UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo *in vivo* (*Mus musculus*) e *post mortem* (*Globicephala melas*) da exposição ao arsênio, sua distribuição tecidual e aplicação de ferramentas analíticas para especiação química

Juliana Maria Oliveira Souza

Ribeirão Preto

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo *in vivo* (*Mus musculus*) e *post mortem* (*Globicephala melas*) da exposição ao arsênio, sua distribuição tecidual e aplicação de ferramentas analíticas para especiação química

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Juliana Maria Oliveira Souza

Coorientador: Dr. Bruno Lemos Batista

Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior

Ribeirão Preto

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Souza, Juliana Maria Oliveira

Estudo *in vivo* (*Mus musculus*) e *post mortem* (*Globicephala melas*) da exposição ao arsênio, sua distribuição tecidual e aplicação de ferramentas analíticas para especiação química.

101 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Barbosa Júnior, Fernando.

1. Arsênio, 2. Exposição crônica, 3. Arroz, 4. Toxicidade 5. Especiação química. 6. Arsenolipídeos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

SOUZA, Juliana Maria Oliveira

Estudo *in vivo* (*Mus musculus*) e *post mortem* (*Globicephala melas*) da exposição ao arsênio, sua distribuição tecidual e aplicação de ferramentas analíticas para especiação química

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Coorientador: Dr. Bruno Lemos Batista

Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

"Um homem precisa viajar. Por sua conta, não por meio de histórias, imagens, livros ou TV. Precisa viajar por si, com seus olhos e pés, para entender o que é seu. Para um dia plantar as suas próprias árvores e dar-lhes valor. Conhecer o frio para desfrutar o calor. E o oposto. Sentir a distância e o desabrigo para estar bem sob o próprio teto. Um homem precisa viajar para lugares que não conhece para quebrar essa arrogância que nos faz ver o mundo como o imaginamos, e não simplesmente como é ou pode ser. Que nos faz professores e doutores do que não vimos, quando deveríamos ser alunos, e simplesmente ir ver."

(Amyr Klink)

Dedico este trabalho a Deus, fonte de luz, proteção, sabedoria e infinito amor, pela oportunidade concedida de viver, sonhar e acreditar! Aos meus maravilhosos pais, Ciro e Dulce, meus melhores exemplos de vida e amor! E à minha amada irmã, Marília, pela confiança, amizade e presença constante. Sem vocês, a alegria de sonhar e realizar não teria o mesmo sentido!

Agradecimentos

A Deus, por iluminar meu caminho e minhas decisões e por me fazer acreditar que minha vida está em Seus planos.

Aos meus pais Ciro Cruz de Souza e Dulce Oliveira Souza, exemplos de fé, amor, companheirismo, simplicidade e dedicação. Fonte de todo apoio incondicional durante minha caminhada.

À minha amada irmã, Marília, pela amizade, confidências, conselhos, abraços, sorrisos, momentos, força e compreensão.

Ao meu namorado, Ruy, pelo amor, carinho, compreensão, companheirismo e otimismo. Obrigada por cada palavra de apoio, pelos momentos especiais e sonhos que compartilhamos.

À minha amada avó, Jandira, que mesmo não estando mais presente fisicamente é uma das minhas melhores e maiores lembranças de amor. A saudade é eterna.

À minha madrinha (mainha), Rosilene, por não medir esforços em tornar os momentos especiais e ser como uma segunda mãe em minha vida.

À minha tia, Conceição, por seu infinito amor e por suas orações.

Às minhas primas, Luciana, por sempre estar ao meu lado e Vivian, pela alegria e otimismo contagiante.

A todos os meus especiais amigos, Simone, Carolina Capizzani, Juliana Vescovi, Patricia Mendes, Carla Souza, Kamila, Nara Pereira, Renan, Bruno Lemos, Maria Fernanda, Eloísa, Denise por me apoiarem e sempre estarem presentes.

A todos os meus companheiros do laboratório que fizeram parte desta caminhada, Vanessa Souza, Katia Marco, Renan Varrique, Bruno Lemos, Denise Grotto, Maria Fernanda, Eloísa de Paula, Airton Junior, Gustavo Barcelos, Bruno Rocha, Jairo, Márcia, Letícia, Rodolfo, Ana Carolina Paulelli, Ana Paula Poles, Vania de Rezende, Vinicius, Aline Santana, Vívian, Samuel.

Ao meu Orientador Dr. Fernando Barbosa Junior pela dedicação, confiança e pela grande oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa.

Ao meu coorientador, Bruno Lemos, pelos conselhos, apoio, força, incentivo e ensinamentos.

A Vanessa pela amizade, sugestões, atenção, auxílio nos experimentos e dedicação ao Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais.

Aos integrantes do grupo TESLA (*Trace Element Speciation Laboratory: University of Aberdeen, School of Natural and Computing Sciences, Department of Chemistry*) Dr. Jörg Feldmann, Dra. Eva Krupp, Dra. Andrea Raab, Dr. Kenneth Amayo, Dra. Dagmar Urgast, Christoph Cornelius, Bera Edi, Claudia Weber, Marilena Ronzan, Michael Stiboller, Johannes Kopp, Peter, Frank, David Bellis, Zuzana, pelo apoio nos estudos desenvolvidos durante o período de estágio de doutorado sanduíche na Universidade de Aberdeen (Escócia, Reino Unido), e por todos os momentos e amizade.

A todos (antigos e novos) integrantes do Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, em especial à Ana Lúcia, Rosemary e Rosana.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo apoio financeiro concedido a esse estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo apoio financeiro às pesquisas desenvolvidas no laboratório.

E a todos que não estão presentes nestas linhas mas que, direta ou indiretamente, participaram da minha caminhada desde a graduação até a defesa desta tese de doutorado.

À todos vocês meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

Souza, J. M. O. **Estudo *in vivo* (*Mus musculus*) e *post mortem* (*Globicephala melas*) da exposição ao arsênio, sua distribuição tecidual e aplicação de ferramentas analíticas para especiação química**. 2014. 125 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

O arsênio é um elemento químico tóxico encontrado na natureza em várias formas químicas. Entretanto, cada uma delas apresenta diferença na toxicocinética e toxicodinâmica. Os alimentos são considerados a principal fonte de exposição pelos humanos, destacando o arroz, que pode conter o arsênio na forma inorgânica e nas formas de ácidos monometilarsônico e dimetilarsínico (DMA), e alimentos de origem marinha. Os compostos de arsênio encontrados na biota marinha são classificados como solúveis em água, como arsenobetaína e arsenoaçúcares, e solúveis em lipídeos como os arsenolipídeos. Assim, é importante o desenvolvimento de estudos que avaliem a exposição ao arsênio pela alimentação, sua distribuição em organismos e sua especiação química. Neste sentido, o presente trabalho está apresentado em dois capítulos. O capítulo I corresponde ao estudo de exposição crônica em camudongos machos *Swiss* ao arsênio presente na dieta e os efeitos em alguns parâmetros bioquímicos. Para isso os animais foram divididos em grupo controle, três grupos expostos à dieta contendo arroz naturalmente contaminado com arsênio e três grupos expostos à dieta preparada com sais de arsênio nas mesmas concentrações presentes no arroz. Concentrações de arsênio total foram determinadas nos tecidos dos animais em estudo por ICP-MS, sendo que as maiores concentrações foram observadas na bexiga > pêlos > pulmões > rins > fígado > coração > cérebro > sangue. Análises de especiação química usando HPLC-ICP-MS mostraram a presença de DMA e As⁵⁺ em amostras de fígado e rins. Adicionalmente, não foram observadas alterações nas concentrações de glicose e de óxido nítrico plasmáticos. Uma redução significativa nas concentrações de hemoglobina sanguínea foi observada apenas para os animais expostos à ração preparada com a maior concentração de arsênio na forma do sal. Alterações em alguns parâmetros relacionados ao estresse oxidativo foram encontradas nos animais expostos às dietas contendo a maior proporção de arroz e a maior concentração de arsênio na forma de sal. Portanto, as características pioneiras deste estudo levantam questionamentos diversos e incentivam a continuidade de pesquisas futuras relacionadas à avaliação da segurança do consumo de arroz. O capítulo II refere-se ao estudo de identificação e distribuição de arsenolipídeos em tecidos de baleia-piloto-de-aleta-longa (*Globicephala melas*), com diferenças na idade e sexo. Arsênio total foi determinado nas amostras por ICP-MS, sendo as maiores concentrações encontradas nos rins. Os resultados mostraram que as baleias-piloto adultas tendem a acumular maior concentração do elemento em relação a juvenis. As amostras de fígado, rins, músculo e camada de gordura foram submetidas a um procedimento de extração. As maiores concentrações de arsênio total foram determinadas nos extratos metanol/diclorometano por ICP-MS e 7 arsenolipídeos (ácidos graxos e hidrocarbonetos contendo arsênio) foram

identificados nestes extratos após análise de especiação química por HPLC-ICP-MS/ESI-MS. Por outro lado, mesmo o extrato hexano apresentando menores concentrações do elemento, alguns arsenolipídeos foram identificados. Foi possível observar que cada tecido apresentou um perfil específico de distribuição destes compostos. Assim, este segundo estudo foi precursor na identificação e distribuição de arsenolipídeos em tecidos de baleias, contribuindo para o fortalecimento da avaliação de aspectos biogeoquímicos e toxicológicos do arsênio.

Palavras-chave: arsênio, exposição crônica, arroz, toxicidade, especiação química, arsenolipídeos.

ABSTRACT

Souza, J. M. O. ***In vivo (Mus musculus) and post mortem (Globicephala melas) study of chronic exposure to arsenic, tissue distribution and application of analytical techniques for arsenic speciation.*** 2014. 125 f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Arsenic is a toxic and widely distributed element in the nature. It is found in different chemical forms and each of them presents different toxicokinetic and toxicodynamic. Food is considered the main source of exposure to humans highlighting the rice that usually contains inorganic arsenic, monomethylarsonic acid and dimethylarsinic acid (DMA), and sea food. Organic arsenic forms, found in marine biota, are classified as water-soluble (arsenobetaine and arsenosugars), or lipid-soluble compounds (arsenolipids). Therefore, it is of extreme importance the development of studies that evaluate arsenic exposure by diet, the distribution of the element in organisms, and its chemical speciation. Thus, the present study is divided in two chapters. Chapter I is related to the effects on some biochemical parameters after a chronic exposure to arsenic through the diet by Swiss male mice. For this, animals were divided into a control group, three groups fed with a diet containing rice naturally contaminated with arsenic, and three groups fed with a diet prepared with arsenic salts at the same concentration present in rice. Total arsenic concentration in the tissues was determined by ICP-MS. The highest concentrations were observed in bladder > hair > lung > kidneys > liver > heart > brain > blood. The chemical speciation analysis using HPLC-ICP-MS showed the presence of DMA and As⁵⁺ in liver and kidneys samples. Additionally, no changes were observed in the plasmatic glucose and nitric oxide levels. A significant reduction in blood hemoglobin concentration was observed only in animals exposed to the diet prepared at the highest concentration of arsenic salts. Biochemical parameters related to oxidative stress were altered in the whole blood of animals exposed to the diets containing higher proportion of rice and higher concentration of arsenic added as a salt. So, the pioneer results of the present study contribute to the answer of a number of issues and may encourage future research concerning safety assessment of rice consumption. Chapter II refers to the identification of arsenolipids in tissue samples collected from long-finned pilot whales (*Globicephala Melas*). The investigation comprised whether arsenolipids were present in the tissues of pilot whales, and how they were distributed into the different organs. Total arsenic concentration in the tissues was determined, with the highest concentration found in the kidneys. The results showed that adult pilot whales tend to accumulate higher concentration of the element compared to the juvenile ones. Furthermore, extractions of nonpolar and polar arsenolipids from liver, kidneys, muscle, and blubber samples were performed. The highest arsenic concentration was found in the methanol/dichloromethane extracts by ICP-MS and also 7 arsenolipids (arsenic-containing fatty acids and hydrocarbons) were identified after chemical speciation analysis by HPLC-ICP-MS/ESI-MS. On the other hand, even the hexane extract having lower arsenic concentration, there were some arsenolipids identified. It was noticed that each tissue presented a specific profile of arsenolipids

distribution. So, this second study was pioneer in identification of arsenolipids in whales tissues and contribute to biogeochemical and toxicological evaluation of arsenic.

Keywords: arsenic, chronic exposure, rice, toxicity, chemical speciation, arsenolipids.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1 - Via de metilação oxidativa para o metabolismo de arsênio em mamíferos. (Adaptado de Watanabe & Hirano (2013)).		7
Figura 2 - Alguns mecanismos de toxicidade do arsênio. (Adaptado de Shi, Shi, & Liu (2004)).		12
Figura 3 - Cromatogramas típicos obtidos da análise de especiação química de arsênio (expresso como arsênio, $m/z=75$). Em A) padrões analíticos das espécies de arsênio: AsB, As ³⁺ , DMA, MMA e As ⁵⁺ . Em B) Material de referência certificada (1568a, <i>Rice Flour</i> , NIST). Em C) Arroz polido utilizado no preparo de algumas rações específicas, destacando 4 espécies quantificadas (As ³⁺ , DMA, MMA e As ⁵⁺).		36
Figura 4 - Variação da massa corporal dos camundongos (grupos I ao VII) durante o período de 15 semanas de tratamento. Valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão. Nenhuma diferença estatística foi encontrada ($p > 0,05$).		38
Figura 5 - Concentração de hemoglobina (g dL^{-1}) em amostras de sangue total coletado dos camundongos após 15 semanas de tratamento. Valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão. *Diferença estatística observada comparada ao grupo controle ($p < 0,05$).		39
Figura 6 - Concentração de arsênio total em pêlos, bexiga, cérebro, coração, fígado, pulmões, rins (ng g^{-1}) e sangue ($\mu\text{g L}^{-1}$) coletados dos camundongos após tratamento crônico. ANOVA uma- via, seguida por teste post-hoc de Duncan com $p < 0,05$. As colunas marcadas com asterisco indicam resultados estatisticamente diferentes do grupo controle.		43
Figura 7 - Cromatograma obtido da análise de especiação química de arsênio (expresso como arsênio, $m/z=75$) em amostras de rins dos animais pertencentes ao grupo VI (destacando DMA e As ⁵⁺).		45

Figura 8 - Biomarcadores de estresse oxidativo: concentração de 47
glutathiona (GSH) (mmol L^{-1}), atividades de catalase (CAT) (k/g
Hemoglobina), glutathiona peroxidase (GPx) ($\mu\text{mol NADPH/min/g}$
Hemoglobina) e superóxido dismutase (SOD) (USOD/mg
Hemoglobina) em amostras de sangue total dos camundongos.
ANOVA uma-via, seguida por teste post-hoc de Duncan com $p < 0,05$. As colunas marcadas com asterisco indicam resultados estatisticamente diferentes do grupo controle.

Figura 9 - Concentração de NO total ($\mu\text{mol L}^{-1}$) em amostras de 52
plasma dos camundongos. ANOVA uma-via, seguida por teste post-
hoc de Duncan com $p < 0,05$.

Capítulo II

Figura 10 - Rota proposta para biossíntese de alguns AsLip, como 57
ácidos graxos e hidrocarbonetos contendo arsênio em organismos
marinhos (Adaptado de Sele, Sloth, e Lundebye (2012)).

Figura 11 - Imagens registradas no dia posterior ao encalhamento de 63
22 baleias-piloto-de-aleta-longa em Anstruther, Fife, Escócia (RU).

Figura 12 - Esquema do procedimento de extração das espécies de 65
arsênio aplicado nas amostras de tecidos de baleias-piloto-de-aleta-
longa.

Figura 13 - Acoplamento das técnicas analíticas HPLC-HR-ICP- 67
MS/HR-LTQ Orbitrap ESI-MS utilizadas para a identificação de AsLip
nos extratos (Adaptado de Batista (2012)).

Figura 14 - Porcentagem de recuperação (%) de cada fase do 73
procedimento de extração de espécies de arsênio em relação à
concentração de arsênio total ($\mu\text{g As g}^{-1}$) em cada tecido original de
baleias-piloto-de-aleta-longa. Soma*: soma da porcentagem de
recuperação de todas as fases (MeOH/DCM + hexano + resíduo).

Figura 15 - Cromatogramas obtidos após análise por HPLC-ICP-MS 77
de extratos MeOH/DCM de amostras de rins, camada de gordura,
fígado e músculo (Baleia 2).

Figura 16 - Cromatogramas obtidos após análise por HPLC-ICP-MS de extratos MeOH/DCM de amostras de rins, camada de gordura, fígado e músculo (Baleia 5).	 77
Figura 17 - Cromatogramas obtidos após análise por HPLC-ICP-MS de extratos MeOH/DCM e hexano de amostras de rins (Baleia 2).	 78
Figura 18 - Cromatogramas obtidos após análise por HPLC-ICP-MS/ESI-MS de extratos MeOH/DCM de amostras de rins, camada de gordura, fígado e músculo (Baleia 5).	 78

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1 - Espécies químicas de arsênio, suas respectivas abreviaturas e fórmulas estruturais (Adaptado de Barra (2000) e Dembitsky e Levitsky (2004)).		2
Tabela 2 - Condições operacionais do ICP-MS para determinação da concentração de arsênio total.		25
Tabela 3 - Programa de aquecimento do forno de microondas utilizado para digestão das amostras de arroz.		26
Tabela 4 - Condições operacionais do HPLC para as análises de especiação química de arsênio.		28
Tabela 5 - Composição nutricional da dieta habitual para camundongos.		32
Tabela 6 - Resultados da análise de materiais de referência certificada (1568a, <i>Rice Flour</i> , 1577c, <i>Bovine Liver</i>) e material de referência (BE07-06 <i>Whole Blood</i>) para garantir exatidão das metodologias analíticas utilizadas no presente estudo. Os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão.		37

Capítulo II

Tabela 7 - Sexo, comprimento (cm), idade (anos) e grupo etário de baleias-piloto-de-aleta-longa de um encalhamento em massa em Anstruther, Fife, Escócia (RU).		62
Tabela 8 - Programa de aquecimento do forno de microondas utilizado para digestão das amostras de tecidos, resíduos do procedimento de extração e extratos.		66
Tabela 9 - Concentração de arsênio total ($\mu\text{g As g}^{-1}$) em amostras liofilizadas de fígado, cérebro, rins e músculo e em camada de gordura de baleias-piloto-de-aleta-longa.		70

Tabela 10 - Fórmulas moleculares protonadas (MH^+), tempos de retenção, massas experimentais (MH^+), registradas pelo ESI-MS, e associadas ao erro relativo (Δm) para os AsLip identificados no extrato MeOH/DCM de amostras de rins (baleia 5).		80
Tabela 11 - Fórmulas moleculares protonadas (MH^+), tempos de retenção, massas experimentais (MH^+), registradas pelo ESI-MS, e associadas ao erro relativo (Δm) para os AsLip identificados no extrato MeOH/DCM de amostras de camada de gordura (baleia 5).		81
Tabela 12 - Fórmulas moleculares protonadas (MH^+), tempos de retenção, massas experimentais (MH^+), registradas pelo ESI-MS, e associadas ao erro relativo (Δm) para os AsLip identificados no extrato MeOH/DCM de amostras de fígado (baleia 5).		82
Tabela 13 - Fórmulas moleculares protonadas (MH^+), tempos de retenção, massas experimentais (MH^+), registradas pelo ESI-MS, e associadas ao erro relativo (Δm) para os AsLip identificados no extrato MeOH/DCM de amostras de músculo (baleia 5).		83
Tabela 14 - Fórmulas moleculares protonadas (MH^+), tempos de retenção, massas experimentais (MH^+), registradas pelo ESI-MS, e associadas ao erro relativo (Δm) para os AsLip identificados no extrato hexano de amostras de rins (baleia 2).		84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACGIH: *American Conference of Industrial Hygienists*

ALAD: ácido δ aminolevulínico desidratase

AsB: arsenobetaína

AsC: arsenocolina

AsLip: arsenolipídeos

ATP: trifosfato de adenosina

BMDL: *Benchmark dose lower confidence limit*

CAT: catalase

DCM: diclorometano

DMA: ácido dimetilarsínico

DNA: ácido desoxirribonucléico

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

EFSA: *European Food Safety Authority*

EPA: *Environmental Protection Agency*

ESI-MS: espectrometria de massas com ionização por *eletrospray*

FAO: Food and Agriculture Organization

FDA: *United States Food and Drug Administration*

FSA: *Food Standards Agency*

GPx: glutationa peroxidase

GSH: glutationa

GSSG: glutationa oxidada

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

HPLC-ICP-MS: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado

HPLC-ICP-MS/ESI-MS: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada simultaneamente à espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado e à espectrometria de massas de alta resolução com ionização por *eletrospray*

IARC: *International Agency for Research on Cancer*

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICP-MS: espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado

IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry*

JECFA: Comitê de Especialistas da FAO/WHO em aditivos alimentares e contaminantes

MMA: ácido monometilarsônico

m/z: razão massa / carga

NADH: dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase

NIST: *National Institute of Standards and Technology*

NOS: óxido nítrico sintase

O₂^{•-}: ânion superóxido

•OH: radical hidroxila

OMS: Organização Mundial de Saúde

ONOO⁻: peroxinitrito

PTWI: *Provisional tolerable weekly intake*

ROS: espécies reativas de oxigênio

RNS: espécies reativas de nitrogênio

rpm: rotações por minuto

-SH: grupamento sulfidrila

SOD: superóxido dismutase

WHO: *World Health Organization*

TMAO: óxido de trimetilarsina

LISTA DE SÍMBOLOS

As: arsênio

As³⁺: arsenito

As⁵⁺: arsenato

As₂O₃: trióxido de arsênio

As₂O₅: pentóxido arsênico

Ga: gálio

Ge: germânio

HCl: ácido clorídrico

HNO₃: ácido nítrico

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

H₃PO₄: ácido fosfórico

H₃AsO₄: ácido arsênico

MeOH: metanol

NaAsO₂: arsenito de sódio

Na₂AsO₄: arsenato de sódio

NaOH: hidróxido de sódio

NO: óxido nítrico

Rh: ródio

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	iii
Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	viii
Lista de Abreviaturas e Siglas	x
Lista de Símbolos	xiii
1. Introdução Geral	1
1.1 Arsênio: espécies químicas, exposição e toxicidade	1
1.2 Toxicocinética do arsênio	4
1.3 Efeitos tóxicos da exposição ao arsênio	7
1.4 Toxicodinâmica do arsênio	8
1.4.1 Interação com grupamentos sulfidríla (-SH)	9
1.4.2 Interação com fosfato	10
1.4.3 Produção de espécies reativas de oxigênio e disfunção no sistema antioxidante	10
1.4.4 Alteração na produção de óxido nítrico (NO)	11
1.5 Arsênio e estudos de especiação química	12
Capítulo I - Distribuição de arsênio e avaliação de efeitos nas concentrações de hemoglobina, glicose, óxido nítrico e em parâmetros relacionados ao estresse oxidativo em camundongos expostos ao arsênio pela dieta contendo arroz	16
1. Introdução	17
1.1 Arsênio e arroz	17
2. Objetivos	20
3. Material e Métodos	21
3.1 Equipamentos e acessórios	21
3.2 Reagentes e soluções	22
3.3 Arroz utilizado no estudo	24
3.4 Metodologias	24
3.4.1 Determinação da concentração de arsênio total por ICP-MS .	24
3.4.2 Análise de especiação química de arsênio por HPLC-ICP-MS	27
3.4.3 Quantificação de hemoglobina e glicose	28
3.4.4 Quantificação de tióis totais	29
3.4.5 Determinação da atividade da enzima antioxidante Catalase (CAT)	29
3.4.6 Determinação da atividade da enzima antioxidante Glutathione Peroxidase (GPx)	30

3.4.7 Determinação da atividade da enzima antioxidante Superóxido Dismutase (SOD)	30
3.4.8 Determinação da concentração de óxido nítrico (NO)	30
3.5 Delineamento Experimental	31
3.5.1 Padronização das rações dos camundongos	31
3.5.2 Animais e descrição do tratamento	33
3.6 Análises estatísticas	34
4. Resultados e Discussão	35
4.1 Concentrações de arsênio total e de suas espécies químicas presentes na amostra de arroz selecionada	35
4.2 Variação da massa corporal dos camundongos	37
4.3 Concentrações de hemoglobina em sangue total e glicose em plasma	38
4.4 Concentrações de arsênio total e de espécies arsenicais determinadas nos tecidos dos animais em estudo	42
4.5 Parâmetros relacionados ao estresse oxidativo	47
4.6 Concentração de NO	51
5. Conclusões	53
Capítulo II - Distribuição e identificação de biomoléculas contendo arsênio em baleias-piloto-de-aleta-longa (<i>Globicephala melas</i>)	55
1. Introdução	56
1.1 Arsênio e o ecossistema marinho	56
2. Objetivos	59
3. Material e Método	60
3.1 Equipamentos e acessórios	60
3.2 Reagentes e soluções	60
3.3 Amostras	61
3.4 Preparo das amostras para determinação da concentração de arsênio total e identificação de arsenolipídeos	63
3.5 Determinação da concentração de arsênio total por HR-ICP-MS	66
3.6 Análise de especiação química de arsênio por HPLC-ICP-MS/ESI-MS para identificação de arsenolipídeos	67
3.7 Análises estatísticas	68
4. Resultados e Discussão	69
4.1 Concentração de arsênio total em fígado, cérebro, rins, músculo e camada de gordura de baleias-piloto-de-aleta-longa	69
4.2 Concentração de arsênio total em amostras provenientes do procedimento de extração: extratos e resíduos da extração	72

4.3 Identificação de arsenolipídeos após análise por HPLC-ICP-MS/ESI-MS	74
5. Conclusões	85
REFERÊNCIAS	87
ANEXOS	101
ANEXO A: Aprovação pela Comissão de Ética Local em Uso Animal (CEUA-USP)	101

1. Introdução Geral

1.1 Arsênio: espécies químicas, exposição e toxicidade

A palavra arsênio é proveniente da palavra persa *Zarnikh*, que significa pigmento amarelo. O elemento foi isolado pela primeira vez em 1250, sendo conhecido como “veneno dos reis” e “rei dos venenos” (Klaassen, 2008).

