UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

AIRTON DA CUNHA MARTINS JUNIOR

Arsênio em arroz: bioacessibilidade *in vitro* e alterações de parâmetros redox em camundongos *Swiss* expostos pela dieta

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior

Coorientador: Dr. Bruno Lemos Batista

Ribeirão Preto
2017

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.

Martins Jr., Airton da Cunha

Arsênio em arroz: bioacessibilidade *in vitro* e alterações de parâmetros redox em camundongos *Swiss* expostos pela dieta, 2017

103 p. : il. ; 30cm.

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

Orientador: Barbosa Jr, Fernando.

1. Arroz *(Oryza sativa L.)*. 2. Arsênio. 3. Parâmetros redox.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Airton da Cunha Martins Junior

Arsênio em arroz: bioacessibilidade *in vitro* e alterações de parâmetros redox em camundongos *Swiss* expostos pela dieta

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.:_____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr.:_____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr.:_____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr.:_____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr.:_____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Dedico este trabalho a Deus por guiar e iluminar meus caminhos e aos meus pais, Leni e Airton pela confiança, amor e apoio durante toda a vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus dedico minha vida e este trabalho, me iluminando e me demonstrando quais os caminhos certos a seguir e amparo nos momentos de tristeza.

À minha família, em especial aos meus pais Airton e Leni pelo alicerce seguro e pelo exemplo de amor e simplicidade que sempre me incentivaram e me motivaram a seguir em frente, pelo apoio incondicional.

Ao meu orientador, professor Fernando Barbosa Júnior, pela oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa, e por todas as oportunidades de aprendizagem que me fizeram amadurecer como pessoa e profissionalmente.

Ao Gustavo, por estar sempre presente em minha vida, me escutando e orientando nos momentos mais difíceis, mostrando-se um verdadeiro companheiro e parceiro tanto nos momentos de alegrias quanto nos de dificuldades, sempre com uma palavra ou gesto de amor e carinho.

Ao meu coorientador Bruno Lemos Batista, pelos ensinamentos, ajuda, confiança e amizade.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais, Ana Carolina, Andréia, Bruno, Cecília, Cibele, Lara, Mariana, Marília, Matheus, Joseph, Juliana, Maria Fernanda, Paula, Prycila, Romena, Silvana, pelo convívio diário momentos de descontração, e, compartilhando alegrias e angústias da vida de pós graduando e por todas as sugestões.

Aos meus amigos Ana, Andréia, Bruno Marcel, César, Grazieli, Jéssica, pela amizade e convívio em Ribeirão Preto que fizeram com que esses anos se passassem de uma forma mais leve e agradável.

À técnica do nosso laboratório e colega, Vanessa, pela amizade, auxílio em experimentos e sugestões. À Cidinha pelo suporte técnico e o cafezinho diário.

A Dra. Luciane Carla Alberice e ao seu laboratório pela ajuda com as análises mitocondriais, fundamentais para este estudo e por todos os seus ensinamentos.

Aos doutorandos, Anderson de Oliveira Souza e Igor H. Sampaio com quem dividi a bancada de trabalho para aprender as técnicas.

A ouro fino *Agrobusiness* pela utilização do espaço (estufas) onde foram plantados o arroz etapa fundamental deste estudo.

Às secretárias da FCFRP, Rosana e Rosemary, pelo cuidado despendido a cada aluno de pós graduação e atenção durante todos esses anos.

Aos professores do departamento de bioquímica onde realizei o estágio PAE, pelos ensinamentos na prática docente e sugestões ao meu projeto. Aos técnicos dos laboratórios de bioquímica em especial a Ana Cristina Polizello.

Aos demais professores e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pelo agradável convívio e colaboração.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa e auxilio financeiro durante o doutorado.

E a todos que não estão presentes nestas linhas, mas que de forma direta ou indireta contribuíram para minha formação acadêmica e pessoal.

A todos vocês meus mais sinceros agradecimentos!

Uma flor nasceu na rua!
Passem de longe, bondes, ônibus, rio de aço do tráfego.
Uma flor ainda desbotada
ilude a polícia, rompe o asfalto.
Façam completo silêncio, paralisem os negócios,
garanto que uma flor nasceu.
Sua cor não se percebe.
Suas pétalas não se abrem.
Seu nome não está nos livros.
É feia. Mas é realmente uma flor.
Sento-me no chão da capital do país às cinco horas da tarde
e lentamente passo a mão nessa forma insegura.
Do lado das montanhas, nuvens maciças avolumam-se.
Pequenos pontos brancos movem-se no mar, galinhas em pânico.
É feia. Mas é uma flor. Furou o asfalto, o tédio, o nojo e o ódio.

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

MARTINS JÚNIOR, A. C. **Arsênio em arroz: bioacessibilidade *in vitro* e alterações de parâmetros redox em camundongos *Swiss* expostos pela dieta**. 2017. 103f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

O arsênio (As) é um semimetal,amplamente distribuído em toda a crosta terrestre, podendo ser encontrado em formas inorgânicas: arsenato (As^{5+}) e arsenito (As^{3+}) e orgânicas como a arsenobetaína (AsB), dimetil-arsênio (DMA) monometil-arsênio (MMA). As formas inorgânicas de As são mais tóxicas que as orgânicas. Patologias como hipertensão, diabetes e vários tipos de câncer estão associados com a exposição ao As inorgânico. Dentre as muitas fontes de exposição a este elemento químico, o arroz (*Oryza sativa* L.), tem sido destacado como uma das maiores fontes de exposição em populações não expostas diretamente ao As presente na água. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a bioacessibilidade *in vitro* do As presente no arroz e avaliar em camundongos *Swiss* o acúmulo do semimetal nos tecidos bem como, possíveis alterações nos parâmetros redox em fígado e músculo decorrente do consumo de arroz contendo As. Para isto, na primeira etapa do estudo, o cultivar de arroz BR IRGA 409 foi plantado e divido em 2 grupos onde o primeiro foi chamado de As (-) (sem adição de As no solo) e outro plantado em solo contaminado com As na concentração de 10 mg/Kg, chamado de As (+). Após a colheita, foi verificado que o arroz do grupo As (+) apresentava uma maior concentração de As total no grão. Foram realizados testes de bioacessibilidade que demonstraram uma alta bioacessibilidade do As presente no arroz, principalmente das formas inorgânicas. Foram preparadas duas rações com o arroz plantado para administrar em 2 grupos de camundongos *Swiss*. Após o tratamento crônico por 100 dias, os amimais foram eutanasiados e coletados órgãos para avaliar o acúmulo do metaloide. Os tecidos que apresentaram um maior acúmulo de As foram bexiga, pelo, rim, baço, testículo, pele e fígado. Além disso, foram realizadas biópsias de músculo e tecido permeabilizados e determinação de parâmetros redox. Não foram observados diferenças estatísticas nas respirações do músculo e fígado. No entanto, observou-se, um aumento na formação de espécies reativas de oxigênio no fígado no grupo As (+), na presença de piruvato. Também foi demonstrado que nos animais expostos a uma maior concentração de As através da dieta ocorreu alterações na atividade enzimática e aumento da peroxidação lipídica. Finalmente, os resultados deste estudo demonstraram que o As inorgânico acumulado nos grãos de arroz se apresentam bioacessiveis e após a exposição pela dieta se distribuem por vários tecidos, levando a alterações em parâmetros redox no fígado.

Palavras-chave: Arroz *(Oryza sativa L.)*, Arsênio, Parâmetros redox

ABSTRACT

MARTINS JÚNIOR, A. C. **Arsenic in rice: bioaccessibility *in vitro* and changes in redox parameters in *Swiss* mice exposed by diet**. 2017. 103f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Arsenic (As) is a metalloid, widely distributed throughout the Earth's crust. Arsenic. It can be found in inorganic forms such as (As^{5+}) and arsenite (As^{3+}) and organic compounds such as arsenobetaine (AsB), dimethyl-arsenic (DMA) and monomethyl-arsenic (MMA). Inorganic forms of As are more toxic than organic forms. Pathologies such as hypertension, diabetes and various types of cancer are associated with exposure to As inorganic. Among the many sources of exposure to this chemical element, rice (Oryza sativa L.) has been reported as the major source of human exposure in populations not exposed directly to As present in the water. In this sense, the objective of this study was to evaluate the *in vitro* bioaccessibility of As present in rice and to evaluate in *Swiss* mice the accumulation of semimetal tissues as well as possible changes in the redox parameters in liver and muscle of these animals by consumption of rice containing As by diet. For this, in the first stage of the study, rice cultivar BR IRGA 409 was planted and divided into 2 groups where the first was called As (-) (without addition of As in soil) and another planted in soil contaminated with As in concentration of 10 mg / kg, called As (+). After harvest, it was verified that the rice of the group As (+) had a higher concentration of As total in the grain. Bioaccessibility tests were performed that demonstrated a high bioaccessibility of As present in rice, mainly inorganic forms. Two feed were prepared with the planted rice to be administered in 2 groups of *Swiss* mice. After the chronic treatment for 100 days, the animals were euthanized and organs were collected to evaluate the accumulation of the metalloid. The tissues that presented a greater accumulation of As were bladder, hair, kidney, spleen, testicle, skin and liver. In addition, permeabilized muscle and tissue biopsies were performed and redox parameters were determined. No changes were observed on muscle and liver breathings. However, there is an increase in the formation of reactive oxygen species in the liver in the As (+) group in the presence of pyruvate. It has been also demonstrated that in animals exposed to a higher concentration of As through diet there were changes in enzymatic activity and increased lipid peroxidation. Finally, the results of this study demonstrated that the As inorganic accumulated in the rice grains are bioaccessible and after dietary exposure they are distributed through several tissues, leading to changes in redox parameters in the liver.

Keywords: Rice *(Oryza sativa L.)*, Arsenic, redox parameters.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Metabolismo do arsênio no ser humano.....8

Figura 2: Mecanismos pelo qual o As induz disfunção mitocondrial e estresse oxidativo 13

Figura 3: Principais partes da planta do arroz (*Oryza sativa L.*).....18

Figura 4: Etapas do plantio.....29

Figura 5: Cromatogramas típicos obtidos da análise de especiação química de arsênio (expresso como arsênio, *m/z*=75). 43

Figura 6: Variação da massa corporal dos camundongos durante o período de 100 dias de tratamento.....46

Figura 7: Distribuição da concentração do As nos tecidos (ng/g).....48

Figura 8: Experimento demonstrando a respiração de fígado realizado no oxígrafo. 61

Figura 9: Curva de decaimento da concentração de glicose plasmática nos animais dos grupos As (-) e As (+) nos primeiros 20 minutos após a injeção de insulina. 66

Figura 10: Taxas respiratórias do músculo sóleo nos estados.....68

Figura 11: Razões entre as velocidades de ATP, oligomicina e CCCP obtidas da respiração do músculo sóleo permeabilizado.....69

Figura 12: Atividade da citrato sintase no sóleo de camundongos.....69

Figura 13: Geração de EROs no sóleo.....70

Figura 14: Taxas respiratórias do fígado nos estados.....71

Figura 15: Razões entre as velocidades de ATP, oligomicina e CCCP obtidas da respiração do tecido hepático permeabilizado 73

Figura 16: Atividade da citrato sintase no fígado.....74

Figura 17: Formação de EROs no tecido hepático permeabilizado. 76

Figura 18: Atividade das enzimas antioxidantes 77

Figura 19: Peroxidação lipídica. 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies químicas de arsênio, suas respectivas abreviaturas e fórmulas estruturais. Adaptado de Barra et al. (2000) e Souza et al. (2015). 5

Tabela 2 - Programa de aquecimento do forno de microondas utilizado para digestão das amostras de arroz. 30

Tabela 3 - Condições operacionais do ICP-MS para determinação da concentração de arsênio total. 31

Tabela 4 - Condições operacionais do HPLC para as análises de especiação química de As. 32

Tabela 5 - Composição nutricional da dieta habitual para camundongos. 33

Tabela 6 - Concentração de As, Cd e Pb nos componentes da ração. 34

Tabela 7 - Concentração de elementos tóxicos e essenciais nos grãos de arroz..... 39

Tabela 8 - Concentração e fração bioacessível do arroz plantado e da ração preparada com arroz. 41

Tabela 9 - Concentração bioacessível e % bioacessível em relação ao total das amostras estudadas 44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AsB: Arsenobetaína

