atômica ótica (ICP OES) (SKOOG et al., 2014). Estudos realizados posteriormente mostraram que isto não era verdade, pois a técnica possui sérios problemas com interferência.

Existem três tipos de interferências que podem ocorrer em ICP-MS – espectrais, matriciais e físicas – e os equipamentos atuais oferecem diversas formas de minimizar ou até eliminá-las. As interferências físicas são causadas pelo acúmulo de sólidos nos orifícios dos cones na interface, e são as mais simples de serem superadas. A maioria dos modelos de ICP-

MS têm uma tolerância máxima de 0,1 a 0,4% de sólidos dissolvidos nas amostras (TYLER G., 1994). A longo prazo podem causar desvios no sinal do analito, verificado pelo desvio padrão relativo (RSD) nos resultados registrados. Uma simples limpeza periódica nos cones de amostragem e skimmer, ou a diluição das amostras podem evitar este tipo de interferência. Além disso, a utilização de padrão interno no branco, padrões e amostras podem compensar os desvios no sinal.

As interferências matriciais são causadas, como o próprio nome se refere, por componentes da matriz onde a amostra está contida e têm como consequências dois efeitos denominados carga espacial e transporte de amostra. O primeiro efeito ocorre principalmente na determinação de elementos de massa pequena na presença de elementos mais pesados. Os íons de maior massa ocupam a região central do feixe de íons que percorre o caminho ótico, enquanto aqueles mais leves permanecem nas regiões periféricas tendo suas trajetórias desviadas e, conseqüentemente, diminuindo a transmissão para o detector.

O efeito de transporte de amostra é causado pela supressão do sinal do analito devido a composição da matriz. Caso a amostra apresente um alto grau de viscosidade, a formação e seleção das gotículas pelo nebulizador e câmara de nebulização respectivamente, serão prejudicadas. Outro impacto causado pela matriz é na temperatura do plasma, visto que sua condição de ionização pode ser reduzida quando altas concentrações de ácidos empregados no preparo de amostras são aspiradas pelo equipamento. O plasma de Ar possui energia suficiente para ionizar a maioria dos elementos, porém quando ocorre a redução dessa energia, elementos com energia de ionização acima de 8 – 9 eV (ex. As, Be e Se) dificilmente são detectados (SPECTROSCOPY, 2016).

O tipo mais preocupante de interferência é a espectral devido à complexidade exigida para sua mitigação. Podem ocorrer de duas formas: pela sobreposição isobárica ou pela combinação dos elementos da amostra e da atmosfera produzindo óxidos, hidróxidos, hidretos e íons poliatômicos

(ou moleculares). Quando estão presentes na amostra elementos com a mesma razão m/z do analito, ocorrerá uma sobreposição isobárica, interferindo na determinação do analito. No caso da determinação de cálcio ($^{40}\text{Ca}^+$), o próprio íon $^{40}\text{Ar}^+$ proveniente do plasma causa este problema, tornando sua detecção muito complexa. A escolha de outro isótopo pode resolver em alguns casos, porém para elementos “monoisotópicos” não há essa possibilidade, como no caso de $^{75}\text{As}^+$.

A combinação de átomos ^1H , ^{16}O e $^{16}\text{O}^1\text{H}$ provenientes da água utilizada como solvente ou do ar atmosférico com elementos da amostra, podem causar interferência com o íon de interesse na mesma razão m/z . Este tipo de interferência está relacionado com as condições de ionização do plasma, podendo ser evitada pela otimização do fluxo de gás no nebulizador, a potência RF aplicada e a posição de amostragem. E por fim, a interferência espectral mais grave de se resolver, os íons poliatômicos, produzidos pela combinação de N e O do ar atmosférico, componentes da matriz (solvente e amostra) com o gás do plasma. A Tabela 2.2 mostra as principais espécies que causam interferências e os analitos afetados por elas.

Tabela 2.2 - Interferências espectrais e os íons afetados

Óxidos/Hidróxidos/ Hidretos	Íons afetados	Espécies Poliatômicas	Íons afetados
$^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}$	^{56}Fe	^{38}ArH	^{39}K
$^{48}\text{Ti}^{16}\text{O}$	^{64}Zn	$^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$	^{56}Fe
$^{98}\text{Mo}^{16}\text{O}$	^{114}Cd	$^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$	^{80}Se
$^{138}\text{Ba}^{16}\text{O}$	$^{154}\text{Sm}, ^{154}\text{Gd}$	$^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}$	^{51}V
$^{139}\text{La}^{16}\text{O}$	^{155}Gd	$^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$	^{75}As
$^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}$	$^{156}\text{Gd}, ^{156}\text{Dy}$	$^{14}\text{N}^{14}\text{N}$	^{28}Si
$^{40}\text{Ca}^{16}\text{OH}$	^{57}Fe	$^{34}\text{S}^{18}\text{O}$	^{52}Cr
$^{31}\text{P}^{18}\text{O}^{16}\text{OH}$	^{66}Zn	$^{12}\text{C}^{12}\text{C}$	^{24}Mg
$^{31}\text{P}^{16}\text{O}_2\text{H}$	^{64}Zn	$^{48}\text{Ca}^{16}\text{OH}$	^{65}Cu
^{79}BrH	^{80}Se	$^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}$	^{63}Cu

Fonte: adaptada (THOMAS R., 2002)

Com exceção das interferências espectrais de sobreposição isobárica e espécies poliatômicas, os efeitos de carga espacial e transporte de amostra, assim como a formação de óxidos, hidróxidos e hidretos, podem ser reduzidos ou eliminados por uma otimização instrumental adequada. O software do próprio equipamento com o auxílio de soluções multielementares certificadas, realiza a otimização de parâmetros como o posicionamento da tocha do plasma, o fluxo de gás no nebulizador, a voltagem aplicada às hastes do quadrupolo, a calibração do detector por meio de uma varredura entre as regiões de massa 5 – 230 *uma*, e por avaliações de performance diárias.

Existem diversas estratégias para superar as interferências espectrais, como equações matemáticas, analisadores de alta resolução, plasma frio e células de reação e colisão. O modo mais eficiente de resolver o problema com interferência espectral é utilizando a tecnologia de alta resolução como o analisador de massas de setor magnético de duplo-foco, mesmo que não seja considerado ideal para análises de rotina, os mesmos oferecem o melhor em poder de resolução sendo um ótimo instrumento em aplicações que requerem detecção em níveis traços em matrizes complexas (THOMAS R., 2002).

Geralmente os espectrômetros de massas quadrupolares empregados nos ICP-MS possuem resolução entre 0,7 a 1,0 *uma*, e mesmo que seja suficiente para a maioria das análises de rotina, não é o bastante para resolver sobreposições isobáricas ou moleculares sobre o elemento de interesse (WOLF R., 2005). O poder de resolução (R) de um espectrômetro de massa é calculado como $R = m/\Delta m$, onde Δm é a variação entre a massa do analito de interesse e a massa da espécie interferente. A Tabela 2.3 mostra alguns exemplos de interferências poliatômicas e isobáricas e a resolução necessária para separar seus espectros e os mesmos serem resolvidos pelo espectrômetro.

Embora o analisador de alta resolução permita a separação das interferências espectrais, alcançando resoluções maiores que 7500, há uma grande perda na sensibilidade e, conseqüentemente, redução nos limites de detecção (KLAUE, BLUM, 1999). Além disso, este tipo de analisador possui um alto custo e tempo de análise mais longo comparado ao analisador quadrupolar, não sendo indicado para análises de rotina.

Tabela 2.3 - Resolução necessária para resolver interferências espectrais

Analito (massa)	Interferente (massa)	$ \Delta m $	m	R
^{75}As (74,9216)	$^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$ (74,9312)	0,00963	75	7788
^{53}Cr (52,9406)	$^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}$ (52,9608)	0,02016	53	2629
^{56}Fe (55,9349)	$^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$ (55,9572)	0,02235	56	2505
^{40}Ca (39,9625)	^{40}Ar (39,96238)	0,00021	40	190476
^{87}Sr (86,9088)	^{87}Rb (86,90918)	0,00029	87	300000

Fonte: (WOLF R., 2005)

Apesar dos benefícios da alta resolução, cerca de 90% dos ICP-MS instalados pelo mundo operam com analisadores quadrupolares, devido a maior rapidez nas análises e menor custo de aquisição e operação (THOMAS R., 2002). Outras formas já citadas para redução ou eliminação das interferências espectrais como equações matemáticas, tecnologia de plasma frio, e células de colisão e/ou reação são bem descritas na literatura em diversos trabalhos (COLON et al., 2009; FIALHO et al., 2011; GUO et al., 2011; GONZALEZ et al., 2016). A forma de correção exigida irá depender da complexidade de matriz, da sensibilidade do analito analisado e dos níveis de interferência do mesmo.

As duas ferramentas empregadas neste trabalho foram as equações matemáticas e célula de colisão. Em casos de interferências isobáricas e íons poliatômicos mais simples, são utilizadas equações no software do equipamento, baseadas na medida da intensidade do interferente em outra unidade de massa, livre de interferência isobárica, sendo que a correção é aplicada na razão desta intensidade pela intensidade da massa do analito

afetado. Por exemplo, a determinação de ^{114}Cd na presença de ^{114}Sn , emprega-se a equação $^{114}\text{Cd} = I_{114} - (^{114}\text{Sn}/^{118}\text{Sn}) \times (^{118}\text{Sn})$, onde leva-se em consideração a intensidade de outro isótopo de estanho (livre de interferência) pela razão relativa à abundância natural destes dois isótopos. Em casos de interferências mais complexas como as poliatômicas, as equações se tornam menos eficazes, sendo necessário outras ferramentas para corrigi-las.

A tecnologia de célula de colisão consiste em um quadrupolo posicionado antes do analisador de massa, o qual é preenchido por um gás colisional quimicamente inerte, como hélio (He), e operado por uma potência RF que irá discriminar o analito do interferente. Esta discriminação se dá pela diferença na energia cinética produzida pela colisão do íon ou molécula interferente com o analito. Como o raio do íon poliatômico é maior que o do analito, a tendência é o mesmo sofrer mais colisões durante o tempo. Apesar da perda de sensibilidade causada pelas colisões, caso otimizado corretamente, a utilização da célula de colisão pode resolver interferências espectrais complexas. Os parâmetros que devem ser otimizados, neste caso, são o fluxo de gás colisional na célula e a voltagem aplicada as hastes do quadrupolo.

3. OBJETIVOS

O objetivo principal do trabalho consistiu na determinação da concentração total de arsênio em tilápias coletadas em ambiente natural (rios e pesqueiro) e criadas no laboratório. Além disso, foi realizado um ensaio de bioacumulação de arsênio(III) afim de se avaliar o comportamento deste contaminante por meio de parâmetros toxicocinéticos. Os objetivos específicos são divididos em duas fases:

I. Determinação de arsênio:

- Otimização dos parâmetros instrumentais para determinação de arsênio;
- Determinação do teor total de arsênio em tilápias coletadas em rio, pesqueiro e mercado municipal;
- Avaliação da distribuição dos contaminantes pelos tecidos (filet, estômago, brânquias e fígado);
- Estudo da estimativa de ingestão semanal de arsênio pela população brasileira.

II. Bioacumulação de As (III):

- Ensaios de Bioacumulação com As (III);
- Avaliação dos parâmetros toxicocinéticos;
- Avaliação da distribuição do arsênio nos tecidos de interesse (filet, estômago, brânquias e fígado).

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Reagentes e soluções

As vidrarias, frascos, tubos de ensaio, ponteiras e outros materiais utilizados nos experimentos foram previamente descontaminados e desmineralizados em banhos ácidos contendo 10% (v/v) de HNO_3 durante 48 horas e, logo após, lavados três vezes com água deionizada ultrapura. No preparo de reagentes e padrões foi empregado água deionizada purificada em sistema Milli-Q® (18,2 Ω cm, Millipore, EUA). Nas digestões por micro-ondas foi empregado HNO_3 concentrado (Sigma-Aldrich) subdestilado e H_2O_2 (Sigma-Aldrich) 30% (v/v). Para o funcionamento do moinho criogênico utilizou-se nitrogênio líquido (99,999%) fornecido pela Nitrogen Comércio De Nitrogênio Líquido Ltda. - ME (Ribeirão Preto, SP).

Para a construção das curvas analíticas e preparo das soluções de calibração necessárias para a análise de arsênio por ICP-MS, foram utilizados padrões preparados a partir de diluições intermediárias de solução estoque de arsênio $998 \pm 2 \text{ mg L}^{-1}$ (Fluka® Analytical traceCERT® CRMs for ICP-MS). Uma solução preparada a partir do sal arsenito de sódio (NaAsO_2) foi empregada nos ensaios de bioacumulação em tilápias criadas no laboratório. Argônio (99,999%) e hélio (99,999%) foram fornecidos pela White Martins (Sertãozinho, SP) e utilizados como gerador de plasma/nebulizador/gás auxiliar e gás colisional respectivamente.

A fim de avaliar a exatidão do método foram utilizados materiais de referência certificado NIST 1640a (trace elements in water), NIST 1566a (Oyster Tissue) e NRCC DORM-3 (Fish Protein) com valores certificados de arsênio total de $8,075 \pm 0,070 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, $7,65 \pm 0,65$ e $6,88 \pm 0,30 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente.