O arsênio apresenta massa atômica de 75 u.m.a. (unidades de massa atômica) e é considerado um semimetal, por apresentar tanto propriedades de metais quanto de ametais. Apesar de elevada toxicidade, foi bastante utilizado, até metade do século XX, no tratamento de doenças como sífilis, tripanossomíase, psoríase, malária e mais recentemente é utilizado no tratamento de leucemia promielocítica aguda (Soignet et al., 2001; Yoshida, Yamauchi, & Sun, 2004).

O arsênio é amplamente distribuído na crosta terrestre em variadas formas químicas, incluindo espécies orgânicas e inorgânicas, as quais apresentam características diferentes em se tratando de toxicocinética e toxicodinâmica. O arsênio inorgânico pode estar presente na natureza na forma trivalente, como trióxido de arsênio (As_2O_3) ou arsenito de sódio (NaAsO_2), ou ainda na forma pentavalente como arsenato de sódio (Na_2AsO_4), pentóxido arsenico (As_2O_5) ou ácido arsenico (H_3AsO_4) (Klaassen, 2008).

Já as formas orgânicas incluem compostos metilados originados de processos de biotransformação em vários organismos, como ácido monometilarsônico (MMA) e ácido dimetilarsínico (DMA), e também ácido arsenílico, óxido de trimetilarsina (TMAO), arsenoaçúcares, arsenobetaína (AsB), arsenocolina (AsC) e arsenolipídeos (AsLip) (Dembitsky & Levitsky, 2004; Klaassen, 2008). Nos últimos anos, um número de diferentes AsLip foram identificados como ácidos graxos e hidrocarbonetos contendo arsênio, arsenoaçúcares fosfolipídeos e trimetilarsênio álcool graxo (Amayo, Raab, Krupp, & Gunnlaugsdottir, 2013; Raab, Newcombe, & Pitton, 2013; Rumpler & Edmonds, 2008; Taleshi et al., 2008).

Tabela 1 - Espécies químicas de arsênio, suas respectivas abreviaturas e fórmulas estruturais. Adaptado de Barra (2000) e Dembitsky e Levitsky (2004).

Composto	Fórmula Estrutural
Arsina	AsH ₃
Ácido Arsenioso (arsenito - As ³⁺)
Ácido Arsênico (arsenato - As ⁵⁺)
Ácido Dimetilarsínico (DMA ⁵⁺)
Ácido Monometilarsônico (MMA ⁵⁺)
Arsenobetaína (AsB)
Arsenocolina (AsC)
Arsenoaçúcares
Arsenolipídeos (AsLip)

A Tabela 1 apresentou as espécies de arsênio mais frequentemente relatadas na literatura, suas respectivas fórmulas estruturais e abreviaturas.

De modo geral, as espécies de arsênio podem ser provenientes de fontes naturais como vulcões e fontes antropogênicas como minas de metais não ferrosos, fumaças e poeiras industriais (fundição), combustão de madeira e de carvão, produção e aplicação de praguicidas e/ou herbicidas que contenham compostos arsenicais, fabricação de outros produtos de uso agropecuário com a presença de arsênio em sua fórmula, utilizados para crescimento e prevenção de doenças em gados, porcos e aves. Assim, as variadas formas químicas deste semimetal podem ser encontradas em solos, ar, água, sedimentos, plantações e ainda podem se acumular em organismos vivos (ATSDR, 2007; Mandal & Suzuki, 2002; Klaassen, 2008).

Os alimentos são considerados a principal fonte de exposição aos humanos, destacando alimentos de origem marinha, cogumelos, aves, arroz e seus derivados. Entretanto, poucas são as legislações existentes que determinam concentrações de arsênio em alimentos e poucas são as informações relacionadas às concentrações de suas espécies químicas presentes nestas fontes de exposição (Berg & Larsen, 1999). Para a presença de arsênio em água, por exemplo, preconiza-se concentração máxima permitida de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pela Portaria nº 518 (25 de março de 2004) do Ministério da Saúde (Portaria, 2004; WHO, 2008). E para a concentração máxima aceitável de arsênio em arroz foi adotado recentemente o valor de $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ pelo comitê *Codex Alimentarius* juntamente com a FAO/WHO (FAO, 2014).

Compostos orgânicos contendo arsênio são abundantes no ecossistema marinho, principalmente dentro de vias de detoxificação de espécies arsenicais inorgânicas presentes na água do mar (García-Salgado, Raber, & Raml, 2012; Schmeisser, Goessler, Kienzl, & Francesconi, 2005). Os compostos usualmente encontrados na biota marinha são classificados como: arsenicais orgânicos solúveis em água, como AsB que predomina em peixes e crustáceos, e arsenoaçúcares que são importantes constituintes de algas e moluscos; e espécies de arsênio solúveis em lipídeos como AsLip (Schmeisser, Goessler, & Francesconi, 2006).

Alguns estudos mostraram que AsLip são produzidos *in vivo* em organismos primários e, então, transferidos ao longo da cadeia alimentar marinha (Sele et al., 2012). Desta forma, os compostos variam de organismo para organismo, como as baleias, que pertencem ao mais alto nível trófico e acumulam elevadas quantidades de elementos em suas diferentes espécies químicas (Nielsen & Nielsen, 2000). Por outro lado, alimentos como o arroz podem conter o arsênio predominantemente na sua forma inorgânica, fato preocupante considerando os aspectos toxicológicos deste semimetal (ATSDR, 2007; Bruno L Batista, Souza, De Souza, & Barbosa, 2011; Bruno Lemos Batista et al., 2014; Hsueh et al., 2002; Ma & Le, 1998; Watanabe & Hirano, 2013).

As espécies trivalentes e pentavalentes são consideradas de maior toxicidade, ao passo que AsB e AsC são relativamente não tóxicas (Barra, 2000). Arsenoaçúcares e AsLip são reportados como possíveis compostos arsenicais bioreativos (Watanabe & Hirano, 2013), a exemplo da biotransformação de AsLip a DMA em humanos (Fukuda, Terasawa, & Shiomi, 2011; Schmeisser et al., 2006). O As^{3+} é considerado 60 vezes mais tóxico que As^{5+} e as formas químicas inorgânicas juntas são 100 vezes mais tóxicas que os compostos metilados (MMA e DMA) (Chatterjee et al., 1995). Assim, a ordem crescente de toxicidade dos compostos de arsênio pode ser: compostos orgânicos de As^{5+} < compostos orgânicos de As^{3+} < compostos inorgânicos de As^{5+} < compostos inorgânicos de As^{3+} (Borba, Coscione, Figueiredo, & Zambello, 2009).

1.2 Toxicocinética do arsênio

Após exposição, principalmente pela via oral (80-90 %), o arsênio, em sua maior parte e, de acordo com a solubilidade de cada espécie, é absorvido via trato gastrointestinal (intestino) e distribuído pelo organismo geralmente ligado a proteínas plasmáticas. Este elemento químico pode ainda sofrer o efeito de primeira passagem pelo fígado, sendo metabolizado por meio de reações de metilação e, então, excretado predominantemente pela urina. (ATSDR, 2007; Correia, Gonçalves, Azevedo, Vieira, & Campos, 2010; NRC, 2001; W. He et al., 2007; Sirot, Guérin,

Volatier, & Leblanc, 2009; Suzuki, Katagiri, Sakuma, Ogra, & Ohmichi, 2004; Watanabe & Hirano, 2013). Considerando a via dérmica, a toxicocinética é pouco conhecida. Em 2010, um estudo *in vitro* com a utilização de pele humana mostrou que a penetração e o acúmulo de arsênio é fortemente dependente das suas espécies químicas. As^{3+} e As^{5+} acumularam-se tanto na epiderme quanto na derme ao passo que arsenoaçúcares e DMA^{5+} apresentaram mínima acumulação (Ouypornkochagorn & Feldmann, 2010).

A maioria das evidências dos processos metabólicos é decorrente da análise de urina e acredita-se que estes mecanismos sejam similares considerando exposição via oral, inalatória e parenteral (ATSDR, 2007). A proporção de cada espécie na urina dependerá da forma química, concentração, via, frequência e duração da exposição (ATSDR, 2007). Para indivíduos expostos ao arsênio inorgânico, as principais formas químicas encontradas na urina são: 60-80 % como DMA, 10-20 % como MMA e 10-20 % como arsênio inorgânico (H. V. Aposhian & Aposhian, 2006; J Feldmann et al., 1999). Já para indivíduos expostos a AsLip de estrutura desconhecida, por meio do consumo de fígado de bacalhau e/ou óleo de fígado de bacalhau, o processo metabólico foi caracterizado pela formação de compostos de arsênio solúveis em água. Assim, o principal metabólito encontrado na urina foi DMA seguido de derivados de AsLip (Schmeisser et al., 2006).

Uma vez na corrente sanguínea, a meia vida biológica do arsênio é de cerca de 10 horas, sendo de 50 a 80 % do total ingerido excretado na urina em 3 dias. O arsênio também possui afinidade pela molécula de queratina, podendo ser excretado por processos de descamação da pele, suor, unhas e cabelos. Considerando este fato, a intoxicação por arsênio também pode ser detectada pelo aparecimento de linhas transversais brancas nas unhas após cerca de 6 semanas do início dos sintomas, sendo esta matriz utilizada para avaliar exposição atual e passada ao elemento (Klaassen, 2008).

Os processos metabólicos em geral ocorrem no fígado e podem ser influenciados por diversos fatores, como faixa etária, sexo, gravidez, alimentação e polimorfismo genético. Um exemplo destes efeitos seria a diminuição na capacidade metabólica em indivíduos com deficiências severas de componentes doadores de grupamentos metila na alimentação (metionina ou proteínas) (Buchet & Lauwerys,

1985, 1987, 1988; Klaassen, 2008; Vahter & Marafante, 1987). Também foi observado um aumento na excreção de DMA em gestantes e uma diminuição na eliminação de arsênio inorgânico e MMA, o que pode comprometer o desenvolvimento fetal (Hopenhayn & Huang, 2003).

Dois processos básicos estão envolvidos no metabolismo do arsênio no organismo, destacando-se as reações de redução/oxidação entre as espécies trivalente e pentavalente e as reações de metilação que convertem o As^{3+} a MMA e DMA (ATSDR, 2007).

A metilação das espécies inorgânicas não pode ser considerada puramente como um mecanismo de destoxificação, pois foi comprovada a existência de elevada toxicidade proveniente de espécies arsenicais metiladas trivalentes intermediárias, como, por exemplo, o aparecimento de efeitos citotóxicos e genotóxicos em estudos com roedores (Kenyon, Hughes, & Adair, 2008). Também foi relatada a ocorrência de toxicidade por ação de um metabólito metilado pentavalente, o ácido dimetilmonotioarsínico (DMMTA^{5+}) (Naranmandura & Suzuki, 2008).

A biometilação é fundamentada pela adição oxidativa de um grupamento metila na espécie trivalente de arsênio (Thompson, 1993). Desta forma, o processo metabólico consiste na redução de As^{5+} a As^{3+} por meio de enzimas, como arsenato redutase, glutatona S-transferase ou por processos não enzimáticos, como pela ação de redutores endógenos (glutatona) ou por determinadas condições fisiológicas (pH, teor de oxigênio). Sequencialmente, o As^{3+} pode ser metilado a metilarsonato (MMA^{5+}) ou a ácido dimetilarsínico (DMA^{5+}) diretamente por meio das enzimas arsênio metiltransferase ou arsenito metiltransferase, utilizando S-adenosilmetionina como doador do grupo metila. Para o MMA^{5+} ser metilado a DMA^{5+} , ele deve primeiramente ser reduzido a MMA^{3+} , que então é metilado oxidativamente a DMA^{5+} . Portanto, durante a metabolização são formados compostos intermediários caracterizados com elevada toxicidade, como MMA^{3+} e DMA^{3+} , que possuirão afinidade por ligações tióis de diversos componentes biológicos, como proteínas, sítios catalíticos, alterando suas funções (H. V. Aposhian & Aposhian, 2006; Thomas, Li, & Waters, 2007; Thomas, Waters, & Styblo, 2004; Thomas, 2007; Thompson, 1993; Vahter, 2002; Watanabe & Hirano, 2013). Este

processo de metilação oxidativa das espécies de arsênio é representado na Figura 1.

A capacidade descrita de metilação de algumas formas químicas de arsênio é observada apenas em algumas espécies de animais, como o homem, camundongos, ratos, hamster, macaco rhesus, coelho (H. V Aposhian, 1997; Healy & Wildfang, 1999), e não encontrada, por exemplo, em chimpanzé e micos (H. V Aposhian, 1997; Healy & Wildfang, 1999).

Figura 1 - Via de metilação oxidativa para o metabolismo de arsênio em mamíferos. (Adaptado de Watanabe & Hirano (2013)).

1.3 Efeitos tóxicos da exposição ao arsênio

A *International Agency for Research on Cancer* (IARC) e a *American Conference of Industrial Hygienists* (ACGIH) classificaram o arsênio como um semimetal carcinogênico para humanos (categoria 1) e a Agência de Proteção Ambiental dos EUA, EPA (do inglês *Environmental Protection Agency*) também classifica o arsênio inorgânico como carcinogênico (ACGIH, 2003; ATSDR, 2007; Basu, Mahata, Gupta, & Giri, 2001; IARC, 2004; Sirot et al., 2009).

Entretanto, vários efeitos tóxicos podem ocorrer no organismo decorrente da exposição ao arsênio, visto que sua absorção ocorre por praticamente todas as vias, destacando-se a via oral e a inalatória (Barra, 2000).

Exposição via oral pela água ou alimentação, contato com o ar contaminado ou contato dérmico podem fornecer altas concentrações de arsênio ao organismo e ser então responsáveis pelo aparecimento de irritação estomacal e respiratória, náuseas, vômitos, diarreia, alterações hematopoiéticas, hipertensão, distúrbios cardiovasculares e no sistema nervoso central, conjuntivite, diabetes *mellitus*, hiperpigmentação e cânceres de pele, pulmão, bexiga e outros órgãos internos (ATSDR, 2007; Barra, 2000; Chen, Chen, Wu, & Kuo, 1992; M. Hughes, 2002; Navas-Acien, 2005; NRC, 2001; Yoshida et al., 2004).

Com relação à ocorrência de diabetes *mellitus*, estudos que avaliam exposição crônica ao arsênio em humanos mostraram a existência de relação dose-resposta entre o acúmulo do elemento no organismo e a prevalência da doença. Entretanto, os mecanismos moleculares e celulares da patogênese ainda não estão bem elucidados (C. Huang, Chen, & Yang, 2011).

Alguns estudos *in vitro* indicam que arsênio inorgânico ou seus metabólitos prejudicam a absorção de glicose dependente de insulina ou a secreção de insulina estimulada pela glicose, contribuindo para o desenvolvimento de diabetes *mellitus* tipo 2. Díaz-Villaseñor, Sánchez-Soto, Cebrián, Ostrosky-Wegman e Hiriart (2006) mostraram inibição da secreção de insulina e expressão de RNA mensageiro (RNAm) após a incubação de células isoladas de ilhotas pancreáticas de ratos com concentração subtóxica de As^{3+} (5 mol L^{-1}) durante 72 horas. Outro estudo utilizando células pancreáticas, porém com exposição a baixas concentrações de As^{3+} (0,05 e $0,5 \text{ mol L}^{-1}$), mostrou que a secreção de insulina estimulada pela glicose foi prejudicada (Fu et al., 2010). Esta disfunção de secreção também ocorreu devido à ação de As_2O_3 (1 e 10 mol L^{-1}) no estudo realizado por Yen et al. (2007). Entretanto, a literatura apresenta resultados conflitantes neste assunto, resultante principalmente da grande variação nas características de exposição entre os estudos experimentais, tais como diferentes tempos de exposição, concentração e formas químicas de arsênio.

1.4 Toxicodinâmica do arsênio

Os mecanismos de toxicidade e carcinogenicidade do arsênio ainda não estão completamente elucidados, mas sabe-se que são influenciados pela valência e pelas atividades de biotransformação do elemento (M. Hughes, Beck, & Chen, 2011; M. Hughes, 2002).

Embora o arsênio seja classificado como um carcinógeno humano, pouco se conhece sobre os mecanismos de toxicidade envolvidos com este efeito. Estudos apresentam relação com dano oxidativo, alteração no estado de metilação do ácido desoxirribonucleico (DNA) e comprometimento do seu mecanismo de reparo, instabilidade genômica, apoptose, necrose e alteração nos mecanismos de regulação da proliferação celular (ATSDR, 2007; NRC, 2001; Rossman, 2003). Os danos observados na molécula de DNA não são causados pela ligação direta do elemento, mas sim pela ação de espécies reativas geradas que poderão causar quebras no DNA, aberrações cromossômicas, formação de adutos e ligações cruzadas (Halliwell, 2007).

1.4.1 Interação com grupamentos sulfidríla (-SH)

As espécies trivalentes de arsênio são consideradas tióis reativas, ou seja, possuem elevada reatividade com compostos sulfidrílicos. Assim, irão interagir prontamente com moléculas como glutathiona (GSH) e cisteína, com outros sítios de proteínas e enzimas alterando reações bioquímicas essenciais, estado redox das células, podendo ocasionar citotoxicidade (ATSDR, 2007; M. Hughes, 2002; NRC, 2001). Neste sentido, mais de 50 proteínas foram identificadas como ligantes ao arsênio trivalente (Yan, Wang, Weinfeld, Cullen, & Le, 2009).

Como exemplo desta interação, tem-se a inibição de glutathiona redutase (Styblo & Thomas, 1997) e tioredoxina redutase (Lin, Cullen, & Thomas, 1999) por MMA^{3+} . A atividade tóxica proporcionada por estas espécies de arsênio trivalentes metiladas pode ser considerada maior em relação ao As^{3+} , MMA^{5+} e DMA^{5+} (M. Hughes, 2002; Styblo, Yamauchi, & Thomas, 1995). Outros estudos mostraram também a afinidade de ligação das espécies trivalentes de arsênio pelo resíduo de

cisteína da molécula de hemoglobina, podendo afetar a sua concentração (Lu et al., 2004).

1.4.2 Interação com fosfato

Arsênio e fósforo pertencem ao grupo 15 da tabela periódica, apresentando, assim, propriedades físico-químicas similares. Ácido arsênico (H_3AsO_4) e ácido fosfórico (H_3PO_4) são as formas protonadas de arsenato e fosfato, respectivamente, apresentando estruturas comparáveis e constantes de dissociação similares (M. Hughes et al., 2011). Desta forma, o As^{5+} pode substituir o fosfato em inúmeras reações bioquímicas (Dixon, 1996), sendo considerado um desacoplador da fosforilação oxidativa na mitocôndria e um substituinte do fosfato inorgânico na formação do trifosfato de adenosina (ATP). Esta espécie também atua desacoplando o fosfato de glicose-6-fosfato, da bomba de sódio e no sistema de transporte de troca aniônica das células vermelhas do organismo humano (ATSDR, 2007; M. Hughes et al., 2011; NRC, 2001).

1.4.3 Produção de espécies reativas de oxigênio e disfunção no sistema antioxidante

Espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) são continuamente produzidas pelo organismo. Porém, elas são efetivamente eliminadas por sistemas antioxidantes intra e extracelulares, como parte de curso regulatório normal do organismo. Todavia, quando um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e as defesas antioxidantes ocorre no sentido do primeiro, gera-se um estado pró-oxidante, denominado estresse oxidativo (Halliwell & Chirico, 1993). Fundamentalmente, o arsênio gera espécies ROS e RNS, que promovem danos oxidativos às células e, conseqüentemente, o aparecimento de efeitos adversos à saúde. Este mecanismo é caracterizado como um dos principais envolvidos na toxicidade e carcinogenicidade do arsênio (De Vizcaya-Ruiz, Barbier, Ruiz-Ramos, &

Cebrian, 2009; Shi et al., 2004). As principais espécies envolvidas no estresse oxidativo são ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($\cdot OH$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete e radical peroxil. O ânion superóxido é considerado a principal espécie relacionada ao estresse induzido pelo arsênio e a sua formação é então responsável por desencadear uma cascata de outras espécies reativas secundárias, destacando $\cdot OH$ e H_2O_2 (Kumagai & Pi, 2004; Shi et al., 2004).

Como resposta do organismo aos danos oxidativos existem as defesas antioxidantes, formadas por sistemas enzimáticos, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx), e não enzimáticos, como vitaminas C e E, carotenóides, flavonoides, oligoelementos (zinco (Zn), selênio (Se)), aminoácidos, e compostos tiólicos como a GSH, principal antioxidante endógeno (Valko et al., 2007). Além da produção de ROS e RNS, a exposição ao arsênio também pode induzir disfunções no sistema antioxidante (De Vizcaya-Ruiz et al., 2009; Kumagai & Pi, 2004).

Os mecanismos de formação destas espécies reativas ainda não estão claros, mas algumas hipóteses podem ser consideradas, como durante a oxidação de As^{3+} a As^{5+} (L M Del Razo et al., 2001), formação de arsina durante os processos metabólicos (Yamanaka & Okada, 1994), estimulação do dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADH) ou de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH-oxidase) (Lynn, Gurr, Lai, & Jan, 2000; Smith, Klei, & Barchowsky, 2001; Straub et al., 2008) ou inibição das enzimas redox, como a glutathione redutase e tioredoxina redutase (Lin et al., 2001; Styblo & Thomas, 1997).

1.4.4 Alteração na produção de óxido nítrico (NO)

Óxido nítrico (NO) é um estimulador endógeno da enzima guanilato ciclase. Também é considerada uma molécula efetora liberada por macrófagos e outras células após ativação imunológica. Sua síntese ocorre a partir do aminoácido L-arginina por ação da enzima NO sintase (NOS), a qual é encontrada nas isoformas neuronal, endotelial e induzida (Moncada, Palmer, & Higgs, 1991). A redução na

disponibilidade de NO ativo no endotélio é relacionado à fisiopatologia de várias doenças vasculares (Kumagai & Pi, 2004).

Vários estudos sugerem que exposição prolongada ao arsênio pela água de beber culmina com desordens no sistema vascular relacionadas à redução na produção de NO (Kumagai & Pi, 2004). Pi et al. (2000) demonstraram que este tipo de exposição resultou na diminuição da concentração de NO plasmático devido, em partes, a inibição de NOS nas células endoteliais. Por outro lado, também é descrito que o arsênio pode afetar de modo diferenciado a produção de NO, devido à diferenças estruturais das espécies de arsênio, a via e duração da exposição e até mesmo o tipo de célula utilizada em estudos *in vitro* (Kumagai & Pi, 2004).

A Figura 2 descreve alguns dos mecanismos de toxicidade das espécies químicas de arsênio.

Figura 2 - Alguns mecanismos de toxicidade do arsênio. (Adaptado de Shi et al. (2004)).

1.5 Arsênio e estudos de especiação química

A análise de especiação química é definida, de acordo com a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), como o processo de identificação e/ou quantificação de uma ou mais espécies químicas em uma mesma amostra. Já especiação química de um elemento é definida como a distribuição de um elemento entre espécies químicas definidas em um sistema (Templeton & Ariese, 2000).

A necessidade da realização de estudos de especiação química de arsênio é enfatizada principalmente pelas diferenças nas estruturas das espécies químicas, nos mecanismos de toxicidade e nas propriedades bioquímicas. Para isto torna-se necessária a utilização de técnicas hifenadas envolvendo separação das espécies com alta eficiência e detectores de elevada sensibilidade. Técnicas de separação, baseadas em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia gasosa, cromatografia por fluido supercrítico e eletroforese capilar, acopladas a detectores como espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), espectrômetros de absorção atômica com geração de hidretos (espectrometria de absorção atômica com forno de grafite ou com chama) ou espectrômetro de massas com ionização por *eletrospray* (ESI-MS), têm sido aplicados para a especiação de arsênio em matrizes biológicas e ambientais (Gong, Lu, Ma, Watt, & Le, 2002).

Além da escolha da técnica analítica mais adequada, a manutenção da estabilidade das espécies químicas é imprescindível em razão da possível ocorrência de conversão, como a oxidação de As^{3+} a As^{5+} , durante procedimentos utilizados para a conservação, tratamento e análises das amostras (J.-H. Huang, Ilgen, & Fecher, 2010). Quando procedimentos de extração das espécies são realizados, é importante garantir também que os solventes não interfiram na análise e que haja eficiência de extração. Esta eficiência pode ser avaliada pela comparação entre a concentração de arsênio total e a soma da concentração de cada espécie química identificada e quantificada na amostra (A. Meharg & Zhao, 2012).

A utilização do acoplamento entre HPLC e ICP-MS garante extrema sensibilidade, capacidade multielementar, amplo intervalo de linearidade e capacidade de determinação da razão isotópica (Parsons & Barbosa, 2007). Considerando tais vantagens, esta técnica tem sido aplicada eficientemente em vários estudos envolvendo especiação química de arsênio em arroz (Bruno L Batista et al., 2011; A. Meharg et al., 2009; Rintala, Ekholm, Koivisto, Peltonen, &

Venäläinen, 2014; Sofuoglu et al., 2014; Sommella et al., 2013; Williams et al., 2005).