AsC: Arsenocolina

AS3MT: Arsênio metiltransferase

ATP:Aadenosina trifosfato

ATSDR: Agency for Toxic Substances and Disease Registry

CAT: catalase

CCCP: carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona

DMA: dimetil-arsênio

E: Estado *Noncoupled*

EFSA: European Food Safety Authority

EROs: Espécies reativas de oxigênio

ERNs: Espécies reativas nitrogenadas

FAO: Food and Agriculture Organization

GPx: Glutationa peroxidase

GR: Glutationa redutase

GSH: Glutationa

GSSG: Glutationa reduzida

GSTO1: Glutationa S-transferase omega-1

H_2O_2: Peróxido de hidrogênio

IARC: International Agency for Research on Cancer

ICP-MS: Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado

L: Estado *Leak*

MMA: Monometil-arsênio

NIST: National Institute of Standards and Technology

$O_2^{\bullet}$: Ânion superóxido

$^{\bullet}OH$ Radical hidroxila

OMS: Organização Mundial de Saúde

P: Estado *Coupled*

SAH: S–adenosil homocisteína

SAM: S-adenosil metionina

SOD: Superóxido dismutase

TMAO: Óxido de tri-metil arsênio

UV/VIS : Ultravioleta / visível

LISTA DE SÍMBOLOS

As: Arsênio

As^{3+}: Arsenito

As^{5+}: Arsenato

Ca: Cálcio

Cd: Cádmio

Co: Cobalto

Mg: Magnésio

P: Fósforo

Pb: Chumbo

Se: Selênio

Zn: Zinco

® Marca registrada

µ micro

®

SUMÁRIO

1 Revisão da Literatura 1
1.1 Arsênio: aspectos gerais 2
1.2 Toxicocinética do As 6
1.3 Toxicodinâmica do As 9
1.3.1 As e mitocôndria 11
1.4 Fontes de exposição ao As 14
1.4.1 As na água 14
1.4.2 As e alimentos 16
1.4.2.1 As e arroz 17
1.5 Bioacesssibilidade e Biodisponibilidade 21
1.6 Estudos toxicológicos em contaminantes de alimentos 22

Capítulo I: Avaliação da bioacessibiliadade *in vitro* de As em arroz e a distribuição do semimetal em tecidos de camundongos *Swiss* expostos pela dieta 25
1 Introdução 25
2 Objetivos 26
3 Metodologia 26
3.1 Plantio do arroz 26
3.1.1 Preparo do solo para o plantio do arroz 26
3.1.1.1 Plantio das mudas e transplante para os vasos 27
3.2 Determinação de As total e espécies de As e de elementos químicos (tóxicos e essenciais) nos grãos de arroz 30
3.3 Preparo da ração para consumo dos animais 32
3.4 Ensaio de bioacessibilidade 34
3.4.1 Solução gastrointestinal 35
3.4.2 Solução intestinal 35
3.4.3 Digestão gástrica 35
3.4.4 Digestão intestinal 36
3.5 Tratamento dos animais 36
3.6 Determinação de As nos tecidos de camundongos *Swiss* 37
3.7 Análise Estatística 38
4 Resultados e discussão 38
4.1 Determinação da concentração de As e outros elementos químicos 38

4.2 Estudo de bioacessibilidade 40
4.3 Determinação da concentração de As nos tecidos dos animais expostos 46
5 Conclusão 54

Capítulo II: Avaliação de parâmetros redox em fígado e alterações mitocondriais em músculo e fígado de camundongos *Swiss* decorrente do consumo de arroz contendo As 56
1 Introdução 56
2 Objetivos 58
3 Metodologia 58
3.1 Tratamento dos animais 58
3.2 Avaliação da sensibilidade à insulina: ITT (Teste de tolerância à insulina) 58
3.3 Ensaios utilizando tecidos permeabilizados 59
3.3.1 Meios utilizados 59
3.3.2 Permeabilização dos tecidos 60
3.3.2.1 Sóleo 60
3.3.2.2 Fígado 60
3.3.3 Determinação do consumo de oxigênio dos tecidos 60
3.3.4 Estimativa da produção de espécies reativas de oxigênio 62
3.4 Dosagem de proteínas 62
3.5 Determinação da atividade da enzima citrato sintase 63
3.6 Determinação da atividade da catalase 63
3.7 Determinação da atividade glutationa peroxidade 64
3.8 Determinação do Malondialdeído 64
3.9 Análise estatística 64
4 Resultados e discussão 65
4.1 Músculo esquelético sóleo. 65
4.2 Fígado 70
5 Conclusão 78

Conclusão Geral 80

Referências 82

Anexo 102

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Arsênio: aspectos gerais

A palavra arsênio deriva da palavra persa “Zarnikh”, traduzida para o grego como “arsenikon”. O arsênio (As) era conhecido no passado como o “veneno” dos reis e o rei dos “venenos” (KLAASSEN, 2008). No início do século XVII na Itália, a *Acqua Toffana* era um cosmético que continha As, utilizado por mulheres com a finalidade de assassinarem seus maridos. No século XIX, na Europa, fazia parte do cotidiano, sendo empregado para uma ampla gama de propósitos, desde pigmentos de papel de parede a medicamentos, comumente vendidos em lojas farmacêuticas até assassinatos, devido à dificuldade de identificação do elemento químico no corpo das vítimas (BERTOMEU-SANCHEZ, 2016).

No passado os compostos de As, especialmente o trióxido de arsênio (As_2O_3), eram utilizados nos tratamentos de doenças como sífilis e tripanossomíase e, atualmente, ainda pode ser encontrado em medicamentos utilizados no tratamento contra leucemia promielocítica (SOIGNET et al., 2001).

O As é um semimetal (metaloide), cristalino, acinzentado, número atômico 33, massa atômica 75 uma, encontrado em diferentes estados de oxidação (- 3, 0, +3 e +5) dependendo da condição físico-química predominante do meio ambiente. (HUGHES, 2002). É o vigésimo elemento mais abundante na crosta terrestre, onde ocorre naturalmente no solo e em rochas podendo ser transportado através da poeira pelo vento e entrar nos corpos d´água pelo escoamento superficial e lixiviação, sendo encontrado em vários compartimentos ambientais como: na atmosfera, água, solo, sedimentos e organismos (JOSEPH, DUBEY,McBEAN, 2015). A permanência e liberação do As para o ambiente pode ocorrer por meio de fontes naturais como atividades vulcânicas quanto por fontes antropogênicas como

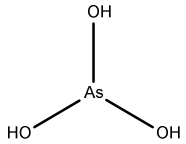
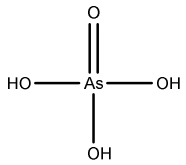
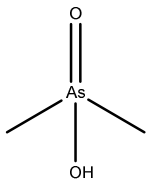
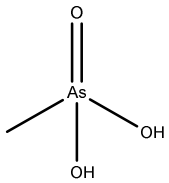
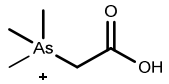
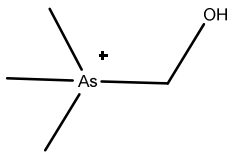
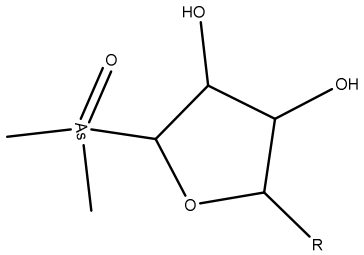
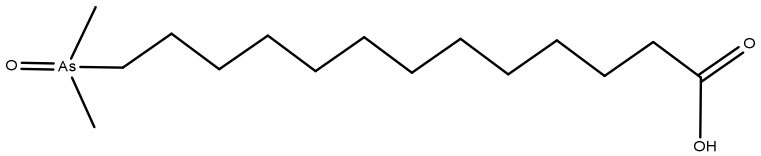
queima de carvão, utilização em lavouras de praguicidas contendo As e água contaminada (ATSDR, 2013; JOSEPH, DUBEY, McBEAN, 2015).

O As pode ser encontrado no meio ambiente em formas inorgânicas: arsenato (As^{5+}) e arsenito (As^{3+}) e orgânicas como arsenobetaína (AsB), dimetil-arsênio (DMA), monometil-arsênio (MMA), entre outras (BASU et al., 2001). A tabela 1 apresenta as formas de As encontradas na natureza e suas respectivas fórmulas estruturais. Há considerável diferença na toxicidade do semimetal conforme sua forma química (RATNAIKE, 2003). De acordo com Borba et al. (2009), a ordem crescente de toxicidade dos compostos de As é: compostos orgânicos de As^{5+} < compostos orgânicos de As^{3+} < compostos inorgânicos de As^{5+} < compostos inorgânicos de As^{3+} .

As formas inorgânicas mais tóxicas de As são as formas predominantes encontradas em reservatórios superficiais e águas subterrâneas, uma vez que pode ser facilmente solubilizado, em função do pH, estado de oxidação e temperatura, fatores adicionais que favorecem a solubilização do As é a presença de silicato, bicarbonato e de matéria orgânica nas águas de poços artesianos (ERCAL; GURER-ORHAN; AYKIN-BURNS; 2001, NORDSTROM, 2002). De fato, muitas águas geotermais contêm altas concentrações de As, maiores do que o padrão de água potável de 10 µg/L devido a composição geológica das rochas presentes nestes locais. (NORDSTROM, 2002; ATSDR, 2013). Portanto, a água se caracteriza como uma importante fonte de exposição ao As, especialmente na Índia, Bangladesh, China, e alguns países da América do sul e Central onde a concentração no solo aumenta sua presença na água (BRINKEL, KHAN, KRAEMER, 2009), frequentemente utilizada para consumo e irrigação (WILLIAMS et al., 2006).

Na intoxicação aguda por As, observa-se um quadro clínico gastroenterítico grave com início após 30 minutos de exposição, que incluem náuseas, vômitos, dor abdominal intensa, diarréia (frequentemente sangrenta), salivação excessiva, etc. (ATSDR, 2013, MAZUMDER, 2008; RATNAIKE, 2003). A exposição crônica é observada ocupacionalmente e em pacientes tratados com compostos contendo As, além de populações expostas através da água contaminada (WHO, 2001; ATSDR, 2013). Esta exposição tem sido associada com possíveis efeitos à saúde, tais como hipertensão, doença cardiovascular, doença pulmonar, disfunções reprodutivas, neurológicas, alterações hematológicas e câncer (WAALKES et al., 2004; GOPALKRISHNAN , RAO, 2006; SANTRA et al., 2007). Os efeitos à saúde humana na toxicidade crônica são conhecidos como arsenicose, caracterizada pela hiperpigmentação da pele e queratose (MAZUMDER, 2008).

Tabela 1 - Espécies químicas de arsênio, suas respectivas abreviaturas e fórmulas estruturais. Adaptado de Barra et al. (2000) e Souza et al. (2015).

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)	

1.2 Toxicocinética do As

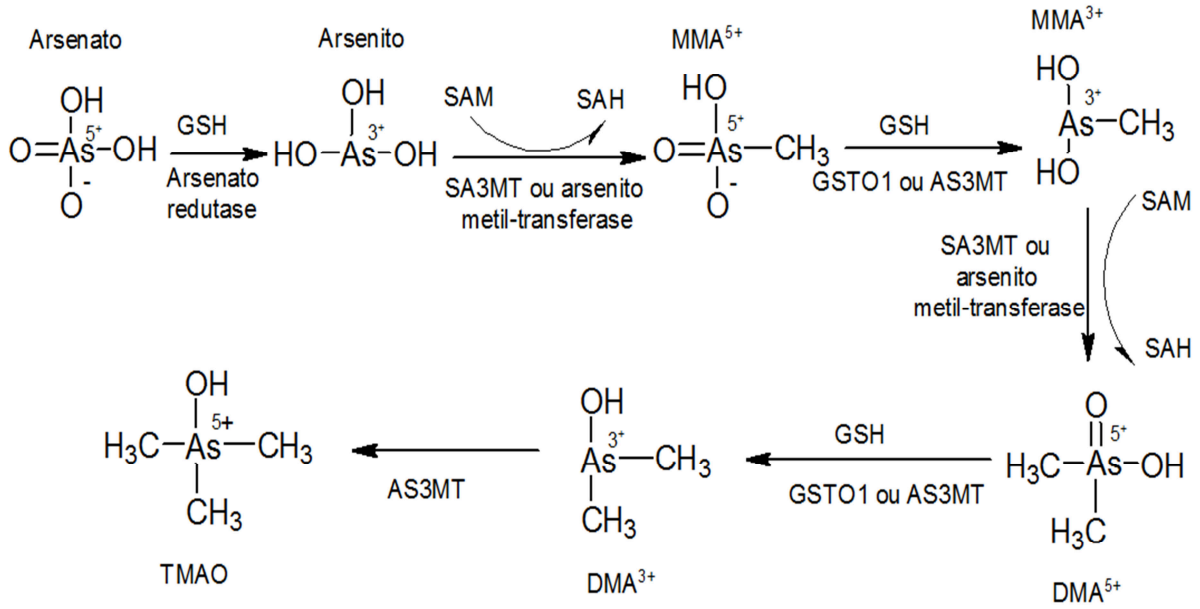
No homem, o As pode ser absorvido por via oral, inalação e contato dérmico (Ratnaike, 2003, ATSDR, 2013). Os compostos de As são facilmente absorvidos, tanto por via oral quanto pela inalação, onde a extensão da absorção depende da solubilidade de cada composto (WATANABE, HIRANO 2013). A absorção do As inorgânico (As-i), através do pulmão é estimada em 30-60%, e cerca de 95% do As trivalente ingerido é absorvido a partir do trato gastrointestinal. Alguns estudos mostram que a absorção de MMA e DMA via trato gastrointestinal corresponde a cerca de 75 a 85%, (SIROT et al. 2009, SUZUKI et al. 2013, WATANABE, HIRANO. 2013). Uma vez na corrente sanguínea, 95 a 99% do As é distribuído aos eritrócitos, ligado principalmente à hemoglobina e em menor escala aos leucócitos e às proteínas do plasma (ATSDR, 2013). Decorridas cerca de 24 horas neste compartimento, o As é distribuído para a maioria dos tecidos (JOLLIFFE,1991; SCHOOLMEESTER, WHITE,1980; ATSDR, 2013). Compostos inorgânicos solúveis são distribuídos rapidamente para órgãos ou tecidos ricos em grupamentos sulfidrila como fígado, rins, baço e glândulas adrenais (QUATREHOMME et al., 1992). Em razão da grande afinidade por ligação aos grupos sulfidrila, compostos de As podem ser detectados em altas concentrações no cabelo, unhas e pele de 2 a 4 semanas da exposição. Após 4 semanas, o As acumula-se nos ossos, coincidindo com a diminuição das concentrações no fígado e rins (JOLLIFFE,1991 ; SCHOOLMEESTER, WHITE,1980).