4.2 Coleta e preparo de amostras

A coleta das tilápias foi realizada no período de julho a agosto de 2015 seguindo critérios legais e que visavam a qualidade dos resultados evitando possíveis contaminações do meio. De acordo com o parágrafo 2º do Artigo 3º da Instrução Normativa Nº 03, de 01 de setembro de 2014 que regula a coleta e captura de espécies com finalidade científica ou didática (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2014), a norma não se aplica a coleta e transporte de material biológico de espécies domesticadas ou cultivadas, silvestres exóticas em condição *ex situ* com exceção a pesquisas realizadas em unidades de conservação federal de domínio público, não sendo necessário portanto autorização especial para captura das tilápias nestes locais.

Foram coletados 5 exemplares de três locais distintos da região noroeste do Estado de São Paulo: um pesqueiro próximo a região de São José do Rio Preto (coordenadas 20°45'49"S 49°13'16"O), em um sistema de criação em tanques-rede no Rio Tietê próximo a região de Buritama (coordenadas 21°7'7.58"S 50°10'29.81"O) e uma peixaria localizada na cidade de Votuporanga (coordenadas 20°25'1.10"S 49°58'31.48"O). A Figura 4.1 mostra um mapa com a localidade dos pontos de coleta dos exemplares de peixes, destacando os principais corpos d'água da região (Tietê, Turvo e Grande). Foram coletadas amostras de água no meio onde as espécies de peixe foram recolhidas, e as mesmas foram estocadas em refrigerador a -5 °C para posterior análise visando a determinação de arsênio total.

Os peixes coletados foram armazenados dentro de sacos plásticos hermeticamente fechados em uma caixa térmica desmineralizada com gelo e levados prontamente ao laboratório. Em seguida os mesmos foram lavados com água deionizada, medidos, pesados e submetidos a retirada dos principais órgãos (brânquias, estômago e fígado) com o auxílio de materiais cirúrgicos de aço inoxidável. Uma porção de tecido muscular

moagem das amostras de tecido de peixe foi realizada empregando um moinho pulverizador criogênico modelo MA775 (Marconi, Piracicaba, SP). O moinho com capacidade para 9 litros de nitrogênio líquido, disponibiliza um sistema eletrônico para variação de velocidade e tempo de moagem e sensor do nível de nitrogênio na cuba. Além disso possui um recipiente de moagem para até 4 cilindros de polycarbonato transparentes com capacidade de 0,1 – 5,0 g de amostra. O programa de moagem consistiu em 1 minuto de congelamento da amostra e 3 minutos de moagem com uma frequência de 20 Hz, sendo que os tecidos musculares necessitaram de uma etapa anterior para diminuição das partículas feita por meio de uma faca de cerâmica.

As digestões foram realizadas em um forno micro-ondas tipo cavidade modelo Multiwave 3000 Microwave oven (Anton Paar GmbH, Graz, Austria), possuindo uma cavidade de 66 litros e equipado com um rotor 16MF100 com capacidade para 16 vasos digestores. Aproximadamente 200 mg de cada amostra foi digerida utilizando 6,0 mL de HNO_3 (7,0 mol L^{-1}) e 2,0 mL de H_2O_2 30% m m^{-1} em frascos fechados de PTFE. O programa de aquecimento do micro-ondas para digestão está descrito na Tabela 4.1. Sensores de temperatura e pressão foram utilizados em todas as digestões. Após a digestão, as amostras e os brancos foram transferidos e ajustados quantitativamente para frascos de polipropileno de 30 mL, e seus volumes ajustados com água ultrapura. Todo processo foi feito em triplicata, incluindo as soluções do branco analítico.

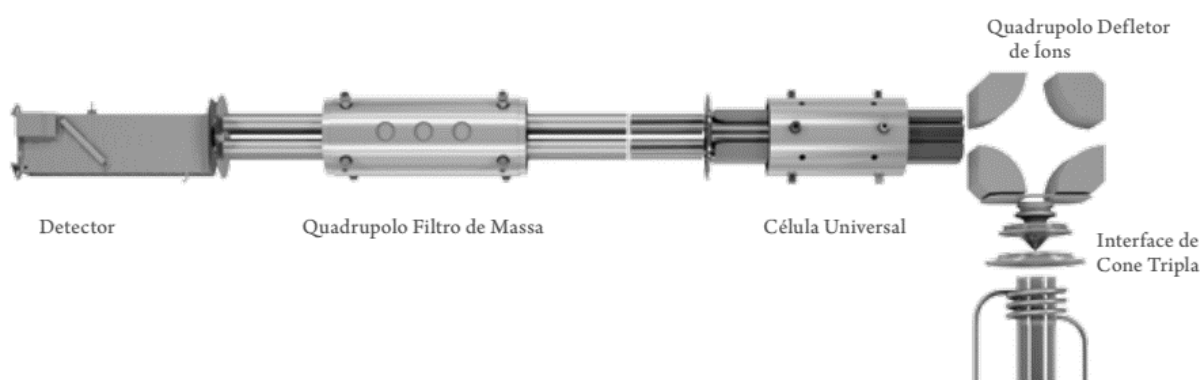
Tabela 4.1 - Programa de aquecimento do micro-ondas para digestão das amostras de tecidos de tilápia

Etapa	Potência (W)	Temperatura (C)	Tempo de espera (min)
1	1100	190	20
2	1100	190	20
Resfriamento	0	0	10

4.3 Instrumentação

As determinações de arsênio total foram realizadas por um ICP-MS modelo NexION 300X (Perkin-Elmer, Shelton, CT) equipado com a tecnologia de célula universal (Universal Cell Technology™ - UCT). O instrumento também opera com a ferramenta de celda de colisão e discriminação por energia cinética (KED) a base de gás Hélio. O esquema dos principais componentes no ICP-MS empregado está demonstrado na Figura 4.2.

Figura 4.2 - Principais componentes do NexION 300X utilizado.



Fonte: Adaptada, The 30-minute Guide to ICP-MS (PerkinElmer, 2010, p.6).

Além da operação em configuração padrão do instrumento (sem utilização da célula universal), a UCT permite que o ICP-MS opere em modos diferentes, dependendo do nível de remoção de interferência e limites de detecção necessários. No desenvolvimento deste projeto foi empregado o modo de operação por discriminação de energia cinética (KED) que apesar da perda de sensibilidade na detecção, possibilita a remoção de grande parte do interferente poliatômico de ^{75}As ($^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$).

A potência de radiofrequência (RF) adotada foi de 1600 Watts. Os parâmetros instrumentais foram otimizados sempre antes das análises e a Tabela 4.2 apresenta as configurações instrumentais bem como os parâmetros de aquisição de dados.

Tabela 4.2 - Configuração instrumental e parâmetros de aquisição de dados

Parâmetros instrumentais	
Potencia RF	1600 W
Vazão de gás no plasma	18 L min ⁻¹
Vazão de gás auxiliar	1,2 L min ⁻¹
Vazão de gás no nebulizador	1,01 L min ⁻¹
Voltagem de entrada	-3,00 V
Voltagem de saída	-32,00 V
CRO ^a	-15,00 V
QRO ^b	-12,00 V
Parâmetros de aquisição de dados	
Número de varreduras por leitura (sweeps)	50
Número de leituras (readings)	1
Número de replicatas	3
Tempo de espera (Dwell Time)	25 s
Gás de colisão	Hélio
RPq ^c	0,25 V
Vazão de gás na Cella de Colisão	0,1 – 3,0 mL min ⁻¹
Faixa de calibração	0,1 – 15,0 µg L ⁻¹

a – CRO (Cell Rod Offset) – é a voltagem aplicada ao quadrupolo da cela de reação/colisão; b – QRO (Quadrupole Rod Offset) – é a voltagem aplicada ao quadrupolo analisador de massas; c – RPq está relacionado a voltagem aplicada as hastes do quadrupolo e precisa ser otimizada.

4.4 Estimativa de ingestão diária de arsênio

A estimativa de ingestão diária ou mensal de arsênio foi calculada baseada no consumo médio de peixes frescos da população brasileira indicada pelo Ministério da Pesca e Aquicultura que estabeleceu um consumo médio de 14,50 kg (40g dia⁻¹) por habitante no ano de 2013. Essa estimativa é útil na avaliação dos riscos associados a ingestão crônica de arsênio, o que pode causar desde lesões na pele a complicações cardiovasculares e cânceres.

Em 1989 a *Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (FAO/WHO) Expert Committee on Food Additives (JECFA)* estabeleceram uma estimativa provisória de ingestão

semanal tolerável (provisional tolerable weekly intake – PTWI) de $15 \mu\text{g kg}^{-1}$ por peso corporal, porém a European Food Safety Authority (EFSA) Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM Panel) determinaram que essa estimativa não era mais apropriada visto que dados obtidos mostravam que o arsênio inorgânico causava câncer de pulmão e bexiga em níveis antes considerados seguros (OMS, 2010; FONTCUBERTA et al., 2011).

O CONTAM Panel estabeleceu doses de referência (benchmark dose lower limit - BMDL) variando de $0,3$ a $8 \mu\text{g kg}^{-1}$ por peso corporal/dia como um marco para a caracterização dos riscos causados pelo arsênio inorgânico, sendo que essas doses correspondem à um valor limite de confiança de 95% da BMDL que causa 1% de risco adicional (BMDL_{01}) a quadros de câncer de pele, bexiga e pulmão (EFSA, 2010). Baseado em estudos epidemiológicos o JECFA recomendou valores de referências mais restritivos de 2 a $7 \mu\text{g kg}^{-1}$ por peso corporal/dia e que correspondem a um aumento de 0,5% na chance da incidência de câncer de pulmão (BMDL_{05}) (EFSA, 2014). A estimativa de ingestão de arsênio diária nesta dissertação será calculada com base no peso corpóreo médio da população brasileira de 18 a 65 anos apresentado pelo IBGE de 69 kg (masculino) e 60 kg (feminino) e extrapolando o consumo médio da população para uma única espécie (tilápia) de acordo com a equação (1).

$$\begin{aligned} \text{Ingestão diária de As } (\mu\text{g kg}^{-1}\text{peso corpóreo dia}^{-1}) = & \quad (1) \\ \frac{\text{consumo da população } (\text{g dia}^{-1}) \times \text{conc. determinada de As } (\mu\text{g kg}^{-1})}{\text{peso corpóreo (69 ou 60 kg)}} \div 1000 \end{aligned}$$

4.5 Validação do método proposto

A fim de garantir a exatidão dos dados, materiais de referência certificados (MRC's) foram incluídos em todas as análises, representando

cada matriz. Foram utilizados materiais de referência certificados NIST SRM 1640a (elementos traços em água natural), NIST SRM 1566a (tecido de ostra) e NRCC DORM-3 (proteína de peixe).

Cada amostra foi analisada em triplicata e padrões analisados a cada 10 leituras afim de se manter o nível do desvio padrão relativo (DPR) abaixo de 15%. Foram construídas curvas analíticas com 7 pontos (0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0 e 15,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) preparadas através de soluções estoque de arsênio, buscando coeficientes de determinação (R^2) maiores que 0,99. Além disso, foram obtidos os limites de detecção e quantificação por meio da análise dos brancos e do coeficiente angular das curvas analíticas. A estatística descritiva foi calculada utilizando os softwares Excel (2013) e Past.

O limite de detecção representa a menor concentração do analito que pode ser detectado seguramente e que produz um sinal que pode ser distinguido de zero (ou do sinal do branco), mas não necessariamente quantificado (GONZALEZ; HERRADOR, 2007). Através da curva de calibração pode-se calcular o LD pela equação (2):

$$LD = 3 \frac{S_b}{b} \quad (2)$$

sendo que ' S_b ' é o desvio padrão de 10 medidas da intensidade do branco e ' b ' é o coeficiente angular da reta.

O limite de quantificação é a menor concentração do analito que pode ser determinada quantitativamente com precisão aceitável sob as condições analíticas estabelecidas (GONZALEZ; HERRADOR, 2007). O LQ pode ser determinado do mesmo modo que o LD substituindo o fator 3 por 10:

$$LQ = 10 \frac{S_b}{b} \quad (3)$$

Normalmente os processos que avaliam a tendência ou recuperação (veracidade) de um método são feitos através de relações entre uma série de resultados obtidos nas análises com materiais de referência certificados (MRC). A tendência pode ser expressa como recuperação analítica

(INMETRO, 2011). Quando a recuperação é obtida a partir do uso do MRC, o fator de recuperação é calculado através da equação (4) (BRASIL, 2011):

$$f_{rec,MRC} = \frac{C_{med}}{C_{MRC}} \times 100 \quad (4)$$

onde 'C_{med}' é a concentração medida na análise do MRC e 'C_{MRC}' é a concentração declarada no certificado. As percentagens de recuperação aceitáveis adotadas em nosso trabalho são apresentadas na Tabela 4.3. Portanto a exatidão é avaliada pela proximidade dos resultados obtidos de recuperação analítica com os valores apresentados pelo MRC.

Tabela 4.3 - Percentagem de recuperação aceitável dependendo da concentração de analito

Unidade do analito	Faixa de recuperação (%)
100 ppm	90-107
10 ppm	80-110
1 ppm	80-110
100 ppb	80-110
10 ppb	60-115
1 ppb	40-120

Fonte: adaptada de "A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles" (González A., Herrador M., 2007).

Por outro lado, a precisão está relacionada com a dispersão dos resultados feitos em replicatas de uma mesma amostra ou amostras parecidas em condições definidas (BRASIL, 2011). Normalmente é expressa pelo coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo (DPR).