Conforme exemplificado acima, a maioria dos estudos reporta a especiação química de compostos de arsênio solúveis em água, embora o elemento também seja encontrado como compostos solúveis em lipídeos. Entretanto, as matrizes em que estes compostos estão presentes são bastante complexas, exigindo técnicas analíticas adequadas (Amayo et al., 2013). Algumas delas apresentam limitações como a hidrólise química de AsLip previamente a análise de especiação (Ebisuda et al., 2003; Edmonds, Shibata, Francesconi, Yoshinaga, & Morita, 1992; Hanaoka et al., 1999) o que justifica a necessidade crescente da utilização de métodos para identificação de AsLip intactos (Amayo et al., 2013).

Outro fator que pode ser destacado é que o uso de ICP-MS como detector ocasiona perda de informação molecular, pois os compostos de arsênio são completamente atomizados no plasma. A utilização de ESI-MS permite a obtenção deste tipo de informação por ser considerada uma fonte com energia de ionização branda, mantendo íons moleculares de macromoléculas como proteínas e peptídeos (Jörg Feldmann, Salaün, & Lombi, 2009). Assim, ESI-MS combinado como um método complementar com HPLC e ICP-MS garante o melhor uso de ESI-MS para análise de especiação de arsênio. Enquanto HPLC-ICP-MS baseia-se na comparação das espécies encontradas na amostra com padrões de arsênio, ESI-MS pode ser utilizada para identificação de compostos sem a necessidade de padrões (Bruno Lemos Batista et al., 2014; Nearing, Koch, & Reimer, 2014).

Neste sentido, alguns trabalhos utilizaram a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada simultaneamente à espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado e à espectrometria de massas de alta resolução com ionização por *eletrospray* (HPLC-ICP-MS/ESI-MS) para a identificação de AsLip em diversas amostras: óleo de fígado de bacalhau (Rumpler & Edmonds, 2008), conservas de fígado de bacalhau (*Gadus morhua*) (Arroyo-Abad et al., 2010), tecido muscular de atum (Taleshi et al., 2010), peixe capelin (*Mallotus villosus*) (Amayo et al., 2011), algas marrons (*Undaria pinnatifida* e *Hizikia fusiformis*) (García-Salgado et al., 2012), fígado de bacalhau fresco (Arroyo-Abad, Lischka, Piechotta, Mattusch, & Reemtsma, 2013), tecidos musculares de peixes (*Sardina pilchardus*, *Scombers*

combrus, *Mullussur muletus* e *Scophthalmus rhombus*) (Amayo, Raab, Krupp, Marschall, et al., 2014), óleo de fígado de bacalhau (Amayo, Raab, Krupp, & Feldmann, 2014), óleo de peixe capelin (Amayo et al., 2013), alga marrom (*Saccharina latissima*) (Raab et al., 2013).

Diante do exposto acima, a presente tese será apresentada em dois capítulos. O capítulo I é referente ao estudo de exposição crônica de camundongos machos Swiss ao arsênio presente na dieta, destacando-se o arroz como componente de algumas rações. Este estudo permitiu a determinação da distribuição de arsênio em tecidos dos camundongos e a avaliação da possível ocorrência de alterações nas concentrações de glicose, hemoglobina, óxido nítrico, bem como alterações em parâmetros bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo. O capítulo II refere-se ao estudo desenvolvido na *School of Natural and Computing Sciences (Department of Chemistry)* da *University of Aberdeen* na Escócia (Reino Unido/RU) em um período de estágio sanduíche do doutoramento, no qual foi realizada a identificação de AsLip em amostras de tecidos de baleia-piloto-de-aleta-longa (*Globicephala melas*) por HPLC-ICP-MS/ESI-MS. O estudo também permitiu a avaliação do perfil de distribuição destes compostos entre diferentes tecidos de um mesmo animal e entre organismos diferentes.

Capítulo I

Distribuição de arsênio e avaliação de efeitos nas concentrações de hemoglobina, glicose, óxido nítrico e em parâmetros relacionados ao estresse oxidativo em camundongos expostos ao arsênio pela dieta contendo arroz

1. Introdução

1.1 Arsênio e arroz

O arroz é uma planta, pertencente à espécie *Oryza sativa* L., que possui a capacidade de acumular significativas quantidades de elementos químicos essenciais e tóxicos, destacando o arsênio. Este fato pode ser devido às características de cultivo que, geralmente, é realizado em solos inundados (cultivo tipo irrigado), onde condições anaeróbicas somadas ao excesso de água levam a maior solubilidade e mobilização do arsênio (A. Meharg et al., 2009; Paul N Williams et al., 2007; Xu, McGrath, Meharg, & Zhao, 2008). Muitos estudos mostram diferenças nas concentrações das espécies de arsênio na planta, influenciadas pela forma química do elemento (orgânica e inorgânica) presente no solo de plantio ou na água de irrigação, a região (por exemplo, proximidade a indústrias de mineração), o tipo e condição de cultivo, tipo de solo, aplicação de praguicidas, contaminação da água de irrigação e também de acordo com as características do cultivar (A. Meharg et al., 2009; P N Williams et al., 2005; Paul N Williams et al., 2007; Zhu et al., 2008).

Esta planta é considerada uma monocotiledônea da família *Poaceae* (gramíneas). Os grãos são constituídos por casca, pericarpo, tegumento, nucelo, aleurona, endosperma e embrião e, após colheita, podem sofrer diferentes tipos de beneficiamento. O arroz polido é caracterizado pela retirada da parte que recobre o grão, que vai do pericarpo até a aleurona (também chamado farelo). O arroz integral não é submetido a este procedimento. Já o arroz parboilizado é parcialmente cozido com a casca, permitindo a absorção de nutrientes como elementos químicos e vitaminas. Desta forma, outros tipos de arroz também podem ser encontrados como o arroz integral parboilizado e parboilizado polido (Embrapa, 2013).

Após o milho e o trigo, o arroz é o alimento mais consumido no mundo, atingindo praticamente metade da população (Embrapa, 2013). Segundo dados fornecidos pela Pesquisa de Orçamentos Familiares do IBGE (Instituto Brasileiro de

Geografia e Estatística), o arroz é um componente fundamental da dieta do brasileiro. A média diária de consumo de arroz é de cerca de 160,3 g por pessoa, dos quais 77,7 % são de arroz do tipo branco ou também conhecido como polido e 22,3 % de outros tipos de arroz de acordo com o tipo de beneficiamento (IBGE, 2010; POF 2008/2009).

Em um estudo desenvolvido por Bruno L Batista et al. (2011) determinou-se a concentração de arsênio total e das espécies químicas deste elemento presentes em 44 amostras de arroz com diferente processamento (branco, branco parboilizado, integral, integral parboilizado, parboilizado orgânico e branco orgânico) e comercializados em diferentes regiões brasileiras. Assim, as espécies de arsênio mais encontradas na maioria das amostras foram, em ordem decrescente, DMA, As^{3+} , MMA e As^{5+} . Este estudo permitiu concluir que o arroz brasileiro representa uma fonte de exposição ao arsênio significativa, com relevância às formas mais tóxicas (As^{3+} e As^{5+}), correspondendo a cerca de 50 % do total deste elemento presente no arroz.

A toxicidade do arsênio expressa pelo Comitê de Especialistas da FAO/WHO (do inglês, *Food and Agriculture Organization/World Health Organization*) em aditivos alimentares e contaminantes (JECFA) é estabelecida por um limite de confiança de 0,5 %, denominado de $\text{BMDL}_{0,5}$ (do inglês, *Benchmark dose lower confidence limit*), para o aumento de incidência de câncer de pulmão em humanos. O $\text{BMDL}_{0,5}$ foi determinado por meio de estudos epidemiológicos, considerando exposição ao arsênio inorgânico pela água e por alimentos e foi calculado como sendo 3,0 µg por kg de peso corpóreo por dia (faixa de 2,0 a 7,0 µg por kg de peso corpóreo por dia). Desta forma, o valor aceitável estabelecido anteriormente para Ingestão Semanal Tolerável Provisória (PTWI, do inglês *Provisional tolerable weekly intake*) de 15 µg de arsênio inorgânico por peso corpóreo (Kg) (2,1 µg por kg de peso corpóreo por dia) não é adequado por estar na faixa do $\text{BMDL}_{0,5}$, e não se encontra mais em uso (WHO/FAO, 2011).

Diversos órgãos como a *United States Food and Drug Administration* (FDA), a *Food Standards Agency* (FSA) e a *European Food Safety Authority* (EFSA) também estão desenvolvendo estudos relacionados à concentração de arsênio segura à saúde humana de acordo com a exposição. Dentro desta perspectiva, o FDA, em

2012, publicou um método analítico validado para análise de especiação química de arsênio em amostras de arroz e produtos derivados de arroz (FDA, 2012).

Em 17 de julho de 2014, em Geneva, o comitê *Codex Alimentarius* juntamente com a FAO/WHO adotaram novas normas para proteger a saúde do consumidor em todo o mundo, incluindo o estabelecimento de concentração máxima aceitável de arsênio em arroz como sendo de $0,2 \text{ mg Kg}^{-1}$. Esta comissão tem a função de estabelecer padrões internacionais de segurança e qualidade dos alimentos para os consumidores em âmbito mundial, sendo bastante utilizados como base para a legislação nacional (FAO, 2014).

Considerando o valor máximo aceitável de concentração de arsênio ($0,2 \text{ mg kg}^{-1}$) em arroz (FAO, 2014) e a média de consumo diário de $160,3 \text{ g}$ de arroz pelo brasileiro (IBGE, 2010; POF 2008/2009), pode-se prever um consumo diário de cerca de $0,46 \text{ }\mu\text{g}$ de arsênio por kg de peso corpóreo. Adicionalmente, o conhecimento de que um indivíduo consome cerca de 2 L de água por dia, supõe-se uma ingestão máxima diária de $0,29 \text{ }\mu\text{g}$ de arsênio por kg de peso corpóreo através da água contaminada com arsênio na maior concentração permitida pela OMS ($10 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$). Com isto, tanto a ingestão de água quanto o consumo de alimentos contaminados com diferentes formas químicas de arsênio podem contribuir para a aproximação do $\text{BMDL}_{0,5}$, refletindo ainda mais a importância de estudos de especiação química para complementar dados seguros relacionados ao consumo alimentar.

Além da importância da avaliação da segurança alimentar, estudos que avaliam a exposição pela alimentação, absorção, distribuição e possíveis efeitos tóxicos em organismos vivos ocasionados pelas espécies de arsênio em alimentos são escassos e extremamente relevantes.

2. Objetivos

Avaliar a distribuição tecidual de arsênio e a ocorrência de possíveis alterações nas concentrações de hemoglobina, glicose, óxido nítrico e alguns efeitos relacionados ao estresse oxidativo em camundongos machos *Swiss* após exposição crônica a este elemento por via oral (dietas contendo arroz polido naturalmente contaminado com arsênio e dietas preparadas com adição de sais das espécies de arsênio).

3. Material e Métodos

3.1 Equipamentos e acessórios

As análises para quantificação de arsênio total foram realizadas utilizando um espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) com cela de reação dinâmica (DRC-ICP-MS ELAN DRCII, PerkinElmer, SCIEX, Norwalk, CT, EUA) operando com argônio de alta pureza (99,999%, Praxair - White Martins, Brasil) e equipado com cone de amostragem e *skimmer* de platina (PerkinElmer, Norwalk, EUA). O sistema de introdução de amostra foi composto por uma câmara de nebulização de quartzo tipo ciclônica e um nebulizador de Meinhard® conectados por tubos Tygon® a bomba peristáltica do ICP-MS.

As análises de especiação química foram realizadas utilizando o acoplamento entre cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (PerkinElmer, modelo L-200, SCIEX, EUA) e ICP-MS, hifenados por um injetor de seis saídas (Rheodyne 9725). A coluna de troca aniônica Hamilton PRP-X100 (Hamilton, Reno, NV, EUA), nas dimensões 5 µm, 150 mm x 4,6 mm, foi utilizada para as separações cromatográficas em temperatura de 25°C, sob condições isocráticas. As amostras foram injetadas com seringa em um *loop* de 100 µL. O eluente proveniente do HPLC foi introduzido diretamente no nebulizador do ICP-MS através de tubos *peek* (1,59 mm o.d.) e de conectores *peek* de baixo volume morto.

Ambos os equipamentos foram conectados em um computador Dell Pentium 4 com os *softwares* Elan® (versão 3.4) e Chromera® (versão 2.1.0.1631), e impressora Hewlett-Packard Laserjet 4250. O *software* Elan® foi utilizado para análise dos resultados de determinação da concentração de arsênio total enquanto que o Chromera®, para resultados das análises de especiação química.

Estes equipamentos encontram-se instalados no Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, em uma sala limpa classe “1000”.

Para a determinação de glicose, hemoglobina, GSH, atividade da CAT, GPx e SOD, foi utilizado um espectrofotômetro da marca Perkin Elmer (EUA), modelo Lambda 25 Ultravioleta/Visível (UV/Vis).

Para a determinação da concentração de NO utilizou-se o equipamento Sievers® Nitric Oxide Analyzer 280 (GE Analytical Instruments, Boulder, CO. EUA). Estas análises foram realizadas pelo grupo de pesquisa de Fisiologia aplicada à Enfermagem, liderado pela professora Doutora Evelin Capellari Cárnio da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto (EERP-USP).

Também foram utilizados destilador de quartzo para ácidos (Marconi, Brasil), moinho elétrico ultra centrífugo com auto-amostrador DR100 (Retsch ZM200, Alemanha), banho Maria (Solab, Brasil), microondas (Milestone Ethos D, Itália), liofilizador (Liobrás, Brasil), banho ultrassônico (Equipalabor, Brasil) e centrífuga (Bioanalítica, Brasil). Estes equipamentos também estão instalados no Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

3.2 Reagentes e soluções

Água deionizada de alta pureza (resistividade 18,2 MΩ.cm) obtida pelo sistema Milli-Q (Millipore®) foi utilizada em todo o trabalho. Ácidos nítrico (HNO₃) e clorídrico (HCl) foram destilados em temperatura inferior à de ebulição, empregando-se destilador de quartzo para eliminação de impurezas. Todos os reagentes utilizados foram de grau de pureza analítica. As soluções e amostras foram armazenadas em frascos de polietileno após prévio tratamento para eliminação de contaminantes, com água de torneira e água Mili-Q, imersão em solução 20% v/v HNO₃ por 24h, lavados 5 vezes com água Milli-Q e secos em capela de fluxo laminar classe 100. Todas as operações para preparo das soluções foram realizadas em sala limpa classe 1000.

Mono-hidrogenofosfato de amônio ((NH₄)₂HPO₄) foi adquirido da Sigma (Steinheim, Alemanha), di-hidrogenofosfato de amônio (NH₄H₂PO₄), hidróxido de

amônio (NH_4OH), hidróxido de sódio (NaOH) foram adquiridos da Fluka (St. Louis, EUA) e metanol (MeOH), da J.T. Baker (EUA). Estes reagentes foram utilizados para o preparo da fase móvel a qual correspondeu à mistura de $10 \text{ mmol L}^{-1} \text{ HPO}_4^{2-} / \text{H}_2\text{PO}_4^-$ (pH 8,5) (98% v/v) e MeOH (2% v/v) (Sanz, Muñoz-Olivas, & Cámara, 2005). Ródio (Rh) (10 mg L^{-1}) e Gálio (Ga) (1000 mg L^{-1}), utilizados como padrão interno, e solução padrão multi-elementar (10 mg L^{-1}) contendo As foram obtidos da PerkinElmer (Shelton, CT, EUA). Peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hidróxido de tetrametil amônio (TMAH) 25% (m/v), triton X-100, ácido tricloroacético (TCA), 5-5-ditio-bis-2-ácido nitrobenzóico, (DTNB), glutatona reduzida (GSH), glutatona redutase (GSHR), fosfato de potássio dibásico, fosfato de potássio monobásico, azida sódica, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), glicina e (-) L-epinefrina foram comprados da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

O *kit* para análise de quantificação de Hemoglobina, contendo padrão hemoglobina e reagente de cor estoque (tampão fosfato 200 mmol L^{-1} , ferricianeto de potássio 120 mmol L^{-1} , cianeto de potássio 150 mmol L^{-1} e surfactante), foi obtido da Bioclin (Belo Horizonte, MG, Brasil). Já o *kit* glicose PAP Liquiform para análise de quantificação de glicose foi adquirido da Labtest Diagnóstica (Lagoa Santa, MG, Brasil). Este *kit* contém Reagente 1 (tampão 50 mmol L^{-1} ; pH 7,5; glicose oxidase $\geq 11.000 \text{ U L}^{-1}$; peroxidase $\geq 700 \text{ U L}^{-1}$; 4-aminoantipirina $\geq 290 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$; fenol $\geq 1 \text{ mmol L}^{-1}$ e azida sódica $7,5 \text{ mmol L}^{-1}$) e Padrão de glicose a 100 mg dL^{-1} .

Soluções estoque na concentração de 1000 mg L^{-1} de cada espécie de arsênio (Sigma Aldrich, EUA) foram preparadas e estocadas em refrigerador a -20°C em frascos âmbar descontaminados. As^{3+} (As_2O_3 , Aldrich, St. Louis, EUA) foi preparado dissolvendo-se a respectiva massa em relação a As em 25 mL de NaOH $0,18 \text{ mol L}^{-1}$ e acidificado com 25 mL de HCl $0,3 \text{ mol L}^{-1}$, o que torna o meio não-oxidante e evita a conversão de As^{3+} a As^{5+} . As^{5+} ($\text{As}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Aldrich, St. Louis, EUA) foi preparado dissolvendo-se a massa relativa a As em 25 mL de NaOH $0,18 \text{ mol L}^{-1}$ e acidificado com 25 mL de HNO_3 $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ (meio oxidante para manter a espécie dissolvida e no estado de oxidação desejado). DMA ($\text{C}_2\text{H}_7\text{AsO}_2$, Fluka, St. Louis, EUA), MMA ($\text{Na}_2\text{CH}_3\text{O}_3 \cdot \text{As} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Chem Service, West Chester, EUA) e AsB ($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{AsO}_2$, Fluka, St. Louis, EUA) foram preparados dissolvendo-se a massa correspondente a As em HNO_3 $0,15 \text{ mol L}^{-1}$. Soluções intermediárias de 10 mg de

As L^{-1} foram preparadas solubilizando As^{3+} em HCl $0,024 \text{ mol } L^{-1}$ e AsB, DMA, MMA e As^{5+} em HNO_3 $0,0014 \text{ mol } L^{-1}$.

A partir destas soluções padrão, as soluções contendo as espécies de arsênio adicionadas a algumas rações foram preparadas em água deionizada de alta pureza. A real concentração de arsênio em todas estas soluções e nas rações foi determinada por ICP-MS.

Também foram utilizados materiais de referência certificada para garantir exatidão das análises, como 1568a, *Rice Flour* e 1577c, *Bovine Liver* produzidos pela NIST (*National Institute of Standards and Technology*), e material de referência BE07-06 *Whole Blood* produzido pelo *New York State Department of Health*, em Albany, EUA.

3.3 Arroz utilizado no estudo

Grãos de arroz (*Oriza sativa* L.) polido foram utilizados neste estudo pelo fato de ser o tipo de arroz mais consumido no Brasil (POF 2008/2009). Estes grãos foram obtidos no mercado brasileiro, submetidos à moagem em um moinho elétrico ultra centrífugo (Retsch ZM200 com auto-amostrador DR100) a 6000 rotações por minuto (rpm), homogeneização e tamização ($<250 \mu m$) para uniformidade do tamanho das partículas. Tais amostras foram cuidadosamente armazenadas em local seco até a análise para determinação da concentração de arsênio total, para a especiação química e para a utilização na preparação das rações utilizadas nos tratamentos dos camundongos.

3.4 Metodologias

3.4.1 Determinação da concentração de arsênio total por ICP-MS

A determinação da concentração de arsênio total nas amostras de arroz, nas rações, em sangue total e nos tecidos coletados dos camundongos foi realizada por ICP-MS cujas condições operacionais estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Condições operacionais do ICP-MS para determinação da concentração de arsênio total.

Potência de rádio frequência	1200 W
Modo de varredura	<i>Peak hopping</i>
Vazão do gás (Ar)	Plasma 15 L min ⁻¹ ; Auxiliar 1,2 L min ⁻¹
Vazão do gás de nebulização (Ar)	0,56-0,98 L min ⁻¹
Rotação bomba peristáltica	20 rpm
Padrão interno	¹⁰³ Rh (10 µg L ⁻¹)
Isótopo	⁷⁵ As
Interface	Cones de Platina
Cone de Amostragem	1,1 mm
<i>Skimmer</i>	0,9 mm
Resolução	0,7u
Replicatas, <i>Sweeps</i> e Leituras	3, 40, 1, respectivamente

Para as análises das amostras de ração e arroz, seguiu-se a metodologia proposta por (Nardi et al., 2009). Para isto, 5 mL de HNO₃ 20% (v/v) e 2 mL de H₂O₂ 30% (v/v) foram adicionados à aproximadamente 250 mg da amostra, preparadas em triplicata, e esta mistura foi submetida à extração assistida por microondas (programa de aquecimento descrito na Tabela 3). Após a digestão, as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente, transferidas para tubos Falcon® e o volume completado para 50 mL com água Mili-Q. A curva de calibração foi preparada por meio do padrão multielementar contendo arsênio no intervalo de concentração de 1 a 20 µg L⁻¹. Rh, na concentração de 10 µg L⁻¹, foi utilizado como padrão interno com a finalidade de minimizar possíveis erros analíticos. O valor encontrado para concentração de arsênio total no arroz foi comparado com a soma das concentrações das espécies químicas de arsênio obtidas por análise de especiação química (HPLC-ICP-MS). Paralelamente e com a utilização da mesma

metodologia descrita acima, analisou-se, em triplicata, o material de referência certificada 1568a, *Rice Flour*, NIST para garantia da exatidão do método.

Tabela 3 - Programa de aquecimento do forno de microondas utilizado para digestão das amostras de arroz.

Etapa	Temperatura (°C)	Potência (W)	Tempo (min)
1	160	1000	4,5
2	160	0	0,5
3	230	1000	5,0
4	230	1000	15,0
5	0	0	20,0

A determinação da concentração de arsênio total em sangue total foi realizada de acordo com metodologia proposta por Bruno Lemos Batista, Rodrigues, Nunes, Souza, & Barbosa (2009). Amostras do material de referência BE07-06 *Whole Blood* também foram preparadas e analisadas. Para isto, todas as amostras foram diluídas 1:50 em solução contendo 0,01% (v/v) Triton[®] X-100, 0,5% (v/v) HNO₃ e 10 µg L⁻¹ de Rh (padrão interno). Os padrões de arsênio para calibração analítica foram preparados no dia da análise, na faixa de concentração de 1,0–20,0 µg L⁻¹, utilizando-se, também, sangue base de carneiro para ajuste de matriz.

As amostras de tecidos coletados dos camundongos foram previamente liofilizadas e, em seguida, preparadas para análise segundo metodologia proposta por Bruno Lemos Batista, Grotto, Rodrigues, Souza, & Barbosa (2009). Assim, 1 mL de TMAH 50% v/v foi adicionado à aproximadamente 75 mg de cada tecido liofilizado. Esta mistura foi mantida em rotação *overnight* a temperatura ambiente. Após esta etapa de solubilização, completou-se o volume para 10 mL com solução contendo 0,01% v/v de Triton[®] X-100 e 0,5% v/v de HNO₃. Rh, na concentração de 10 µg L⁻¹, foi utilizado como padrão interno para minimização de possíveis variações durante as análises. A curva de calibração foi preparada utilizando padrão multielementar contendo arsênio no intervalo de concentração de 1 a 20 µg L⁻¹. O material de referência certificada 1577c, *Bovine Liver*, NIST também foi analisado para garantia da exatidão do método.

3.4.2 Análise de especiação química de arsênio por HPLC-ICP-MS

Análises de especiação química foram realizadas na amostra de arroz e em amostras de fígado e rins coletados dos camundongos.

As amostras de arroz e material de referência certificada 1568a, *Rice Flour*, NIST foram preparadas e analisadas de acordo com metodologia proposta por Bruno L Batista et al. (2011), utilizando HPLC-ICP-MS. Para isto, 10 mL de HNO₃ 2% (v/v) foi adicionado à aproximadamente 200 mg do arroz (procedimento realizado em triplicata). Esta mistura foi aquecida em banho de água a 95°C por 2,5 horas. Após esta etapa, as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente, filtradas em filtros de acetato celulose de 0,20 µm e diretamente injetadas em HPLC-ICP-MS. As condições cromatográficas e operacionais para a realização desta análise estão descritas na Tabela 4. As condições estabelecidas para o detector ICP-MS estão descritas na Tabela 2.

As análises de especiação química das amostras liofilizadas de fígado e rins foram realizadas de acordo com metodologia proposta por B. Batista, Nacano, Souza, e Jr (2012). Para o preparo da amostra, cerca de 50 mg de cada tecido liofilizado foram exatamente pesados (em duplicata) em tubos cônicos de 15 mL. Posteriormente, foram adicionados 1,25 mL de solução contendo 2% (v/v) HNO₃ + 4% (v/v) de MeOH, os tubos foram fechados, a mistura foi agitada em *vortex*, mantidas em banho ultrassônico por 2 minutos e aquecidas em banho de água por 2,5 horas a 90 °C. Finalmente após resfriamento das amostras a temperatura ambiente, a mistura foi filtrada com a utilização de filtros de acetato de celulose 0,2 µm e transferida para *vials* para a injeção no HPLC-ICP-MS seguindo as mesmas condições descritas na Tabela 4.

Tabela 4 - Condições operacionais do HPLC para as análises de especiação química de arsênio.