A biotransformação e a toxicidade dos compostos inorgânicos e orgânicos de As diferem-se substancialmente (NEMETI, GREGUS; 2002; ATSDR, 2013). As formas inorgânicas sofrem metilação formando o ácido monometil-arsônico (MMA) e

o ácido dimetil-arsínico (DMA). Este processo começa quando o As^{5+} (arsenato) é rapidamente reduzido pela enzima arsenato redutase a As^{3+} (arsenito) (APOSHIAN e APOSHIAN, 2006) que é 60 vezes mais tóxico que o As^{5+}. O As^{3+} sofre então uma metilação oxidativa, com S-adenosilmetionina (SAM) como doador do grupamento metil, formando o ácido mono-metil-arsonato (MMA^{5+}). Este composto é reduzido ao ácido monometil-arsônico (MMA^{3+}) antes de um subsequente passo de metilação oxidativa produzindo o ácido dimetil arsínico (DMA^{5+}) e sequencialmente, ao ácido dimetil-arsinoso (DMA^{3+}) por metil-transferases (KLAASSEN, 2008 WATANABE, HIRANO 2013). Portanto, os compostos inorgânicos (arsenito e arsenato) são metabolizados a MMA e DMA, por meio de dois processos: reações de óxido/redução e reações de metilação (ROSSMAN, 2003; NEMETI, GREGUS; 2002). A Figura 1 demonstra os processos descritos anteriormente. Os metabólitos metilados são menos reativos com os componentes do tecido, menos tóxicos e mais facilmente excretados na urina que o As inorgânico (VAHTER, CONCHA e NERMELL, 2000).

O As inorgânico é excretado 45-85% na urina dentro de 1-3 dias e muito pouco eliminado pelas fezes (APOSTOLI et al 1999;. BUCHET et al, 1981; ATSDR, 2013). Já a eliminação das formas orgânicas MMA e DMA ocorre principalmente através da urina (75-85%), no prazo de 1 dia (BUCHET et al, 1981, MARAFANTE et al, 1987; ATSDR,2013).

Figura 1: Metabolismo do arsênio no ser humano



Legenda: GSH: glutationa reduzida; AS3MT: arsênio metiltransferase (Cyt 19); SAM: S-adenosil metionina; SAH: S–adenosil homocisteína; GSTO1: glutationa S-transferase omega-1; MMA^{5+}: ácido mono-metil arsônico; MMA^{3+}: ácido mono-metil arsonoso; DMA^{5+}: ácido di-metil arsínico; DMA^{3+}: ácido di-metil arsinoso; TMAO: óxido de tri-metil arsênio (Adaptado de KLAASSEN, 2008)

Entretanto, fatores relacionados ao indivíduo podem alterar o metabolismo do As, ocorrendo grandes variações na metilação devido à idade, sexo, etnia, dose de exposição, gravidez, estado nutricional e polimorfismos genéticos do indivíduo (VAHTER 2000; VAHTER, CONCHA e NERMELL, 2000). Apesar de vários grupos étnicos parecerem semelhantes quanto à distribuição relativa média do As e seus metabólitos na urina, há certas exceções, como os indígenas do norte da Argentina, que excretam uma baixa percentagem de MMA, e indivíduos de Taiwan, que excretam em média 27% (VAHTER et al., 1995; CHIOU et al., 1997; CONCHA, NERMELL e VAHTER, 1998). Nota-se também que os homens são mais susceptíveis que as mulheres aos efeitos na pele relacionadas ao As, devido à menor capacidade de metilação pelos homens (GUHA MAZUMDER et al., 1998; KADONO et al., 2002; CHEN et al., 2005; VAHTER et al., 2007). Durante a gestação há um aumento na excreção urinária de DMA e uma diminuição de espécies

inorgânicas e MMA, que pode afetar o desenvolvimento fetal (HOPENHAYN et al., 2003). Já está bem estabelecido que uma diminuída capacidade de metilação do arsênio está relacionada ao aumento de arsênio nos tecidos em geral o que, provavelmente, corresponde ao aumento de toxicidade deste elemento (MARAFANTE e VAHTER, 1984; MARAFANTE, VAHTER e ENVALL, 1985; CONCHA, NERMELL e VAHTER, 1998).

1.3 Toxicodinâmica do As

O modo de ação do As é bastante complexo e para compreendê-lo, determinantes multifatoriais precisam ser abordadas (FLORA, 2011). Estes determinantes variam de acordo com propriedades físico-químicas, tais como o estado de valência (trivalente/pentavalente), o grau de metilação, atração e repulsão eletrostática de sítios ativos em macromoléculas importantes (lipídios, proteínas, DNA), e fatores relacionados à toxicocinética (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) (ERCAL; GURER-ORHAN; AYKIN-BURNS, 2001; FLORA, 2011).

Vários estudos epidemiológicos relacionam a intoxicação por As com incidência de câncer (CHEN et al., 1992; KITCHIN, 2001), doenças cardiovasculares (WANG, et al., 2007; RAHMAN et al., 1999) e diabetes (RAHMAN et al., 1998; TSENG et al., 2000). Embora o mecanismo pelo qual o As induz essas doenças não esteja completamente elucidado, estudos sugerem que o estresse oxidativo induzido pelo semimetal seja um dos principais contribuintes (KITCHIN, 2001; FLORA, 2011).

O estresse oxidativo pode ser conceituado como um desequilíbrio entre a geração e eliminação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogenadas (ERN) resultando na alteração do estado redox celular (WANG & MICHAELIS, 2010).

Portanto, quando ocorre um aumento na formação de ERO e ERN e baixa eliminação pelo sistema antioxidante, a sobrecarga de ERO causa danos às células pela oxidação de biomoléculas celulares, incluindo ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos (LOBO et al., 2010).

Neste sentido, o As pode induzir estresse oxidativo pela formação e acúmulo de radicais livres em células (HALLIWELL, WHITEMAN, 2004; FLORA, 2011). As principais espécies reativas formadas por As incluem ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), o radical hidroxila ($^{\bullet}OH$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete ($^1O_2$) e radicais peroxil (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). Yamanaka e colaboradores (1989; 1990) foram os primeiros a demonstrar que o As induzia a formação de radicais livres e que estes levavam a dano no DNA. Sabe-se ainda que o As afeta intensamente as enzimas que metabolizam as ERO, as chamadas enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPx) e glutationa redutase (GR) (FLORA, 2011). Geralmente, a exposição de curto prazo e a baixas concentrações do elemento químico resultam em um aumento na atividade destas enzimas, enquanto que a exposição crônica normalmente resulta na sua redução (FLORA, 2011). Além disso, o As também é conhecido por regular a atividade de tioredoxina redutase, heme oxigenase-redutase, e da NADPH-oxidase *in vitro* (SHI, 2004; KITCHIN; CONOLLY, 2010).

Recentemente, Xu et al. (2017) em uma meta-análise, em que foram incluídos 58 estudos, observou que a exposição ao As geralmente suprimia os níveis de atividade de antioxidantes como GSH, CAT, GPx, SOD, GR e glutationa s-transferase (GST)). No entanto, também se observou que a exposição está associada ao aumento nos níveis de oxidantes como a glutationa oxidada (GSSG)

malondialdeído (MDA) e de EROs, detectando assim uma relação positiva entre a exposição ao As e dano oxidativo causado em ratos ou camundongos

1.3.1 As e mitocôndria

A mitocôndria desempenha um papel central no metabolismo energético, responsável pela grande maioria da síntese de adenosina trifosfato (ATP) conduzida pelo catabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos. Sendo assim, esta organela é responsável por uma grande quantidade de reações de oxidação-redução, cujo resultado final dessas reações é a formação de energia química, o ATP (TAHARA et al. 2009).

A cadeia de transporte de elétrons mitocondrial é a principal fonte de geração de ATP na célula de mamíferos. Durante a passagem de elétrons pela cadeia transportadora de elétrons, um pequeno fluxo de elétrons escapa e reage prematuramente com o oxigênio, formando superóxido, que contribui para o desenvolvimento do estresse oxidativo (VALKO et al., 2004). Os complexos I e III da mitocôndria, são as principais fontes de geração de superóxido liberando-o na matriz e no espaço extramitocondrial (MULLER, LIU, VAN REMMEN, 2004). O estresse oxidativo gerado pelas ERO provoca uma desorganização mitocondrial (SANTRA et al.,2007) desencadeando uma cascata de eventos como a liberação do citocromo c, a ativação de proteínas e fatores pró apoptose (MISHRA, MEHTA, FLORA, 2008).

Os compostos que interagem com as membranas mitocondriais perturbando a eficiência de acoplamento entre a oxidação e fosforilação promovem grandes déficits de bioenergética que levam à perda de várias funções vitais para a sobrevivência da organela (FISKUM et al., 1999;. MATTIASON et al., 2003). Neste sentido, elementos

químicos tóxicos têm sido reportados como causadores de danos na mitocôndria. (BLAJSZCZAK, BONINI 2017; HOSSEINI et al. 2013; JOMOVA et al. 2010). De fato, as mitocôndrias são os principais alvos de intoxicação pelo As, seja indiretamente, através do acúmulo de radicais livres ou diretamente através de condensação da matriz mitocondrial e a abertura de poros de transição de permeabilidade em virtude de sua propriedade oxidante tiol, levando a uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial (PULIDO, PARRISH, 2003). Isso ocorre devido à membrana mitocondrial conter lipídeos não saturados que são susceptíveis ao ataque do As em comparação com outras organelas. Além disso, enzimas mitocondriais que contêm grupamento tiol são alvos de espécies de As. E ainda, o dano direto em proteínas mitocondriais pode diminuir a afinidade por substratos ou coenzimas e, assim, interromper as funções da mitocôndria (LIU et al., 2002).