4.6 Ensaios de bioacumulação com As(III)

Antes do início do experimento toda metodologia a ser aplicada no trabalho foi aprovada por avaliação da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da UNESP, utilizando do dispositivo da Lei nº 11.794, de

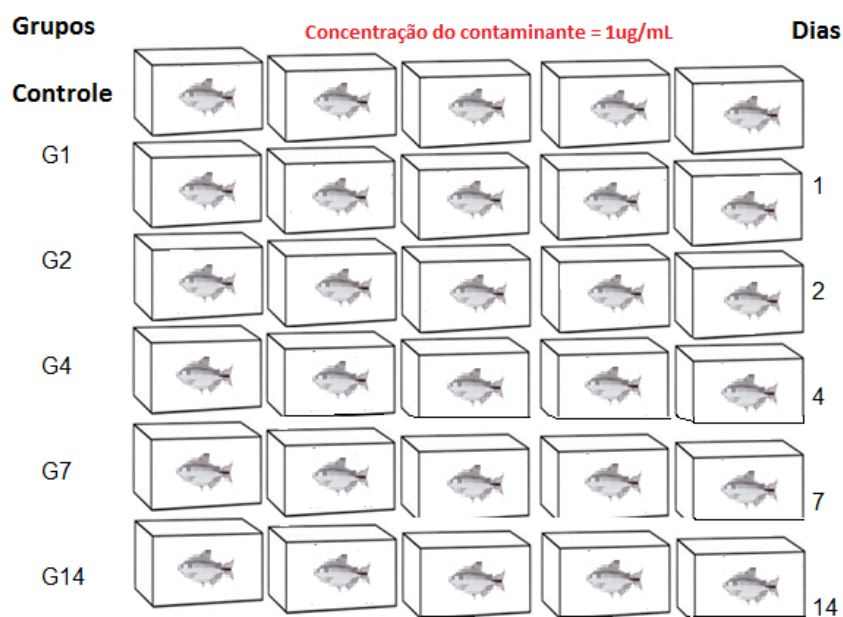
8 de outubro de 2008, e da Resoluções Normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

Os peixes utilizados para o ensaio de bioacumulação foram obtidos com o responsável pelos tanques de piscicultura do campus do IBILCE/UNESP. Foram coletados com auxílio de uma rede de pesca 35 indivíduos da espécie *Oreochromis niloticus* visivelmente sem lesões, doenças ou deformidades. Em seguida permaneceram por um período de 14 dias de aclimação em tanques de 450 litros de água com oxigenação e temperatura controlada (27 ± 2 °C), alimentados diariamente com ração própria para peixes juvenis.

O delineamento experimental foi baseado em Liao et al. (2008). Todo o experimento foi realizado em aquários de plástico retangulares de 25 Litros, aerados constantemente. A concentração de arsênio (III) foi fixada em $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ para cada aquário. Esta alta concentração é necessária para produzir níveis de As nos tecidos da tilápia que sejam viáveis para a avaliação da toxicocinética deste contaminante. Prepararam-se soluções de As (III) dissolvendo uma quantidade calculada de arsenito de sódio de grau analítico (NaAsO_2) em água deionizada. As soluções foram diluídas para a concentração nominal com água da torneira local.

As tilápias foram divididas em 6 grupos (Controle, G1, G2, G4, G7 e G14) contendo 5 indivíduos em cada ($n = 5$), referente aos dias de teste (0, 1, 2, 4 e 7 dias), totalizando 30 tilápias (Figura 4.3). O grupo do dia “0” foi considerado o “grupo Controle” do experimento, ou seja, aquele que não entrou em contato com arsênio. Os peixes foram retirados da água após 1, 2, 4, e 7 dias de absorção/bioacumulação. Os indivíduos dos grupos G14 passaram pelo mesmo período de exposição de 7 dias e em seguida foram alocados para aquários livres de contaminante e deixados lá para um período de depuração de mais 7 dias (totalizando 14 dias para o grupo G14).

Figura 4.3 - Esquema do ensaio de bioacumulação



Fonte: autoria própria.

Ao final dos testes de exposição e depuração, os animais de cada grupo foram coletados, anestesiados e induzidos a morte por imersão em água com 28 mg L⁻¹ de benzocaína e tiveram seus fígados, brânquias, estômagos e músculos coletados e congelados a -80°C para posterior preparo de amostras e análises em ICP-MS. Amostras de água dos aquários foram coletadas diariamente para avaliação dos níveis de arsênio. Todos os grupos estavam sob as mesmas condições (temperatura e oxigenação) e durante o experimento foram alimentados com ração para peixes a cada dois dias. Todos os peixes receberam o mesmo tratamento e as condições de pH e temperatura foram verificados diariamente, não apresentando variações significativas.

O método para determinar os parâmetros toxicocinéticos, as constantes de absorção e de taxa de depuração para cada órgão/tecido alvo se deu pelo ajuste dos dados obtidos das concentrações para a forma integrada da equação cinética para a exposição constante da água, utilizando análise por regressão não-linear (CHOU et al., 2006; TSAI &

LIAO, 2006; LIAO et al., 2008; TSAI et al., 2011; TSAI et al., 2012; CHEN & LIAO, 2012).

$$C_o(t) = C_o(t = 0)e^{-k_d t} + \frac{k_a}{k_d} C_a (1 - e^{-k_d t}) \quad (5)$$

onde $C_o(t)$ é a concentração de As dependente do tempo determinada no órgão alvo da tilápia ($\mu\text{g g}^{-1}$), $C_o(t=0)$ é a concentração de As no tecido alvo no início do ensaio ($\mu\text{g g}^{-1}$), k_a é a constante da taxa de absorção específica de cada órgão ($\text{mL g}^{-1} \text{d}^{-1}$), k_d é a constante da taxa de depuração (d^{-1}), t é o tempo em dias, e C_a é a concentração de As na água ($\mu\text{g mL}^{-1}$). O tempo de meia-vida da depuração ($t_{1/2}$) foi calculada como $\ln 2/k_d$. O fator de bioconcentração (BCF) pode ser calculado como $BCF=k_a/k_d$, representando a capacidade de acumulação líquida que é o resultado da competição entre os processos de absorção e depuração. Utilizamos a opção de análise não-linear do software Origin (*OriginLab Corporation*) para executar todos os ajustes de curvas. O Origin também foi utilizado para calcular o coeficiente de determinação (r^2) e realizar análises estatísticas (análise de variância – ANOVA). A significância estatística foi justificada se os valores de p fossem inferiores a 0,05.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Otimização do método de análise

Primeiramente foi realizado uma otimização do método de análise por ICP-MS por meio da determinação da concentração de arsênio total de três materiais de referência certificado (MRC's). Dois modos de operação do ICP-MS foram avaliados, padrão e KED, afim de se obter os resultados mais exatos possíveis dentro da faixa de desvio padrão dos MRC's. No modo padrão de operação do instrumento, no qual não existe a função da UCT, foram testadas duas equações matemáticas com intuito de se avaliar a correção dos possíveis interferentes presentes nas amostras, além do modo padrão sem correções. No modo KED foram testadas cinco vazões de gás hélio na cela de colisão para se observar os níveis de correção e a perda de sensibilidade oferecido por este modo de operação do instrumento. A Tabela 5.1 mostra os parâmetros de otimização avaliados para os dois modos de operação. As equações de correção estão representadas abaixo.

Tabela 5.1 - Parâmetros de otimização do método (modo padrão e KED) de análise por ICP-MS.

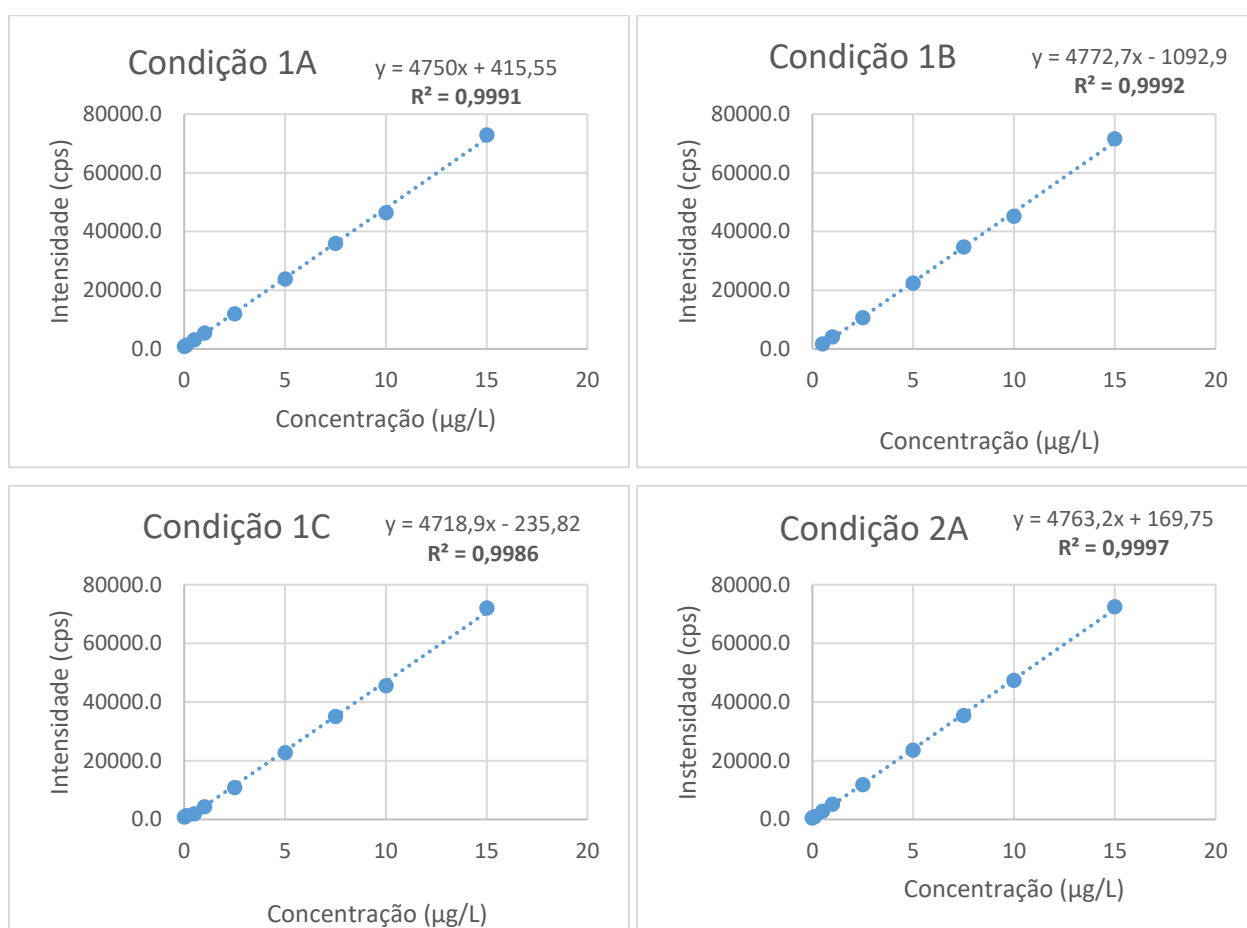
Modo	Padrão			KED				
Condição	1A	1B	1C	2A	2B	2C	2D	2E
Fluxo de He (mL min⁻¹)	---	---	---	0,2	0,5	1,0	2,0	3,0
Equação (correção)	---	Sim ¹	Sim ²	---	---	---	---	---

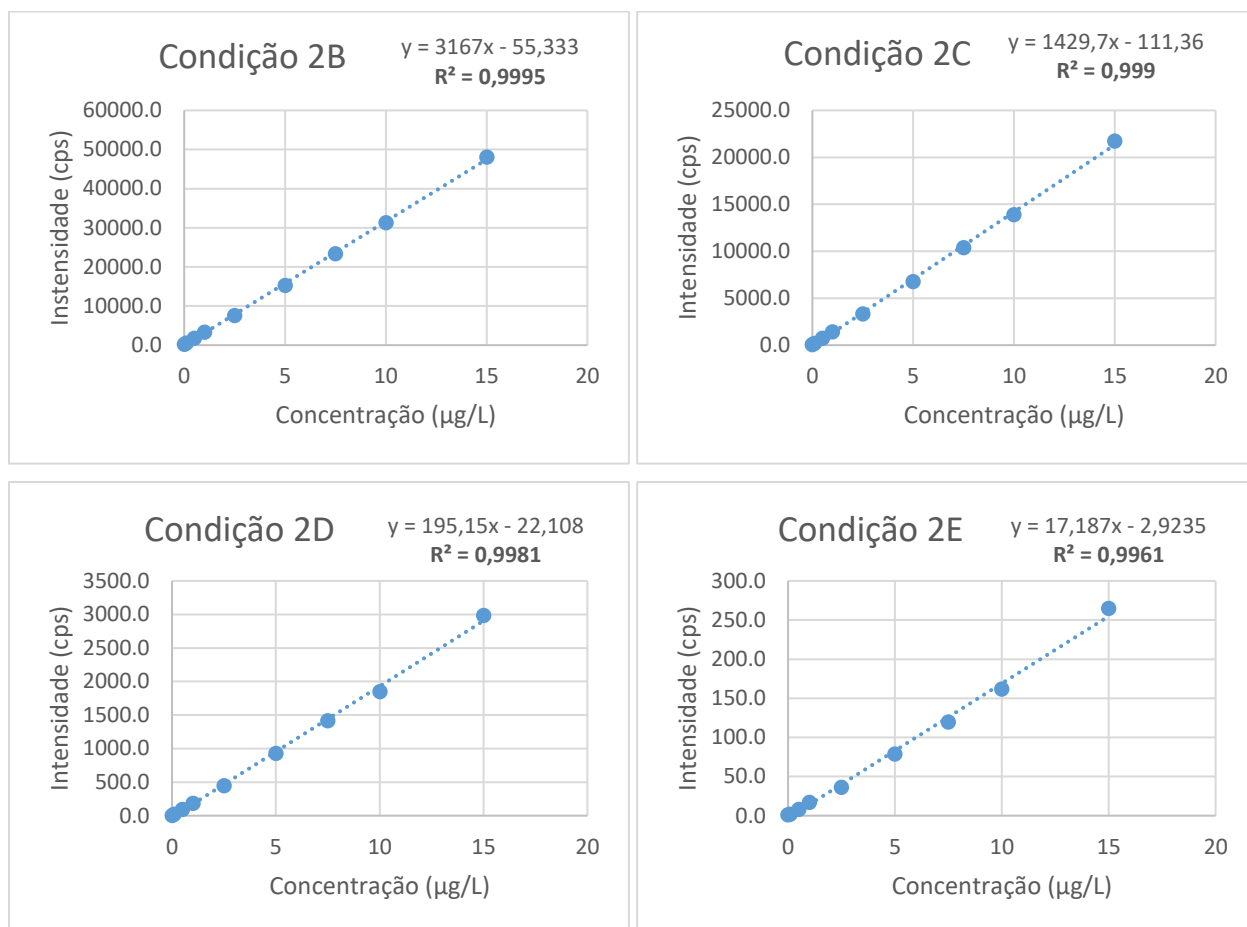
$$1 - 1B \text{ equação de correção} = -3,127 \times \text{massa}_{77}$$

$$2 - 1C \text{ equação de correção} = -3,127 \times (\text{massa}_{77} - 0,874 \times \text{massa}_{82})$$