Coluna (troca aniônica)	Hamilton PRP-X100 (5 µm, 150 mm x 4,6 mm)
Fase móvel	10mmol L ⁻¹ HPO ₄ ²⁻ /H ₂ PO ₄ ⁻ pH 8,5 + 2%(v/v) MeOH
Vazão da fase móvel	1 mL min ⁻¹
Temperatura da coluna	25 °C
Equilíbrio	1 min
Tempo de corrida	8,5 min
Lavagem	1 min
Modo	Isocrático
Volume de injeção	100 µL
Quantificação	Altura de pico

3.4.3 Quantificação de hemoglobina e glicose

A determinação espectrofotométrica a 540 nm de hemoglobina em sangue total foi realizada no mesmo dia da eutanásia devido a curta estabilidade da amostra. O método baseou-se na oxidação do átomo de ferro (Fe²⁺) da molécula de hemoglobina pelo ferricianeto de potássio em pH fracamente alcalino, formando a meta-hemoglobina que foi convertida em ciano-meta-hemoglobina após a reação com o cianeto de potássio. O composto formado apresentou coloração avermelhada, estável por 60 minutos, sendo sua concentração proporcional à concentração de hemoglobina na amostra. Esta, então, foi determinada com a utilização de um fator de calibração calculado a partir da análise do padrão de hemoglobina, também constituinte do *Kit*.

A determinação de glicose foi realizada em plasma por método enzimático espectrofotométrico a 505 nm, com a utilização do *Kit* glicose PAP Liquiform. O método baseou-se na oxidação da glicose, pela enzima glicose oxidase, com formação de H₂O₂. Este composto reagiu com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase e em temperatura de 37 °C, formando um composto de coloração vermelha cuja concentração é proporcional à concentração de glicose na

amostra. Neste método, a concentração de glicose na amostra também foi determinada pela utilização de um fator de calibração obtido a partir da análise do padrão de glicose, nas mesmas condições.

3.4.4 Quantificação de tióis totais

A determinação de tióis totais reduzidos pode ser representada pela quantificação de GSH em sangue total, sendo um parâmetro importante para a avaliação de efeitos relacionados ao estresse oxidativo.

Para a determinação de GSH foi utilizado sangue total e um método espectrofotométrico com leituras a 412 nm, segundo metodologia descrita por Ellman (1959). Este método consistiu na adição de Triton[®] X-100 a 10% v/v e ácido tricloroacético (TCA) a 30 % v/v ao sangue, mantido em banho de gelo, e esta mistura foi então centrifugada e os sobrenadantes foram separados. Após esta etapa, o sobrenadante límpido foi acrescido de tampão fosfato 1 mol L⁻¹ (pH 7,4) e do reativo DTNB (5-5-ditio-bis-2-ácido nitrobenzóico) para a ocorrência de uma reação colorimétrica. O resultado é expresso com relação à concentração de grupamentos tióis presentes na amostra em mmol L⁻¹ de sangue total.

3.4.5 Determinação da atividade da enzima antioxidante catalase (CAT)

A avaliação da atividade de enzimas antioxidantes também é fundamental em estudos relacionados com a ação de ROS e RNS. Sendo assim, a atividade da enzima CAT foi determinada em amostras de sangue total por decaimento de absorbância, monitoradas por leitura em espectrofotômetro UV/Vis.

O ensaio enzimático para avaliação da atividade, descrito por Aebi (1984), utiliza H₂O₂ em concentração elevada como substrato e meio tamponado com tampão fosfato de potássio (pH 7,0; 50 mmol L⁻¹), EDTA e Triton[®] X-100. Com o decorrer da reação, ocorre decomposição de H₂O₂ por ação da enzima e este

processo pode ser detectado pelo decaimento da absorbância monitorada, durante 5 minutos, por espectrofotometria em comprimento de onda de 240nm.

3.4.6 Determinação da atividade da enzima antioxidante glutathione peroxidase (GPx)

A atividade enzimática foi determinada em sangue total de acordo com metodologia proposta por Paglia e Valentine (1967). O método foi baseado na oxidação de NADPH a 25 °C na presença de sangue diluído, GSH, GSH redutase, NADPH, azida sódica e H₂O₂. Assim, a atividade da enzima foi monitorada durante 2 minutos por espectrofotometria em comprimento de onda de 340 nm. Os resultados foram expressos em µmol NADPH/min/g hemoglobina.

3.4.7 Determinação da atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada em sangue total baseada na quantificação da inibição de 50% da oxidação da epinefrina dependente de superóxido de acordo com McCord & Fridovich (1969). A atividade foi monitorada por espectrofotometria em comprimento de onda de 480 nm e os resultados foram expressos em USOD/mg hemoglobina.

3.4.8 Determinação da concentração de óxido nítrico (NO)

Quantificações de espécies relacionadas ao NO, como nitritos e nitratos, têm sido utilizadas para avaliar sua produção. Sendo assim, amostras de plasma foram analisadas para a determinação da concentração de nitrato utilizando a técnica de quimioluminescência NO/ozone e Sievers® Nitric Oxide Analyzer 280 (GE Analytical

Instruments, Boulder, CO. USA). O método foi baseado na redução de nitrato a NO pelo cloreto de vanádio em meio ácido. Após esta etapa, o NO formado reagiu com ozônio resultando em dióxido de nitrogênio que emite fótons a serem detectados. Assim, a concentração de nitrato foi expressa em $\mu\text{mol L}^{-1}$.

3.5 Delineamento Experimental

3.5.1 Padronização das rações dos camundongos

De modo geral, estudos envolvendo exposição de animais ao arsênio e/ou suas espécies químicas utilizam concentrações elevadas que podem não estar relacionadas a real concentração a que a maioria da população está exposta.

Contrariamente ao exposto acima, os grãos de arroz moídos, tamizados e armazenados, como descrito no Item 3.3, foram utilizados para o preparo de algumas rações utilizadas no tratamento dos camundongos. Após as análises para quantificação de arsênio total e quantificação das suas espécies no arroz, três tipos de ração, como descrito abaixo, foram padronizados e diferenciados pela quantidade de arroz adicionada. Esta razão reflete três diferentes porcentagens de consumo humano deste alimento que foram definidas de acordo com dados fornecidos pela Pesquisa de Orçamentos Familiares – 2008, 2009 – Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil (POF 2008/2009).

Assim, a média de consumo de arroz pelo brasileiro foi estabelecida como 20% da dieta total diária de alimentos sólidos e, a partir deste valor, uma quantidade menor e uma maior de arroz foram determinadas. A maior quantidade pode refletir alguma população que represente uma produção e consumo de arroz superior a 90%, como os países asiáticos. Com isto, as porcentagens de arroz adicionado às rações neste estudo foram 10%, 20% e 40%.

Três outros tipos de rações foram produzidos com diferentes espécies químicas de arsênio na forma de sal. As concentrações foram adicionadas em

equivalência as concentrações das espécies encontradas na amostra de arroz. Assim, o arroz polido selecionado e as soluções contendo as espécies de arsênio na forma de sal foram utilizados para a produção dos *peletes* de ração pela empresa Rhoster Indústria e Comércio Ltda. A Tabela 5 fornece uma composição total e detalhada da dieta habitual para camundongos. Estes dados indicam a presença de farelo de arroz como um componente que pode contribuir para uma porcentagem extra de arroz aos animais. De modo a evitar este padrão de confusão, o farelo de arroz foi substituído no preparo das rações pelo farelo de milho sem ocorrência de alteração no balanço nutricional de cada animal.

Tabela 5 - Composição nutricional da dieta habitual para camundongos.

Composição nutricional	Porcentagem (%)
Farelo de milho	38,40
Farelo de soja	24,60
Farelo de trigo	10,00
Farelo de carne	9,00
Caulim (Calcáreo)	1,95
Melaço em pó	2,00
Sacarose (P.A.)	1,00
Óleo de soja	1,00
Sal comum	0,50
Foscálcio	0,40
Farelo de arroz ^a	11,00
Minerais e vitaminas	0,15
Total	100,00

^asubstituído pelo farelo de milho nas dietas preparadas aos animais

3.5.2 Animais e descrição do tratamento

Foram utilizados 42 camundongos machos *Swiss* (*Mus musculus*) (30 dias/15 a 20 gramas) provenientes do Biotério Central da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. O protocolo de pesquisa foi enviado à comissão de ética no uso de animais (CEUA-USP) para apreciação e, após aprovação com o número 12.1.1384.53.1, os experimentos foram seguidos. Os animais foram alojados em seis por gaiola de acordo com o tipo de grupo de tratamento e mantidos em salas com ciclo claro/escuro de 12 horas, com umidade e temperatura controladas (22-25 °C), alimentados com ração (abaixo especificada) e água. Os animais foram divididos em 7 grupos, com 6 animais em cada (n=42):

- Grupo I (n=6): Controle, tratados com água e ração habitual (farelo de arroz substituído por farelo de milho).
- Grupo II (n=6): tratados com água e ração contendo baixa quantidade de arroz naturalmente contaminado com arsênio (correspondendo a 10% da dieta diária do animal).
- Grupo III (n=6): tratados com água e ração contendo média quantidade de arroz naturalmente contaminado com arsênio (correspondendo a 20% da dieta diária do animal).
- Grupo IV (n=6): tratados com água e ração contendo alta quantidade de arroz naturalmente contaminado com arsênio (correspondendo a 40% da dieta diária do animal).
- Grupo V (n=6): tratados com água e ração contendo as espécies de arsênio (na concentração correspondente a exposição do grupo II).
- Grupo VI (n=6): tratados com água e ração contendo as espécies de arsênio (na concentração correspondente a exposição do grupo III).

- Grupo VII (n=6): tratados com água e ração contendo as espécies de arsênio (na concentração correspondente a exposição do grupo IV).

O tratamento teve duração de 100 dias para mimetizar uma exposição crônica e foi realizada pesagem semanal dos camundongos. Ao final deste período, os animais foram pesados e anestesiados pela via peritoneal com cloridrato de xilazina (30 mg kg^{-1}) e cloridrato de quetamina (300 mg kg^{-1}), utilizando uma seringa de insulina com agulha 13 mm x 4,5 mm. Posteriormente, as cavidades peritoneal e torácica foram expostas para rompimento do diafragma. O coração foi puncionado com agulha heparinizada para coleta de sangue e aliquoteados para tubos de coleta livre de metais contendo anticoagulante heparina para a determinação de hemoglobina, arsênio e marcadores de estresse oxidativo em sangue total.

Alíquotas de sangue total foram rapidamente centrifugadas em centrífuga refrigerada para obtenção do plasma. Após a coleta de sangue, os animais foram decapitados, com a utilização de tesoura, para coleta do cérebro. Em seguida, foram coletadas outras amostras (pêlos, bexiga, cérebro, coração, fígado, pulmões e rins) para avaliação da biodistribuição de arsênio. As amostras de tecidos e as alíquotas de sangue e plasma foram primeiramente armazenadas sob nitrogênio líquido e, em seguida, transportadas e adequadamente armazenadas a -80°C até o momento das análises. As amostras de tecidos foram submetidas ao processo de liofilização como uma etapa prévia às análises para determinação da concentração de arsênio total.

3.6 Análises estatísticas

Todos os resultados foram reportados como média $\pm$ desvio padrão. As diferenças entre os tratamentos foram avaliadas utilizando ANOVA-uma via, seguida por teste *pos hoc* de Duncan. Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente diferentes. Os dados foram analisados no programa Statistica 8.0 (Statsoft software-USA) e os gráficos foram obtidos pelo programa Origin[®] 6.1 (Data Analysis and Technical Graphics) e GraphPad Prism 5.0 Software.

4. Resultados e Discussão

4.1 Concentrações de arsênio total e de suas espécies químicas presentes na amostra de arroz selecionada

Após a coleta dos grãos de arroz polido e tratamento para homogeneização do tamanho de partícula, os mesmos foram submetidos à análise para quantificação de arsênio total por ICP-MS. Assim, a amostra selecionada para o preparo dos tipos específicos de ração para o tratamento dos animais apresentou uma concentração de $169 \pm 6 \text{ ng g}^{-1}$ de arsênio. Este valor de concentração total aproxima-se do valor médio encontrado de arsênio correspondente a $222,8 \text{ ng g}^{-1}$ (variando de $107,9$ a $427,7 \text{ ng g}^{-1}$) em amostras de arroz brasileiro analisadas por Bruno L Batista et al. (2011). O estudo de Bruno L Batista et al. (2011) apresentou resultados de concentração de arsênio total para diferentes tipos de arroz de acordo com o processamento, como arroz branco ou polido, parboilizado branco, integral, parboilizado integral, parboilizado orgânico e branco orgânico. Destaca-se também que a maior concentração de arsênio total foi encontrada no arroz integral e que no arroz tipo branco, a concentração foi próxima ao valor médio citado anteriormente (Bruno L Batista et al., 2011).

Com o propósito de definir quais espécies químicas de arsênio seriam adicionadas às rações dos grupos de tratamento V, VI e VII, realizou-se análise de especiação química da amostra de arroz por HPLC-ICP-MS.

Assim, as espécies encontradas e suas respectivas concentrações foram As^{3+} ($40,8 \text{ ng g}^{-1}$), DMA ($65,7 \text{ ng g}^{-1}$), MMA ($11,9 \text{ ng g}^{-1}$) e As^{5+} ($26,0 \text{ ng g}^{-1}$) o que pode ser confirmado pelo terceiro cromatograma representado na Figura 3. Pode-se observar também que a soma das concentrações das espécies arsenicais ($144,34 \text{ ng g}^{-1}$) encontradas no arroz se aproxima ao valor total de arsênio obtido por análise direta com ICP-MS, citado anteriormente.

Figura 3 - Cromatogramas típicos obtidos da análise de especiação química de arsênio (expresso como arsênio, $m/z=75$). Em A) padrões analíticos das espécies de arsênio: AsB, As³⁺, DMA, MMA e As⁵⁺. Em B) Material de referência certificada (1568a, *Rice Flour*, NIST). Em C) Arroz polido utilizado no preparo de algumas rações específicas, destacando 4 espécies quantificadas (As³⁺, DMA, MMA e As⁵⁺).

A presença de espécies inorgânicas e orgânicas, destacando a forma dimetilada (DMA), na amostra de arroz do tipo polido corrobora com dados encontrados na literatura. Alguns pesquisadores consideram um tipo de classificação para o arroz de acordo com a forma química de arsênio presente no grão, como sendo tipo-arsênio inorgânico e tipo-DMA (Zavala, Gerads, Gürleyük, & Duxbury, 2008). Xu et al. (2008) mostraram que DMA e arsênio inorgânico foram as espécies predominantes, respectivamente, em grãos de arroz cultivados em condições anaeróbicas (sistema irrigado) e em grãos sob condições aeróbicas. Trabalho descrito por Bruno L Batista et al. (2011) mostrou a presença de 4 espécies arsenicais (As³⁺, DMA, MMA e As⁵⁺, correspondendo a 39,7; 38,7; 3,7 e 17,8 %, respectivamente) na maioria das amostras de arroz cultivadas em diferentes regiões do Brasil.

Retomando a Figura 3, o primeiro cromatograma representa a separação cromatográfica de 5 padrões analíticos de arsênio na concentração de 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$,

sendo, respectivamente, AsB, As³⁺, DMA, MMA e As⁵⁺. Já o segundo, corresponde ao material de referência certificada 1568a, *Rice Flour*, NIST, cuja soma da concentração das espécies de arsênio se aproxima a concentração de arsênio total descrita na Tabela 6. Esta Tabela também demonstra as concentrações de As determinadas em outro material de referência certificada (1577c, *Bovine Liver*, NIST), e no material de referência BE07-06 *Whole Blood* analisados para garantir exatidão das metodologias analíticas utilizadas neste projeto. Os valores encontrados apresentaram concordância com os valores certificados.

Tabela 6 - Resultados da análise de materiais de referência certificada (1568a, *Rice Flour* e 1577c, *Bovine Liver*) e material de referência (BE07-06 *Whole Blood*) para garantir exatidão das metodologias analíticas utilizadas no presente estudo. Os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Material certificado	As total estabelecido	As total quantificado
<i>Rice Flour</i>	290,0 $\pm$ 30,0 ($\eta\text{g g}^{-1}$) ^a	247,0 $\pm$ 20,0 ($\eta\text{g g}^{-1}$)
<i>Bovine Liver</i>	19,6 $\pm$ 1,4 ($\eta\text{g g}^{-1}$) ^a	19,0 $\pm$ 1,7 ($\eta\text{g g}^{-1}$)
<i>Whole Blood</i>	10,9 $\pm$ 1,6 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	12,7 $\pm$ 0,3 ($\mu\text{g L}^{-1}$)

^aConcentração certificada

4.2 Variação da massa corporal dos camundongos

A Figura 4 apresenta a variação da massa corporal dos camundongos durante as 15 semanas de tratamento. De acordo com a figura, observa-se um leve aumento na massa corporal de todos os animais e um mesmo perfil de variação durante o tratamento crônico, sendo um fator importante para avaliar a aceitação de uma dieta, diferente da habitual (grupo controle), preparada para os grupos II ao VII.

Figura 4 - Variação da massa corporal dos camundongos (grupos I ao VII) durante o período de 15 semanas de tratamento. Valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão. Nenhuma diferença estatística foi encontrada ($p > 0,05$).

4.3 Concentrações de hemoglobina em sangue total e glicose em plasma

A Figura 5 descreve as concentrações de hemoglobina encontradas na análise de sangue total do grupo controle e dos grupos tratados, representando um perfil equivalente entre os grupos II, III e IV (tratados com ração contendo arroz naturalmente contaminado com espécies de arsênio) e os grupos V, VI e VII (tratados com ração contendo 4 espécies de arsênio na forma de sal). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados e o grupo controle, exceto o grupo VII, que mostrou significativa redução na concentração de hemoglobina em relação ao grupo controle o que pode ser comparado com alguns dados da literatura (Antonio Garcia, Herrera Dueñas, & Pineda Pampliega, 2013; Lu et al., 2004; Mondal, Chatterjee, & Bhattacharyya, 2012).

Figura 5 - Concentração de hemoglobina (g dL^{-1}) em amostras de sangue total coletado dos camundongos após 15 semanas de tratamento. Valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão. *Diferença estatística observada comparada ao grupo controle ($p < 0,05$).

Os resultados do estudo de Antonio Garcia et al. (2013) mostraram redução no número de células vermelhas, no valor de hematócrito e na concentração de hemoglobina, bem como desenvolvimento de anemia normocítica e normocrômica associados a exposição de ratas, em período de gestação e lactação, ao arsênio (As^{3+} a 50 mg L^{-1}) pela água de beber. No caso da anemia, o arsênio possivelmente provoca aumento da razão colesterol/fosfolípido culminando com alterações na membrana dos eritrócitos e, conseqüentemente, eritrofagocitose e hemólise (Biswas et al., 2008).

Mondal et al. (2012) demonstraram que a exposição crônica (durante 10 anos) pela água de beber ao arsênio na concentração de $293 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ altera a conformação da hemoglobina, culminando com fraca ligação da molécula de oxigênio e forte ligação do As^{3+} . Este tipo de afinidade pode ser considerado importante quando se pretende estudar a toxicidade decorrente de uma exposição crônica ao elemento.

Lu et al. (2004) também estudaram e compararam a afinidade de ligação de algumas espécies químicas de arsênio (As^{3+} , MMA^{3+} e DMA^{3+}) pela molécula de hemoglobina de ratos e humanos. O estudo mostrou que o tempo de retenção do arsênio no sangue de ratos foi bem maior que no sangue humano, devido à maior afinidade de ligação por parte da hemoglobina de ratos. Este fato pode ser devido a um maior número de resíduos de cisteína na molécula que contribuem com a presença de grupos sulfidril para ligação ao arsênio. Ambas as moléculas são

tetrâmeros com duas cadeias α e duas cadeias β . Porém, a hemoglobina de ratos contém 3 cisteínas em cada cadeia α e 2 em cada cadeia β ao passo que a hemoglobina humana contém apenas 1 cisteína em cada cadeia α e 2 em cada cadeia β . Lu et al. (2007) realizaram outro estudo para avaliar a retenção de arsenicais em sangue de ratos, porém a exposição foi realizada com espécies pentavalentes (As^{5+} , MMA^{5+} e DMA^{5+}). Foi observado um rápido processo metabólico com formação de espécies de arsênio trivalentes e forte ligação, principalmente de DMA^{3+} , à molécula de hemoglobina, contribuindo para aproximadamente 99% da presença de arsênio total nos eritrócitos. O sítio da ligação foi identificado como sendo o resíduo 13 de cisteína da cadeia α numa estequiometria 1:1. Vale destacar que este resíduo de aminoácido não é encontrado em hemoglobinas humanas o que contribui para uma menor retenção de arsênio no sangue e possíveis diferenças na toxicidade.

Já os estudos de Flora, Chouhan, Kannan, Mittal, & Swarnkar (2008) mostraram que a enzima ácido δ aminolevulínico desidratase sanguínea (ALAD) é sensível aos efeitos do arsênio. Esta é uma enzima que contém -SH e está envolvida na síntese do grupamento heme, presente na hemoglobina, por exemplo. Assim, o arsênio possui afinidade por ligação ao grupo -SH da enzima, resultando em sua inibição a qual gera diminuição na produção do heme e, consequente ocorrência de anemia. A inativação da enzima ALAD sanguínea promove acúmulo de ácido δ aminolevulínico culminando com superprodução de ROS, fato este que poderia explicar um dos mecanismos associados ao estresse oxidativo induzido pelo arsênio.

Ainda torna-se importante destacar que possíveis causas de anemia devem ser avaliadas minuciosamente em vista de fatores contribuintes como a deficiência de ferro e vitamina B12 pela alimentação. No presente estudo, as rações utilizadas durante os experimentos foram previamente estudadas com relação à sua composição total de modo a garantir um balanço nutricional adequado aos animais.

Com relação às concentrações de glicose determinadas nas amostras de plasma não foi observada diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle. Alguns trabalhos sugerem que camundongos são menos suscetíveis a efeitos diabetogênicos que humanos devido a um maior clearance de arsênio e seus

metabólitos dos tecidos (C. Huang et al., 2011; Paul, Walton, Saunders, & Stýblo, 2011). Entretanto, a maioria dos trabalhos mostra uma relação positiva entre a exposição ao arsênio e o desenvolvimento de diabetes *mellitus* em humanos (C. Huang et al., 2011), apresentando características similares ao diabetes *mellitus* tipo 2 (Tseng, 2004).

Destaca-se que somente a exposição ao arsênio não implica presumivelmente com o desenvolvimento de diabetes *mellitus*. É importante também considerar a susceptibilidade individual, como as características genéticas, metabolismo, estado nutricional, estado de saúde, entre outros fatores (Tseng, 2004). O estado nutricional pode influenciar a concentração de antioxidantes e, conseqüentemente, o estresse oxidativo induzido por arsênio, favorecendo ou impedindo o início de doenças, como o diabetes *mellitus* (Ford, Mokdad, Giles, & Brown, 2003; Tseng, 2004). Tanto a elevada ingestão de calorias, caracterizando a obesidade, quanto à desnutrição com ingestão insuficiente de antioxidantes constituem fatores de risco à ocorrência da doença em casos associados com exposição crônica ao arsênio (Tseng, 2004).

Resultados encontrados por James et al. (2013) mostraram uma significativa associação entre a exposição crônica a baixas concentrações de arsênio inorgânico pela água de beber e o risco de ocorrência do diabetes, considerando ajuste de variáveis como etnia, idade, índice de massa corporal e prática de atividade física. Jovanovic et al. (2013) também mostraram que uma população consumindo água com baixas concentrações de arsênio ($56 \mu\text{g L}^{-1}$), comparada a uma população não exposta, apresentou maiores riscos para o desenvolvimento de diabetes tipo 2. O estudo considerou os fatores idade, história familiar de prevalência da doença e casos de indivíduos com sobrepeso.

Outra relação positiva foi apresentada por Del Razo et al. (2011) em que a exposição ao arsênio (3 a $215 \mu\text{g L}^{-1}$) pela água de beber esteve associada à incidência de diabetes *mellitus*. Esta relação foi avaliada por meio da determinação da concentração de arsênio urinária e de indicadores relacionados à doença em estudo para a obtenção de respostas mais conclusivas e significativas.

Uma revisão bibliográfica realizada por C. Huang et al. (2011) mostrou a existência de sugestões tanto positivas quanto negativas para o fato da exposição

crônica ao arsênio implicar em um fator de risco para incidência de diabetes *mellitus*. Eles destacaram que muitos estudos *in vitro* indicam que o arsênio inorgânico e seus metabólitos prejudicam a absorção de glicose dependente de insulina ou até mesmo a secreção de insulina estimulada pela molécula de glicose, prejudicando, desta forma, a função das células pancreáticas e, conseqüentemente contribuindo para o desenvolvimento da doença. Já os estudos *in vivo* demonstram uma alteração nas concentrações de glicose sanguínea e insulina.

4.4 Concentrações de arsênio total e de espécies arsenicais determinadas nos tecidos dos animais em estudo

As concentrações de arsênio total em pêlos, bexiga, cérebro, coração, fígado, pulmões, rins e sangue total dos animais em estudo são mostradas na Figura 6. De um modo geral, os resultados indicam um aumento na concentração de arsênio total em todos os tecidos avaliados comparativamente ao grupo controle. Estes achados podem estar relacionados ao aumento na concentração de arsênio em cada dieta específica utilizada durante o estudo, semelhante a um padrão dose-resposta. Por outro lado, após análise das rações por ICP-MS, foi observado que os animais do grupo controle também apresentaram certa exposição ao arsênio, mesmo preparando as rações com a substituição do farelo de arroz por farelo de milho.

Os valores mais significativos foram encontrados em amostras de tecidos dos animais expostos a dieta preparada com a maior concentração das espécies adicionadas na forma de sal. Esta observação pode estar relacionada ao fato destas espécies de arsênio não estarem ligadas a moléculas constituintes do alimento, como GSH, sendo mais biodisponíveis. Entretanto, informações a respeito de quais espécies químicas podem ser encontradas nos tecidos e a possível ocorrência de efeitos toxicológicos relacionados, por exemplo, ao estresse oxidativo são importantes para complementar os resultados.