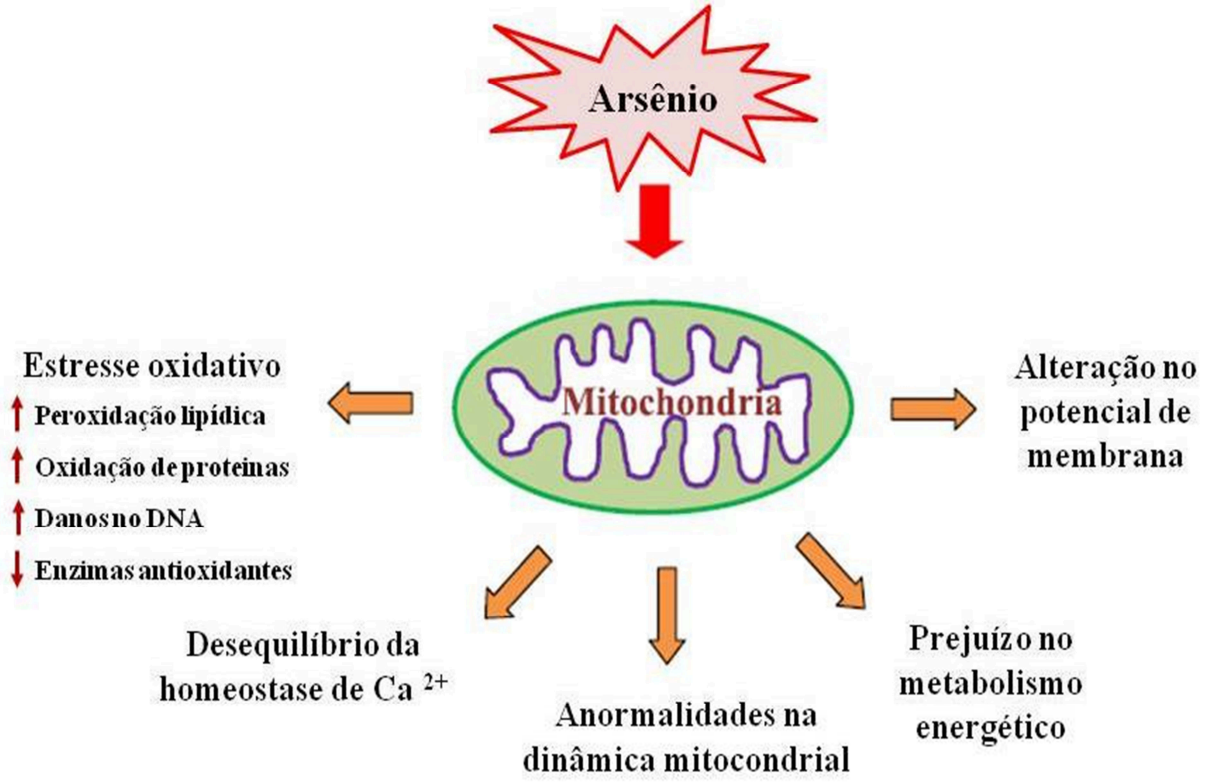
Portanto, a disfunção mitocondrial é provocada pelo aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial e perda de potencial de membrana (KOYA et al., 2000), uma vez que o As provoca o declínio rápido do potencial de membrana mitocondrial induzindo alterações morfológicas na integridade mitocondrial. Alterações mitocondriais podem ser consideradas sítios primários na formação descontrolada de ânion superóxido. O colapso do complexo de poros de transição de permeabilidade pode induzir a perda irreversível do potencial da membrana, que precede manifestações de apoptose e ativação de caspases (JOMOVA et al. 2010, GREEN, REED, 1998; KROENER, 1999).

Ainda, estudos sugerem que o As pode causar disfunção mitocondrial pelo aumento da captura de Ca^{2+} pela mitocôndria, uma vez, que o Ca^{2+} livre intracelular atua como um mensageiro para regular o crescimento, a diferenciação e a morte celular (ORRENIUS et al., 2003). Este aumento no Ca^{2+} intracelular pode estar

envolvido na ativação das vias que conduzem a uma perda de integridade da membrana, alteração na composição lipídica, anormalidades do citoesqueleto e geração de radicais livres (GIBSON et al. 2012).

Portanto, as alterações que o As induz nas enzimas antioxidantes, bem como na função mitocondrial com a geração de ERO, levam ao estresse oxidativo, podendo resultar em peroxidação lipídica (VIZCAYA-RUIZ et al., 2009), danos em proteínas (MAHATA et.al, 2008) e danos ao DNA (TOKAR et al., 2010). O mecanismo pelo qual o As induz estresse oxidativo e disfunção mitocondrial esta demonstrado na Figura 2.

Figura 2: Mecanismos pelo qual o As induz disfunção mitocondrial e estresse oxidativo



Legenda: Adaptado de Park et al. 2016.

1.4 Fontes de exposição ao As

1.4.1 As na água

Como descrito anteriormente, uma das principais fontes de exposição ao As é através da água contaminada pelo semimetal. Esta contaminação é um grave problema de saúde pública principalmente no oeste da Índia e em Bangladesh (delta de Bengala ou delta do Ganges) (EDMUNDS et al., 2015; BHOWMICK et al., 2018; JOSEPH, DUBEY,McBEAN, 2015). Para diminuir os problemas relacionados à água contaminada com microrganismos que causavam doenças como a cólera e verminoses, levando à alta incidência de disenteria na região, os governos locais juntamente com a Organização Mundial da Saúde (OMS), decidiram realizar a perfuração de poços artesianos. Porém, sem o conhecimento prévio da composição do solo, mais especificamente relacionado a presença de elementos tóxicos, como o As. A água subterrânea (poços artesanais) foi usada pela população para beber como uma fonte de água potável e também para outros propósitos domésticos (BHOWMICK et al., 2018).

Infelizmente, a alta concentração de As na água levou a um surto maciço de problemas de saúde em decorrência do consumo de água contaminada. A primeira incidência de contaminação por As nas águas subterrâneas foi relatado em 1984 (GARAI et al., 1984) e o primeiro diagnóstico de intoxicação por As foi realizado no Departamento de Dermatologia da Escola de Medicina Tropical de Calcutá no início da década de 1980, onde a toxicidade crônica do As foi detectada a partir de1068 pacientes que estavam usando regularmente água subterrânea de poços que possuíam concentrações do elemento tóxico acima de 50 µg L^{-1} (SAHA , PODDAR, 1986).

Desde então, vários estudos realizados em Bangladesh demonstraram um aumento do risco para a saúde após a ingestão de alta concentração de As nas águas subterrâneas e sua relação com aumento de câncer e doenças como hipertensão, diabetes, doença vascular periférica e outras (BHOWMICK et al., 2013, 2014; GUHA MAZUMDER et al., 1998, 2000; HAQUE et al., 2003; MANDAL et al., 2007).

Atualmente, a OMS preconiza valores máximos de 10 µg L^{-1} de As em água. Particularmente em Bangladesh, devido à alta concentração deste elemento no solo, a concentração preconizada é de 50 µg/L (WHO, 2004). A quantidade do elemento tóxico ingerido pela água depende de dois fatores que são altamente variáveis: a concentração de As em água e a quantidade de água ingerida diariamente (BHOWMICK et al. 2018). Sendo assim, além da concentração do semimetal presente na água, o volume de água ingerido também contribui para a intoxicação por As. Segundo a OMS um valor de 2 L por dia para um adulto de 60 kg é utilizado para estimar o consumo de um determinado contaminante e avaliar a qualidade da água (OMS, 2011). No entanto Hossain e colaboradores (2013) observaram uma média de ingestão de água diária de 6,1 L para homens adultos e 4,84 L para mulheres adultas em Bangladesh, demonstrando que o valor utilizado pela OMS possa estar subestimado.

No Brasil, mais especificamente na Serra do Navio (Amapá), houve a contaminação da água por As devido à atividade mineradora. Os valores encontrados na água potável, excetuando-se os valores nos pontos de rejeição da mineradora, foram em torno de 8,43 µg/L, ficando abaixo do valor máximo determinado na legislação brasileira que é de 10 µg/ L (SANTOS et al. 2003). Porém esta avaliação sem a determinação das espécies químicas do metalóide que

estavam presentes na água pode estar subestimada, pois, como mencionado anteriormente, existem diferenças nas toxicidades destas formas químicas (BORBA et al., 2009).

1.4.2 As e alimentos

O consumo de alimentos contaminados com o semimetal representa outra importante fonte de exposição (MEHARG et al., 2013; BATISTA et al., 2012). Esta contaminação pode decorrer, por exemplo, da utilização de praguicidas em lavouras. No Brasil o herbicida monosódiometil-arsonato, que possui As como um dos principais constituintes de sua formulação, é utilizado em lavouras de café e cana-de-açúcar (BRASIL, 2004).

A utilização de medicamentos veterinários e aditivos em rações de compostos contendo As, entre eles o Roxarsone® (ácido arsanílico), para promover o crescimento e prevenção de doenças como disenteria em porcos, eram permitidos nos Estados Unidos pelo "Food and Drug Administration" (FDA) como aditivos de ração para suínos e aves com dosagens de 25 a 200 mg kg^{-1} SILBERGELD, NACHMAN, 2008). No entanto foram proibidos após estudos mostrarem a presença e aumento de As inorgânico em fígado de galinhas tratadas com o medicamento em relação a galinhas não tratadas (controle), sugerindo que o medicamento poderia contaminar a carne para o consumo humano (PENG et al. 2017).

Uma importante fonte de As na dieta é a de alimentos de origem marinha como peixes, crustáceos e outros que contêm, em geral, altas concentrações de As orgânico (arsenobetaína, arsenoaçúcares e arsenolípidos) (NAVAS-ACIEN et al., 2011). As algas marinhas absorvem arseniatos, forma predominante de As na água

de mar, similar ao fosfato, e o transformam em diferentes ribosídeos contendo As. Assim, provavelmente, os organismos marinhos adquirem As inorgânico através da cadeia alimentar e o transformam em AsB, via metilação do MMA e DMA (PETROPULU, VARSAMIS e PARISSAKIS, 1997). Por outro lado, estudos que avaliaram a urina de indivíduos que consumiram frutos do mar não detectaram a presença de As inorgânico, sugerindo que a arsenobetaína e arsenocolina, encontradas em alimentos de origem marinha não são biotransformadas, sendo excretadas inalteradas na urina. (NAVAS-ACIEN et al., 2011).

1.4.2.1 As e arroz

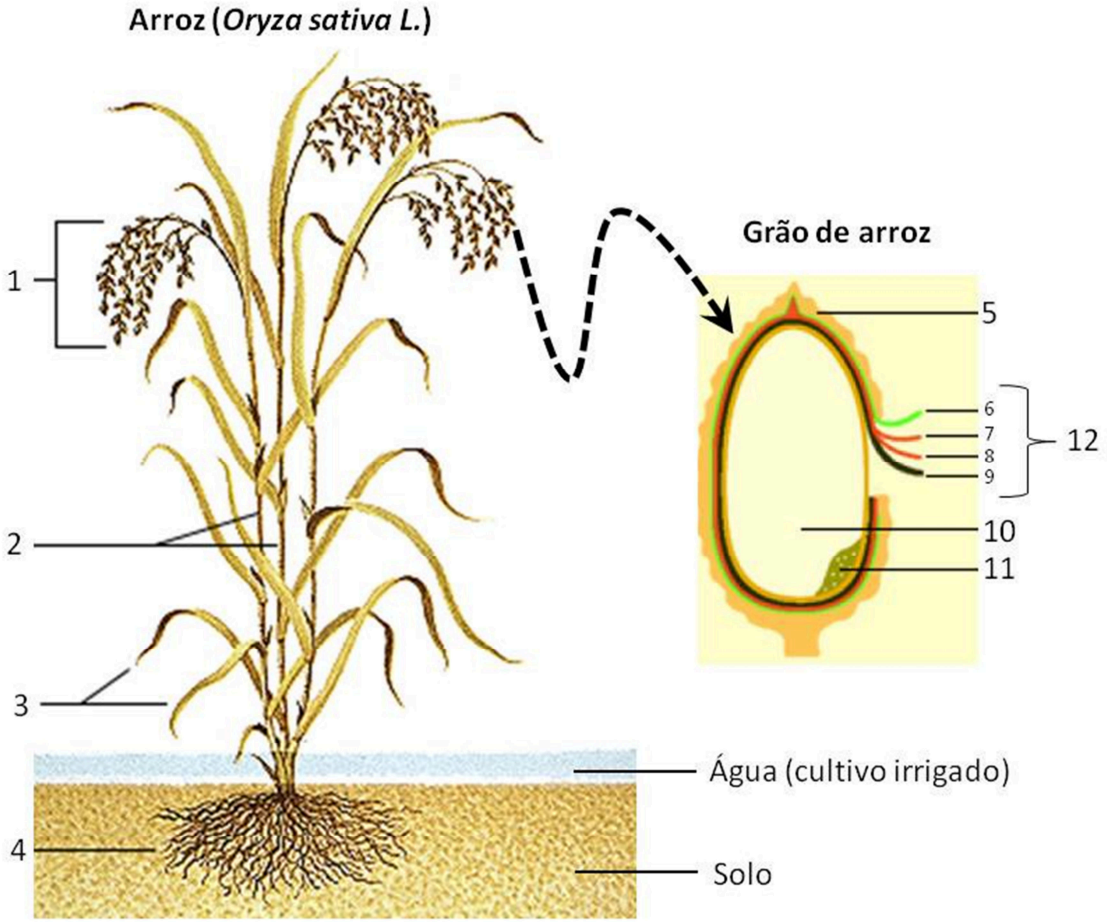
Atualmente, a exposição ao As através do consumo de arroz vem sendo amplamente estudado, tendo em vista a importância desse alimento para a população, tanto do Brasil como de vários países na América do Sul e Central, Ásia e África (CASCIO et. al, 2011; BATISTA et al., 2011, SEGURA et al. 2016; ADEYEMI et al. 2017; SOUZA et al. 2014; MEHARG et al., 2013). O arroz é o terceiro cereal mais consumido no mundo apenas atrás do milho e do trigo, chegando a mesa de mais de 50% da população mundial (EMBRAPA, 2013).