Para cada parâmetro testado foi realizada uma curva analítica afim de se verificar a linearidade por meio dos coeficientes de correlação linear. As curvas foram preparadas com 8 concentrações crescentes de arsênio ($0,1 - 15,0 \mu\text{g L}^{-1}$) em meio de HNO_3 1% v/v, e as intensidades registradas pelo equipamento foram utilizadas para a construção dos gráficos como mostrado na Figura 5.1. Os coeficientes de correlação obtidos para todos os parâmetros testados se apresentaram dentro dos limites estabelecidos como aceitáveis pela ANVISA e INMETRO, 0,99 e 0,90 respectivamente.

Figura 5.1 - Curvas analíticas dos parâmetros de otimização instrumental.





Fonte: autoria própria

Pode ser observado no eixo das coordenadas a diminuição da intensidade detectada pelo instrumento com o aumento da vazão de gás no modo KED também comparado ao modo padrão. Essa diminuição pode ser explicada pelo aumento de colisões ocorridas na célula universal. A Tabela 5.2 mostra os parâmetros de desempenho do método. Por meio da diminuição dos coeficientes angulares apresentados pode-se confirmar a perda de sensibilidade ocorrida com o aumento da vazão de gás hélio. Apesar dessa perda de sensibilidade, os modos de operação com o KED mantiveram os limites de detecção e quantificação relativamente baixos, próximos dos modos em operação padrão.

Tabela 5.2 - Parâmetros de desempenho dos diferentes métodos de detecção por ICP-MS.

Modo	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Coef. Angular	R ²	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1A*		4750,0	0,9991	0,022	0,075
1B		4772,7	0,9992	0,029	0,096
1C		4718,9	0,9986	0,026	0,088
2A*		4763,2	0,9997	0,017	0,058
2B	0,1 – 15,0	3167,0	0,9995	0,007	0,025
2C		1429,7	0,9990	0,013	0,042
2D		195,2	0,9981	0,023	0,075
2E		17,2	0,9961	0,062	0,208

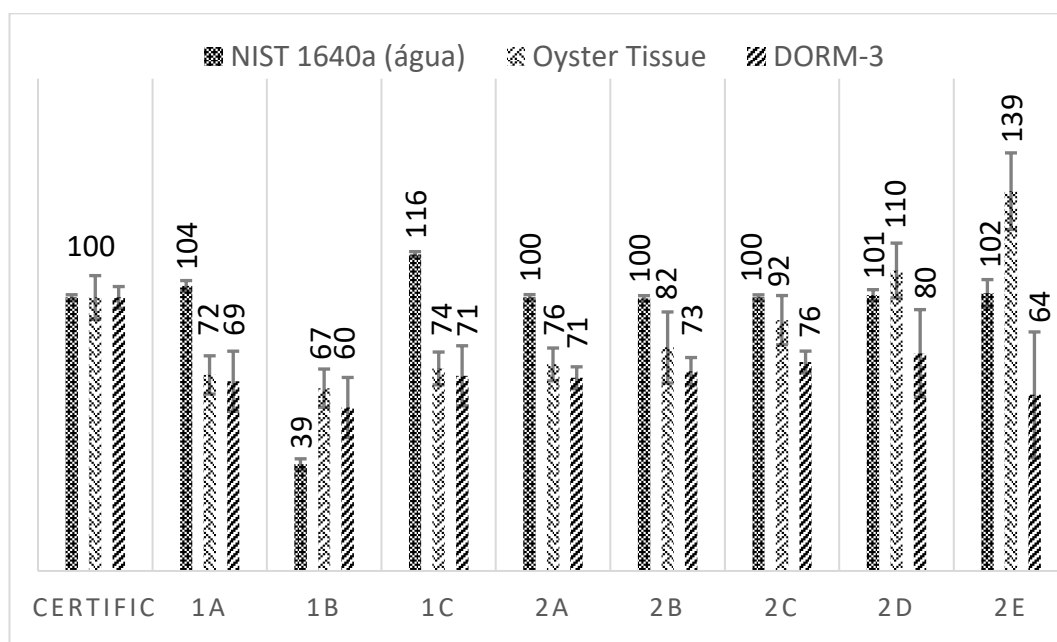
*1 – Condição padrão do ICP-MS, sendo 1A sem utilização da equação de correção e 1B e 1C empregando equações de correção. 2 – Condição KED, sendo que 2A – E foi variado a vazão do fluxo de gás hélio na faixa de 0,2 a 3,0 ml min⁻¹.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados baseados na intensidade determinada a partir de 10 medidas do branco analítico e nos coeficientes angulares de cada curva analítica. Por meio da análise dos materiais de referência certificado foi possível determinar o melhor parâmetro de operação do ICP-MS para as determinações de arsênio nas amostras. A Figura 5.2 mostra um gráfico de barras comparando os valores de recuperação (%) para cada parâmetro testado frente aos valores certificados e seus desvios padrão relativos (RSD). Observando o gráfico fica claro que o parâmetro 2D – vazão de gás hélio em 2,0 mL min⁻¹ no modo KED – apresentou resultados mais exatos, ou seja, dentro dos

valores de referência certificados. Já no modo padrão (1A, 1B e 1C) não se observou resultados satisfatórios, mesmo com o emprego das equações de correção de interferências.

Estas equações matemáticas foram fornecidas pelo próprio equipamento como uma alternativa para a redução de interferências poliatômicas de arsênio, quando utilizado o modo de operação padrão. A primeira delas utiliza a intensidade registrada na massa 77 levando em consideração o isótopo menos abundante de cloro – ^{37}Cl ($^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}$), enquanto a segunda leva em conta os isótopos de selênio (^{77}Se e ^{82}Se). Entretanto o modo de operação KED se mostrou preciso nos resultados obtidos.

Figura 5.2 - Porcentagem de recuperação das concentrações certificadas nos diferentes métodos empregados na análise dos MRC's.



Fonte: autoria própria

Além disso, foi aplicado uma análise de variância de um critério (*one-way ANOVA*) a fim verificar que houve diferenças estatisticamente significativas entre os valores obtidos e os certificados. Em seguida, o teste de Tukey permitiu identificar os grupos com valores significativamente

diferentes dos valores certificados. A Tabela 5.3 mostra as concentrações obtidas nas condições testadas em comparação com os valores certificados.

Tabela 5.3 - Concentrações de As determinadas nos MRC's (Média $\pm$ SD (Rec.%))

	NIST 1640a	Oyster Tissue	DORM-3
Certificado	8,070 $\pm$ 0,070 ^a	7,65 $\pm$ 0,65 ^b	6,88 $\pm$ 0,30 ^c
1A	8,413 $\pm$ 0,128 ^a (104)	5,48 $\pm$ 0,37 [*] (72)	4,77 $\pm$ 0,53 [*] (69)
1B	3,150 $\pm$ 0,060 [*] (39)	5,11 $\pm$ 0,38 [*] (67)	4,11 $\pm$ 0,47 [*] (60)
1C	9,350 $\pm$ 0,080 [*] (116)	5,67 $\pm$ 0,36 ^b (74)	4,91 $\pm$ 0,55 [*] (71)
2A	8,080 $\pm$ 0,050 ^a (100)	5,78 $\pm$ 0,34 ^b (76)	4,86 $\pm$ 0,22 [*] (71)
2B	8,050 $\pm$ 0,050 ^a (100)	6,25 $\pm$ 0,79 ^b (82)	5,03 $\pm$ 0,25 [*] (73)
2C	8,070 $\pm$ 0,090 ^a (100)	7,02 $\pm$ 0,64 ^b (92)	5,26 $\pm$ 0,22 [*] (76)
2D	8,140 $\pm$ 0,180 ^a (101)	8,41 $\pm$ 0,87 ^b (110)	5,47 $\pm$ 0,85 ^c (80)
2E	8,200 $\pm$ 0,410 ^a (102)	10,62 $\pm$ 1,44 [*] (139)	4,43 $\pm$ 1,01 [*] (64)

a, b, c – letras iguais são valores significativamente semelhantes ($p > 0,05$)

* – valores com diferenças significativas ($p < 0,05$)

Pode-se observar pela Tabela 5.3 que, pela análise do teste de Tukey aplicado, as condições no modo padrão não apresentaram valores estatisticamente semelhantes com as concentrações certificadas. Já nas condições empregando o modo KED, a única que mostrou valores significativamente semelhantes ($p > 0,05$) com os materiais de referência certificados foi a 2D, confirmando a análise realizada anteriormente sobre o gráfico de barras.

5.2 Determinação do teor total de As nos tecidos de tilápias

Após a otimização dos parâmetros instrumentais, foram analisadas as amostras de tilápia (filet, brânquias, fígados e estômagos) dos três locais de coleta. As determinações foram realizadas em triplicata e os RSDs se mantiveram abaixo de 20%. Foi levado em consideração o músculo, ou filet como sendo a porção consumida pelos seres humanos, enquanto que as vísceras como os órgãos internos analisados (brânquias, fígado e estômago). A Tabela 5.4 mostra os resultados em $\mu\text{g g}^{-1}$ obtidos na determinação da concentração total de arsênio em cada amostra analisada.

Tabela 5.4 - Concentração total de arsênio determinada por ICP-MS no músculo, brânquias, fígados e estômagos das amostras de tilápias, além da média determinadas nas águas coletadas em cada meio (n = 3, $\pm$ SD).

Arsênio total nos tecidos ($\mu\text{g g}^{-1}$) e águas ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
Tecidos/ Água	Rio Tietê	Pesqueiro	Mercado
Músculo	0,021 $\pm$ 0,001	0,038 $\pm$ 0,006	0,031 $\pm$ 0,004
Estômago	0,052 $\pm$ 0,009	1,170 $\pm$ 0,046	0,034 $\pm$ 0,002
Fígado	0,032 $\pm$ 0,003	0,051 $\pm$ 0,007	0,029 $\pm$ 0,002
Brânquia	0,016 $\pm$ 0,001	0,039 $\pm$ 0,001	0,031 $\pm$ 0,002
Água	0,337 $\pm$ 0,001	0,221 $\pm$ 0,012	0,234 $\pm$ 0,029

Em relação aos locais de coleta (Tietê, pesqueiro e mercado), não houve variação significativa ($p>0,05$) entre as concentrações de As determinadas. Pode-se observar que as brânquias apresentaram valores de contaminante relativamente baixos e os menores se comparados aos

outros tecidos analisados, com exceção as do mercado que apresentaram níveis próximos aos encontrados no fígado. Atualmente não há uma total compreensão sobre os processos e mecanismos de bio-absorção de arsênio em tilápia, principalmente devido às formas como esse contaminante é captado pelos tecidos, aos níveis presentes no meio, e à forma em que ele se apresenta. O termo bio-absorção descreve o processo pelo qual uma substância penetra no corpo de um ser aquático (CHEN; LIAO, 2004). As brânquias são órgão complexos e multifuncionais que exercem papéis de transporte iônico, trocas gasosas e excreção de resíduos. Além disso, as brânquias são o principal alvo para a toxicidade aguda de metal no peixe e que são considerados como o local de absorção primária dominante de metais (ALVARADO et al., 2006).

Tsai et al. (2012) estudaram a toxicocinética em tilápias expostas a concentrações de arsênio e determinaram as menores concentrações nas brânquias e músculos, estando de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho. Além disso, o mesmo estudo avaliou as constantes de depuração de metais nos órgãos da tilápia, chegando à conclusão de que os músculos possuem melhores habilidades de depuração. As concentrações de arsênio determinadas nos filets variaram de 0,021 a 0,038 $\mu\text{g g}^{-1}$, comparáveis aos reportados por Wu et al. (2014) que determinaram concentrações na faixa de 0,014 a 0,037 $\mu\text{g g}^{-1}$ do mesmo contaminante nos filets de peixes em várias cidades da China.