Figura 6 - Concentração de arsênio total em pêlos, bexiga, cérebro, coração, fígado, pulmões, rins (ng g⁻¹) e sangue (μg L⁻¹) coletados dos camundongos após tratamento crônico. ANOVA uma-va, seguida por teste post-hoc de Duncan com $p < 0,05$. As colunas marcadas com asterisco indicam resultados estatisticamente diferentes do grupo controle.

As concentrações de arsênio determinadas nas amostras de pêlo foram superiores a 60 ng g⁻¹. Espécies de arsênio absorvidas podem se acumular em

unhas e cabelos devido à ligação do As^{3+} aos grupamentos sulfidrilas da molécula de queratina, podendo este processo ser caracterizado como uma possível forma de eliminação do organismo (M. F. Hughes, 2006). Assim, a determinação de arsênio em cabelo também pode ser considerada um biomarcador para avaliação da exposição (Hindmarsh, 2002). Vale ainda destacar que muitos trabalhos mostram uma correlação significativa e positiva entre a exposição ao arsênio inorgânico e a determinação deste elemento em matrizes biológicas, como urina, cabelos e sangue (M. F. Hughes et al., 2003). Samanta, Sharma, Roychowdhury, & Chakraborti (2004) encontraram arsênio ($3,43 \mu\text{g g}^{-1}$) e outros elementos tóxicos em amostras de cabelo de indivíduos expostos a água de beber ($\text{As} > 50 \mu\text{g L}^{-1}$) e alimentos provenientes de uma área contaminada em West Bengal (WB), India. Concentrações similares de arsênio ($5,52 \mu\text{g g}^{-1}$) foram também encontradas em amostras de cabelo de moradores expostos ao arsênio ambiental por meio da água de beber ($43,8 \mu\text{g L}^{-1}$), como descrito por Hinwood et al. (2002).

Na bexiga foram observadas as concentrações mais elevadas deste elemento, pelo fato provavelmente da urina ser considerada a principal via de eliminação das espécies de arsênio. Destaca-se um aumento gradativo na concentração à medida que as mesmas aumentam nas rações. Entretanto, apenas as concentrações de arsênio total determinadas nos tecidos dos animais dos grupos VI e VII foram estatisticamente diferentes do grupo controle. É importante considerar que o principal biomarcador de exposição ao arsênio é a quantificação deste elemento na urina (M. F. Hughes, 2006) e que a utilização da bexiga pode apenas sugerir informações com relação à eliminação destes compostos.

Y. He e Zheng (2010) avaliaram a biodisponibilidade *in vivo* de arsênio em arroz por meio de um balanço de massa durante um curto período de exposição humana a uma dieta controlada baseada em arroz contendo arsênio. O estudo mostrou que o arsênio proveniente do arroz é rapidamente eliminado na urina após 24 h da ingestão, correspondendo a mais de 60 % da dose. Assim, a real biodisponibilidade do arsênio no arroz foi considerada mais alta que o indicado pela eliminação urinária devido aos processos de acumulação e excreção por outras vias, como cabelo, unhas e pele.

As concentrações de arsênio determinadas no sangue dos animais expostos (grupo II ao VII) variaram de 2,1 a 3,3 $\mu\text{g L}^{-1}$. Estes valores de concentração estão próximos aos valores encontrados para população brasileira (0,1 – 3,2 $\mu\text{g L}^{-1}$) no estudo de Nunes et al. (2010). Este estudo utilizou amostras de sangue de indivíduos de várias regiões do país (estados de Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Rio Grande do Sul e Pará) e também considerou fatores como idade, gênero, hábito de fumar e consumo de bebidas alcoólicas (Nunes et al., 2010). Assim, a proximidade entre os valores de concentração de ambos os estudos pode ser sugerida pelo fato do consumo de arroz contribuir significativamente com a exposição ao arsênio pela população brasileira.

No presente estudo, as maiores concentrações de arsênio total foram observadas na bexiga > pêlos > pulmões > rins > fígado > coração > cérebro > sangue. Complementando estas informações, DMA e As^{5+} foram as principais espécies químicas identificadas e quantificadas nas amostras de fígado e rins. Para as amostras de fígado, a proporção de cada espécie foi aproximadamente 40% de DMA e 60% de As^{5+} . As^{5+} também apresentou a maior proporção nos rins, correspondendo a 80%. A Figura 7 mostra estas espécies determinadas nas amostras de rins dos animais pertencentes ao grupo VI.

Figura 7 - Cromatograma obtido da análise de especiação química de arsênio (expresso como arsênio, $m/z=75$) em amostras de rins dos animais pertencentes ao grupo VI (destacando DMA e As^{5+}).

Os dados de concentração de arsênio em alguns tecidos avaliados, como bexiga, pulmões e rins, podem ser comparados aos resultados apresentados no estudo de Kenyon et al. (2008). Os autores avaliaram a exposição de camundongos fêmea à forma química As^{5+} por meio da água de beber durante 12 semanas. Não foi observado efeito adverso e nem alteração na massa corpórea dos animais. As maiores concentrações de arsênio foram encontradas nos rins > pulmões > bexiga >>> pele > sangue > fígado. MMA foi o metabólito predominante nos rins e DMA, nos pulmões. A bexiga e a pele apresentaram concentrações equivalentes de espécies inorgânicas e dimetiladas, indicando assim que o perfil de eliminação urinária não necessariamente reflete a concentração em outros tecidos.

M. F. Hughes et al. (2003) avaliaram o acúmulo tecidual de arsênio em camundongos expostos a repetidas doses orais de As^{5+} por meio de gavagem. As maiores concentrações de arsênio foram encontradas na bexiga, rins e pele. Wu, Krishnamohan, Lam, e Ng (2011) também avaliaram resultados de uma exposição via oral de camundongos a As^{5+} . A mesma foi caracterizada como sendo subcrônica, por meio da água de beber e em uma concentração próxima àquela encontrada em áreas endêmicas. Os resultados mostraram uma concentração significativa de arsênio na urina e com forte correlação com a dose administrada.

Jin et al. (2010) avaliaram as concentrações de espécies de arsênio em camundongos durante o primeiro estágio de desenvolvimento após exposição de camundongos fêmea em gestação. A exposição foi realizada por meio de água de beber contendo As^{3+} (0, 10 ou 30 mg L^{-1}) durante todo o período de gestação até o final da lactação. Os resultados mostraram a ocorrência de transferência placentária, caracterizada pela presença de arsênio inorgânico e formas metiladas, MMA e DMA, no fígado e cérebro dos fetos. Já a transferência de espécies de arsênio pela lactação foi ineficiente.

Considerando os dados apresentados e a distribuição do arsênio por todo o organismo dos camundongos, a presença das espécies deste elemento nos órgãos pode ocasionar o aparecimento de efeitos tóxicos. Como exemplo tem-se a indução de tumores renais, adrenais, hepáticos e pulmonares em camundongos machos por ação de arsênio inorgânico e DMA durante uma exposição crônica pela água de beber (Tokar, Diwan, & Waalkes, 2012). Porém, a maioria destes estudos avalia

exposição via oral pela água, devendo-se, portanto, considerar também a alimentação como fonte de espécies arsenicais potencialmente tóxicas.

4.5 Parâmetros relacionados ao estresse oxidativo

Os biomarcadores, determinados em sangue total dos camundongos, para avaliação de efeitos relacionados ao estresse oxidativo estão descritos na Figura 8.

Figura 8 - Biomarcadores de estresse oxidativo: concentração de glutathiona (GSH) (mmol L⁻¹), atividades de catalase (CAT) (κ/g Hemoglobina), glutathiona peroxidase (GPx) (μmol NADPH/min/g Hemoglobina) e superóxido dismutase (SOD) (USOD/mg Hemoglobina) em amostras de sangue total dos camundongos. ANOVA uma-via, seguida por teste post-hoc de Duncan com $p < 0,05$. As colunas marcadas com asterisco indicam resultados estatisticamente diferentes do grupo controle.

Conforme citado previamente, o estresse oxidativo ocorre como resultado de um desequilíbrio entre a geração de radicais livres e o sistema de defesa antioxidante do organismo. Muitos estudos mostraram que ROS e/ou RNS podem ser gerados durante os processos metabólicos das espécies de arsênio ou até

mesmo pela própria ação do semimetal nas vias de sinalização. A mitocôndria é caracterizada como o principal sítio fonte de ROS induzidas pela exposição ao arsênio (De Vizcaya-Ruiz et al., 2009; Shi et al., 2004). Os principais mecanismos de defesa do organismo contra estas espécies envolvem mecanismos preventivos, de reparo, defesas físicas e antioxidantes (Valko et al., 2007). Estes últimos são considerados compostos que possuem a capacidade para inibir a geração de radicais livres, sequestrá-los e/ou reduzir a oxidação e danos causados por esses radicais (Shi et al., 2004).

A GSH (γ -glutamil-L-cisteinil-glicina) é considerada o principal composto celular livre não protéico com grupamento tiólico, e também o principal antioxidante endógeno do organismo (Cecconi et al., 1988), atuando, desta forma, como a primeira linha de defesa celular contra efeitos de compostos potencialmente tóxicos. Este mecanismo de ação protetor faz com que as reservas de GSH diminuam, e que o organismo fique susceptível ao dano oxidativo pela acumulação de ROS e RNS, normalmente neutralizadas pela GSH (Sarafian, 1999). Tal redução pode ser considerada um marcador de estresse oxidativo (Spear & Aust, 1995).

Os possíveis mecanismos que a exposição ao arsênio gera uma redução nas concentrações de GSH são: a molécula atua como doadora de elétrons no processo de redução do As^{5+} a As^{3+} , o As^{3+} possui elevada afinidade pela ligação ao -SH presente na molécula e as ROS e RNS podem promover oxidação da GSH. Portanto, a exposição ao arsênio, principalmente à espécie trivalente inorgânica, pode ocasionar depleção nas concentrações de GSH do organismo (Shi et al., 2004).

Depleção nas reservas de GSH foi observada no sangue dos camundongos neste presente estudo. A redução foi estatisticamente diferente do grupo controle para os animais tratados com dieta contendo a maior porcentagem de arroz na sua composição (grupo IV) e, conseqüentemente, a maior concentração de arsênio total. Este comportamento também foi observado em todos os grupos tratados com dieta contendo as espécies na forma de sal. Tal fato pode sugerir que as espécies de arsênio exerceram um maior efeito no organismo sobre a molécula de GSH, estando provavelmente mais disponíveis para se ligarem ao grupamento sulfidrílico da mesma e reduzirem, desta forma, sua concentração. Neste sentido, estes animais podem apresentar um risco aumentado para ocorrência de danos relacionados ao estresse oxidativo.

Estes dados apresentados corroboram com alguns estudos já realizados. Entretanto, os estudos prévios mostram relação entre os efeitos observados em tecidos, como fígado e cérebro de animais, e a uma exposição crônica ao arsênio pela água de beber. Maiti & Chatterjee (2001) reportaram uma reduzida concentração de GSH no fígado de ratos após uma hora de exposição à As^{3+} (15,8 mg por kg de peso corpóreo via intraperitoneal). Estes animais expostos foram ainda divididos em grupos de acordo com uma diferença na dieta proteica (6% ou 18% de proteína). Assim, os animais pertencentes ao grupo de baixa ingestão proteica foram menos afetados com relação à concentração de arsênio e de GSH. Este fato pode ser devido à deficiência no tecido avaliado de possíveis proteínas alvo para ligação com o arsênio ou até mesmo menor concentração de aminoácidos para a síntese de proteínas relacionadas ao estresse oxidativo. Para este mesmo tecido, Santra et al. (2000) também observaram redução na concentração de GSH em camundongos expostos cronicamente a arsênio pela água de beber.

Considerando outro tipo de tecido estudado, C. C. Yen et al. (2011) encontraram reduzidas concentrações de GSH no córtex cerebral de camundongos expostos pela água de beber, por 6 semanas, ao As^{3+} ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$ e 5 mg L^{-1}). Reduzidas concentrações de GSH e outros efeitos relacionados ao estresse oxidativo também foram observados em amostras de cérebro de ratos expostos cronicamente ao arsênio ($300 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) pela água de beber em estudo realizado por Chattopadhyay et al. (2002).

Como já citado, os antioxidantes são compostos que atuam no sistema de defesa do organismo frente aos radicais livres. Eles são geralmente representados por enzimas, como CAT, SOD e GPx as quais são amplamente utilizadas em culturas celulares expostas ao arsênio para avaliação do efeito protetor. Como exemplo tem-se a redução da formação de micronúcleos após adição de CAT em células expostas ao arsênio (Wang, Shu, Liu, Jan, & Huang, 1997) e a redução de danos ao DNA após adição de CAT e SOD (Nordenson & Beckman, 1991). Alguns estudos também mostram um aumento celular nas concentrações de GSH e antioxidantes, como vitamina E, CAT e SOD como mecanismo protetor à genotoxicidade ocasionada pelo arsênio (Nordenson & Beckman, 1991; Rossman, 2003; Sun et al., 2006).

A determinação da atividade de tais enzimas no compartimento orgânico pode também ser utilizada como marcador de estresse oxidativo e muitos trabalhos

mostram um aumento desta atividade relacionada à exposição ao arsênio (Shi et al., 2004).

A enzima CAT é uma hemoproteína tetramérica cuja principal função é converter o H_2O_2 , gerado pela SOD nas células em decorrência de estresse oxidativo, em água e oxigênio. Desta forma, células com diferentes concentrações desta enzima possuirão diferenças de sensibilidade frente a uma exposição a este elemento potencialmente tóxico (Sun et al., 2006). A GPx é uma selenoproteína com estrutura tetramérica. Esta enzima reduz lipídeos ou hidroperóxidos não lipídicos bem como H_2O_2 enquanto oxida duas moléculas de GSH (Michiels, Raes, Toussaint, & Remacle, 1994). A SOD é uma metaloproteína e possui a capacidade de converter o radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) em H_2O_2 e oxigênio molecular (Mruk, Silvestrini, Mo, & Cheng, 2002).

Os camundongos tratados com dieta contendo a maior concentração de arsênio total em meio de sal misturado à dieta (grupo VII) apresentaram significativo aumento na atividade destas 3 enzimas avaliadas (CAT, GPx e SOD). Este perfil também pode ser explicado pela maior biodisponibilidade e concentração das espécies de arsênio durante o período de exposição, bem como pelo aumento na concentração de H_2O_2 ou ativação de genes de expressão proteica.

Estudos avaliando atividade de enzimas antioxidantes também são realizados em humanos. Banerjee, Banerjee, e Ghosh (2010) mostraram que indivíduos expostos cronicamente ao arsênio pela água de beber apresentaram significativo aumento na atividade da CAT, o qual apresentou uma correlação positiva tanto com a concentração de arsênio total em urina quanto na água utilizada para a exposição.

Nandi, Patra, e Swarup (2006) conduziram um experimento onde ratos foram expostos a 10 mg L^{-1} de arsênio (As^{3+}) pela água de beber num período máximo de 12 semanas. Eles realizaram eutanásia dos animais após os períodos de exposição de 4, 8 e 12 semanas. Ao final de todo o tratamento, observaram um aumento na concentração de arsênio total em sangue, fígado e rins. Também foi observado um aumento significativo inicial na atividade enzimática da SOD e da CAT a qual teve redução ao final das 12 semanas, atingindo uma atividade que não foi mais diferente daquela observada nos animais controle. Estes dados mostraram que a exposição a baixas concentrações de arsênio por um curto tempo ativou o sistema de defesa antioxidante intrínseco o qual foi suprimido com o decorrer do período de tratamento. Santra et al. (2000) também estudaram os efeitos sobre as enzimas

antioxidantes em camundongos expostos cronicamente (3, 6, 9, 12 e 15 meses) ao arsênio ($3,2 \text{ mg L}^{-1}$) pela água de beber. As enzimas tiveram um aumento de atividade nos primeiros meses de tratamento, seguida por uma redução. Um comportamento um pouco semelhante também foi observado por Das e Santra (2005). Neste estudo, camundongos foram expostos a As_2O_3 (50, 100 e $150 \mu\text{g}$ de As) pela água de beber por períodos de 3, 6, 9 e 12 meses. Após este período, amostras de fígado foram coletadas dos animais e utilizadas para determinação de vários parâmetros. Ao final de 3 meses de tratamento, eles observaram um aumento significativo de atividade enzimática da GPx e da CAT, entretanto, ao final de 9 e 12 meses houve uma redução considerável de tais atividades. O aumento inicial observado pode ser ocasionado como forma de adaptação do sistema antioxidante frente aos danos relacionados ao estresse oxidativo e a posterior depleção foi avaliada como sendo dose-dependente.

Portanto, de acordo com estes resultados obtidos e com as informações da literatura, pode-se prever que a atividade enzimática que foi observada aumentada no sangue dos animais do grupo VII poderia sofrer redução ao longo do tempo se a exposição prosseguisse.

4.6 Concentração de NO

De acordo com dados observados na literatura, a exposição ao arsênio pode ocasionar tanto o aumento quanto a redução na produção de NO, dependendo do tipo de célula, das espécies químicas e da dose de exposição (Gurr, Yih, Samikkannu, & Bau, 2003). Entretanto, no presente estudo, as espécies de arsênio não foram capazes de modificar significativamente as concentrações de NO comparando com os valores do grupo controle (Figura 9).

Figura 9 - Concentração de NO total ($\mu\text{mol L}^{-1}$) em amostras de plasma dos camundongos. ANOVA uma-*via*, seguida por teste *pos hoc* de Duncan com $p < 0,05$.

5. Conclusões

Existem inúmeros trabalhos na literatura relacionados a aspectos toxicológicos e de distribuição do arsênio e suas espécies químicas em diferentes organismos. Entretanto, grande parte destes descrevem resultados após exposição via oral, principalmente, pela água de beber e raros são os estudos que avaliam estes parâmetros após uma exposição crônica pela alimentação. Desta forma, este estudo foi desenvolvido objetivando ampliar o campo de informações com relação à exposição às diversas formas químicas de arsênio por meio da alimentação, destacando o arroz, componente base da dieta do brasileiro e mundial.

Os dados apresentados mostram um aumento gradativo e o mesmo perfil de variação da massa corpórea dos camundongos ao longo do experimento, indicando a aceitabilidade da dieta modificada, bem como a não ocorrência de algum tipo de transtorno alimentar que talvez pudesse ser causado pelo arroz e pelas espécies de arsênio presentes nas rações. Não foi observada alteração na concentração de glicose no plasma dos camundongos. Apenas para os animais pertencentes ao grupo exposto à ração contendo a maior concentração de arsênio total na forma do sal adicionado à dieta (grupo VII) foi observada redução significativa na concentração de hemoglobina, o que pode ser avaliado pela melhor biodisponibilidade das espécies e elevada afinidade pela ligação ao grupamento sulfidríla do resíduo de cisteína da molécula.

As maiores concentrações de arsênio total foram observadas na bexiga > pêlos > pulmões > rins > fígado > coração > cérebro > sangue. Embora a exposição tenha sido a quatro diferentes espécies de arsênio pela alimentação (As^{3+} , DMA, MMA e As^{5+}), somente DMA e As^{5+} foram identificados e quantificados em amostras de fígado e rins dos camundongos.

Alterações em alguns parâmetros relacionados ao estresse oxidativo foram observados no sangue total dos animais expostos tanto à dieta preparada com a maior concentração de arsênio total adicionada na forma de sal (grupo VII) quanto à dieta contendo a maior proporção de arroz polido naturalmente contaminado (grupo

IV). Com relação à concentração plasmática de NO, as espécies de arsênio contidas no arroz ou adicionados como sal à dieta não foram capazes de promover significativas alterações.

Em se tratando de todos os resultados, os mais significativos foram relacionados às exposições às maiores concentrações de arsênio total pela dieta. Considerando, por exemplo, que as concentrações de exposição dos grupos IV e VII foram semelhantes, esta relação não pode ser afirmada para todos os efeitos avaliados. Isto pode ser explicado pela diferença de disponibilidade do arsênio nas diferentes matrizes, pois nas dietas para os grupos II, III e IV, o elemento era constituinte do arroz, podendo estar ligado a outras moléculas e, então, apresentar disponibilidade química diferente.

A presença de arsênio na dieta destinada ao grupo controle torna-se um fator limitante para este estudo. Além disto, a disponibilidade de empresas brasileiras para produção de rações para estudos laboratoriais com qualidade é pequena e o controle de contaminação das matérias-primas e de todas as etapas de produção é inviável. Este fato é importantíssimo para o delineamento de estudos futuros envolvendo exposição pela alimentação, não somente a elementos químicos.

Todos os resultados obtidos são relevantes e pioneiros no tocante à biodisponibilidade das espécies de arsênio encontradas no arroz, a distribuição do elemento no organismo exposto via oral pela alimentação e a possível ocorrência de alguns efeitos tóxicos decorrentes desta exposição. Entretanto, estudos adicionais para complementar a avaliação de mais efeitos relacionados ao estresse oxidativo, a ocorrência de diabetes *mellitus* e anemia são necessários.

Diante do exposto e mesmo considerando alguns fatores limitantes, o caráter inédito deste estudo contribui para questionamentos diversos e incentiva a continuidade de pesquisas futuras relacionadas à avaliação da segurança do consumo de arroz naturalmente contaminado com arsênio.

Capítulo II

Distribuição e identificação de biomoléculas contendo arsênio em baleias-piloto-de-aleta-longa (*Globicephala melas*)

1. Introdução

1.1 Arsênio e o ecossistema marinho

A ocorrência, distribuição e especiação de arsênio no ambiente aquático são importantes para avaliação da bioacumulação e transferência através da cadeia alimentar. Como citado previamente, as espécies de arsênio metiladas e as espécies orgânicas mais complexas, solúveis em água e solúveis em lipídeos (AsLip), são encontradas em abundância em água natural e organismos pertencentes à cadeia alimentar marinha (Rahman, Hasegawa, & Lim, 2012).

“Bioacumulação” em um organismo marinho refere-se ao acúmulo de um composto absorvido a partir de fontes ambientais como água e alimentação. A magnitude da bioacumulação depende do composto químico e de suas propriedades. A biomagnificação resulta do processo de acumulação de um composto químico e aumento da sua concentração nos tecidos dos organismos vivos em cada nível trófico da cadeia alimentar (Henry, 2003).

O arsênio é o 22º mais abundante elemento químico em águas marinhas (Neff, 1997; Smedley & Kinniburgh, 2002). Peixes marinhos contêm de 85 a 90 % de arsênio na forma de AsB, AsC e DMA e, aproximadamente 10 % de arsênio inorgânico (Rahman et al., 2012). Compostos de arsênio solúveis em lipídeos, como AsLip, são as principais espécies presentes em macroalgas (Morita & Shibata, 1988).

De modo geral, As^{5+} é absorvido da água pelo fitoplâncton, importante produtor primário da cadeia alimentar marinha, ocorrendo, em seguida, reações de redução, oxidação, metilação e reações com outros compostos químicos com a formação de diferentes espécies de arsênio (Rahman et al., 2012). A Figura 10 mostra uma possível rota de formação de alguns AsLip, como ácidos graxos e hidrocarbonetos contendo arsênio em algas e organismos marinhos.

Figura 10 - Rota proposta para biossíntese de alguns AsLip, como ácidos graxos e hidrocarbonetos contendo arsênio em organismos marinhos (Adaptação de Sele et al. (2012)).

Este processo mostra que o arsênio é principalmente acumulado em organismos marinhos a partir da água e dos organismos pertencentes aos menores níveis tróficos (Rahman et al., 2012). Assim, plantas e animais de regiões naturalmente contaminadas com arsênio ou regiões próximas a fontes antropogênicas devem conter elevadas concentrações deste elemento em seus tecidos, as quais estão associadas ao aumento sucessivo no nível trófico.

No hemisfério norte, os mamíferos marinhos são explorados pela caça ou indiretamente por encalhamentos com a finalidade de alimentação, obtenção de combustível e fabricação de roupas. Muitas vezes o encalhamento ocorre com os animais mortos que são lançados em terra. As causas de morte frequentemente são desconhecidas, entretanto há grande influência de fatores ambientais como a poluição (Cawthorn & Consultants, 1997).

Mamíferos marinhos, como as baleias, estão presentes no topo da cadeia trófica e podem ser bastante vulneráveis a efeitos tóxicos de elevadas concentrações de elementos químicos como o arsênio. Como exposto, estes

organismos acumulam principalmente compostos de arsênio solúveis em lipídeos, o que é demonstrado em vários estudos pela presença de elevadas concentrações de arsênio na camada de gordura, em músculo, fígado, rins e cérebro de muitas espécies de cetáceos (Cawthorn & Consultants, 1997).

Considerando o exposto e também o fato do grande interesse em estudos de especiação química de arsênio em organismos marinhos, a utilização de técnicas adequadas para a identificação de AsLip é de extrema relevância para avaliação de aspectos biogeoquímicos e toxicológicos do arsênio.

2. Objetivos

Identificação de AsLip presentes em amostras de tecidos de baleia-piloto-de-aleta-longa (*Globicephala melas*) após análise de especiação química por HPLC-ICP-MS/ESI-MS e avaliação da distribuição destas espécies de arsênio nestes tecidos.

3. Material e Métodos

3.1 Equipamentos e acessórios

As análises para quantificação de arsênio total foram realizadas utilizando um espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (quadrupolo ICP-MS (Element 2, Thermo Scientific, EUA).

As análises de especiação química de arsênio foram realizadas utilizando um HPLC Accela com duas saídas, sendo parte do eluente dirigido ao HR-ICP-MS (Element 2, Thermo Scientific, EUA) e parte ao ESI-MS LTQ Orbitrap Discovery (Thermo Fisher Scientific, EUA).