A planta do arroz (*Oryza sativa* L.) é uma monocotiledônea da família das Poaceae (gramíneas) (EMBRAPA 2013). A morfologia da planta é de fundamental importância para a compreensão da relação As e arroz. A planta do arroz se divide em quatro partes principais: raiz, folhas, caule (colmo) e a panícula, sendo esta uma inflorescência particular desta planta onde se formam os grãos, localizada sobre o último entrenó do caule e precedida pela folha-bandeira (Figura 3) (EMBRAPA 2013). Em relação à morfologia do grão, da parte externa para a parte interna tem-

se a seguinte ordem: casca, pericarpo, tegumento, nucelo, aleurona, endosperma e embrião (Figura 3).

Após a colheita, os grãos maduros podem sofrer diferentes tipos de beneficiamento. O arroz integral é o grão que não sofreu o processo de polimento, ou seja, a retirada da parte que recobre o grão que vai do pericarpo até a aleurona (também chamado farelo). Já o arroz parboilizado (do inglês "partial boiled") é aquele parcialmente cozido com a casca, onde o grão absorve nutrientes da casca como elementos químicos e vitaminas. O arroz polido que é o mais consumido é aquele cuja casca é retirada que vai do pericarpo até a aleurona (GOMES et al., 2004).

Figura 3: Principais partes da planta do arroz (*Oryza sativa L.*)



Legenda: 1: panícula; 2: colmo (caule); 3: folha; 4: raiz; 5: casca; 6: pericarpo; 7: tegumento; 8: nucelo; 9: aleurona; 10: endosperma; 11: embrião; 12: farelo (Adaptada de Gomes et al. 2004).

O Brasil é o país não asiático mais importante produtor de arroz, chegando a mais de 50 kg de arroz/habitante/ano, 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, 2013; POF 2008/2009). A produção agrícola é de mais de 13 milhões de toneladas de arroz por ano, sendo os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, responsáveis por mais de 80% da produção nacional (GOMES et al., 2004; IBGE, 2013).

O plantio do arroz pode ser realizado de duas formas: (i)- Pode ser cultivado em solo sem ser inundado por uma lâmina de água, chamado plantio sequeiro (também chamado aeróbico ou terras altas) ou (ii)- Plantado com o solo inundado (com lâmina de água), chamado cultivo irrigado (também chamado anaeróbico, terras baixas ou alagamento). Este último método é o mais utilizado, já que favorece a produtividade e, consequentemente, a absorção de elementos essenciais para a planta, no entanto também favorece a distribuição e absorção de As no solo (SCHOOF et al., 1999). Portanto, as plantas de arroz irrigado e o solo são submetidos a condições anaeróbicas que, juntamente com o excesso de água, resulta em maior mobilidade de elementos, sendo mais propenso à absorção e contaminação dos grãos (XIAO et al., 2004). Além disso, a água utilizada para a irrigação (WILLIAMS et al. 2006) e o uso de praguicidas e fertilizantes pode contaminar as plantas aumentando a concentração do semimetal nos grãos (QUAZI; SARKAR; DATTA; 2013)

Estudos têm demonstrado que o arroz e produtos relacionados a este grão são as maiores fontes de exposição humana a este elemento em populações não expostas diretamente ao As presente na água (MONDOL, POLYA, 2008; RAHMAN et al., 2009; BATISTA et al., 2011). As pesquisas envolvendo o elemento As no arroz iniciaram-se em 1999 a partir de um estudo da concentração de As em alimentos da cesta básica

nos Estados Unidos. Este estudo revelou altas concentrações de As inorgânico no arroz quando comparado a outros alimentos como por exemplo trigo e cevada (SCHOOF et al., 1999). Além disso, estudos tem demonstrado que as espécies predominantes no grão de arroz são as espécies inorgânicas do semimetal (As^{5+} e As^{3+}), justamente as consideradas formas mais tóxicas (ZAVALA et al. 2008; MEHARG et al. 2008).

No Brasil, Batista et al. (2011) determinou a concentração de As 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. Os níveis de As total nas amostras brasileiras de arroz variaram de 107 a 427 ng/g, com uma média de 222 ng/g, Além disso, as espécies de As mais encontradas na maioria das amostras foram, em ordem decrescente, As^{3+} (39,7%), DMA (38,7%), As^{5+} (17,8) e MMA (3,7%). Este estudo demonstrou que as formas mais tóxicas (As^{3+} e As^{5+}), correspondem a 57,5 % do total deste elemento presente no arroz, permitindo concluir que o arroz brasileiro representa uma fonte de exposição ao As significativa.

Diante da gama de efeitos tóxicos relatados decorrentes da exposição ao As e da sua presença nos grãos de arroz, diversos órgãos como a *Food and Agriculture Organization* (FAO) da Organização Mundial de Saúde (WHO), a *United States Food and Drug Administration* (FDA), a *Food Standards Agency* (FSA) e a *European Food Safety Authority* (EFSA) estão em intensa discussão sobre a concentração de As seguras à saúde humana (SOUZA et al., 2015). A FAO/WHO tem recomendado uma ingestão semanal tolerável provisória (PTWI) não mais que 15 µg de As inorgânico por quilo corpóreo.

A última reunião do Codex que ocorreu em Genebra em 2014 resultou em um valor preliminar para o nível máximo de As inorgânico em arroz polido de 200 ng g^{-1}

(FAO,2014). De acordo com a FAO / CODEX, os países devem realizar a especiação química para concentrações de As total quando as concentrações nas amostras forem > 200 ng/g. Por outro lado, se a concentração de As total encontrada for menor do que o valor sugerido máximo, nenhum outro teste é necessário (FAO, 2014).

1.5 Bioacesssibilidade e Biodisponibilidade

Outra questão importante a considerar é a bioacessibilidade e biodisponibilidade de As e suas espécies sobre a avaliação do risco de ingestão através do consumo de arroz (ALAVA et al., 2013; ALAVA et al., 2015; SUN et al., 2012).

Segundo o Conselho Nacional de Pesquisa (NRC) dos Estados Unidos a "biodisponibilidade" é definida como a fração de dose de um contaminante que atinge a circulação sistêmica (NRC, 2003; ROSTAMI, JUHASZ, 2011), ou seja, é a porção do analito contido no alimento ingerido que será absorvido pelo intestino e que subsequentemente alcança o sistema circulatório para ser redistribuído por todo o organismo. O analito quando levado ao fígado é biotransformado podendo exercer os efeitos tóxicos (KOCH et al., 2007; BOLAN et al. 2017).

A bioacessibilidade é um teste *in vitro* ou *in vivo* usado para prever a biodisponibilidade, fornecendo informações acerca da fração dos elementos químicos que são liberados da matriz (alimento) no trato gastrointestinal, tornando-se disponível para absorção intestinal (KOCH et al., 2011).

Recentemente, Islam et al. (2017) utilizando-se de um modelo *in vivo,* avaliou a biodisponibilidade do As em diferentes cultivares (genótipos diferentes) plantados em regiões contaminadas em Bangladesh e demonstrou uma variação entre 25% e

94% na biodisponibilidade do elemento tóxico, demonstrando que o genótipo do cultivar influencia neste parâmetro. Embora extremamente relevante a necessidade em saber a bioacessibilidade e biodisponibilidade do As no arroz, estudos que avaliam estes parâmetros em cultivares brasileiros ainda permanecem escassos.

1.6 Estudos toxicológicos em contaminantes de alimentos

Ao longo dos últimos anos, fatores como o aumento na produção de alimentos, a crescente globalização dos produtos, a utilização de equipamentos e procedimentos para armazenamento em grande escala; e poluições crescentes em todos os compartimentos ambientais estão aumentando o risco de exposição a elementos tóxicos através da ingestão de alimentos (NACANO et al. 2014; NASREDDINE E PARENT-MASSIN, 2002).

Ciminelli e colaboradores (2017) avaliaram a concentração de As em diferentes alimentos da cesta básica brasileira vendida em supermercados, entre eles, o arroz e feijão que são os alimentos mais consumidos na dieta do brasileiro. Seus resultados demonstraram que o consumo destes dois alimentos contribui entre 67% e 90% da ingestão de As total na dieta. Outra recente e importante avaliação foi a determinação das concentrações de As total e suas espécies em cultivares plantados pelo método orgânico e convencional vendidos em supermercados brasileiros. Além disso, não foram encontradas diferenças estatísticas na concentração de As total no arroz orgânico quando comparado ao arroz convencional (SEGURA et al. 2016).

Apesar do crescente número de estudos com a finalidade de identificar e quantificar elementos tóxicos em alimentos como o As, pouco se sabe sobre as

concentrações de As em amostras de cultivares de arroz brasileiro, tampouco sobre a quantidade de As presente no arroz que é absorvida pelo organismo a partir da ingestão deste alimento (BATISTA et al., 2011). 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 do semimetal em alimentos são escassos, mas de extrema importância.

Nota-se também, que apesar de vários estudos toxicológicos do As e suas espécies demonstrando que o metaloide seja capaz de promover disfunção mitocondrial e estresse oxidativo, não se sabe até o momento quais seriam as consequências do consumo do arroz contendo As sobre estes parâmetros.

Portanto, embora já descrito na literatura que a identificação e a quantificação das formas do As são determinantes na avaliação de sua real biodisponibilidade e toxicidade, estudos mais concretos da sua bioacessibilidade em alimentos e um maior entendimento dos seus mecanismos de toxicidade em decorrência do consumo de arroz, são necessários. Neste contexto, dois estudos foram propostos nesta tese, divididos em dois capítulos.

Capítulo I: Avaliação da bioacessibiliadade *in vitro* de As em arroz e a distribuição do semimetal em tecidos de camundongos *Swiss* expostos pela dieta.

Capítulo II: Avaliação de parâmetros redox em fígado e alterações mitocondriais em músculo e fígado de camundongos *Swiss* decorrente do consumo de arroz contendo As.

CAPÍTULO I

Capítulo I: Avaliação da bioacessibiliadade *in vitro* de As em arroz e a distribuição do semimetal em tecidos de camundongos *Swiss* expostos pela dieta

1 Introdução

A ingestão pela dieta de elementos tóxicos como o As representa riscos para a saúde humana e animal. Embora uma grande variedade de pessoas esteja exposta ao semimetal através do consumo de água contaminada, os alimentos também são importantes fontes de exposição para uma notável quantidade de pessoas (ARSALAN et al. 2017). Neste contexto, apesar da dieta desempenhar um papel significativo na exposição humana, poucos estudos na literatura demonstraram quais espécies de As estavam presentes nos alimentos, uma vez que as espécies orgânicas do metaloide são menos tóxicas quando comparadas com as espécies inorgânicas (BORBA et al. 2009, NAVAS-ACIEN et al., 2011, RATNAIKE, 2003). De acordo com a EFSA (2009) quase 98% dos estudos publicados em 15 países europeus consideraram a presença de As total em vários alimentos sem diferenciar espécies orgânicas e inorgânicas.

Além da determinação das concentrações totais de elementos tóxicos como As e suas espécies em alimentos, estudos de avaliação de risco também devem considerar sua bioacessibilidade, ou seja, a quantidade do composto ingerido que é solubilizado a partir da matriz do alimento após digestão gastrointestinal. Este parâmetro indica a máxima quantidade de um composto que poderá ser absorvido pelo organismo (KOCH et al., 2007; BOLAN et al. 2017).

Após a absorção da fração bioacessível, o As e suas espécies químicas podem se distribuir e concentrar nos tecidos. Neste sentido, estudos anteriores têm

demonstrado os efeitos tóxicos do semimetal em diferentes órgãos como fígado, rins, testículos, pele entre outros. No entanto estes estudos utilizam o As presente na água contaminada ou soluções contendo As e suas espécies na forma livre e não avaliam os efeitos tóxicos que esse metaloide presente em alimentos pode causar (HUGES et al. 2003; LI et al 2017, SILVA et al. 2017, SORIA et al. 2017).