As concentrações de As determinadas nos filets e brânquias se mostraram relativamente próximas, especialmente nos peixes coletados no pesqueiro e mercado, variando de 0,038 – 0,039 e 0,031 $\mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente, e 0,016 – 0,021 $\mu\text{g g}^{-1}$ nos peixes do Tietê. Alguns estudos na literatura indicam que a bioacumulação direta de arsênio pela tilápia é proporcional a concentração dessa espécie na água (AKAN, 2012; LIAO et al., 2003). As concentrações de As nas águas determinadas no presente trabalho estiveram na faixa de 0,221 – 0,337 $\mu\text{g L}^{-1}$ e não houve

variação significativa entre os locais de coleta ($p > 0,05$), o que pode explicar a proximidade dos valores observados de As nas brânquias.

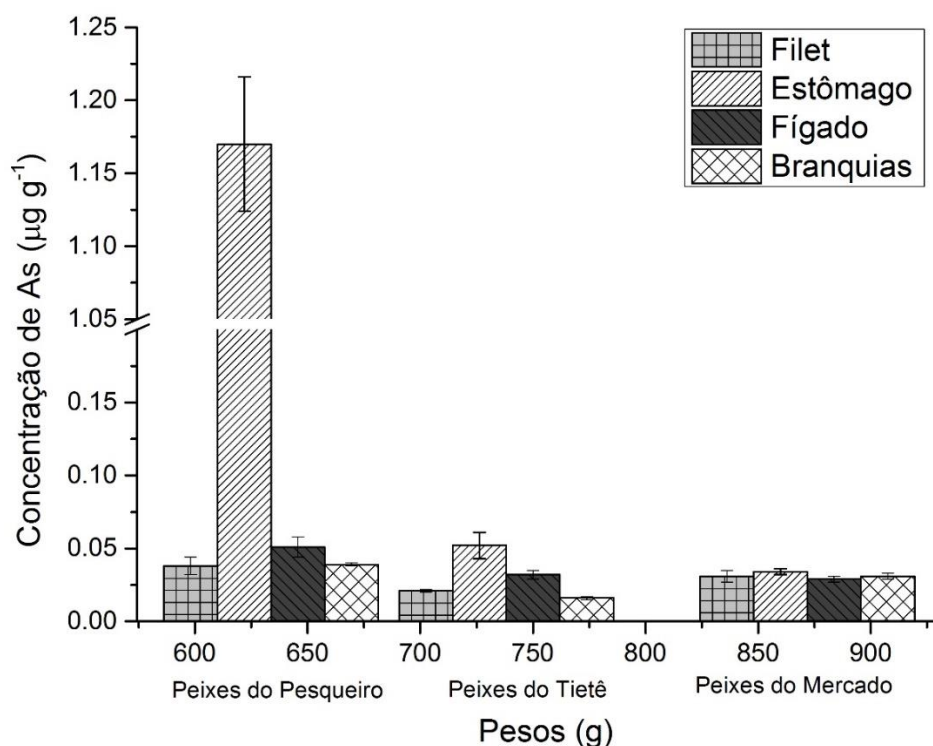
A concentração de As total nas amostras de fígado apresentou-se próxima comparados as brânquias e filets, com exceção aos do pesqueiro ($0,051 \mu\text{g g}^{-1}$), em $0,029$ e $0,032 \mu\text{g g}^{-1}$ para as tilápias do mercado e Tietê respectivamente. Os tecidos do fígado nos peixes são comumente utilizados como indicadores ambientais para poluição aquática e a literatura mostra que em muitos casos o mesmo também tem um papel importante no armazenamento de contaminantes, redistribuição, desintoxicação ou transformação e atua como um sítio ativo de efeitos patológicos induzidos por contaminantes (LICATA et al., 2005). A diferença observada nos valores de As entre os fígados dos locais de coleta pode ser explicada pelas diferenças nos tamanhos dos peixes que, apesar de apresentarem o mesmo comprimento em centímetros, possuíam peso corporal variado, impactando nos tamanhos dos fígados coletados e resultados obtidos. Al-yousuf, El-shahawi e Al-ghais (2000) indicaram que as concentrações de metais geralmente diminuem com o aumento do tamanho do peixe.

Levando em consideração aspectos de tamanho do peixe, pode-se explicar os resultados de As observados para as tilápias coletadas no pesqueiro que, por apresentarem menor peso corporal, resultaram em níveis de arsênio maiores comparados aos outros dois locais de coleta. O estômago foi o órgão que apresentou maiores concentrações de arsênio em todas as amostras analisadas, em uma faixa de $0,034 - 1,170 \mu\text{g g}^{-1}$. A ordem das concentrações de As determinadas em cada ponto de coleta foi: estômago > fígado > filet > brânquias (rio Tietê); estômago > fígado > filet $\approx$ brânquias (pesqueiro); e estômago > filet $\approx$ brânquias > fígado (mercado). Esta ordem resultante é semelhante ao estudo realizado por Liao et al. (2003), no qual a ordem estabelecida de bioacumulação de As nos tecidos foi: estômago > fígado $\approx$ brânquias > filet.

A amostra de estômago das tilápias coletadas no pesqueiro foram as únicas que apresentaram um corpo de fundo após a digestão por micro-

ondas em frascos fechados, mesmo depois das mesmas terem sido refeitas, e também as que resultaram em um nível elevado de arsênio ($1,170 \mu\text{g g}^{-1}$) comparado aos outros locais. Não foi possível correlacionar os resultados obtidos com a presença do corpo de fundo, pois os mesmos não foram analisados. Entretanto pode-se especular que esta concentração elevada de As seja explicada pelo sistema de criação dos peixes. Sabe-se que o tanque onde as tilápias foram retiradas é utilizado na pesca esportiva e os peixes que vivem ali são alimentados com diversos tipos de alimentação, sintética ou natural, o que pode contribuir para estes resultados. Portanto são necessárias análises mais aprofundadas levando em consideração a alimentação e sedimento de onde vivem estes peixes. A Figura 5.3 mostra a distribuição do contaminante pelos tecidos dos peixes de cada localidade em relação as diferentes faixas de pesos observados.

Figura 5.3 - Distribuição da concentração de As total em diferentes amostras de tecido analisadas por ICP-UCT-MS de tilápias cultivadas em diferentes condições.



Fonte: autoria própria

Conforme observado na Figura 5.3, os níveis de concentração de arsênio encontrados para os peixes de mercado são semelhantes entre todas as amostras de tecidos analisadas. No entanto, o maior valor de concentração de As foi obtido para as amostras de estômago dos peixes do lago de pesca (pesqueiro), em comparação com outros tecidos analisados, o que pode indicar que nos peixes menores a acumulação e distribuição de arsênio não é uniforme, considerando os tecidos biológicos analisados. De fato, o tamanho do peixe pode influenciar na distribuição e acumulação de arsênio em seu corpo.

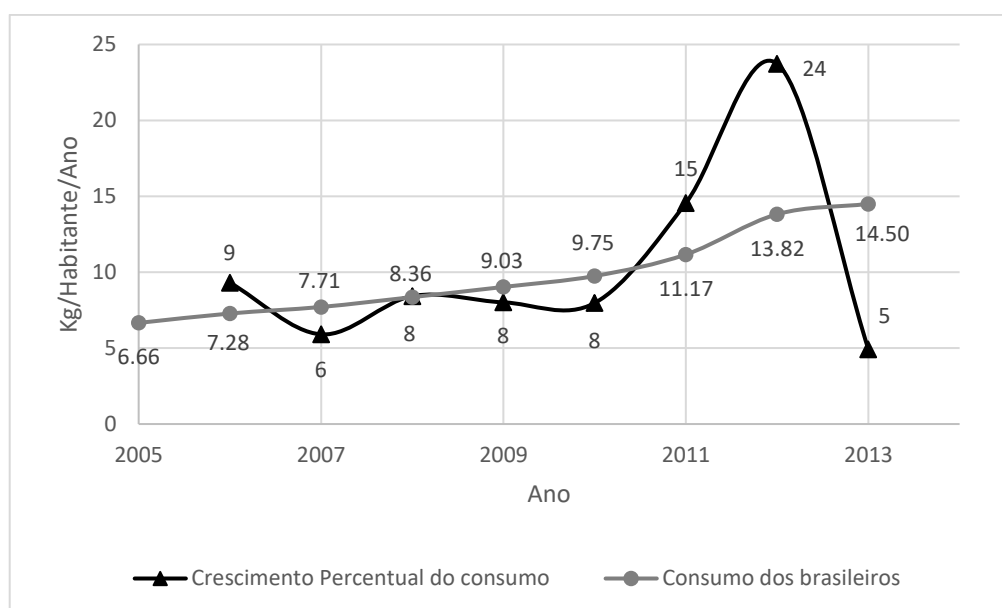
Como também observado para os peixes que apresentam um peso corpóreo de cerca de 700 gramas, os níveis de concentração de As também foram semelhantes entre as amostras analisadas. Neste caso, verificou-se um ligeiro aumento da concentração de arsênio nos tecidos do estômago e do fígado, o que indica novamente que o peso corpóreo do peixe pode influenciar na distribuição e acumulação semelhantes de arsênio. Como já citado, pesquisadores indicaram que as concentrações de metais geralmente diminuem com o aumento do tamanho do peixe (peso corpóreo), perfil observado nos resultados obtidos. No entanto, essas observações estão sendo estudadas a fim de verificar se o tamanho do peixe realmente pode influenciar na distribuição e acumulação de As em peixes da mesma espécie.

5.3 Estimativa da ingestão de As pela população do Noroeste Paulista

O consumo de peixes no Brasil vem aumentando com o passar dos anos e os dados mais recentes divulgados pelo MPA indicaram um aumento de 5% levando em consideração os anos de 2012 e 2013, atingindo a marca de 14,5 kg habitante⁻¹ ano⁻¹. A Figura 5.4 mostra este crescimento da ingestão de peixes na última década. A estimativa de

ingestão de arsênio pela população foi calculada tendo em vista esse consumo, levando em consideração também o peso corpóreo médio de homens e mulheres adultos na faixa etária de 18 a 65 anos indicada pelos dados mais recentes do IBGE, de 69 e 60 kg respectivamente.

Figura 5.4 - Crescimento do consumo de peixes pela população brasileira (MPA; MDIC e IBGE, 2013).

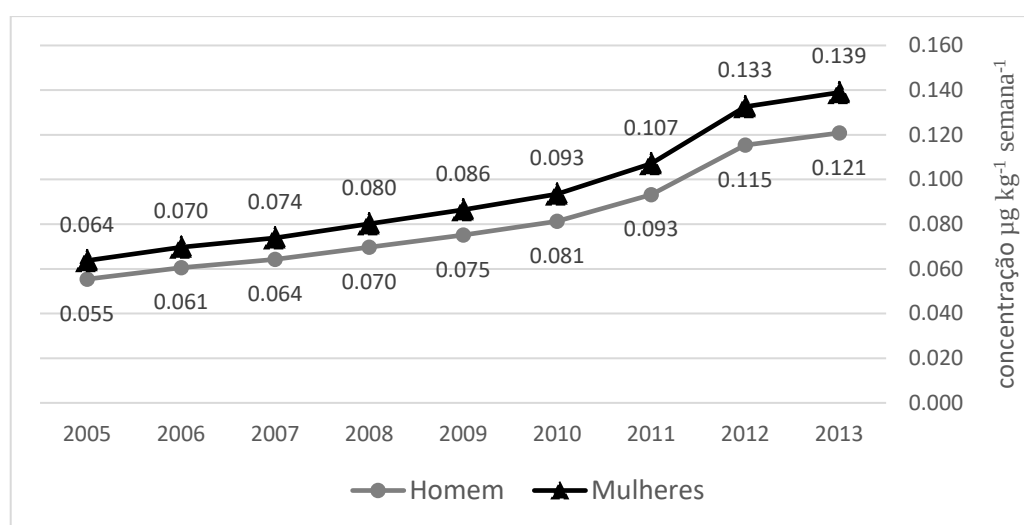


Fonte: adaptada pelo autor

Levando em consideração apenas a ingestão de tilápias e assumindo o músculo ou filet como a parte consumível dos peixes, tem-se uma média de concentração de arsênio total, partindo dos resultados obtidos, de $0,030 \pm 0,008 \mu\text{g g}^{-1}$. Baseado nestes dados, a estimativa de ingestão semanal de arsênio pela população brasileira resultou em 0,121 e 0,139 $\mu\text{g kg}^{-1}$ peso corpóreo⁻¹ semana⁻¹ para homens e mulheres respectivamente. Estes níveis estão bem abaixo do valor guia estabelecido em 1989 pela JECFA, o PTWI de 15 $\mu\text{g kg}^{-1}$ por peso corporal. A Figura 5.5 mostra um gráfico da estimativa de ingestão semanal de arsênio levando em consideração o crescimento do consumo por parte da população brasileira.