Além destes equipamentos, banho ultrassônico (Grant XUB25, Fisher Scientific, Reino Unido), centrífuga e microondas (Mars-5, CEM *instrument*, Reino Unido) foram utilizados no preparo das amostras.

3.2 Reagentes e soluções

Água ultra pura foi obtida pelo sistema Elga (18mΩ cm Elga Ltd., High Wycomb, Bucks, Reino Unido) e utilizada em todas as soluções. Todos os reagentes foram de grau analítico. Hexano, MeOH, diclorometano (DCM) e H₂O₂ (32%) foram adquiridos da Fisher Scientific (Reino Unido) e HNO₃ (67%), da Fluka (RU). Soluções padrão de Ga (razão massa / carga (m/z) 69), germânio (Ge, m/z 74) e arsênio (As₂O₃) foram preparadas a partir dos sais destes elementos fornecidos pela Sigma Aldrich (Reino Unido). Ga e Ge foram utilizados como padrão interno. DMA⁵⁺ utilizado no preparo da solução padrão para obtenção do fator de resposta foi obtido da ChemService (EUA). O material de referência certificada DORM-3, *Fish Protein* foi obtido do *National Research Council Canada* (NRCC).

Todas as soluções e amostras foram preparadas na sala de preparo de amostras dos laboratórios do grupo *Trace Element Speciation Laboratory* (TESLA) da *University of Aberdeen*. Frascos de plástico e vidrarias utilizados foram limpos na sequência: lavados com detergente neutro e água, lavados em máquina de lavar louças, rinsados com água ultrapura, descontaminados em solução HNO₃ 15 % v/v por 48 horas, lavados cinco vezes com água ultrapura novamente e secados em estufa.

3.3 Amostras

As amostras utilizadas neste estudo foram obtidas de baleias-piloto-de-aleta-longa (*Globicephala melas*) de um encalhamento em massa de 22 baleias em Anstruther, Fife, Escócia (RU) em 1º de setembro de 2012 (Figura 11). A baleia-piloto-de-aleta-longa ou também chamada de baleia-piloto-de-peitorais-longos é um cetáceo da família Delphinidae encontrado nas águas subantárticas e com uma população disjunta no Atlântico Norte (Mead e Brownell, 2005). Estas baleias são amplamente consumidas no hemisfério norte e podem acumular tanto organoclorados quanto elementos químicos tóxicos em elevadas concentrações. Isto implica consequentemente na possibilidade de acúmulo dos compostos nos seres humanos, com efeitos prejudiciais, em casos de elevado consumo da carne (Cawthorn & Consultants, 1997).

A Tabela 7 descreve as principais informações das baleias (numeradas de 1 a 21) encontradas no encalhamento. A idade das baleias foi determinada pela análise dentária realizada na *Scottish Agricultural College, Stranding Scheme*, Inverness (RU).

Tabela 7 - Sexo, comprimento (cm), idade (anos) e grupo etário de baleias-piloto-de-aleta-longa de um encalhamento em massa em Anstruther, Fife, Escócia (RU).

Baleia	Sexo	Comprimento (cm)	Idade (anos)	Grupo etário
1	Feminino	291	2,5	Subadulto
2	Feminino	420	25-27	Adulto
3	Feminino	389	17	Adulto
4	Feminino	420	ND	Adulto
5	Feminino	411	20	Adulto
6	Feminino	192	ND	Juvenil
7	Feminino	191	ND	Juvenil
8	Feminino	194	ND	Juvenil
9	Masculino	333	ND	Subadulto
10	Feminino	291	4	Subadulto
11	Feminino	445	29	Adulto
12	Feminino	315	3	Subadulto
13	Feminino	360	9	Adulto
14	Masculino	296	2,5	Subadulto
15	Feminino	462	35-36	Adulto
16	Masculino	318	4	Subadulto
17	Masculino	287	2	Subadulto
18	Feminino	440	25	Adulto
19	Masculino	444	14-16	Adulto
20	Feminino	435	14	Adulto
21	Masculino	538	16	Adulto

ND: não determinada

A coleta foi realizada no dia posterior ao encalhamento e os tecidos (músculo, fígado, rins, gordura, cérebro, sangue e leite) foram armazenados em sacos

plásticos *Ziplok*[®], mantidos em caixa térmica com gelo para transporte até o armazenamento final a -20 °C. Todos os animais foram classificados como possuidores das mesmas características de alimentação e movimentação no oceano.

As amostras de fígado, cérebro, rins e músculo foram submetidas à liofilização e moídas para homogeneização do tamanho das partículas. Após esta etapa, as amostras liofilizadas foram armazenadas a -20 °C até o momento das análises.

Figura 11 - Imagens registradas no dia posterior ao encalhamento de 22 baleias-piloto-de-aleta-longa em Anstruther, Fife, Escócia (Reino Unido).

3.4 Preparo das amostras para determinação da concentração de arsênio total e identificação de AsLip

As amostras dos tecidos foram submetidas a um procedimento de extração de acordo com pequenas modificações nas metodologias propostas por Amayo et al. (2011) e Raab et al. (2013).

Aproximadamente 1-2 g de cada tecido foi pesado e transferido para todos cônicos de 50 mL. O material certificado de referência DORM-3, *Fish Protein* (NRCC) também foi preparado nas mesmas condições como parâmetro para controle de qualidade do método utilizado. Assim, 10 mL de hexano foram adicionados a cada amostra para a obtenção da fração apolar de AsLip. Esta mistura foi mantida em agitação em banho ultrassônico durante 3 h e, após este período, foi centrifugada a 4000 rpm durante 15 minutos e o sobrenadante foi separado do resíduo. Este sobrenadante foi evaporado até securo sob fluxo de ar comprimido e, então, redissolvido em 1 mL de MeOH para análise.

Após a extração da fração apolar com hexano, o resíduo foi submetido ao mesmo procedimento de extração com 20 mL de MeOH : DCM (1:2). Esta mistura foi agitada em banho ultrassônico durante 3 h e a separação do sobrenadante foi realizada conforme já descrito acima para recuperação da fração polar de AsLip. A extração com MeOH e DCM foi realizada duas vezes, porém a mistura foi mantida em banho ultrassônico *overnight* após a segunda extração. Após este tempo, os tubos foram centrifugados a 4000 rpm por 15 minutos e o *pool* de sobrenadantes foi evaporado até securo sob fluxo de ar comprimido e, então, redissolvido em 1 mL de MeOH para análise. Todos os extratos obtidos foram armazenados a -20 °C e depois foram utilizados para análises de determinação da concentração de arsênio total e também para análise de indentificação de AsLip. A Figura 12 ilustra o procedimento de extração aplicado nas amostras de tecidos.

Figura 12 - Esquema do procedimento de extração das espécies de arsênio aplicado nas amostras de tecidos de baleias-piloto-de-aleta-longa.

As amostras de tecidos, os resíduos provenientes das extrações e os respectivos extratos (hexano e MeOH/DCM) foram submetidos à extração assistida por microondas para posterior determinação da concentração de arsênio total.

Para a digestão, todas as amostras foram preparadas em triplicata. Os tecidos e os resíduos das extrações (0,05-0,10 g) foram exatamente pesados e então misturados com 1 mL de HNO₃ concentrado em tubos cônicos de 50 mL. Com relação aos extratos, 250 µL de cada um (hexano e MeOH/DCM) foram transferidos à tubos cônicos de 50 mL e foram evaporados até secura sob fluxo de ar comprimido. Após a evaporação, 1 mL de HNO₃ concentrado foi adicionado. Estas misturas foram mantidas em repouso *overnight* e, então, 2 mL de H₂O₂ foram adicionados à cada tubo. Assim, todas as amostras foram submetidas à extração assistida por microondas de acordo com o programa de aquecimento descrito na Tabela 8. Após a digestão, cada amostra foi diluída para 50 mL com água ultrapura e a concentração de arsênio total foi determinada por ICP-MS.

Tabela 8 - Programa de aquecimento do forno de microondas utilizado para digestão das amostras de tecidos, resíduos do procedimento de extração e extratos.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)
1	50	5,0
2	75	5,0
3	95	25,0

3.5 Determinação da concentração de arsênio total por HR-ICP-MS

A concentração de arsênio total (m/z 75) nas amostras digeridas (tecidos, extratos e resíduos do procedimento de extração) foi determinada por HR-ICP-MS (Element 2, Thermo Scientific, EUA). Ga (m/z 69) foi utilizado como padrão interno. A quantificação foi realizada utilizando soluções padrão de As₂O₃ na faixa de calibração de 0,0-25,0 µg L⁻¹. A exatidão do método foi avaliada pela análise do material de referência certificada DORM-3, *Fish Protein*, NRCC.

3.6 Análise de especiação química de arsênio por HPLC-ICP-MS/ESI-MS para identificação de AsLip

Análises de especiação química de arsênio foram realizadas nos extratos MeOH/DCM e hexano para identificação de AsLip por HPLC-ICP-MS/ESI-MS.

Após a injeção de 100 μ L de cada extrato, as separações cromatográficas foram realizadas utilizando coluna cromatográfica de fase reversa Eclipse XDB-C18 (Agilent), nas dimensões 5 μ m, 150 mm x 4,6 mm, em temperatura de 30 °C e em condições de gradiente de água e MeOH, ambos contendo 0,1 % de ácido fórmico. O gradiente foi de 0 a 100 % de metanol de 0 a 20 minutos, seguido de um período linear (100% de MeOH) de 20 a 40 minutos e então, de 0 a 100 % de água de 40 a 50 minutos. O eluente pós-coluna teve seu fluxo dividido em 25 % para HR-ICP-MS e 75 % para ESI-MS. A Figura 13 ilustra os equipamentos utilizados e a conexão entre o HPLC e os espectrômetros de massas (detectores).

Figura 13 - Acoplamento das técnicas analíticas HPLC-HR-ICP-MS/HR-LTQ Orbitrap ESI-MS utilizadas para a identificação de AsLip nos extratos (Adaptado de Batista (2012)).

No HR-ICP-MS, em modo de resolução médio, as intensidades dos sinais das m/z 75 e 74 foram determinadas para arsênio e Ge (padrão interno),

respectivamente. Um nebulizador micro-concêntrico foi utilizado. O HR-LTQ Orbitrap ESI-MS foi utilizado em modo positivo de ultra varredura de 100 a 2000 m/z. A voltagem do capilar, pressão do nebulizador, vazão do gás de secagem, temperatura do quadrupolo e voltagem de fragmentação para modo de ionização positivo foram de 4000 v, 40 psi, 12 L min⁻¹ at 350 °C, 100 °C e 100 v, respectivamente. Durante todos os experimentos a coluna e o auto-amostrador foram mantidos a 30 °C e 4 °C, respectivamente.

Ge (10 µg L⁻¹) foi utilizado como padrão interno injetado com confluência em fluxo. Uma solução contendo DMA⁵⁺ (100 µg L⁻¹) e Ge (10 µg L⁻¹) foi utilizada para obtenção do fator de resposta.

3.7 Análises estatísticas

Alguns resultados foram reportados como média ± desvio padrão. ANOVA-uma via, seguida por teste *pos hoc* de Duncan, e correlação de Spearman foram utilizadas para avaliar a relação entre as faixas etárias das baleias e as concentrações de arsênio determinadas nos tecidos. Teste t de *Student* foi utilizado para avaliar a relação do sexo das baleias com o comprimento dos animais e o acúmulo de arsênio nos tecidos. Valores de p menores que 0,05 foram considerados significantes. Os dados foram analisados no programa Statistica 8.0 (Statsoft software-USA) e os gráficos foram obtidos pelo programa Origin[®] 6.1 (Data Analysis and Technical Graphics) e GraphPad Prism 5.

4- Resultados e Discussão

4.1 Concentração de arsênio total em fígado, cérebro, rins, músculo e camada de gordura de baleias-piloto-de-aleta-longa

A análise do material de referência certificada DORM-3 *fish protein* (NRCC) forneceu resultados satisfatórios para garantia da exatidão da metodologia utilizada. A concentração de arsênio total determinada foi $6,47 \pm 0,26 \mu\text{g As g}^{-1}$ ($n=3$), correspondendo a uma recuperação de aproximadamente 94 % em relação ao valor certificado ($6,88 \pm 0,30 \mu\text{g As g}^{-1}$).

A Tabela 9 descreve as concentrações de arsênio total determinadas em algumas amostras de tecidos.

Tabela 9 - Concentração de arsênio total ($\mu\text{g As g}^{-1}$) em amostras liofilizadas de fígado, cérebro, rins e músculo e em camada de gordura de baleias-piloto-de-aleta-longa.

Baleia	Fígado	Cérebro	Rins	Músculo	Gordura
1	0,88 $\pm$ 0,09	ND	2,66 $\pm$ 1,57	0,70 $\pm$ 0,03	ND
2	0,91 $\pm$ 0,14	0,64 $\pm$ 0,04	4,11 $\pm$ 0,28	2,32 $\pm$ 0,18	ND
3	0,93 $\pm$ 0,09	ND	6,42 $\pm$ 1,38	1,18 $\pm$ 0,14	ND
4	0,63 $\pm$ 0,01	ND	4,05 $\pm$ 0,29	1,89 $\pm$ 0,12	ND
5	0,69 $\pm$ 0,14	0,72 $\pm$ 0,21	7,98 $\pm$ 2,30	1,16 $\pm$ 0,23	ND
6	0,52 $\pm$ 0,13	0,48 $\pm$ 0,01	1,70 $\pm$ 0,43	0,51 $\pm$ 0,22	0,81 $\pm$ 0,10
7	0,33 $\pm$ 0,13	0,28 $\pm$ 0,04	0,84 $\pm$ 0,21	0,54 $\pm$ 0,05	ND
8	0,59 $\pm$ 0,16	0,35 $\pm$ 0,04	0,84 $\pm$ 0,09	0,75 $\pm$ 0,10	ND
9	0,70 $\pm$ 0,14	ND	2,95 $\pm$ 1,03	0,93 $\pm$ 0,06	ND
10	0,87 $\pm$ 0,25	0,60 $\pm$ 0,10	3,09 $\pm$ 0,35	1,49 $\pm$ 0,28	ND
11	1,03 $\pm$ 0,17	0,49 $\pm$ 0,09	2,92 $\pm$ 0,44	0,82 $\pm$ 0,10	ND
12	0,83 $\pm$ 0,06	0,55 $\pm$ 0,07	5,79 $\pm$ 0,96	ND	ND
13	0,74 $\pm$ 0,13	ND	2,06 $\pm$ 0,25	1,37 $\pm$ 0,22	ND
14	0,83 $\pm$ 0,29	ND	3,32 $\pm$ 0,07	1,08 $\pm$ 0,15	ND
15	0,38 $\pm$ 0,06	ND	1,54 $\pm$ 0,27	1,36 $\pm$ 0,06	ND
16	0,64 $\pm$ 0,18	ND	2,57 $\pm$ 0,33	0,90 $\pm$ 0,04	ND
17	1,06 $\pm$ 0,12	ND	2,91 $\pm$ 0,22	0,81 $\pm$ 0,10	ND
18	0,67 $\pm$ 0,19	ND	2,08 $\pm$ 0,25	1,87 $\pm$ 0,33	ND
19	0,72 $\pm$ 0,02	ND	5,43 $\pm$ 0,87	1,00 $\pm$ 0,09	ND
20	0,62 $\pm$ 0,29	ND	2,41 $\pm$ 0,71	1,78 $\pm$ 0,61	1,49 $\pm$ 0,06
21	0,55 $\pm$ 0,17	ND	1,41 $\pm$ 0,05	1,16 $\pm$ 0,20	1,25 $\pm$ 0,18
Média	0,72 $\pm$ 0,14	0,51 $\pm$ 0,07	3,19 $\pm$ 0,59	1,18 $\pm$ 0,16	1,18 $\pm$ 0,11

ND: não determinada

Como demonstrado pela Tabela 9, as concentrações de arsênio total variaram de 0,33 a 1,06 $\mu\text{g As g}^{-1}$ no fígado, de 0,28 a 0,72 $\mu\text{g As g}^{-1}$ no cérebro, 0,84 a 7,98 $\mu\text{g As g}^{-1}$ nos rins, de 0,51 a 2,32 $\mu\text{g As g}^{-1}$ no músculo e de 0,81 a 1,49 $\mu\text{g As g}^{-1}$ na camada de gordura das baleias. As médias de concentração de arsênio em cada tecido foram, respectivamente, 0,72 $\mu\text{g As g}^{-1}$ no fígado, 0,51 $\mu\text{g As g}^{-1}$ no cérebro, 3,19 $\mu\text{g As g}^{-1}$ nos rins, 1,18 $\mu\text{g As g}^{-1}$ no músculo e 1,18 $\mu\text{g As g}^{-1}$ na camada de gordura. Assim, os rins apresentaram as maiores concentrações de arsênio, podendo indicar preferência de acúmulo neste tipo de tecido.

A avaliação estatística permitiu concluir que as baleias-piloto-de-aleta-longa adultas têm maior concentração de arsênio no fígado, no cérebro, no músculo e nos rins que as juvenis ($p < 0,05$). Também foi observado que as baleias subadultas têm maior concentração de arsênio no fígado comparado às juvenis ($p < 0,05$). Com relação à aplicação do teste de correlação de Spearman, houve correlação positiva entre idade e concentração de arsênio no cérebro ($r = 0,818$, $p < 0,05$) e concentração de arsênio no músculo ($r = 0,733$, $p < 0,05$), mostrando que quanto mais velha a baleia, mais arsênio pode ser encontrado nestes dois tecidos. Estes resultados enfatizam a ocorrência de acúmulo de arsênio em tecidos de mamíferos pertencentes aos níveis tróficos mais elevados da cadeia alimentar.

Avaliando as baleias de acordo com sexo masculino e feminino, pelo teste *t* de Student, não houve diferença em nenhuma variável ($p > 0,05$). Assim, pode-se concluir que o sexo não interfere no acúmulo de arsênio em nenhum tecido, nem no comprimento das baleias.

Alguns resultados encontrados no presente estudo corroboram com dados obtidos em pesquisas com baleias encontradas na literatura (Goessler & Rudorfer, 1998; R Kubota, Kunito, & Tanabe, 2001; Reiji Kubota, Kunito, & Tanabe, 2002).

Caurant, Navarro, & Amiard (1996) relataram que a capacidade de baleias-piloto (*Globicephala melas*) em acumular cádmio (Cd) e mercúrio (Hg) está bem estabelecida. O estudo de Caurant et al. (1996) também mostrou que as concentrações de Hg foram maiores que as encontradas em outras espécies de mamíferos marinhos (117 mg Kg^{-1} em fígado e 2,2 mg Kg^{-1} no músculo). Entretanto, as concentrações de arsênio e outros elementos químicos tóxicos não foram determinadas. Nielsen e Nielsen (2000) também determinaram concentrações de

Hg, Cd, chumbo (Pb) e Se em amostras de sangue de baleias-piloto (*Globicephala melas*) e de baleias cachalote (*Physeter catodon*) encalhadas na Dinamarca. As concentrações médias encontradas em amostras de sangue de baleias-piloto (n=6) foram 228,8 $\mu\text{g Hg L}^{-1}$, 969,9 $\mu\text{g Se L}^{-1}$, 13,2 $\mu\text{g Cd L}^{-1}$ e 10 $\mu\text{g Pb L}^{-1}$ e em amostras de sangue de baleias cachalote (n=4) foram 1042 $\mu\text{g Hg L}^{-1}$, 569 $\mu\text{g Se L}^{-1}$, 10817 $\mu\text{g Cd L}^{-1}$ e 40 $\mu\text{g Pb L}^{-1}$. Assim, os autores concluíram que as concentrações de Hg e Cd excederam drasticamente àquelas que estão associadas à toxicidade grave em outras espécies de mamíferos (Nielsen & Nielsen, 2000).

Zeisler, Demiralp, e Koster (1993) forneceram informações relacionadas à concentração de 36 elementos traço e metilmercúrio em tecidos de mamíferos marinhos, incluindo beluga ou baleia-branca (*Delphinapterus leucas*). Eles analisaram amostras de fígado, rins e músculo destes animais. Praticamente todas as concentrações de arsênio estavam abaixo de 1 $\mu\text{g g}^{-1}$. Concentrações de arsênio total também foram determinadas em amostras de fígado de focas e de diferentes espécies de baleias (*Globicephalas melas* e *Delphinapterus leucas*) no estudo realizado por Goessler e Rudorfer (1998). As concentrações variaram de 0,17 a 2,40 $\mu\text{g As g}^{-1}$ (massa seca).

Outro estudo avaliou a concentração de arsênio em fígado de diferentes espécies de mamíferos (cetáceos e pinípedes) para elucidar o acúmulo de acordo com idade, sexo e hábitos alimentares (R Kubota et al., 2001). As concentrações encontradas variaram de acordo com as espécies de <0,10 a 7,68 $\mu\text{g As g}^{-1}$ (massa seca), não havendo diferença significativa de acordo com o sexo (R Kubota et al., 2001). Em 2002, estes mesmos pesquisadores determinaram concentração de arsênio total em fígado de diferentes organismos marinhos (cetáceos, pinípedes e tartarugas marinhas) para avaliação do perfil de acumulação em animais pertencentes a elevados níveis tróficos. A concentração de arsênio total hepática determinada em baleia-piloto-de-aleta-curta (*Globicephala macrorhynchus*) foi de 3,14 $\mu\text{g As g}^{-1}$ (massa seca) (Reiji Kubota et al., 2002).

4.2 Concentração de arsênio total em amostras provenientes do procedimento de extração: extratos e resíduos da extração

Figura 14 – Porcentagem de recuperação (%) de cada fase do procedimento de extração de espécies de arsênio em relação à concentração de arsênio total ($\mu\text{g As g}^{-1}$) em cada tecido original de baleias-piloto-de-aleta-longa. Soma*: soma da porcentagem de recuperação de todas as fases (MeOH/DCM + hexano + resíduo).

A Figura 14 descreve as porcentagens de recuperação de cada fase do procedimento de extração das espécies de arsênio (MeOH/DCM, hexano e resíduo) em relação às concentrações de arsênio total determinadas nas amostras originais dos tecidos. De modo geral, a soma das porcentagens de recuperação da concentração de arsênio em todas as fases do procedimento de extração foi maior que 50 %.

De acordo com estes resultados, pode-se observar que as maiores concentrações de arsênio total foram encontradas nos extratos MeOH/DCM, correspondentes à etapa do procedimento de extração para obtenção das espécies de arsênio mais polares (arsênio inorgânico, DMA, MMA, AsB, AsC e alguns AsLip). As concentrações de arsênio total nos extratos hexano foram menores (cerca de 14 % em relação a concentração do elemento nos tecidos), entretanto este valor não culmina com a ausência de compostos de arsênio de menor relevância. Como justificativa para estes achados cita-se o estudo de Amayo et al. (2011) sobre a identificação de compostos lipofílicos em extrato hexano, correspondente a 12 % da concentração de arsênio total em peixe capelin (*Mallotus villosus*). Amayo, Raab, Krupp, Marschall, et al. (2014) também encontraram pequena porcentagem (2–17 %) de arsênio total na fase hexano extraído de amostras de peixes.

Considerando ainda o extrato hexano em comparação ao extrato MeOH/DCM, concentrações maiores de arsênio foram observadas nos extratos provenientes de amostras de gordura das baleias adultas 20 e 21, podendo indicar maior acúmulo de espécies lipofílicas nestes organismos.

Para confiabilidade dos resultados apresentados na Figura 14, o material de referência certificada DORM-3 *fish protein* (NRCC) também foi analisado (n=3). A concentração de arsênio total determinada foi $6,44 \pm 0,33 \mu\text{g As g}^{-1}$, correspondendo a uma recuperação satisfatória de aproximadamente 94 % em relação ao valor certificado ($6,88 \pm 0,30 \mu\text{g As g}^{-1}$).

4.3 Identificação de AsLip após análise por HPLC-ICP-MS/ESI-MS

Alguns estudos encontrados na literatura mostram resultados de especiação química de arsênio em amostras marinhas sem, no entanto, identificarem AsLip. Reiji Kubota et al. (2002) identificaram AsB como sendo o principal composto de arsênio presente em animais marinhos, seguido de outras espécies como DMA, MMA, TMAO, AsC e As³⁺. Os autores sugerem que as diferenças encontradas podem ser decorrentes de mecanismos de biotransformação em cada organismo. Estas mesmas espécies químicas também foram identificadas em amostras de baleias (*Globicephalas melas* e *Delphinapterus leucas*) utilizadas no estudo de Goessler e Rudorfer (1998).

Diferindo destes estudos, o presente trabalho identificou AsLip em um tipo de organismo marinho. Assim, o procedimento de extração aplicado nas amostras de tecidos das baleias-piloto-de-aleta-longa permitiu a obtenção de dois tipos de extratos como citado previamente, um contendo possivelmente as espécies de arsênio mais polares (MeOH/DCM) e o outro contendo as espécies mais apolares (hexano). Alguns destes extratos foram utilizados para identificação de AsLip após análise de especiação química por HPLC-ICP-MS/ESI-MS.

O método analítico utilizou gradiente de MeOH e água para a separação cromatográfica e, nestas condições, a intensidade do arsênio sofre alteração com o aumento da concentração deste solvente (Raber, Khoomrung, & Taleshi, 2009). Para a solução deste problema, Amayo et al. (2011) descreveram uma metodologia para o ajuste da variação na intensidade dos sinais em uma análise em gradiente. O método baseia-se na utilização pós-coluna de uma solução de calibração contendo arsênio (100 µg L⁻¹) e Ge (10 µg L⁻¹), em uma corrida com injeção de um branco. Após esta injeção, o sinal analítico para arsênio fornecido pelo ICP-MS é monitorado e um fator de resposta ao gradiente para MeOH pode ser calculado para o arsênio e Ge (Amayo et al., 2011)

Na atualidade, padrões de arsênio solúveis em lipídeos não estão disponíveis para identificação e quantificação das espécies. Assim, a hifenação simultânea ao ESI-MS fornece informação valiosa a respeito das massas exatas de espécies que eluem ao mesmo tempo em que os picos de arsênio obtidos pelo ICP-MS (Amayo et al., 2011). Seguindo este conceito, a identificação dos AsLip foi realizada pela comparação do tempo de retenção dos picos de arsênio do cromatograma gerado

pelo sistema HPLC-ICP-MS com o tempo de retenção do cromatograma das massas exatas dos possíveis AsLip gerado pelo HPLC-ESI-MS.