Portanto, estudos utilizando alimentos como o arroz, que possui capacidade de absorver e concentrar grande quantidade de As e é consumido por cerca de 50% da população mundial, são necessários.

2 Objetivos

Determinar as concentrações de As no arroz e nas rações administradas aos animais.

Realizar estudos de bioacessibilidade *in vitro* com o arroz e a ração para determinar e quantificar as espécies químicas presentes.

Determinar as concentrações de As em tecidos de camundongos *Swiss* após exposição crônica ao As através da dieta.

3 Metodologia

3.1 Plantio do arroz

3.1.1 Preparo do solo para o plantio do arroz

O cultivar comercial BR IRGA 409 (primeiro cultivar do tipo moderno/filipino de planta, lançada em parceria pela Embrapa e IRGA no ano de 1979. Destaca-se pela

excelente qualidade dos grãos e alta produtividade (EMBRAPA, 2013). Este cultivar é proveniente do Instituto Rio Grandense de Arroz e foi plantado em estufas da Fazenda Experimental da Ouro Fino *Agrobusiness* (Guatapará, SP).

O solo de cultivo foi preparado com mistura de solo superficial, areia e matéria orgânica nas proporções 2:2:1, respectivamente. Após esta etapa foi realizada uma amostragem, coletando 10 amostras para caracterização da concentração de As presente no solo de cultivo. Aproximadamente 10 g de solo foram secas, moídas, peneiradas (< 0,5 mm) e digeridas em micro-ondas. Após o preparo das amostras estas foram analisadas por ICP-MS. Foi encontrada concentração média de As presente no solo de cultivo de 45 ± 7.2 ng. g^{-1} de solo. Esta concentração foi considerada para o preparo da solução de As, utilizada no estudo, de forma que a concentração final no solo ficasse em 10 mg de As. kg^{-1} de solo.

Esta solução de As (As^{5+}) foi preparada dissolvendo-se 1,2 g de pentóxido de As ($As_2O_5.H_2O$, Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) primeiro em hidróxido de amônio 0,18 mol L^{-1} (NH_4OH, Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) e após em ácido nítrico 0,3 mol L^{-1} (HNO_3).

Para o plantio das mudas foi utilizado substrato orgânico BIOPLANT PRATA HT, da Bioplant que tem em sua composição casca de pinus (principal matéria prima), agregantes como fibra de coco, vermiculita e nutrientes em pH de 5,5 a 6,0.

3.1.1.1 Plantio das mudas e transplante para os vasos

Esta etapa foi realizada na casa de vegetação da Fazenda Experimental da Ouro Fino (Figura 4A), na cidade de Guatapará-SP. A semeadura foi realizada em outubro de 2014, época considerada ideal para semeadura pela EMBRAPA, em

bandeja para crescimento de mudas de 7 cm de profundidade (Figura 4B) foi adicionado substrato orgânico, aguado, adicionadas 2 sementes da cultivar (Figura 4C) e identificado. A bandeja foi acondicionada em um ambiente úmido (60%) com temperatura variando entre 15 a 25 ºC por 15 dias. Depois deste prazo as mudas (Figura 4D) foram replantadas (com todo o conteúdo do pequeno vaso que a muda estava contida) em vasos maiores (tambores).

Os vasos plásticos (tambores) utilizados no plantio foram de 100 L com 30 cm de profundidade. Em cada vaso (tambor) foi colocado um saco plástico de densidade elevada para simular o plantio irrigado (evitar o extravasamento do solo ou da água de irrigação e a contaminação do ambiente com As). Em seguida foram colocados 75 kg de solo pré-selecionado (solo superficial: areia: matéria orgânica 2:2:1). Esse solo foi removido e uma muda foi transplantada (Figura 4E). Após o transplante, a muda ficou em aclimatação por uma semana. Finalmente após esse período, de 2 a 3 cm do caule foi encoberto com uma lâmina de água (sistema de inundação) e, além da água, os vasos expostos receberam 5 L de uma solução de As^{5+} a 150 mg kg^{-1}de forma que a concentração final ficasse ao redor de 10 mg de As kg^{-1} solo (Figura 4F). Os vasos foram regados diariamente pela manhã para manter o caule encoberto de 2 a 3 cm de água. A temperatura e a umidade médias da casa de vegetação foram de 21,7 ºC e 58,3% respectivamente.

Figura 4: Etapas do plantio

Legenda: a) casa de vegetação b) bandeja para crescimento das mudas c) semeadura d) mudas e) transplante da muda para o vaso (tambor) f) cultivares plantados em vasos (tambores) simulando o cultivo de arroz irrigado.

3.2 Determinação de As total e espécies de As e de elementos químicos (tóxicos e essenciais) nos grãos de arroz

Após completa maturação dos grãos das plantas, as panículas foram retiradas e os grãos descascados, moídos e tamisados (<250µm) para a análise da concentração de elementos essenciais, do As e outros elementos tóxicos presentes nos grãos. O arroz plantado sem a adição de As no solo foi considerado nosso grupo controle e chamado de As (-) e o arroz plantado em solo com adição de As, chamado de grupo As (+), que foram utilizados para a fabricação da ração dos grupos controle As (-) e exposto As (+).

O procedimento de digestão das amostras de arroz foi realizado em triplicatas de acordo com Nardi et al. (2009), utilizando 5 ml de HNO_3 20% v/v + 2 ml de H_2O_2 30% v/v + 250 mg de amostra e colocados em sistema de micro-ondas (MILESTONE ETHOS D, Itália). O programa de aquecimento esta descrito na Tabela 2.

Tabela 2 - 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
5	0	0	20

Posteriormente, as amostras digeridas 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 As no intervalo de concentração de 1 a 20 µg/L. Ródio (Rh), na concentração de 10 µg/L, foi utilizado como padrão interno.

A determinação dos elementos químicos foi realizada em um espectrômetro de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS ELAN DRC II, PerkinElmer, SCIEX, Norwalk, CT, EUA), equipado com cone de amostragem e *skimmer* de platina e operando com argônio de alta pureza (99.999%, Praxaair, Brasil). 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 condições operacionais estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3 - Condições operacionais do ICP-MS para determinação da concentração de arsênio total.

Potência de rádio frequência	1200W
Modo de varredura	*Peak hoping*
Vazão do gás (Ar)	Plasma 15 L min^{-1}; Auxiliar 1,2 L min^{-1}
Vazão do gás de nebulização	0,56-0,98 L min^{-1}
Rotação bomba Peristáltica	20rpm
Padrão interno	^{103}Rh (10µg L^{-1})
Isótopo	^{75}As
Interface	Cones de platina
Cone de amostragem	1,1mm
skimmer	0,9 mm
Resolução	0,7 u
Replicatas, *Sweeps*, Leituras	3, 40, 1

O preparo de amostras para especiação química de As e do material de referência certificado SRM 1568b Rice Flour (Arroz), proveniente do *National*

Institute of Standards and Technology (NIST, EUA) foram feitos de acordo com Batista et al., (2011). Foi utilizado como solução extratora 10 ml de HNO_3 2% (v/v) + aquecimentoa 95ºC, filtradas em filtros de celulose de 0,20 µm e injetadas em HPLC-ICP-MS. As condições cromatográficas e operacionais para a realização desta análise estão descritas na Tabela 4.

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

Coluna (troca aniônica)	Hamilton PRP-X100 (5 µm, 150 mm x 4,6 mm)
Fase móvel	10mmol L^{-1} HPO42-/H2PO4- 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

3.3 Preparo da ração para consumo dos animais

A quantidade de arroz a ser administrada aos animais foi definida com base em dados fornecidos pela Pesquisa de Orçamentos Familiares – 2008, 2009 – Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil (POF 2008/2009), mostrando que o arroz representa 20% da dieta do brasileiro. Sendo assim a ração administrada aos camundongos teve 20% de arroz. .

As amostras de arroz coletadas foram utilizadas para a produção dos *pellets* de ração, juntamente com os demais ingredientes comprados da empresa Rhoster Indústria e Comércio Ltda. Deste modo, foram produzidas duas rações, uma contendo arroz com baixa concentração de As, chamada de grupo R As (-) e outra contendo o arroz que foi plantado onde se adicionou As, que foi denominada R As (+). A Tabela 5 fornece uma composição total e detalhada da dieta habitual para camundongos. Sabe-se que as rações apresentam em sua composição farelo de arroz como um componente que pode contribuir para uma porcentagem extra de arroz aos animais. Neste estudo, o farelo de arroz foi substituído no preparo das rações pelo arroz plantado por nós 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	29,40
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
Arroz	20,00
Minerais e vitaminas	0,15
Total	100,00

Antes do preparo das rações foram determinadas as concentrações dos elementos tóxicos As, cádmio (Cd) e chumbo (Pb) nos insumos, para assegurar que os componentes da ração não apresentavam concentrações relevantes de elementos tóxicos, como demonstrado na Tabela 6.

Tabela 6 - Concentração de As, Cd e Pb nos componentes da ração.

Componente	As (ng/g)	Cd (ng/g)	Pb (ng/g)
Farelo de milho	4,9±1,2	1,3±0,2	6,5±1,5
Farelo de soja	13±0,3	16±1,2	15±7,3
Farelo de carne	17±6,7	2,8±0,6	31±5,2
Caulim	66±17	4,8±1,7	59±17
Melaço em pó	10±9,3	16±0,3	14±0,7
Sacarose	< LOD	0,1±0,03	< LOD
Fosfocálcio	104±30	238±69	108±10
Sal	0,5±0,2	0,3±0,2	2,8±1,5

3.4 Ensaio de bioacessibilidade

Uma alíquota de arroz plantado de ambos os grupos (As (-) e As (+)) foi separada para os testes de bioacessibilidade. Após o preparo das rações que seriam administradas aos animais (RAs (-) e RAs (+)), foram realizados ensaios de bioacessibilidade. A avaliação *in vitro* da bioacessibilidade foi realizada de acordo com Bertin et al., (2016) e com a Farmacopeia dos Estados Unidos (USP, 2000). O ensaio foi realizado em duas etapas, para mimetizar a solução gástrica e solução intestinal. Para verificar a exatidão do procedimento foi utilizado material de referência certificado NIST de farinha de arroz 1568b.

3.4.1 Solução gastrointestinal

A solução gástrica foi preparada dissolvendo 0,32 g de pepsina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) com 0,7 mL de HCl (36 % v/v, Synth, Brasil) 12 mol/L, seguido da adição de água deionizada para um volume de 100 mL, sendo que a pepsina foi previamente diluída em água deionizada (Millipore RiOs-DITM, Massachusetts, EUA) antes da adição do HCl. Em seguida o pH foi ajustado para 1,2 utilizando uma solução de HCl (0,1 mol/L).

3.4.2 Solução intestinal

Para o preparo da solução intestinal foram solubilizados 0,2 g de sais biliares (0,08 g de glicodeoxicolato de sódio (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) + 0,05 de taurodeoxicolato de sódio (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) + 0,08 de taurocolato de sódio hidratado (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e 0,5 g pancreatina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) em uma solução de $NaHCO_3$ (3% m/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) para 100mL.

3.4.3 Digestão gástrica

A digestão gástrica foi realizada com 200 mg de amostras (duplicata) que foram pesadas em tubo tubos cônicos de 50 mL (Falcon®, Corning, Tamaulipas, México) e adicionados 3 mL da solução gástrica a um pH de 1,2. As amostras em seguida foram colocadas no banho maria (SL1522L, Solab, Brasil) a 37° C por 2 h e agitadas periodicamente.

3.4.4 Digestão intestinal

Posteriormente a digestão gástrica, foram adicionados $NaHCO_3$ (3% m/v) para um ajuste de pH para 6,8 e em seguida adicionado 3 ml de fluído intestinal, seguido de aquecimento em banho maria a 37° C por 2 h com agitação. Por fim, após o banho termostático as amostras foram arrefecidas a temperatura ambiente e em seguida centrifugadas (SL700, Solab, Brasil) a uma velocidade de 1077 g por 20 min. Os sobrenadantes desta etapa foram separados dos precipitados e assim submetidos a digestão para a determinação da concentração dos elementos e especiação química do As como descrito na seção 3.1.1.

3.5 Tratamento dos animais

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética de pesquisa animal local (CEUA-USP), protocolo número 15.1.486.60.0 conforme demonstrado em anexo.

Após a aprovação, foram utilizados camundongos machos *Swiss* (21 dias/15 a 20 gramas) provenientes do Biotério Central da Prefeitura do campus de Ribeirão Preto. Os animais foram alojados em caixas convencionais (2 animais por caixa) e a cada 7 dias foram pesados, para verificar a massa corporal e adesão ao tratamento. Os animais foram mantidos em salas com ciclo claro/escuro de 12 horas, com umidade e temperatura controlada (22-25°C), alimentados com ração segundo seu grupo e água filtrada á vontade.