Em termos de ingestão diária de arsênio, a estimativa fica em 0,017 e 0,020 $\mu\text{g kg}^{-1}$ peso corpóreo $^{-1}$ dia $^{-1}$ para homens e mulheres respectivamente. Sendo que estes níveis também se encontram bem abaixo dos valores restritivos recomendados pelo CONTAM Panel (0,3 – 8,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ peso corpóreo $^{-1}$ dia $^{-1}$) e JECFA (2,0 – 7,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ peso corpóreo $^{-1}$ dia $^{-1}$) como marcos indicadores de possível incidência no desenvolvimento de câncer. Apesar de que os níveis de segurança aos quais os guias internacionais estabelecem se aplicam as concentrações de arsênio inorgânico, muito mais tóxico ao ser humano comparado aos compostos orgânicos.

Figura 5.5 - Estimativa de ingestão semanal de arsênio levando em consideração o crescimento do consumo por parte da população brasileira.



Fonte: autoria própria

Observando a Figura 5.5 pode-se notar um perfil de crescimento na ingestão de arsênio na última década. Entretanto o As presente nos seres aquáticos em sua maior parte é composto por formas orgânicas, mais facilmente metabolizadas e excretadas pelo organismo humano, possibilitando a ingestão segura de peixes tendo em vista os níveis consumidos pela população brasileira atualmente.

5.4 Bioacumulação de As(III) em tilápias

O período de aclimação e ensaios de bioacumulação ocorreram no laboratório de toxicologia do campus, sendo que a mortalidade registrada para a fase de aclimação foi de 5% e nos ensaios não foi observado mortalidade em nenhum dos grupos. Não houve crescimento significativo dos peixes durante o período de aclimação, e estes não apresentaram doenças nem deformidades. A Tabela 5.5 mostra as características dos peixes que participaram do experimento de bioacumulação. A média dos pesos e comprimentos foi de $100,4 \pm 15,6$ g e $15,1 \pm 1,0$ cm respectivamente, sem diferença significativa entre as medidas dos grupos ($p > 0,05$).

Tabela 5.5 - Características físicas dos peixes utilizados nos ensaios de bioacumulação

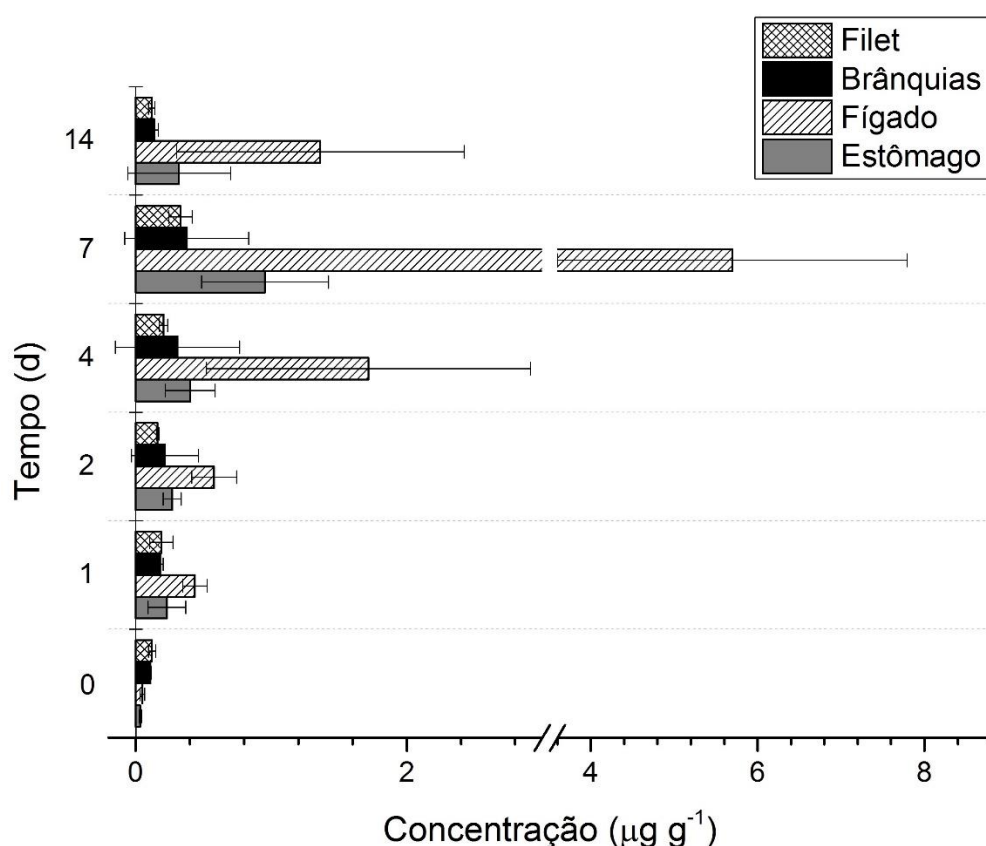
Parâmetros	Controle	G1	G2	G4	G7	G14
Peso (g)	$74,6 \pm 25,7$ (52 – 118)	$106,4 \pm 21,5$ (83 – 138)	$117,5 \pm 26,8$ (72 – 138)	$90,6 \pm 21,8$ (70 – 126)	$111,6 \pm 27,3$ (78 – 148)	$101,3 \pm 22,7$ (77 – 125)
Comp. (cm)	$13,7 \pm 1,6$ (12 – 16)	$15,5 \pm 1,3$ (14 – 17)	$16,3 \pm 1,4$ (14 – 17)	$14,2 \pm 1,5$ (12 – 16)	$15,5 \pm 1,6$ (13 – 17)	$15,5 \pm 1,3$ (14 – 17)

Os ensaios de bioacumulação foram conduzidos por 7 dias de exposição a uma concentração de As de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ com base no cenário experimental descrito por Tsai et al. (2011). Um dos grupos foi transferido em água livre de contaminante para um período de depuração de mais 7 dias. A concentração de As medida nas águas de cada grupo do período de exposição foi em média $1,09 \pm 0,19 \mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto que nas águas dos grupos controle e depuração estiveram abaixo do limite de detecção do método ($5 \times 10^{-5} \mu\text{g mL}^{-1}$).

Para as tilápias expostas ao arsênio, as maiores concentrações foram determinadas no fígado ($0,42 - 5,70 \mu\text{g g}^{-1}$) e estômago ($0,23 - 0,95 \mu\text{g g}^{-1}$), seguidas das brânquias ($0,18 - 0,40 \mu\text{g g}^{-1}$) e filet ($0,19 - 0,33 \mu\text{g g}^{-1}$).

g^{-1}). A Figura 5.6 mostra a distribuição do As pelos diferentes tecidos durante o período de 7 dias de exposição e mais 7 dias de depuração. Perfil semelhante de distribuição foi observado nos tecidos de tilápias cultivadas em diferentes ambientes (seção 5.2), demonstrando a capacidade do estômago e fígado em acumular o contaminante.

Figura 5.6 - Distribuição de As pelos órgãos de interesse durante os períodos de exposição e depuração



O ensaio de bioacumulação visou também a determinação das constantes de absorção (k_a) e depuração (k_d), assim como o fator de bioconcentração (BCF) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) da depuração após a exposição de 7 dias ao As(III). O método para estimar os parâmetros toxicocinéticos foi por meio do ajuste da forma integrada da equação (2) para a exposição constante da água contaminada e os dados de concentração determinados utilizando uma regressão não-linear. A Tabela

5.6 resume os parâmetros toxicocinéticos de arsênio para os órgãos alvos das tilápias calculados a partir dos dados de exposição obtidos.

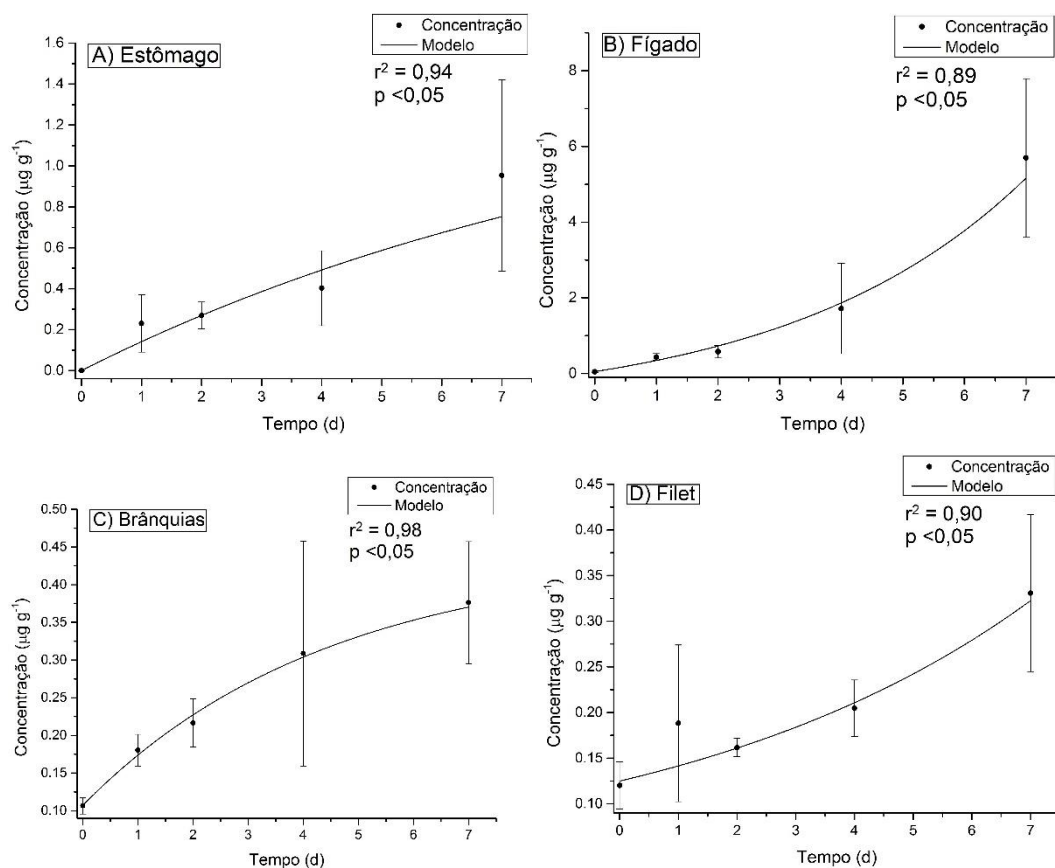
Tabela 5.6 – Estimativas das constantes da taxa de absorção (k_a), depuração (k_d), fator de bioconcentração (BCF) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para órgãos específicos de tilápias durante um período de 7 dias de exposição a As.

Órgão Alvo	k_a^a (mL g ⁻¹ d ⁻¹)	k_d^a (d ⁻¹)	BCF ^b (mL g ⁻¹)	$t_{1/2}^c$ (d)
Estômago	0,15 ±0,04	0,10 ±0,18	1,5	6,93
Fígado	0,25 ±0,07	0,26 ±0,12	1,0	2,67
Brânquias	0,10 ±0,01	0,22 ±0,06	0,5	3,15
Filet	0,03 ±0,02	0,16 ±0,11	0,2	4,33

^aMédia ±EP (erro padrão); ^bBCF = k_a/k_d ; ^c $t_{1/2} = \ln 2/k_d$

O experimento de 7 dias de exposição a As(III) nos tecidos de interesse apresentou perfis de regressão não-linear com correlações significativas ($r^2 = 0,89 - 0,98$, $p < 0,05$), resultantes do melhor ajuste do modelo de bioacumulação “unicompartimental” de primeira ordem (Figura 5.7). As constantes de absorção (k_a) específicas de cada órgão estiveram na faixa de 0,03 a 0,25 mL g⁻¹ d⁻¹, enquanto que as constantes de depuração (k_d) variaram entre 0,10 e 0,26 d⁻¹. Os maiores valores de BCF foram observados para o estômago e fígado, indicando que estes órgãos específicos têm potencial para acumular As quando expostos à águas contaminadas. Diversos estudos laboratoriais descritos na literatura revelaram que muitos elementos (As, Zn, Cu, Cr, Ni, Hg, Cd e Pb) são acumulados em maior quantidade no estômago/intestino/fígado do que no filet (músculo) da tilápia (KUREISHY & D’silva, 1993; LIANG et al., 1999; TSAI & LIAO, 2006).

Figura 5.7 – Modelo de análise por regressão não-linear



A constante de absorção mais alta ocorreu no fígado, seguido do estômago, brânquias e filet, respectivamente. O estudo realizado por Tsai et al. (2006) determinou ordem de k_a semelhante, exceto pelo fato de que os autores observaram maior constante de absorção no sistema digestivo como um todo (estômago e intestino), o que pode ter contribuído para um valor de k_a superior ao determinado no fígado. No entanto, o presente trabalho revelou que o estômago possui a menor constante da taxa de depuração e maior tempo de meia-vida para depuração de As entre os órgãos analisados, demonstrando sua maior capacidade em bioacumular arsênio, o que está de acordo com os resultados obtidos nas análises anteriores realizadas em nosso estudo.

Apesar do fígado possuir a maior taxa de absorção do contaminante, o mesmo também possui a melhor capacidade de depuração comparado aos outros órgãos, justificado pela maior constante de eliminação e menor tempo de meia-vida para a depuração de arsênio, o que pode ser explicado pela sua habilidade em metabolização e distribuição de contaminantes. Quanto ao filet ou músculo, apesar de representarem a maior biomassa da tilápia, apresentaram a menor habilidade em absorção comparado aos outros tecidos. A Tabela 5.7 mostra uma comparação dos resultados obtidos no presente trabalho com dados observados na literatura.