Além da comparação dos tempos de retenção conforme explicado, a utilização de uma equação matemática torna-se necessária para a confirmação de que a massa gerada pelo ESI-MS (massa experimental) é correspondente a um AsLip (incerteza < 5 %). Para certificar se a m/z experimental é de um possível AsLip, aplica-se a equação 1:

$$[(m/z \text{ teórica}) - (m/z \text{ experimental})] / [(m/z \text{ teórica}) \times 10^6] = [\Delta m] \quad (1)$$

Para garantia de 95 % de confiança do resultado, deve-se considerar a variação da exatidão da massa (Δm) $-5 \text{ ppm} < \Delta m < +5 \text{ ppm}$ (Batista, 2012). A determinação da Δm é essencial para se evitar equívocos na identificação de analitos por ESI-MS e considera apenas a composição dos elementos da molécula, mas não sua estrutura.

Os cromatogramas obtidos após análise por HPLC-ICP-MS de alguns extratos (MeOH/DCM) estão apresentados nas Figuras 15 e 16 e mostram uma diferente composição de AsLip entre as amostras analisadas. Vale destacar que a distribuição dos picos de arsênio é característica para cada tecido e que os picos apresentam intensidades diferentes até mesmo quando se compara dois organismos adultos (baleias 2 e 5). Observa-se também um grande pico de arsênio no volume morto, sugerindo-se a presença de espécies de arsênio solúveis em água e/ou de produtos de degradação de AsLip. Este fato também foi observado no estudo de (Amayo, Raab, Krupp, Marschall, et al., 2014).

A Figura 17 mostra a comparação entre os cromatogramas obtidos após análise do extrato MeOH/DCM e hexano de amostras de rins da baleia-piloto-de-aleta-longa 2. Pode-se notar que os picos de arsênio presentes possuem certa semelhança de distribuição, porém a intensidade dos mesmos é diferente para cada extrato avaliado.

Figura 15 - Cromatogramas obtidos após análise por HPLC-ICP-MS de extratos MeOH/DCM de amostras de rins, camada de gordura, fígado e músculo (Baleia 2).

Figura 16 - Cromatogramas obtidos após análise por HPLC-ICP-MS de extratos MeOH/DCM de amostras de rins, camada de gordura, fígado e músculo (Baleia 5).

Figura 17 - Cromatogramas obtidos após análise por HPLC-ICP-MS de extratos MeOH/DCM e hexano de amostras de rins (Baleia 2).

A Figura 18 mostra a sobreposição dos picos de arsênio provenientes respectivamente da resposta elementar do ICP-MS e da resposta molecular do ESI-MS para extratos MeOH/DCM de amostras de rins, camada de gordura, fígado e músculo (baleia 5). Os AsLip identificados estão destacados na figura por letras.

Figura 18 - Cromatogramas obtidos após análise por HPLC-ICP-MS/ESI-MS de extratos MeOH/DCM de amostras de rins, camada de gordura, fígado e músculo (Baleia 5).

Considerando a coincidência de tempos de retenção entre os picos de arsênio presentes nos cromatogramas obtidos após análise por HPLC-ICP-MS e os picos provenientes da composição elementar fornecida pelo ESI-MS, como visto pela Figura 18, foi possível a identificação de 7 AsLip. Estas moléculas foram previamente identificadas em outros estudos com amostras marinhas. Adicionalmente, as massas precisas dos compostos protonados (MH^+) sugerem que todos possuem um átomo de arsênio por molécula.

Os AsLip identificados nos picos B, C, D, E podem ser considerados ácidos graxos contendo arsênio, pois as informações de massa exata indicam a presença de 3 átomos de oxigênio por molécula e estes compostos foram previamente identificados em outros estudos presentes na literatura (Amayo, Raab, Krupp, & Feldmann, 2014; Amayo et al., 2011, 2013; Arroyo-Abad et al., 2013). Além disso, ácidos graxos contendo arsênio são moléculas mais polares que hidrocarbonetos, portanto, eluindo primeiro no sistema cromatográfico (Amayo et al., 2011). Avaliando também a massa e fórmula molecular, os AsLip correspondentes aos picos F, G, H no cromatograma são possíveis hidrocarbonetos contendo arsênio (Amayo, Raab, Krupp, & Feldmann, 2014; Amayo et al., 2011, 2013; Arroyo-Abad et al., 2013; García-Salgado et al., 2012; Raab et al., 2013). Tanto os picos C, D, E quanto F, G obtidos pela resposta do ESI-MS correspondem a picos individuais no cromatograma após análise por HPLC-ICP-MS, mostrando que sinais analíticos de diferentes massas de AsLip podem corresponder a um mesmo tempo de retenção de um pico largo de arsênio em ICP-MS. Este fato indica que, mesmo quando a resolução cromatográfica do método por HPLC-ICP-MS não é suficiente para a separação de todos os compostos contendo arsênio, os sinais fornecidos pelo ESI-MS podem ser utilizados para a identificação de espécies sobrepostas.

As Tabelas 10, 11, 12, 13 e 14 listam as respectivas fórmulas moleculares protonadas (MH^+), massas experimentais (MH^+), tempos de retenção e Δm dos AsLip identificados, respectivamente, nos extratos MeOH/DCM de amostras de rins, camada de gordura, fígado e músculo (baleia 5) e no extrato hexano de amostras de rins (baleia 2). Pode-se verificar na tabela que houve uma pequena variação na Δm , assim como no tempo de retenção e na massa experimental dos analitos.

Tabela 10 - Fórmulas moleculares protonadas (MH^+), tempos de retenção, massas experimentais (MH^+), registradas pelo ESI-MS, e associadas ao erro relativo (Δm) para os AsLip identificados no extrato MeOH/DCM de amostras de rins (baleia 5).

Pico de arsênio	Fórmula molecular (MH^+)	Tempo de retenção (min)	Massa experimental (MH^+)	Δm (ppm)	Referências
B	$C_{17}H_{36}AsO_3$	17,21	363,1881	0,617	(Amayo, Raab, Krupp, & Feldmann, 2014; Amayo et al., 2011, 2013)
C	$C_{23}H_{38}AsO_3$	18,40	437,2040	0,867	(Arroyo-Abad et al., 2013)
F	$C_{23}H_{38}AsO$	20,18	405,2157	2,356	(Amayo et al., 2011, 2013)
G	$C_{17}H_{38}AsO$	20,42	333,2130	-0,364	(Amayo, Raab, Krupp, & Feldmann, 2014; Amayo et al., 2011, 2013; Arroyo-Abad et al., 2013; Raab et al., 2013)
H	$C_{19}H_{42}AsO$	21,21	361,2438	-0,814	(Amayo, Raab, Krupp, & Feldmann, 2014; Amayo et al., 2011, 2013; Arroyo-Abad et al., 2013; García-Salgado et al., 2012; Raab et al., 2013)

Tabela 11 - Fórmulas moleculares protonadas (MH^+), tempos de retenção, massas experimentais (MH^+), registradas pelo ESI-MS, e associadas ao erro relativo (Δm) para os AsLip identificados no extrato MeOH/DCM de amostras de camada de gordura (baleia 5).

Pico de arsênio	Fórmula molecular (MH^+)	Tempo de retenção (min)	Massa experimental (MH^+)	Δm (ppm)	Referências
B	$C_{17}H_{36}AsO_3$	17,49	363,1879	0,377	(Amayo, Raab, Krupp, & Feldmann, 2014; Amayo et al., 2011, 2013)
C	$C_{23}H_{38}AsO_3$	18,59	437,2043	1,207	(Arroyo-Abad et al., 2013)
D	$C_{19}H_{40}AsO_3$	18,76	391,2183	-0,503	(Amayo, Raab, Krupp, & Feldmann, 2014; Arroyo-Abad et al., 2013)
F	$C_{23}H_{38}AsO$	20,50	405,2159	2,536	(Amayo et al., 2011, 2013)
G	$C_{17}H_{38}AsO$	20,61	333,2156	2,296	(Amayo, Raab, Krupp, & Feldmann, 2014; Amayo et al., 2011, 2013; Arroyo-Abad et al., 2013; Raab et al., 2013)
H	$C_{19}H_{42}AsO$	21,37	361,2461	1,446	(Amayo, Raab, Krupp, & Feldmann, 2014; Amayo et al., 2011, 2013; Arroyo-Abad et al., 2013; García-Salgado et al., 2012; Raab et al., 2013)

Tabela 12 - Fórmulas moleculares protonadas (MH^+), tempos de retenção, massas experimentais (MH^+), registradas pelo ESI-MS, e associadas ao erro relativo (Δm) para os AsLip identificados no extrato MeOH/DCM de amostras de fígado (baleia 5).

Pico de arsênio	Fórmula molecular (MH^+)	Tempo de retenção (min)	Massa experimental (MH^+)	Δm (ppm)	Referências
B	$C_{17}H_{36}AsO_3$	17,02	363,1883	0,797	(Amayo, Raab, Krupp, & Feldmann, 2014; Amayo et al., 2011, 2013)
D	$C_{19}H_{40}AsO_3$	18,50	391,2160	-2,763	(Amayo, Raab, Krupp, & Feldmann, 2014; Arroyo-Abad et al., 2013)
E	$C_{24}H_{38}AsO_3$	18,54	449,2024	-0,753	(Amayo et al., 2011, 2013; Arroyo-Abad et al., 2013)

Tabela 13 - Fórmulas moleculares protonadas (MH^+), tempos de retenção, massas experimentais (MH^+), registradas pelo ESI-MS, e associadas ao erro relativo (Δm) para os AsLip identificados no extrato MeOH/DCM de amostras de músculo (baleia 5).

Pico de arsênio	Fórmula molecular (MH^+)	Tempo de retenção (min)	Massa experimental (MH^+)	Δm (ppm)	Referências
C	$C_{23}H_{38}AsO_3$	18,11	437,2033	0,137	(Arroyo-Abad et al., 2013)
E	$C_{24}H_{38}AsO_3$	18,27	449,2038	0,687	(Amayo et al., 2011, 2013; Arroyo-Abad et al., 2013)
F	$C_{23}H_{38}AsO$	19,76	405,2136	0,246	(Amayo et al., 2011, 2013)
G	$C_{17}H_{38}AsO$	19,96	333,2130	-0,364	(Amayo, Raab, Krupp, & Feldmann, 2014; Amayo et al., 2011, 2013; Arroyo-Abad et al., 2013; Raab et al., 2013)
H	$C_{19}H_{42}AsO$	20,94	361,2444	-0,164	(Amayo, Raab, Krupp, & Feldmann, 2014; Amayo et al., 2011, 2013; Arroyo-Abad et al., 2013; García-Salgado et al., 2012; Raab et al., 2013)

Tabela 14 - Fórmulas moleculares protonadas (MH^+), tempos de retenção, massas experimentais (MH^+), registradas pelo ESI-MS, e associadas ao erro relativo (Δm) para os AsLip identificados no extrato hexano de amostras de rins (baleia 2).

Pico de arsênio	Fórmula molecular (MH^+)	Tempo de retenção (min)	Massa experimental (MH^+)	Δm (ppm)	Referências
B	$C_{17}H_{36}AsO_3$	17,45	363,1850	-2,523	(Amayo, Raab, Krupp, & Feldmann, 2014; Amayo et al., 2011, 2013)
F	$C_{23}H_{38}AsO$	20,37	405,2132	-0,084	(Amayo et al., 2011, 2013)
G	$C_{17}H_{38}AsO$	20,64	333,2134	0,066	(Amayo, Raab, Krupp, & Feldmann, 2014; Amayo et al., 2011, 2013; Arroyo-Abad et al., 2013; Raab et al., 2013)
H	$C_{19}H_{42}AsO$	21,33	361,2468	2,156	(Amayo, Raab, Krupp, & Feldmann, 2014; Amayo et al., 2011, 2013; Arroyo-Abad et al., 2013; García-Salgado et al., 2012; Raab et al., 2013)

5. Conclusões

De acordo com os resultados deste estudo, em média, as maiores concentrações de arsênio total ($3,19 \mu\text{g As g}^{-1}$) foram encontradas em amostras de rins das baleias-piloto-de-aleta-longa encalhadas na costa oriental da Escócia (Anstruther, Fife). Observou-se também que as baleias-piloto adultas tendem a acumular maior concentração do elemento em relação a baleias juvenis. Estas observações enfatizam a ocorrência de acúmulo de arsênio em tecidos de mamíferos marinhos pertencentes aos níveis tróficos mais elevados da cadeia alimentar.

Considerando o procedimento utilizado para extração de espécies de arsênio das amostras de rins, camada de gordura, fígado e músculo, as maiores concentrações de arsênio total foram encontradas nos extratos MeOH/DCM. Por outro lado, mesmo o extrato hexano apresentando menores concentrações do elemento, alguns AsLip foram identificados após análise de especiação química por HPLC-ICP-MS/ESI-MS.

Os cromatogramas obtidos após análise por HPLC-ICP-MS de alguns extratos (MeOH/DCM) mostraram diferentes perfis entre as amostras analisadas. A distribuição e intensidade dos picos de arsênio foram características para cada tecido e organismo adulto em estudo. Complementando estes dados, as informações de massa exata provenientes do ESI-MS, permitiram a identificação de 7 AsLip que foram relatados previamente em estudos envolvendo outras amostras de origem marinha. Dentre os compostos identificados, destacaram-se ácidos graxos e hidrocarbonetos contendo arsênio.

Sendo assim, a combinação de técnicas hifenadas de cromatografia (HPLC) com ICP-MS e ESI-MS permitiu a identificação direta de compostos de arsênio solúveis em lipídeos (AsLip), mesmo não havendo espécies de arsênio padrão com comportamento cromatográfico semelhante.

Diante dos resultados obtidos, informações futuras a respeito dos compostos presentes em outros tecidos das baleias-piloto e da distribuição destes entre todos os tecidos coletados poderão descrever o comportamento biogeoquímico do arsênio e instigar questionamentos a respeito das razões para ocorrência do fenômeno de encalhe.

Vale ainda destacar que este segundo estudo é inédito com relação à identificação de AsLip em tecidos de baleias e, desta forma, precursor de inúmeros outros, como a identificação de outros tipos de AsLip e até mesmo o estudo de outros organismos expostos ao arsênio.

REFERÊNCIAS¹

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126.
- Amayo, K. O., Petursdottir, A., Newcombe, C., Gunnlaugsdottir, H., Raab, A., Krupp, E. M., & Feldmann, J. (2011). Identification and quantification of arsenolipids using reversed-phase HPLC coupled simultaneously to high-resolution ICPMS and high-resolution electrospray MS without species-specific standards. *Analytical Chemistry*, 83(9), 3589–3595.
- Amayo, K. O., Raab, A., Krupp, E. M., & Feldmann, J. (2014). Identification of arsenolipids and their degradation products in cod-liver oil. *Talanta*, 118, 217–223.
- Amayo, K. O., Raab, A., Krupp, E. M., & Gunnlaugsdottir, H. (2013). Novel Identification of Arsenolipids Using Chemical Derivatizations in Conjunction with RP-HPLC-ICPMS/ESMS. *Analytical Chemistry*, 85, 9321–9327.
- Amayo, K. O., Raab, A., Krupp, E. M., Marschall, T., Horsfall, M., & Feldmann, J. (2014). Arsenolipids show different profiles in muscle tissues of four commercial fish species. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 28(2), 131–137.
- American Conference of Governmental Industrial Hygienists. (2003). *Threshold Limits Values (TLVs) for Chemical Substances and Physical Agents Biological Exposure Indices for 2003*. Cincinnati, OH: ACGIH.
- Antonio Garcia, M. T., Herrera Dueñas, A., & Pineda Pampliega, J. (2013). Hematological effects of arsenic in rats after subchronical exposure during pregnancy and lactation: the protective role of antioxidants. *Experimental and Toxicologic Pathology: Official Journal of the Gesellschaft Für Toxikologische Pathologie*, 65(5), 609–14.
- Aposhian, H. V., & Aposhian, M. M. (2006). Arsenic Toxicology: Five Questions. *Chemical Research in Toxicology*, 19(1), 1–15.
- Aposhian, H. V. (1997). Enzymatic methylation of arsenic species and other new approaches to arsenic toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 37, 397–419.
- Arroyo-Abad, U., Lischka, S., Piechotta, C., Mattusch, J., & Reemtsma, T. (2013). Determination and identification of hydrophilic and hydrophobic arsenic species in methanol extract of fresh cod liver by RP-HPLC with simultaneous ICP-MS and ESI-Q-TOF-MS detection. *Food Chemistry*, 141(3), 3093–102.

¹De acordo com o estilo APA – American Psychological Association

- Arroyo-Abad, U., Mattusch, J., Mothes, S., Möder, M., Wennrich, R., Elizalde-González, M. P., & Matysik, F. M. (2010). Detection of arsenic-containing hydrocarbons in canned cod liver tissue. *Talanta*, 82(1), 38–43.
- Agency for toxic substances and disease registry. (2007). *Toxicological Profile for Arsenic*. Atlanta, GA: ATSDR.
- Banerjee, M., Banerjee, N., & Ghosh, P. (2010). Evaluation of the serum catalase and myeloperoxidase activities in chronic arsenic-exposed individuals and concomitant cytogenetic damage. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 249(1), 47–54.
- Barra, C. M. (2000). Especificação de arsênio - uma revisão. *Química Nova*, 23(1), 58–70.
- Basu, A., Mahata, J., Gupta, S., & Giri, A. K. (2001). Genetic toxicology of a paradoxical human carcinogen, arsenic: A review. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*.
- Batista, B. L. (2012). *Desenvolvimento de métodos rápidos de preparo de amostras para especificação química de arsênio em alimentos por LC-ICP-MS e avaliação das concentrações e do metabolismo em arroz*. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Batista, B. L., Grotto, D., Rodrigues, J. L., Souza, V. C. D. O., & Barbosa, F. (2009). Determination of trace elements in biological samples by inductively coupled plasma mass spectrometry with tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature. *Analytica Chimica Acta*, 646(1-2), 23–9.
- Batista, B. L., Nigar, M., Mestrot, A., Alves Rocha, B., Barbosa Júnior, F., Price, A. H., ... Feldmann, J. (2014). Identification and quantification of phytochelatin in roots of rice to long-term exposure: evidence of individual role on arsenic accumulation and translocation. *Journal of Experimental Botany*, 65(6), 1467–79.
- Batista, B. L., Rodrigues, J. L., Nunes, J. A., Souza, V. C. D. O., & Barbosa, F. (2009). Exploiting dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry (DRC-ICP-MS) for sequential determination of trace elements in blood using a dilute-and-shoot procedure. *Analytica Chimica Acta*, 639(1-2), 13–8.
- Batista, B. L., Souza, J. M. O., De Souza, S. S., & Barbosa, F. (2011). Speciation of arsenic in rice and estimation of daily intake of different arsenic species by Brazilians through rice consumption. *Journal of Hazardous Materials*, 191(1-3), 342–8.
- Batista, B., & Nacano, L. (2012). Rapid sample preparation procedure for As speciation in food samples by LC-ICP-MS. *Food Additives & Contaminants*, 29(5), 780–788.

¹De acordo com o estilo APA – American Psychological Association

- Berg, T., & Larsen, E. (1999). Speciation and legislation—Where are we today and what do we need for tomorrow? *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 363, 431–434.
- Biswas, D., Banerjee, M., Sen, G., Das, J. K., Banerjee, A., Sau, T. J., ... Biswas, T. (2008). Mechanism of erythrocyte death in human population exposed to arsenic through drinking water. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 230(1), 57–66.
- Borba, R., Coscione, A., Figueiredo, B., & Zambello, F. (2009). Estudo da especiação de arsênio inorgânico e determinação de arsênio total no monitoramento ambiental da qualidade de águas subterrâneas. *Química Nova*, 32(4), 970–975.
- Buchet, J., & Lauwerys, R. (1985). Study of inorganic arsenic methylation by rat liver in vitro: relevance for the interpretation of observations in man. *Archives of Toxicology*, 57, 125–129.
- Buchet, J., & Lauwerys, R. (1987). Study of factors influencing the in vivo methylation of inorganic arsenic in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 91(1), 65–74.
- Buchet, J., & Lauwerys, R. (1988). Role of thiols in the in-vitro methylation of inorganic arsenic by rat liver cytosol. *Biochemical Pharmacology*, 37(16), 3149–3153.
- Caurant, F., Navarro, M., & Amiard, J. (1996). Mercury in pilot whales: possible limits to the detoxification process. *Science of the Total Environment*, 186, 95–104.
- Cawthorn, M., & Consultants, F. (1997). *Meat consumption from stranded whales and marine mammals in New Zealand: Public health and other issues*. Wellington, New Zealand: Department of Conservation.
- Chatterjee, A., Das, D., Mandal, B. K., Chowdhury, T. R., Samanta, G., & Chakraborty, D. (1995). Arsenic in ground water in six districts of West Bengal, India: the biggest arsenic calamity in the world. Part I. Arsenic species in drinking water and urine of the affected. *Analyst*, 120(March), 643–650.
- Chattopadhyay, S., Bhaumik, S., Purkayastha, M., Basu, S., Nag Chaudhuri, A., & Das Gupta, S. (2002). Apoptosis and necrosis in developing brain cells due to arsenic toxicity and protection with antioxidants. *Toxicology Letters*, 136(1), 65–76.
- Chen, C., Chen, C., Wu, M., & Kuo, T. (1992). Cancer potential in liver, lung, bladder and kidney due to ingested inorganic arsenic in drinking water. *British Journal of Cancer*, 66(5), 888–92.
- Correia, C. L. T., Gonçalves, R. a., Azevedo, M. S., Vieira, M. a., & Campos, R. C. (2010). Determination of total arsenic in seawater by hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Microchemical Journal*, 96(1), 157–160.

¹De acordo com o estilo APA – American Psychological Association

- Das, S., & Santra, A. (2005). Implications of oxidative stress and hepatic cytokine (TNF- α and IL-6) response in the pathogenesis of hepatic collagenesis in chronic arsenic toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 204, 18–26.
- De Vizcaya-Ruiz, A., Barbier, O., Ruiz-Ramos, R., & Cebrian, M. E. (2009). Biomarkers of oxidative stress and damage in human populations exposed to arsenic. *Mutation Research*, 674(1-2), 85–92.
- Del Razo, L. M., García-Vargas, G. G., Valenzuela, O. L., Castellanos, E. H., Sánchez-Peña, L. C., Currier, J. M., ... Stýblo, M. (2011). Exposure to arsenic in drinking water is associated with increased prevalence of diabetes: a cross-sectional study in the Zimapán and Lagunera regions in Mexico. *Environmental Health : A Global Access Science Source*, 10(1), 73.
- Del Razo, L. M., Quintanilla-Vega, B., Brambila-Colombres, E., Calderón-Aranda, E. S., Manno, M., & Albores, A. (2001). Stress proteins induced by arsenic. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 177, 132–148.
- Dembitsky, V., & Levitsky, D. (2004). Arsenolipids. *Progress in Lipid Research*, 43(5), 403–48.
- Díaz-Villaseñor, A., Sánchez-Soto, M. C., Cebrián, M. E., Ostrosky-Wegman, P., & Hiriart, M. (2006). Sodium arsenite impairs insulin secretion and transcription in pancreatic beta-cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 214(1), 30–4.
- Dixon, H. (1996). The biochemical action of arsonic acids especially as phosphate analogues. *Advances in Inorganic Chemistry*, 44, 191.
- Ebisuda, K.-I., Kunito, T., Fujihara, J., Kubota, R., Shibata, Y., & Tanabe, S. (2003). Lipid-soluble and water-soluble arsenic compounds in blubber of ringed seal (*Pusa hispida*). *Talanta*, 61(6), 779–87.
- Edmonds, J. S., Shibata, Y., Francesconi, K. A., Yoshinaga, J., & Morita, M. (1992). Arsenic lipids in the digestive gland of the western rock lobster *Panulirus cygnus*: an investigation by HPLC ICP-MS. *The Science of the Total Environment*, 122, 321–335.
- Ellman, G. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82, 70–77.
- EMBRAPA (2013). Recuperado em 17 de abril de 2014, de <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arroz/Abertura.html>.
- Feldmann, J., Lai, V. W., Cullen, W. R., Ma, M., Lu, X., & Le, X. C. (1999). Sample preparation and storage can change arsenic speciation in human urine. *Clinical Chemistry*, 45(11), 1988–97.
- Feldmann, J., Salaün, P., & Lombi, E. (2009). Critical review perspective: elemental speciation analysis methods in environmental chemistry - moving towards methodological integration. *Environmental Chemistry*.