Os animais foram divididos em 2 grupos, com 6 animais em cada:

- Grupo As (-) (n=6): Controle, tratados com a ração feita a base de grãos provenientes de arroz plantado sem adição de As.

- Grupo As (+) (n=6): Tratados com a ração feita a base grãos provenientes de arroz naturalmente contendo maiores concentrações de As.

O tratamento foi realizado durante de 100 dias para ambos os grupos para mimetizar uma exposição crônica. Ao final de cada tratamento, os animais foram pesados e eutanasiados através do monóxido de carbono. Esta eutanásia se justifica, já que o uso de anestésicos para a eutanásia geralmente altera as funções mitocondriais em fígados de animais. Estas funções são o objetivo fundamental de investigação do estudo presente no segundo capítulo desta tese. Dessa forma, para melhor confiabilidade dos nossos resultados utilizamos após o monóxido de carbono o método físico de eutanásia de decapitação.

Após a eutanásia foram coletadas amostras de 12 tecidos: baço, bexiga, coração, cérebro, fígado, gastro, osso, pele, pelos, pulmão, rins, testículo para a determinação da concentração de As nos tecidos. As amostras de tecidos foram adequadamente armazenadas a -80 ºC.

3.6 Determinação de As nos tecidos de camundongos *Swiss*

As amostras de tecidos coletados dos camundongos foram previamente liofilizadas e, em seguida, preparadas para análise segundo o método proposto por Batista et al. (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 HNO_3. O 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 As 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.

3.7 Análise Estatística

As concentrações de As e outros elementos químicos estão representados pela média ± desvio padrão, enquanto as concentrações de As nos tecidos dos animais estão representados pela média ± erro padrão da média. As diferenças entre os tratamentos foram avaliadas utilizando o teste *t* de Student, utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.0 *Software*. Valores menores que 0,05 foram considerados significativos.

4 Resultados e discussão

4.1 Determinação da concentração de As e outros elementos químicos

Primeiramente foram determinadas as concentrações de As total e outros elementos tóxicos e essenciais no arroz, cultivado com a adição de As no solo (As (+)) e no arroz plantado sem adição de As no solo (As (-)). Os resultados estão demonstrados na Tabela 7.

Tabela 7 - Concentração de elementos tóxicos e essenciais nos grãos de arroz

Plantio/ Solo	As (ng/g)	Ca (µg/g)	Co (ng/g)	Cd (ng/g)	P (µg/g)	Mg (µg/g)	Se (ng/g)	Zn (µg/g)
As (-)	104± 25,9	58,5 ± 2,4	39,1± 2,2	5,2± 0,5	2874± 83	1085± 62	62 ± 2,0	24,6± 2,7
As (+)	251± 23,7	48,9± 10,4	32,6± 1,2	3,5± 0,4	2639 ± 187	955± 90	95± 9,5	25,9 ± 1,2

Os resultados demonstram que o arroz plantado em solo com a adição de As apresentou concentração 251 ± 23,7 ng/g As e estatisticamente superior ao arroz plantado sem adição de As, que apresentou 104 ± 25,9 ng/g As. Estes valores mostram a eficiência deste cereal em absorver este elemento químico do solo. Em geral, o cultivo de arroz em condições alagadas (anaeróbicas ou terras baixas), como o realizado neste trabalho, facilita a mobilidade do semimetal e aumentam a concentração desse elemento nos grãos (XU et al., 2008; LIAO et al., 2005; SAHA , ALI, 2007; LU et al., 2009; MEHARG et al., 2009).

As concentrações de As nos grãos observadas neste estudo estão em acordo com as concentrações de As nas amostras de arroz comercializadas no Brasil (variação de 107,9 a 427,7 ng/g, BATISTA et al. 2012). Por outro lado, os valores encontrados em nosso estudo são superiores aos encontrados em países como Nigéria (58.8 ± 0.7 ng/g), Canadá (65 ng/g) e Índia (45.6 ng/g) (ADEYEMI et al. 2017; WILLIAMS et al. 2005).

Plantas exibem uma capacidade diferente de absorver e translocar elementos químicos tóxicos e essenciais a partir do solo para as partes aéreas (NADIMI-GOKI et al., 2014). Em relação aos elementos essenciais nota-se que as concentrações destes apresentam-se menores no grupo As (+) em relação ao grupo As (-). Entre as

diferentes formas químicas de As presente no solo, o As^{5+} é a forma predominante em solos aeróbicos. Esta forma de As é um análogo do fosfato, podendo o As ser absorvido e transportado pelos mesmos canais de P (XU et al., 2008).

4.2 Estudo de bioacessibilidade

Estudos de bioacessibilidade *in vitro* são amplamente utilizados na literatura, para simular as condições enzimáticas e químicas que o arroz ou outro alimento esta sujeito no trato gastrointestinal (BOLAN et al. 2017, LAPARRA et al. 2005, HE et al. 2012, TRENARY et al. 2012). A Tabela 8 mostra a concentração total de As presente no arroz, a concentração bioacessível bem com a fração bioacessível. Podemos observar que a fração bioacessível do arroz As (-) (70,2%) e As (+) (55,2%), são menores que 100%, o que significa que a exposição interna ao elemento (fração bioacessível) foi menor que a exposição externa (ingestão do elemento). Estudos anteriores com arroz cultivados nos Estados Unidos demonstraram que o As bioaccessível em 31 amostras investigadas variou de 53% a 102% (HE et al. 2012). Laparra et al. (2005) testou a bioacesssibilidade de 12 amostras de arroz cozido e demonstrou que 90% do As estava bioacessível, demonstrando que o cozimento não alterou a bioacessibilidade do metaloide. Em concordância com nosso estudo, a avaliação de 17 amostras de arroz cultivada nos Estados Unidos teve um média de bioacessibilidade de 61%, variando de 45% a 79% (TRENARY et al. 2012).

Tabela 8 - Concentração e fração bioacessível do arroz plantado e da ração preparada com arroz.

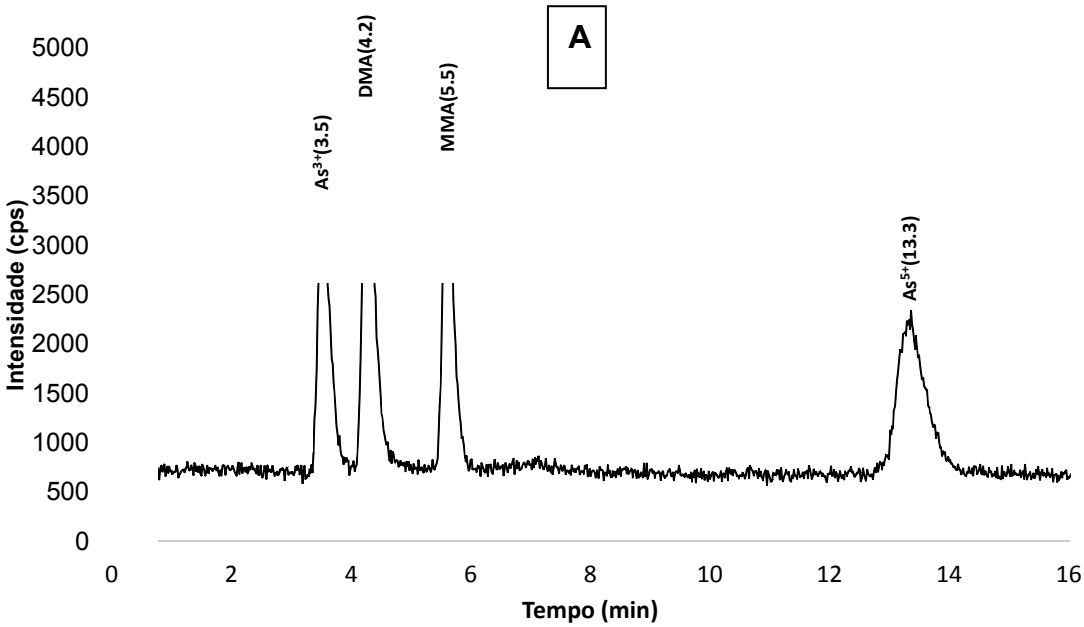
Amostra	Concentração total (µg/Kg)	Concentração bioacessível (µg/Kg)	Fração bioacessível %
As (-)	104± 25,9	73±5,79	70,2
As (+)	251±23,7	138±46,2	55,2
R As (-)	335±57,3	253±114	75,5
R As (+)	585.5±30,1	442±59,0	75,5

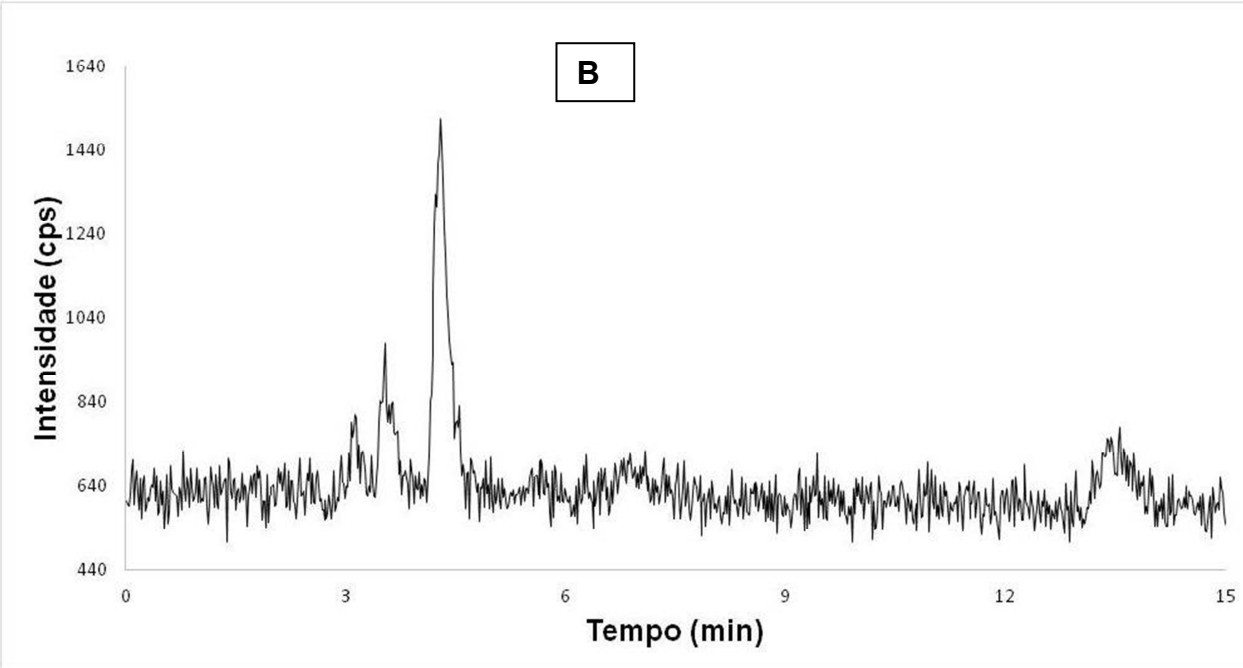
Nós avaliamos a bioacessibilidade das rações que foram administradas aos animais, porque quando um alimento é ingerido, este pode conter diversos agentes tóxicos e ou nutrientes (proteínas, fibras), ademais um alimento pode ser consumido concomitantemente com outro e neste caso podem interagir com o arroz, diminuindo ou aumentando a absorção do As (BOLAN et al. 2017). Nosso estudo demonstrou que tanto a ração feita a partir do arroz controle quanto o com o arroz plantando em solo, com adição de As, apresentaram fração bioacessível semelhantes (75,5%).

Além das informações acerca da concentração total do elemento tóxico e da sua fração bioacessível, para se estimar o real risco deste elemento químico á saúde, é fundamental determinar as espécies do metaloide presentes nas amostras e correlacioná-las com os possíveis efeitos bioquímicos e toxicológicos (KOT e NAMIESNIK, 2000). Portanto, a técnica de especiação é a melhor maneira de estimar o risco da exposição ao As presente em amostras de alimentos como o arroz, especialmente quando consideramos a biodisponibilidade da espécie e a sua toxicidade (BATISTA et al. 2012,

Assim sendo, foi realizada a especiação química da concentração bioacessível das amostras para elucidar quais eram as espécies químicas presentes e quantifica-las. A figura 6 demonstra os cromatogramas referentes a esta análise. O primeiro cromatograma (Figura 5A) representa a separação cromatográfica de 4 padrões analíticos de As na concentração de 20 µg/L, sendo, respectivamente, As^{3+}, DMA, MMA e As^{5+}. Para garantir o controle de qualidade das análises de especiação foi realizada a análise do material de referência de arroz NIST 1568b Rice Flour. O valor de referência para esse material certificado é de 290±30 ng g^{-1} de As, a recuperação para a especiação química ficou acima de 85% e a soma das espécies não diferiram estatisticamente do valor certificado no material de referência NIST Rice Flour 1568b. A Figura 5B representa um cromatograma de uma amostra analisada.