Tabela 5.7 – Dados comparativos dos parâmetros de bioacumulação de As obtidos na literatura

Espécie/massa do peixe/órgão alvo	Constante k_a (mL g ⁻¹ d ⁻¹)	Constante k_d (d ⁻¹)	BCF (mL g ⁻¹)	Referência
O. mossambicus (As)				
35,5 gramas				
Sistema digestivo	0,84	0,20	4,2	Tsai et al. (2006)
Fígado	0,61	0,20	3,1	
Brânquias	0,31	0,13	2,9	
Carcaça (Filet)	0,12	0,001	1,1	
Corpo inteiro	0,025	0,007	3,8	Chen e Liao (2012)
O. mossambicus (Cu)				
20,2 gramas				
Sistema digestivo	0,46	0,25	1,8	Tsai et al. (2012)
Fígado	3,36	0,17	19,3	
Brânquias	0,07	0,12	0,58	
Músculo (filet)	0,94	1,75	0,53	
O. nilóticus (As)				
100,5 gramas				
Estômago	0,15	0,10	1,5	Este trabalho
Fígado	0,25	0,26	1,0	
Brânquias	0,10	0,22	0,5	
Filet	0,03	0,16	0,2	

Um pressuposto inerente ao modelo de primeira ordem aplicado aos dados obtidos do ensaio de bioacumulação é de que as constantes de absorção e depuração são independentes da concentração do contaminante químico na água ou no peixe e da duração da exposição (TSAI & LIAO, 2006; LIAO et al., 2008). Entretanto é possível observar que os peixes utilizados no ensaio de bioacumulação do presente trabalho são cerca de 3 vezes maiores que as tilápias empregadas em Tsai et al. (2006), o que pode explicar os valores de BCF aproximadamente 3 vezes menores comparados ao estudo em questão.

Estudo anteriores descrevem que a maior taxa de absorção de metais em espécies juvenis está relacionada a taxas metabólicas mais altas e mecanismos insuficientemente desenvolvidos para a eliminação de metais traços (LIAO et al., 2003). Este fato pode explicar as maiores constantes de absorção apresentadas pelos peixes menores (mais jovens) em comparação aos peixes utilizados em nosso trabalho, assim como para os valores de k_d . Estes parâmetros de bioacumulação não só podem descrever a capacidade de absorção-depuração de uma outra espécie de tilápias, mas também contribuir para o entendimento dos processos toxicocinéticos do arsênio em seu organismo.

6. CONCLUSÃO

A técnica de ICP-MS empregada no trabalho se mostrou exata e precisa para as determinações de contaminantes traços, mesmo em matrizes complexas como as amostras biológicas analisadas. A exatidão do método proposto foi verificada com a análise de materiais de referência certificados obtendo valores de recuperação em 101, 110 e 80% para o NIST 1640a, NIST 1566b e NRCC DORM-3 respectivamente.

As concentrações de arsênio determinadas nas tilápias variaram numa faixa de 0,021 – 0,038 $\mu\text{g g}^{-1}$ nos filets, 0,034 – 1,170 $\mu\text{g g}^{-1}$ nos estômagos, 0,029 – 0,051 $\mu\text{g g}^{-1}$ nos fígados e 0,016 – 0,039 $\mu\text{g g}^{-1}$ nas brânquias. Levando em consideração somente os peixes eviscerados, todos os resultados se apresentaram abaixo dos níveis permitidos pela Resolução RDC Nº 42, de 29 de agosto de 2013 (1,0 $\mu\text{g g}^{-1}$) para a porção consumível do peixe, o filet. Tendo em vista essa porção, a concentração média de arsênio foi de $0,030 \pm 0,008 \mu\text{g g}^{-1}$, enquanto que nas vísceras (estômago, brânquias e fígado) foi de $0,485 \pm 0,225 \mu\text{g g}^{-1}$, onde pode-se concluir que as vísceras possuem maior habilidade em bioacumular o contaminante comparado aos músculos.

O trabalho permitiu concluir, também, que o perfil de crescimento no consumo de peixes por parte da população brasileira leva a um aumento da ingestão de arsênio, levando em consideração o consumo de tilápia especificamente. Entretanto os níveis observados estão bem abaixo de todos os valores guias estabelecidos pelos órgãos internacionais como marcos que caracterizam possíveis riscos à saúde humana. Além disso, sabe-se que a maior parte do arsênio presente no organismo do peixe está na forma orgânica e, juntamente ao fato dos peixes serem consumidos eviscerados, os riscos à saúde da população são mínimos.

O ensaio de bioacumulação realizado permitiu concluir que o estômago e fígado da tilápia desempenham um importante papel na absorção e acúmulo de arsênio presente em águas contaminadas. Os

resultados estão de acordo com as primeiras análises realizadas em peixes coletados em campo. Além disso, o experimento de exposição a As demonstrou que o filet possui baixa habilidade em absorver o contaminante comparado aos outros órgãos, sendo que este tende a permanecer nas vísceras do peixe (estômago e fígado). A estimativa dos parâmetros toxicocinéticos se mostrou uma ferramenta útil para avaliar a capacidade de absorção e depuração de arsênio nos tecidos da tilápia, contribuindo assim para o melhor entendimento quanto aos processos toxicocinéticos deste contaminante em tilápias do Nilo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAH, Homira et al. Concentrations of some trace metals in the tissues of two commercial fishes from Tonekabon. **Journal of the Persian Gulf: Marine Science**. Persian Gulf, 9 out. 2010. p. 55-64.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2007. **Toxicological Profile for Arsenic**. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Services.

AHSAN, D A; VALLS, T A del. Impact of Arsenic Contaminated Irrigation Water in Food Chain: An Overview from Bangladesh. **Int. J. Environ. Res**, [s.l.], v. 3, n. 5, p.627-638, nov. 2011.

AKAN, J. Study on the Distribution of Heavy Metals in Different Tissues of Fishes from River Benue in Vinikilang, Adamawa State, Nigeria. **British Journal of Applied Science & Technology**, [s.l.], v. 2, n. 4, p.311-333, 10 Jan. 2012. Science domain International. DOI: 10.9734/bjast/2012/1716.

AL-YOUSUF, M.h; EL-SHAHAWI, M.s; AL-GHAIS, S.m. Trace metals in liver, skin and muscle of Lethrinus lentjan fish species in relation to body length and sex. **Science of the Total Environment**, [s.l.], v. 256, n. 2-3, p.87-94, Jul. 2000. Elsevier BV. DOI: 10.1016/s0048-9697(99)00363-0.

ALVARADO, Nelva E. et al. Quantitative changes in metallothionein expression in target cell-types in the gills of turbot (*Scophthalmus maximus*) exposed to Cd, Cu, Zn and after a depuration treatment. **Aquatic Toxicology**, [s.l.], v. 77, n. 1, p.64-77, abr. 2006. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.aquatox.2005.10.017.

ALZIEU, C. Water: the medium for culture. In: BARNABÉ, G. **Aquaculture**. Rhode Island/USA, v 1. 1999. p. 37–60.

ARENZON, Alexandre; PEREIRA NETO, Tiago José; GERBER, Wagner (Org.). **Manual sobre toxicidade em efluentes industriais**. 2011. P.7. Disponível em: <<http://www.ecocell.com.br/Manual de Toxicidade.pdf>>. Acesso em: 29 abr. 2015.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (Brasil). Inmetro. **Requisitos Gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração**. 2005.

ATTAR, Khudre M. et al. Levels of Arsenic in Fish from the Arabian Gulf. **Marine Pollution Bulletin**, Saudi Arabia, v. 24, n. 2, p.94-97, fev. 1992.

AYROZA, Luiz Marques da Silva. **Criação de tilápia-do-Nilo, Oreochromis niloticus, em tanques-rede, na usina hidrelétrica de Chavantes, rio Paranapanema, SP/PR**. 2009. 89 f. Tese (Doutorado) - Curso de Aquicultura, Centro de Aquicultura da Unesp, Universidade Estadual Paulista - Unesp, Jaboticabal, 2009.

BALLIN, U.; KRUSE, R.; RUSSEL, H. -a. Determination of total arsenic and speciation of arseno-betaine in marine fish by means of reaction headspace gas chromatography utilizing flame-ionization detection and element specific spectrometric detection. **Fresenius J Anal Chem**, [s.l.], v. 350, n.12, p.54-61, 1994. Springer Science Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00326253>.

BARRA, Cristina Maria et al. REVISÃO: Especificação de Arsênio - Uma revisão. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 1, p.58-70, fev. 2000.

BOCCA, Beatrice; FORTE, Giovanni. Microwave digestion procedures for human matrices: Principles and applications to metal analysis. In: MARCHETTI, Andrea (Ed.). **Microwaves: Theoretical Aspects and Practical Applications in Chemistry**. Modena: Andrea Marchetti, 2011. Cap. 4. p. 139-182.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Brasil. **Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para**

alimentação e medicamentos veterinários. Brasília: Biblioteca Nacional de Agricultura – Binagri, 2011. 72 p. (ISBN 978-85-7991-053-1).

BRASIL. Mpa. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Aquicultura: Significado e Especialidades da Aquicultura.** 201. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/index.php/aquicultura>>. Acesso em: 17 mar. 2015.

BRASIL. Mpa. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura.** 2010. P.21. Disponível em: <http://www.uesc.br/cursos/pos_graduacao/mestrado/animal/bibliografia2013/luis_art4_rousseff.pdf>. Acesso em: 18 mar. 2015.

BRASIL. Mpa. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Consumo de pescado no Brasil aumenta 23,7% em dois anos.** 2013. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/index.php/ultimas-noticias/832-consumo-de-pescado-no-brasil-aumenta-23-7-em-do>>. Acesso em: 18 mar. 2015.

BRASIL. Norma Brasileira nº 17025, de 2005. Requisitos Gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. **ABNT NBR ISO/IEC 17025.** 2. ed. Rio de Janeiro, 31 out. 2005.

BRASIL. Resolução nº 42, de 2013. **Dispõe sobre O Regulamento Técnico Mercosul Sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos.** 168. ed. Brasil, 30 set. 2013. v. 2, n. 2200, Seção 1, p. 33-35.

BRASIL. Resolução nº 5, de 2005. **Dispõe sobre A Classificação dos Corpos de água e Diretrizes Ambientais Para O Seu Enquadramento, Bem Como Estabelece As Condições e Padrões de Lançamento de Efluentes, e Dá Outras Providências.** Brasília, DF, 18 mar. 2005. Seção 53, p. 58-63.

BRASIL. Resolução nº 899, de 2003. **GUIA PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E BIOANALÍTICOS. Re Nº 899, de 29 de maio de 2003.** Brasília, DF, 29 maio 2003.

BRITO, Johnny Martins de et al. Polyculture of tilápias (*Oreochromis niloticus*) and Marine Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in cages – review. **Revista Eletrônica Nutritime**, [s.l.], v. 11, n. 2, p.3225-3237, abr. 2014. ISSN 1983-9006.

CAMPOS, Cristiane Meldau de et al. AVALIAÇÃO ECONÔMICA DA CRIAÇÃO DE TILÁPIAS EM TANQUE-REDE, MUNICÍPIO DE ZACARIAS, SP. **B. Inst. Pesca**, São Paulo, v. 33, n. 2, p.265-271, fev. 2007.

CARABANTES, Alexandra Galetovic; FERNICOLA, Nilda A.g.g. de. Arsénico en el agua de bebida: un problema de salud pública. **Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 39, n. 4, p.365-372, dez. 2003.

CARVALHO FILHO, Jomar (Ed.). **Conferência Mundial da Tilápia atraindo especialistas ao Rio de Janeiro**. 2013. Disponível em: <<http://www.panoramadaaquicultura.com.br/novosite/?p=3874>>. Acesso em: 22 abr. 2015.

CHATTERJEE, A.; DAS, D.; MANDAL, B. K.; CHOWDRURY, T. R.; SAMANTA, R.; CHAKRABORTI, D. *Journal of Environmental Science and Health. Part A - Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* 1995, v.38, p.25.

CHEN, Bo-Ching; LIAO, Chung-min. Farmed tilapia *Oreochromis mossambicus* involved in transport and biouptake of arsenic in aquacultural ecosystems. **Aquaculture**, [s.l.], v. 242, n. 1-4, p.365-380, dez. 2004. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2004.09.009.

CHEN, Wei-yu; LIAO, Chung-min. Toxicokinetics/toxicodynamics links bioavailability for assessing arsenic uptake and toxicity in three aquaculture species. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, n. 9, p.3868-3878, 9 jun. 2012. Springer Nat. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-012-1012-z>.

CHOU, Berry Yun-hua et al. Toxicokinetics/toxicodynamics of arsenic for farmed juvenile milkfish *Chanos chanos* and human consumption risk in BFD-endemic

area of Taiwan. **Environment International**, [s.l.], v. 32, n. 4, p.545-553, maio 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2006.01.004>.

COLON, Mireia; HIDALGO, Manuela; IGLESIAS, Mònica. Correction strategies over spectral interferences for arsenic determination in aqueous samples with complex matrices by quadrupole ICP-MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, [s.l.], v. 24, n. 4, p.518-521, fev. 2009. (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/b820898k>.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (São Paulo). Secretaria do Meio Ambiente. **Ficha de Informação Toxicológica: Arsênio**. 2014. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/laboratorios/fit/Arsenio.pdf>. Acesso em: 19 mar. 2015.

COSTA, Carla Regina et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**. Ribeirão Preto, p. 1820-1830. 24 set. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v31n7/v31n7a38.pdf>. Acesso em: 29 abr. 2015.