¹De acordo com o estilo APA – American Psychological Association

- Flora, S. J. S., Chouhan, S., Kannan, G. M., Mittal, M., & Swarnkar, H. (2008). Combined administration of taurine and monoisoamyl DMSA protects arsenic induced oxidative injury in rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1(1), 39–45.
- Food and Agriculture Organization.(2014, 17 de julho): FAO. Recuperado em 28 de julho de 2014, de <http://www.fao.org/news/story/en/item/238802/icode/1>. UN strengthens regulations on lead in infant formula and arsenic in rice e 1.Joint FAO-WHO Codex Alimentarius Committee sets new food safety standards
- Food and Drug Administration. (2012, novembro): FDA. Recuperado em 10 de março de 2014, de <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm328363.htm>.
- Ford, E., Mokdad, A., Giles, W., & Brown, D. (2003). The metabolic syndrome and antioxidant concentrations findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes*, 52(March), 2346–2352.
- Fu, J., Woods, C. G., Yehuda-Shnaidman, E., Zhang, Q., Wong, V., Collins, S., ... Pi, J. (2010). Low-level arsenic impairs glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic beta cells: involvement of cellular adaptive response to oxidative stress. *Environmental Health Perspectives*, 118(6), 864–70.
- Fukuda, S., Terasawa, M., & Shiomi, K. (2011). Phosphatidylarsenocholine, one of the major arsenolipids in marine organisms: synthesis and metabolism in mice. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 49(7), 1598–603.
- García-Salgado, S., Raber, G., & Raml, R. (2012). Arsenosugar phospholipids and arsenic hydrocarbons in two species of brown macroalgae. *Environmental Chemistry*, 9(1), 63–66.
- Goessler, W., & Rudorfer, A. (1998). compounds in marine mammals with high- performance liquid chromatography and an inductively coupled plasma mass spectrometer as element- specific detector. *Applied ...*, 12, 491–501.
- Gong, Z., Lu, X., Ma, M., Watt, C., & Le, X. (2002). Arsenic speciation analysis. *Talanta*, 58, 77–96.
- Gurr, J., Yih, L., Samikkannu, T., & Bau, D. (2003). Nitric oxide production by arsenite. *Mutation Research/ ...*, 533, 173–182.
- Halliwell, B. (2007). Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochemical Journal*, 401(1), 1–11.
- Halliwell, B., & Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 57, 715S–725S.

¹De acordo com o estilo APA – American Psychological Association

- Hanaoka, K., Goessler, W., Yoshida, K., Fujitaka, Y., Kaise, T., & Irgolic, K. J. (1999). Arsenocholine- and dimethylated arsenic-containing lipids in starspotted shark *Mustelus manazo*. *Applied Organometallic Chemistry*, 13, 765–770.
- He, W., Greenwell, R. J., Brooks, D. M., Calderón-Garcidueñas, L., Beall, H. D., & Coffin, J. D. (2007). Arsenic exposure in pregnant mice disrupts placental vasculogenesis and causes spontaneous abortion. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 99(1), 244–53.
- He, Y., & Zheng, Y. (2010). Assessment of in vivo bioaccessibility of arsenic in dietary rice by a mass balance approach. *The Science of the Total Environment*, 408(6), 1430–6.
- Healy, S., & Wildfang, E. (1999). Diversity of inorganic arsenite biotransformation. *Biological Trace Element Research*, 68(3), 249–66.
- Henry, T. R. (2003). *Technical Summary of Information Available on the Bioaccumulation of Arsenic in Aquatic Organisms*. Office of Science and Technology Office of Water. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Hindmarsh, J. T. (2002). Caveats in hair analysis in chronic arsenic poisoning. *Clinical Biochemistry*, 35(1), 1–11.
- Hinwood, A. L., Sim, M. R., Jolley, D., de Klerk, N., Bastone, E. B., Gerostamoulos, J., & Drummer, O. H. (2002). Hair and Toenail Arsenic Concentrations of Residents Living in Areas with High Environmental Arsenic Concentrations. *Environmental Health Perspectives*, 111(2), 187–193.
- Hopenhayn, C., & Huang, B. (2003). Profile of urinary arsenic metabolites during pregnancy. *Environmental Health Perspectives*, 111(16), 1888–1891.
- Hsueh, Y. M., Hsu, M. K., Chiou, H. Y., Yang, M. H., Huang, C. C., & Chen, C. J. (2002). Urinary arsenic speciation in subjects with or without restriction from seafood dietary intake. *Toxicology Letters*, 133(1), 83–91.
- Huang, C., Chen, Y., & Yang, C. (2011). Arsenic and diabetes: current perspectives. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 27(9), 402–10.
- Huang, J.-H., Ilgen, G., & Fecher, P. (2010). Quantitative chemical extraction for arsenic speciation in rice grains. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 25(6), 800.
- Hughes, M. (2002). Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicology Letters*, 133(1), 1–16.
- Hughes, M., Beck, B., & Chen, Y. (2011). Arsenic exposure and toxicology: a historical perspective. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 123(2), 305–32.

¹De acordo com o estilo APA – American Psychological Association

- Hughes, M. F. (2006). Biomarkers of Exposure: A Case Study with Inorganic Arsenic. *Environmental Health Perspectives*, 117(11), 1790–1796.
- Hughes, M. F., Kenyon, E. M., Edwards, B. C., Mitchell, C. T., Razo, L. M. Del, & Thomas, D. J. (2003). Accumulation and metabolism of arsenic in mice after repeated oral administration of arsenate. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 191(3), 202–210.
- International Agency for Research on Cancer. (2004). *Agents reviewed by the IARC monographs*. France: IARC.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2010). *Aquisição alimentar domiciliar per capita anual, por Grandes Regiões, segundo os produtos, período 2008-2009*. IBGE.
- James, K. a, Marshall, J. a, Hokanson, J. E., Meliker, J. R., Zerbe, G. O., & Byers, T. E. (2013). A case-cohort study examining lifetime exposure to inorganic arsenic in drinking water and diabetes mellitus. *Environmental Research*, 123, 33–8.
- Jin, Y., Wang, G., Zhao, F., Liao, Y., Sun, D., Zhong, Y., ... Sun, G. (2010). Distribution of speciated arsenicals in mice exposed to arsenite at the early life. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(6), 1323–6.
- Jovanovic, D., Rasic-Milutinovic, Z., Paunovic, K., Jakovljevic, B., Plavsic, S., & Milosevic, J. (2013). Low levels of arsenic in drinking water and type 2 diabetes in Middle Banat region, Serbia. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 216(1), 50–5.
- Kenyon, E., Hughes, M., & Adair, B. (2008). Tissue distribution and urinary excretion of inorganic arsenic and its methylated metabolites in C57BL6 mice following subchronic exposure to arsenate in drinking. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 232(3), 448–55.
- Klaassen, C. D. (2008). *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*. USA: McGraw-Hill.
- Kubota, R., Kunito, T., & Tanabe, S. (2001). Arsenic accumulation in the liver tissue of marine mammals. *Environmental Pollution*, 115, 303–312.
- Kubota, R., Kunito, T., & Tanabe, S. (2002). Chemical speciation of arsenic in the livers of higher trophic marine animals. *Marine Pollution Bulletin*, 45, 218–223.
- Kumagai, Y., & Pi, J. (2004). Molecular basis for arsenic-induced alteration in nitric oxide production and oxidative stress: implication of endothelial dysfunction. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 198(3), 450–7.
- Lin, S., Cullen, W. R., & Thomas, D. J. (1999). Methylarsenicals and arsinothiols are potent inhibitors of mouse liver thioredoxin reductase. *Chemical Research in Toxicology*, 12(10), 924–30.

¹De acordo com o estilo APA – American Psychological Association

- Lin, S., Del Razo, L. M., Styblo, M., Wang, C., Cullen, W. R., & Thomas, D. J. (2001). Arsenicals inhibit thioredoxin reductase in cultured rat hepatocytes. *Chemical Research in Toxicology*, 14, 305–311.
- Lu, M., Wang, H., Li, X.-F., Arnold, L. L., Cohen, S. M., & Le, X. C. (2007). Binding of dimethylarsinous acid to cys-13alpha of rat hemoglobin is responsible for the retention of arsenic in rat blood. *Chemical Research in Toxicology*, 20(1), 27–37.
- Lu, M., Wang, H., Li, X.-F., Lu, X., Cullen, W. R., Arnold, L. L., ... Le, X. C. (2004). Evidence of hemoglobin binding to arsenic as a basis for the accumulation of arsenic in rat blood. *Chemical Research in Toxicology*, 17(12), 1733–42.
- Lynn, S., Gurr, J. R., Lai, H. T., & Jan, K. Y. (2000). NADH oxidase activation is involved in arsenite-induced oxidative DNA damage in human vascular smooth muscle cells. *Circulation Research*, 86, 514–519.
- Ma, M., & Le, X. C. (1998). Effect of arsenosugar ingestion on urinary arsenic speciation. *Clinical Chemistry*, 44(3), 539–50.
- Maiti, S., & Chatterjee, A. (2001). Effects on levels of glutathione and some related enzymes in tissues after an acute arsenic exposure in rats and their relationship to dietary protein deficiency. *Archives of Toxicology*, 75(9), 531–537.
- Mandal, B. K., & Suzuki, K. T. (2002). Arsenic round the world: a review. *Talanta*, 58(1), 201–35.
- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*, 244, 6049–6055.
- Meharg, A. a, Williams, P. N., Adomako, E., Lawgali, Y. Y., Deacon, C., Villada, A., ... Yanai, J. (2009). Geographical variation in total and inorganic arsenic content of polished (white) rice. *Environmental Science & Technology*, 43(5), 1612–7.
- Meharg, A., & Zhao, F. (2012). *Arsenic & rice*. Springer Science+Business Media B.V. doi:10.1007/978-94-007-2947-6
- Mead, J. G.; Brownell, R. L. (2005). Order Cetacea. In: Wilson, D. E.; Reeder, D. M. (Eds.) *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference* (pp. 723-743). Baltimore: Johns Hopkins University Press.
- Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O., & Remacle, J. (1994). Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radical Biology and ...*, 17(3), 235–248.
- Moncada, S., Palmer, R., & Higgs, E. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 43(2), 109–142.

¹De acordo com o estilo APA – American Psychological Association

- Mondal, B., Chatterjee, D., & Bhattacharyya, M. (2012). Structure-function alteration of hemoglobin in arsenicosis patients: a probable pathway to exert toxicity. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 32(8), 581–9.
- Morita, M., & Shibata, Y. (1988). Isolation and identification of arseno-lipid from a brown alga, *Undariapinnatifida* (Wakame). *Chemosphere*, 17(6), 1147–1152.
- Mruk, D., Silvestrini, B., Mo, M., & Cheng, C. (2002). Antioxidant superoxide dismutase-a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception*, 65, 305–311.
- Nandi, D., Patra, R., & Swarup, D. (2006). Oxidative stress indices and plasma biochemical parameters during oral exposure to arsenic in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 1579–1584.
- Naranmandura, H., & Suzuki, K. (2008). Formation of dimethylthioarsenicals in red blood cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 227(3), 390–9.
- Nardi, E. P., Evangelista, F. S., Tormen, L., Saint-Pierre, T. D., Curtius, A. J., Souza, S. S. De, & Barbosa, F. (2009). The use of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for the determination of toxic and essential elements in different types of food samples. *Food Chemistry*, 112(3), 727–732.
- Navas-Acien, A. (2005). Arsenic exposure and cardiovascular disease: a systematic review of the epidemiologic evidence. *American Journal of Epidemiology*, 162(11), 1037–49.
- Nearing, M. M., Koch, I., & Reimer, K. J. (2014). Complementary arsenic speciation methods: A review. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 99, 150–162.
- Neff, J. M. (1997). Ecotoxicology of arsenic in the marine environment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16, 917–927.
- Nielsen, J., & Nielsen, F. (2000). Toxic Metals and Selenium in Blood from Pilot Whales (*Globicephala melas*) and Sperm Whales (*Physeter catodon*). *Marine Pollution Bulletin*, 40(4), 0–3.
- Nordenson, I., & Beckman, L. (1991). Is the genotoxic effect of arsenic mediated by oxygen free radicals? *Human Heredity*, 41, 71–73.
- Nunes, J. A., Batista, B. L., Rodrigues, J. L., Caldas, N. M., Neto, J. A. G., & Barbosa, F. (2010). A simple method based on ICP-MS for estimation of background levels of arsenic, cadmium, copper, manganese, nickel, lead, and selenium in blood of the Brazilian population. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, 73, 878–887.
- Ouypornkochagorn, S., & Feldmann, J. (2010). Dermal uptake of arsenic through human skin depends strongly on its speciation. *Environmental Science & Technology*, 44(10), 3972–8.

¹De acordo com o estilo APA – American Psychological Association

- Parsons, P. J., & Barbosa, F. (2007). Atomic spectrometry and trends in clinical laboratory medicine. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 62(9), 992–1003.
- Paglia, D. E.; Valentine, W. N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*, 70, 158-169.
- Paul, D. S., Walton, F. S., Saunders, R. J., & Stýblo, M. (2011). Characterization of the impaired glucose homeostasis produced in C57BL/6 mice by chronic exposure to arsenic and high-fat diet. *Environmental Health Perspectives*, 119(8), 1104–9.
- Pi, J., Kumagai, Y., Sun, G., Yamauchi, H., Yoshida, T., Iso, H., ... Shimojo, N. (2000). Decreased serum concentrations of nitric oxide metabolites among Chinese in an endemic area of chronic arsenic poisoning in inner Mongolia. *Free Radical Biology & Medicine*, 28(7), 1137–42.
- Pesquisa de Orçamentos Familiares. (2008/2009). *Análise do consumo alimentar pessoal no Brasil*. IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística): POF.
- Portaria nº 518 - Ministério da Saúde. (2004, 25 de março). Recuperado em 30 de maio de 2014, de <http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2004/GM/GM-518.htm>
- Raab, A., Newcombe, C., & Pitton, D. (2013). Comprehensive Analysis of Lipophilic Arsenic Species in a Brown Alga (*Saccharina latissima*). *Analytical Chemistry*, 85(5), 2817–2824.
- Raber, G., Khoomrung, S., & Taleshi, M. (2009). Identification of arsenolipids with GC/MS. *Talanta*, 78, 1215–1218.
- Rahman, M. A., Hasegawa, H., & Lim, R. P. (2012). Bioaccumulation, biotransformation and trophic transfer of arsenic in the aquatic food chain. *Environmental Research*, 116, 118–135.
- Rintala, E.-M., Ekholm, P., Koivisto, P., Peltonen, K., & Venäläinen, E.-R. (2014). The intake of inorganic arsenic from long grain rice and rice-based baby food in Finland - low safety margin warrants follow up. *Food Chemistry*, 150, 199–205.
- Rossmann, T. (2003). Mechanism of arsenic carcinogenesis: an integrated approach. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 533(1-2), 37–65.
- Rumpler, A., & Edmonds, J. (2008). Arsenic Containing Long Chain Fatty Acids in Cod Liver Oil: A Result of Biosynthetic Infidelity? *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 47(14), 2665–7.

¹De acordo com o estilo APA – American Psychological Association

- Samanta, G., Sharma, R., Roychowdhury, T., & Chakraborti, D. (2004). Arsenic and other elements in hair, nails, and skin-scales of arsenic victims in West Bengal, India. *The Science of the Total Environment*, 326(1-3), 33–47.
- Santra, a, Maiti, a, Das, S., Lahiri, S., Charkaborty, S. K., & Mazumder, D. N. (2000). Hepatic damage caused by chronic arsenic toxicity in experimental animals. *Journal of Toxicology. Clinical Toxicology*, 38(4), 395–405.
- Sanz, E., Muñoz-Olivas, R., & Cámara, C. (2005). Evaluation of a focused sonication probe for arsenic speciation in environmental and biological samples. *Journal of Chromatography. A*, 1097(1-2), 1–8.
- Sarafian, T. A. (1999). Methylmercury-induced generation of free radicals: biological implications. *Metal Ions in Biological Systems*, 36, 415–444.
- Schmeisser, E., Goessler, W., & Francesconi, K. a. (2006). Human metabolism of arsenolipids present in cod liver. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385(2), 367–76.
- Schmeisser, E., Goessler, W., Kienzl, N., & Francesconi, K. a. (2005). Direct measurement of lipid-soluble arsenic species in biological samples with HPLC-ICPMS. *The Analyst*, 130(6), 948–55.
- Sele, V., Sloth, J., & Lundebye, A. (2012). Arsenolipids in marine oils and fats: a review of occurrence, chemistry and future research needs. *Food Chemistry*, 133(3), 618–630.
- Shi, H., Shi, X., & Liu, K. J. (2004). Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 255(1-2), 67–78.
- Sirot, V., Guérin, T., Volatier, J.-L., & Leblanc, J.-C. (2009). Dietary exposure and biomarkers of arsenic in consumers of fish and shellfish from France. *Science of the Total Environment*, 407(6), 1875–85.
- Smedley, P. L., & Kinniburgh, D. G. (2002). A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry*.
- Smith, K. R., Klei, L. R., & Barchowsky, A. (2001). Arsenite stimulates plasma membrane NADPH oxidase in vascular endothelial cells. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 280, L442–L449.
- Sofuoglu, S. C., Güzelkaya, H., Akgül, Ö., Kavcar, P., Kurucaovalı, F., & Sofuoglu, A. (2014). Speciated arsenic concentrations, exposure, and associated health risks for rice and bulgur. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 64, 184–91.
- Soignet, S. L., Frankel, S. R., Douer, D., Tallman, M. S., Kantarjian, H., Calleja, E., ... Warrell, R. P. (2001). United States multicenter study of arsenic trioxide in relapsed acute promyelocytic leukemia. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 19(18), 3852–60.

¹De acordo com o estilo APA – American Psychological Association

- Sommella, a, Deacon, C., Norton, G., Pigna, M., Violante, a, & Meharg, a a. (2013). Total arsenic, inorganic arsenic, and other elements concentrations in Italian rice grain varies with origin and type. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 181, 38–43.
- Spear, N., & Aust, S. D. (1995). Effects of glutathione on Fenton reagent-dependent radical production and DNA oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 324, 111–116.
- Straub, A. C., Clark, K. A., Ross, M. A., Chandra, A. G., Li, S., Gao, X., ... Barchowsky, A. (2008). Arsenic-stimulated liver sinusoidal capillarization in mice requires NADPH oxidase-generated superoxide. *The Journal of Clinical Investigation*, 118, 3980–3989.
- Styblo, M., & Thomas, D. J. (1997). Binding of arsenicals to proteins in an in vitro methylation system. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 147(1), 1–8.
- Styblo, M., Yamauchi, H., & Thomas, D. (1995). Comparative in Vitro Methylation of Trivalent and Pentavalent Arsenicals. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 135, 172–178.
- Sun, X., Li, B., Li, X., Wang, Y., Xu, Y., Jin, Y., ... Sun, G. (2006). Effects of sodium arsenite on catalase activity, gene and protein expression in HaCaT cells. *Toxicology in Vitro*, 20, 1139–1144.
- Suzuki, K. T., Katagiri, A., Sakuma, Y., Ogra, Y., & Ohmichi, M. (2004). Distributions and chemical forms of arsenic after intravenous administration of dimethylarsinic and monomethylarsonic acids to rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 198(3), 336–44.
- Taleshi, M. S., Edmonds, J. S., Goessler, W., Ruiz-Chancho, M. J., Raber, G., Jensen, K. B., & Francesconi, K. a. (2010). Arsenic-containing lipids are natural constituents of sashimi tuna. *Environmental Science & Technology*, 44(4), 1478–83.
- Taleshi, M. S., Jensen, K. B., Raber, G., Edmonds, J. S., Gunnlaugsdottir, H., & Francesconi, K. a. (2008). Arsenic-containing hydrocarbons: natural compounds in oil from the fish capelin, *Mallotus villosus*. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 7345(39), 4706–7.
- Templeton, D., & Ariese, F. (2000). Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000. *Pure and Applied Chemistry*, 72(8), 1453–1470.
- Thomas, D. (2007). Molecular processes in cellular arsenic metabolism. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 222(3), 365–73.

¹De acordo com o estilo APA – American Psychological Association

- Thomas, D., Li, J., & Waters, S. (2007). Arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase and the methylation of arsenicals. *Experimental Biology and Medicine*, 232, 3–13.
- Thomas, D., Waters, S., & Styblo, M. (2004). Elucidating the pathway for arsenic methylation. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 198(3), 319–26.
- Thompson, D. (1993). A chemical hypothesis for arsenic methylation in mammals. *Chemico-Biological Interactions*, 88, 89–114.
- Tokar, E. J., Diwan, B. a, & Waalkes, M. P. (2012). Renal, hepatic, pulmonary and adrenal tumors induced by prenatal inorganic arsenic followed by dimethylarsinic acid in adulthood in CD1 mice. *Toxicology Letters*, 209(2), 179–85.
- Tseng, C.-H. (2004). The potential biological mechanisms of arsenic-induced diabetes mellitus. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 197(2), 67–83.
- Vahter, M. (2002). Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology*, 181-182, 211–7.
- Vahter, M., & Marafante, E. (1987). Effects of low dietary intake of methionine, choline or proteins on the biotransformation of arsenite in the rabbit. *Toxicology Letters*, 37, 41–46.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44–84.
- Wang, T., Shu, Y., Liu, Y., Jan, K., & Huang, H. (1997). Glutathione peroxidase and catalase modulate the genotoxicity of arsenite. *Toxicology*, 121, 229–237.
- Watanabe, T., & Hirano, S. (2013). Metabolism of arsenic and its toxicological relevance. *Archives of Toxicology*, 87(6), 969–79.
- Williams, P. N., Price, a H., Raab, a, Hossain, S. a, Feldmann, J., & Meharg, a a. (2005). Variation in arsenic speciation and concentration in paddy rice related to dietary exposure. *Environmental Science & Technology*, 39(15), 5531–40.
- Williams, P. N., Villada, A., Deacon, C., Raab, A., Figuerola, J., Green, A. J., ... Meharg, A. a. (2007). Greatly enhanced arsenic shoot assimilation in rice leads to elevated grain levels compared to wheat and barley. *Environmental Science & Technology*, 41(19), 6854–9.
- World Health Organization. (2008). *Guidelines for drinking-water quality [electronic resource]: incorporating 1st and 2nd addenda, Vol.1, Recommendations*. WHO.
- World Health Organization / Food and Agriculture Organization. (2011). *Evaluation of certain contaminants in food. Seventy-second report of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. WHO Technical Report Series 959: WHO/FAO.

¹De acordo com o estilo APA – American Psychological Association

- Wu, H.; Krishnamohan, M.; Lam, P. K. S.; Ng, J. C. (2011). Urinary arsenic speciation profiles in mice subchronically exposed to low concentrations of sodium arsenate in drinking water. *Kaohsiung Journal of Medical Science*, 27 (9), 417-423.
- Xu, X. Y., Mcgrath, S. P., Meharg, A. A., & Zhao, F. J. (2008). Growing rice aerobically markedly decreases arsenic accumulation. *Environmental Science & Technology*, 42, 5574–5579.
- Yamanaka, K., & Okada, S. (1994). Induction of lung-specific DNA damage by metabolically methylated arsenics via the production of free radicals. *Environmental Health Perspectives*, 102 Suppl , 37–40.
- Yan, H., Wang, N., Weinfeld, M., Cullen, W. R., & Le, X. C. (2009). Identification of arsenic-binding proteins in human cells by affinity chromatography and mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 81, 4144–4152.
- Yen, C. C., Ho, T. J., Wu, C. C., Chang, C. F., Su, C. C., Chen, Y. W., ... Huang, C. F. (2011). Inorganic arsenic causes cell apoptosis in mouse cerebrum through an oxidative stress-regulated signaling pathway. *Archives of Toxicology*, 85(6), 565–75.
- Yen, C., Lu, F., Huang, C., & Chen, W. (2007). The diabetogenic effects of the combination of humic acid and arsenic: in vitro and in vivo studies. *Toxicology Letters*, 172(3), 91–105.
- Yoshida, T., Yamauchi, H., & Sun, G. F. (2004). Chronic health effects in people exposed to arsenic via the drinking water: dose–response relationships in review. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 198(3), 243–52.
- Zavala, Y. J., Gerads, R., Gürleyük, H., & Duxbury, J. M. (2008). Arsenic in rice: II. Arsenic speciation in USA grain and implications for human health. *Environmental Science and Technology*, 42, 3861–3866.
- Zeisler, R., Demiralp, R., & Koster, B. (1993). Determination of inorganic constituents in marine mammal tissues. *Science of the Total ...*, 140, 365–386.
- Zhu, Y. G., Sun, G. X., Lei, M., Teng, M., Liu, Y. X., Chen, N. C., ... Williams, P. N. (2008). High percentage inorganic arsenic content of mining impacted and nonimpacted Chinese rice. *Environmental Science & Technology*, 42(13), 5008–13.

¹De acordo com o estilo APA – American Psychological Association

ANEXOS

ANEXO A: Aprovação pela Comissão de Ética Local em Uso Animal (CEUA-USP)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO <i>Campus de Ribeirão Preto</i> <i>Comissão de Ética no Uso de Animais</i>
 CERTIFICADO 	
<p>Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 12.1.1384.53.1), intitulado "Avaliação do Estado Redox e da Distribuição de Arsênio em Tecidos de Camundongos Cronicamente Expostos", de autoria de Juliana Maria Oliveira Souza e de Fernando Barbosa Junior, por estar de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do <i>Campus de Ribeirão Preto – USP</i> foi aprovado em reunião da CEUA de 05.11.2012.</p>	
<p>This is to certify that the work (Protocol number 12.1.1384.53.1), entitled: "Avaliação do Estado Redox e da Distribuição de Arsênio em Tecidos de Camundongos Cronicamente Expostos", by Juliana Maria Oliveira Souza and Fernando Barbosa Junior, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the <i>Campus of Ribeirão Preto – USP</i>, and was approved in the meeting, November 5, 2012.</p>	
<p>Ribeirão Preto, 13 de novembro de 2012.</p>
Presidente da CEUA Profa. Dra. Claudia Maria Padovan
Secretária da CEUA Maria Angélica Depiro	
<hr/> <small>Av. Bandeirantes, 3900 – CEP 14040-900 – Ribeirão Preto – São Paulo Fone: (16) 3602 4469 – Fax: (16) 3633 7964</small>	