European Food Safety Authority (EFSA). **Scientific Opinion on Arsenic in Food**: EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). 2010. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/de/scdocs/doc/1351.pdf>. Acesso em: 24 mar. 2015.

European Food Safety Authority (EFSA). **SCIENTIFIC REPORT OF EFSA**: Dietary exposure to inorganic arsenic in the European population. 2014. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3597.pdf>. Acesso em: 24 mar. 2015.

FARMER, J G; JOHNSON, L R. Assessment of occupational exposure to inorganic arsenic based on urinary concentrations and speciation of arsenic. **British Journal Of Industrial Medicine**. [s. L.], p. 342-348. Maio 1990.

FIALHO, Lucimar L.; PEREIRA, Catarinie D.; NÓBREGA, Joaquim A. Combination of cool plasma and collision-reaction interface for correction of polyatomic interferences on copper signals in inductively coupled plasma quadrupole mass spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, [s.l.], v. 66, n. 5, p.389-393, maio 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sab.2011.04.001>.

FIGUEIREDO JÚNIOR, Carlos Alberto; VALENTE JÚNIOR, Aírton Saboya. **Cultivo de tilápias no Brasil: origens e cenário atual**. 2008. Disponível em: <<http://www.sober.org.br/palestra/9/178.pdf>>. Acesso em: 17 mar. 2015.

FITZSIMMONS, Kevin. **TILAPIA PRODUCT QUALITY AND NEW PRODUCT FORMS FOR INTERNATIONAL MARKETS**. 2008. Disponível em: <<https://ag.arizona.edu/azaqua/ista/ISTA8/Fitzsimmons.pdf>>. Acesso em: 22 abr. 2015.

FLORES, Érico Marlon Moraes. **Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Determination**. Santa Maria: Elsevier, 2014. 416 p.

FONTCUBERTA, Mireia et al. Total and Inorganic Arsenic in Marketed Food and Associated Health Risks for the Catalan (Spain) Pop. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Barcelona, 28 Jul. 2011. p. 10013-10022.

GONÇALVES, Alexandra M. et al. Determination and Fraction of Barium in Brazil Nuts. **J. Braz. Chem. Soc.** São Carlos, p. 760-769. 30 abr. 2009.

GONTIJO, Bernardo; BITTENCOURT, Flávia. Arsênio – Uma revisão histórica: Arsenic - A historical review. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s.l.], v. 1, n. 80, p.81-85, out. 2005.

GONZALEZ, Mario H. et al. Determination of Elemental Impurities in Acyclovir Ointment and Raw Materials Using Microwave Acid Digestion (MW-AD) and ICP-MS. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, [s.l.], v. 0, n. 0, p.1-8, mar.

2016. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20160151>.

GONZALEZ, Mario H. et al. Sample preparation for spectroanalytical determinations based on microwave-assisted procedures: An alternative towards greener strategies. In: MARCHETTI, Andrea. **Microwaves: Theoretical Aspects and Practical Applications in Chemistry**. Modena: Andrea Marchetti, 2011. Cap. 8. p. 249-278.

GONZALEZ, Mario Henrique. **Identificação de Produtos de Reação Presentes em Soluções Resultantes de Digestões Ácidas de Amostras Agronômicas**. 2007. 69 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

GUIMARÃES, Guilherme Luiz. Impactos Ecológicos do Uso de Herbicidas ao Meio Ambiente. **IPEF - Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais**, Piracicaba, v. 4, n. 12, p.159-180, set. 1987. Semestral. Disponível em: <<http://www.ipef.br/publicacoes/tecnica/nr12/cap12.pdf>>. Acesso em: 18 mar. 2015.

GUO, Wei et al. Use of ion–molecule reactions and methanol addition to improve arsenic determination in high chlorine food samples by DRC-ICP-MS. **Talanta**, [s.l.], v. 84, n. 3, p.887-894, maio 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2011.02.026>.

HERMES, César Ademar; TAKAMATSU, Alexandre Akira; SEEFELD, Marlon. CULTIVO DE PEIXES EM BIOSISTEMA INTEGRADO. **Varia Scientia**, [s.l.], v. 7, n. 13, p.11-24, jan. 2009.

INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos. **DOQ-CGCRE-008 Revisão 04**. Jul. 2011. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf> Acesso em: 18 agosto 2016.

International Agency for Research on Cancer (IARC). **Agents Classified by the IARC Monographs**, Volumes 1–116. 2016. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsAlphaOrder.pdf>>. Acesso em: 13 ago. 2016.

KLAUE, Bjoern; BLUM, Joel D. Trace Analyses of Arsenic in Drinking Water by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: High Resolution versus Hydride Generation. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 71, n. 7, p.1408-1414, abr. 1999. American Chemical Society. <http://dx.doi.org/10.1021/ac980846>.

KRUG, Francisco José. **III Workshop de Preparo de Amostras: Métodos de Decomposição de Amostras**. São Carlos: F.j. Krug, 2000. 18 f.

KUBITZA, Fernando. Tilápias: qualidade da água, sistemas de cultivo, planejamento da produção, manejo nutricional e alimentar e sanidade (Parte I). **Panorama da Aquicultura**, [s.l.], v. 10, n. 59, p.44-53, jun. 2000.

KUBITZA, Fernando; KUBITZA, Ludmilla M. M. **Tilápias: Qualidade da água, sistemas de cultivo, planejamento da produção, manejo nutricional e alimentar e sanidade**.

KUREISHY, Tw; D'SILVA, C. Uptake and loss of mercury, cadmium and lead in marine organisms. **Ind J Exp Biol**, Goa, v. 31, p.373-379, abr. 1993.

LIANG, y et al. Reclamation of wastewater for polyculture of freshwaterfish: bioaccumulation of trace metals in fish. **Water Res**, [s.l.], v. 33, p.2690-2700, 1999.

LIAO, Chung-min et al. Acute Toxicity and Bioaccumulation of Arsenic in Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) from a Blackfoot Disease Area in Taiwan. **Wiley Periodicals**, Taiwan, v. 18, n. 4, p.252-259, 30 abr. 2003.

LICATA, Patrizia et al. Heavy Metals in Liver and Muscle of Bluefin Tuna (*Thunnus thynnus*) Caught in the Straits of Messina (Sicily, Italy). **Environmental**

Monitoring and Assessment, [s.l.], v. 107, n. 1-3, p.239-248, ago. 2005. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/s10661-005-2382-1.

MEURER, Fábio; HAYASHI, Carmino; BOSCOLO, Wilson Rogério. Influência do Processamento da Ração no Desempenho e Sobrevivência da Tilápia do Nilo Durante a Reversão Sexual. **R. Bras. Zootec**, [s.l.], v. 32, n. 2, p.262-267, Jan. 2003.

MICHAEL THOMPSON (Londres). International Union of Pure and Applied Chemistry. **Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis**: (IUPAC Technical Report). 2002. Pp. 835–855. Disponível em: <<http://www.iupac.org/publications/pac/2002/pdf/7405x0835.pdf>>. Acesso em: 20 mar. 2015.

MKETO, Nomvano; NOMNGONGO, Philiswa N.; NGILA, Catherine. An innovative microwave-assisted digestion method with diluted hydrogen peroxide for rapid extraction of trace elements in coal samples followed by inductively coupled plasma-mass spectrometry. **Microchemical Journal**, [s.l.], v. 124, p.201-208, Jan. 2016. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.microc.2015.08.010.

NOGUEIRA, Ana Rita de Araújo. **Preparo de Amostras**. 2003. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/met/images/arquivos/08MET/Palestras/preparao_mostras.pdf>. Acesso em: 4 nov. 2003.

OCHSENKÜHN-PETROPULU, M.; VARSAMIS, J.; PARISSAKIS, G. Speciation of Arsenobetaine in marine organisms using a selective leaching/digestion procedure and hydride generation atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 337, n. 3, p.323-327, Jan. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670\(96\)00411-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670(96)00411-4).

OLIVEIRA, Elisabeth de. Sample preparation for atomic spectroscopy: evolution and future trends. **J. Braz. Chem. Soc.**, [s.l.], v. 14, n. 2, p.174-182, 15 abr. 2003. Mensal.

OSTRENSKY, Antônio et al. **Aqüicultura no Brasil: o desafio é crescer**. Brasília: Antonio Ostrensky, José Roberto Borghetti e Doris Soto, 2008. 276 p. (ISBN: 978-85-60930-00-5).

PÉTURSDÓTTIR, Ásta H. et al. HPLC-HG-ICP-MS: a sensitive and selective method for inorganic arsenic in seafood. **Anal Bioanal Chem**, Aberdeen, v. 8, n. 404, p.2185-2191, 29 set. 2012.

RIBO, Juan M. Interlaboratory Comparison Studies of the Luminescent Bacteria Toxicity Bioassay. **Environmental Toxicology and Water Quality**. Barcelona, p. 283-294. 28 out. 1996.

SOUZA, Juliana M. O. et al. Arsenic and Rice: Toxicity, Metabolism, and Food Safety. **Química Nova**, [s.l.], v. 38, n. 1, p.118-127, out. 2014. GN1. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140279>.

SPECTROSCOPY (Ed.). How to Improve Analytical Figures of Merit of Hard-To-Ionize Elements in ICP-Based Techniques. **Spectroscopy**, [s.l.], v. 31, n. 1, p.48-51, 1 Jan. 2016.

TAWHEEL, Abdulali; SHUAIMI, 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**. Malaysia, p. 45-51. 2. Mai. 2013.

THOMPSON, Michael; ELLISON, Stephen L. R.; WOOD, Roger. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis: (IUPAC Technical Report). **Pure Appl. Chem**, [s.l.], v. 74, n. 5, p.835-855, Jan. 2002.

THOMAS R., 2001: Thomas, R., A Beginner's Guide to ICP-MS (Part I). **Spectroscopy Tutorial**, v. 16, n. 4, p. 38-42, Abr. 2001.

THOMAS R., 2002: Thomas, R., A Beginner's Guide to ICP-MS: Part IX – Mass Analyzers: Collision/Reaction Cell Technology. **Spectroscopy Tutorial**, v. 17, n. 2, p. 42-48, Fev. 2002.

THOMAS R., 2008: Thomas, R., 2008. Practical guide to ICP-MS – a tutorial for beginners (2nd Ed) **CRC Press**, Boca Raton, Florida. 347p.

TSAI, Jeng-wei et al. Detoxification and bioregulation are critical for long-term waterborne arsenic exposure risk assessment for tilapia. **Environmental Monitoring and Assessment**, Beijing, v. 184, n. 1, p.561-572, 15 abr. 2011. Springer Nat. <http://dx.doi.org/10.1007/s10661-011-1988-8>.

TSAI, Jeng-wei et al. Toxicokinetics of tilapia following high exposure to waterborne and dietary copper and implications for coping mechanisms. **Environmental Science and Pollution Research**, [s.l.], v. 20, n. 6, p.3771-3780, 22 Nov. 2012. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/s11356-012-1304-3.

TSAI, Jeng-wei; LIAO, Chung-min. A dose-based modeling approach for accumulation and toxicity of arsenic in tilapia *Oreochromis mossambicus*. **Environmental Toxicology**, Taiwan, v. 21, n. 1, p.8-21, 2006. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/tox.20150>.

USEPA. National Primary Drinking Water Regulations, Arsenic and Clarifications to Compliance and New Source Contaminants Monitoring; Proposed Rule. **Federal Register**, v. 65, n. 121, June 22, 2000, p.38888-38983.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. National Academy Of Sciences. U.S. Environmental Protection Agency. **Arsenic in Drinking Water: 2001 Update**. Washington D.c: National Academy Press, 2001. 226 p. (0-309-07629-3).

TYLER, Geoffrey. **ICP-MS, or ICP-AES and AAS?—a comparison**. 1994. Varian Australia Pty Ltd. Disponível em: <<http://concours.univ->

lyon1.fr/servlet/com.univ.collaboratif.utils.LectureFichiergw?ID_FICHIER=1320397709943>. Acesso em: 14 ago. 2016.

VALENTI, W. C.; POLI, C. R.; PEREIRA, J. A.; BORGHETTI, J. R. (Eds.). 2000. **Aquicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável**. Brasília: CNPQ/ Ministério da Ciência e Tecnologia. 399 p.

VIRANI, Farah; TANNER, Scott. Mass Cytometry: An Evolution in ICP-MS Enabling Novel Insights in Single-Cell Biology. **Spectroscopy**, [s.l.], v. 30, n. 5, p.1-9, 1 maio 2015.

VOIGT, Carmen Lúcia et al. Bioconcentration and bioaccumulation of metal in freshwater Neotropical fish *Geophagus brasiliensis*. **Environmental Science and Pollution Research**, [s.l.], v. 22, n. 11, p.8242-8252, 19 dez. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-014-3967-4>.

WOLF, Ruth E. **What is ICP-MS? And more importantly, what can it do?** 2005. Disponível em: <http://crustal.usgs.gov/laboratories/icpms/What_is_ICPMS.pdf>. Acesso em: 14 ago. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (Geneva). **Arsenic**. 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs372/en/>>. Acesso em: 23 mar. 2017.

World Health Organization/ Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO/WHO). **Dietary exposure assessment of chemicals of chemicals in food**: Report of a Joint FAO/WHO Consultation. 2005. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241597470_eng.pdf>. Acesso em: 24 mar. 2015.

WU, Xing et al. The arsenic content in marketed seafood and associated health risks for the residents of Shandong, China. **Ecotoxicology And Environmental Safety**. Shandong, p. 168-173. 14 fev. 2014.