Figura 5: Cromatogramas típicos obtidos da análise de especiação química de arsênio (expresso como arsênio, *m/z*=75).





Legenda: A) Padrões analíticos das espécies de arsênio: As^{3+}, DMA, MMA e As^{5+}. B) Cromatograma de uma amostra de R As (+), destacando as espécies quantificadas (As^{3+}, DMA e As^{5+}).

A Tabela 9 exibe as concentrações das espécies químicas encontradas neste estudo.

Tabela 9 - Concentração bioacessível e % bioacessível em relação ao total das amostras estudadas

Amostra	Concentração bioacessível (µg/Kg)	% bioacessível em relação ao total
As (+)		
As^{3+}	39,6±5,81	15,8
DMA	19,1±1,0	7,6
As^{5+}	51,4±4,83	21,8
R As (-)		
As^{3+}	100±12,5	30,0
DMA	< LOD*	< LOD*
As^{5+}	133±14,2	39,8
R As (+)		
As^{3+}	133±27,3	22,8
DMA	124±12,6	21,3
As^{5+}	183±14,8	31,4

* Para a espécie DMA, os valores ficaram abaixo do limite de detecção (LOD) experimental que corresponde ao valor 0,04 ng/g.

Devido à baixa concentração de As presente na amostra de arroz plantado em solo sem adição de As (As (-)), nenhuma espécie de As foi detectada pelo método utilizado. A tabela 10 apresenta as concentrações das espécies químicas encontradas neste estudo. Como pode ser observada, a espécie encontrada em maior concentração tanto no arroz plantado em solo com adição de As (As (+)) quanto nas rações administradas aos animais foi o As^{5+}. Nota-se ainda, que a ração R As (-) apresentou apenas as espécies inorgânicas de As.

A alta concentração da espécie As^{5+} encontrada neste estudo pode ser explicada pela relação à absorção das diferentes espécies de As pela planta. Estudos demonstram um favorecimento na absorção de As inorgânico, devido à alta solubilidade em água, o que aumenta sua mobilidade no solo, sendo eficientemente absorvido pelas raízes (XU et

al. 2008). Nas raízes, as plantas de arroz absorvem o arsenito As^{3+} principalmente através de transportadores de ácido silícico e As^{5+} por competição com fosfato devido à similaridade estrutural, favorecendo e prevalecendo as formas inorgânicas em grão de arroz. Ainda, as formas metiladas DMA e MMA são absorvidas muito mais lentamente do que formas inorgânicas (MEHARG, NAYLOR e MACNAIR, 1994; ABEDIN et al., 2002; ABEDIN, FELDMANN e MEHARG, 2002; MA et al., 2006; MA et al., 2008).

Destaca-se na tabela 10, a porcentagem da fração bioacessível em relação ao total, ou seja, é a porcentagem da espécie química que foi ingerida e pode se tornar acessível para ocasionar dano à saúde. A espécie As^{5+} apresentou maior porcentagem em todas as amostras analisadas, As (+) (21,8%), R As (-) (39,8 %), R As (+) (31,4%). Importante também mencionar que a porcentagem bioacessível presente em ambas as ração das formas inorgânicas são superiores a 50%, demonstrando uma alta bioacessibilidade das formais mais tóxicas do semimetal. Estes resultados são corroborados por estudos anteriores que demonstram que as formas inorgânicas de As são mais bioacessíveis que as espécies orgânicas de As (ALBERT et al. 2006, BOLAN et al. 2017, LAPARRA et al. 2005). Foi demonstrado, que o DMA é pouco absorvido após a administração oral de arroz contendo altas proporções de espécie As inorgânicas, resultando em baixos valores de biodisponibilidade para esta forma orgânica. Laparra et al. (2005) demonstraram que após o cozimento de amostras de arroz, 80% do As total presente era As na forma inorgânica e que mais de 90% deste As estava bioacessível, demonstrando a alta bioacessibilidade destas espécies. Um único trabalho avaliou a biodisponibilidade *in vivo* de As em arroz por meio de um balanço de massa durante um curto período de exposição humana a uma dieta controlada baseada em arroz contendo o metaloide. A taxa de excreção urinária, foi usada para avaliar a bioacessibilidade do As no arroz para o corpo. O As excretado na urina deve ter sido inicialmente absorvido pelo sistema digestivo, metabolizado e circulado no sangue antes de ser eliminado. A biodisponibilidade real do As no arroz

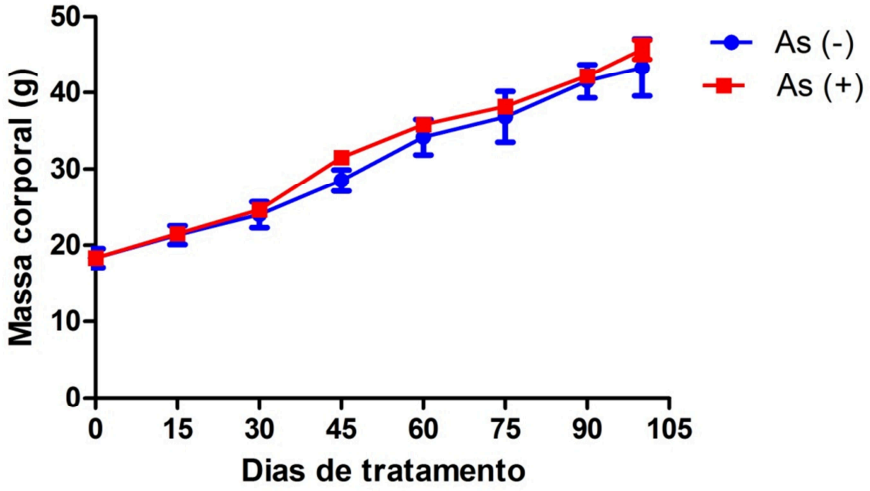
provavelmente será maior do que a induzida pela taxa de excreção do As urinário que foi de 60% da concentração ingerida (HE, ZHENG, 2010).

Tendo em vista que a espécie As^{5+} está relacionada com alterações na fosforilação oxidativa é importante se estudar quais os órgãos onde o As pode se distribuir e acumular e ainda quais danos na maquinaria energética em órgãos alvos esse metaloide pode causar.

4.3 Determinação da concentração de As nos tecidos dos animais expostos

Na etapa seguinte, foram administradas as rações para o grupo controle As (-) e exposto As (+) por um período de 100 dias. Durante o tratamento a massa corporal dos grupos foi verificada semanalmente. A figura 6 demonstra que a massa corporal aumentou proporcionalmente nos 2 grupos e não foi diferente entre os tratamentos, sendo um fator importante para avaliar a aceitação da dieta.

Figura 6: Variação da massa corporal dos camundongos durante o período de 100 dias de tratamento.

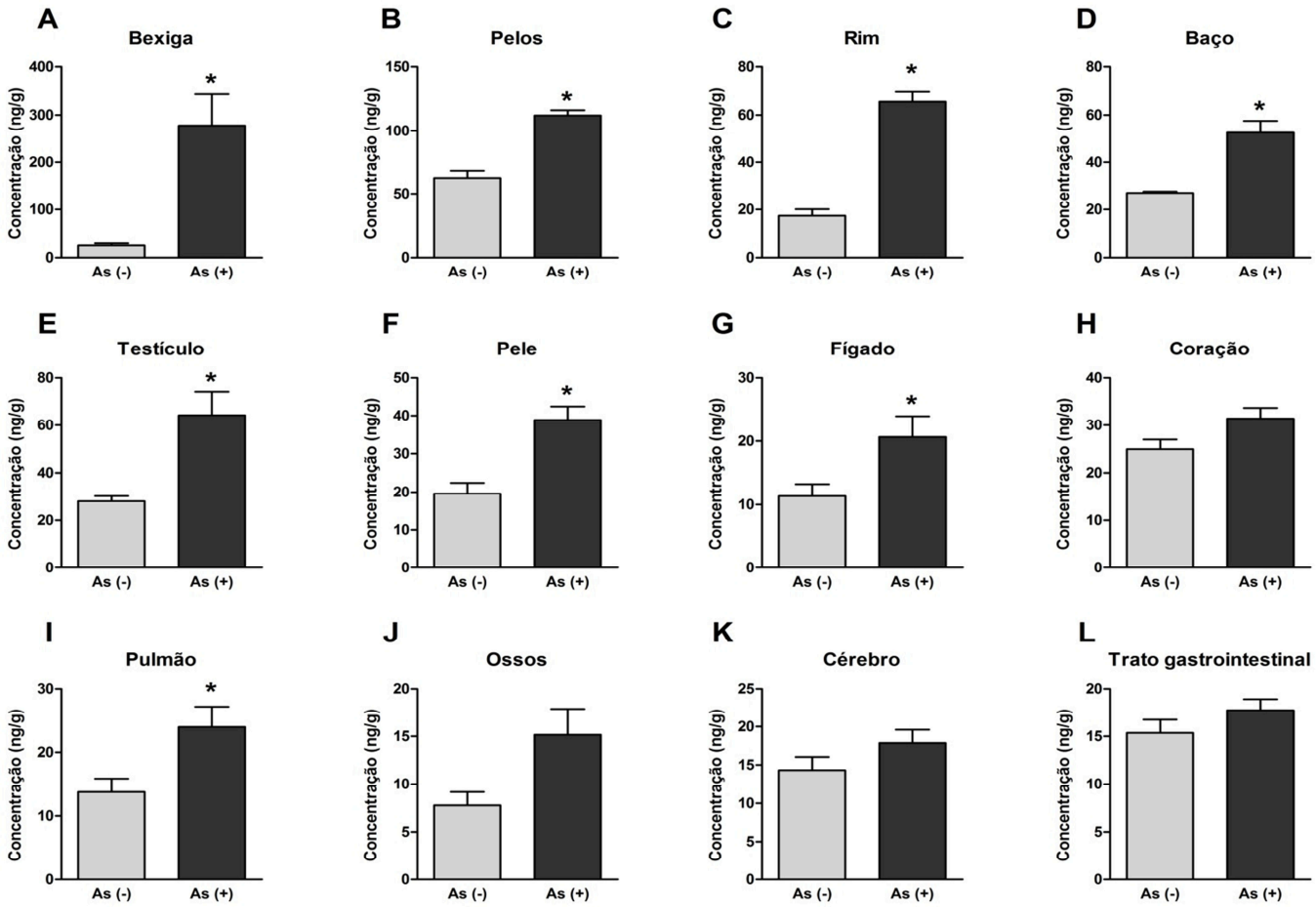


Legenda: Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. Não foi encontrada diferença estatística ($p > 0,05$).

As concentrações de As total em baço, bexiga, cérebro, coração, fígado, osso, pulmões, pele, pelos, rins, trato gastrointestinal e testículos dos animais são mostradas na Figura 8. De um modo geral, os resultados indicam um aumento na concentração do metaloide nos tecidos avaliados comparativamente ao grupo controle (As-) ($p > 0,05$) com exceção do coração, osso, cérebro e trato gastrointestinal.

As maiores concentrações após a exposição dos animais do grupo As (+) foram encontradas em ordem decrescente bexiga, pelo, rim, baço, testículo, pele, fígado pulmão, coração, ossos, cérebro e trato gastrointestinal.

Figura 7: Distribuição da concentração do As nos tecidos (ng/g).



Legenda: A) Bexiga. B) Pelos. C) Rim. D) Baço. E) Testículo. F) Pele. G) Fígado. H) Coração. I) Pulmão. J) Ossos. K) Cérebro. L) Trato gastrointestinal. *p<0,05 em relação ao grupo As (-).

O órgão que apresentou a maior concentração após a exposição crônica do metaloide através da dieta foi a bexiga, sendo a média de concentração do grupo As (+) de 271 ± 114ng/g e no grupo As (-) 25,8 ± 10,4 ng/g ($p < 0,05$). Estudos epidemiológicos recentes demonstram uma correlação positiva entre câncer de bexiga e exposição ao As (POLO et al. 2017, SMITH et al. 2017; LYNCH et al. 2017). Neste contexto, Saint-Jacques et al. (2017), sugeriram um aumento no risco de câncer de bexiga na população canadense exposta a baixa concentração de As (abaixo de 10 µg/ L) considerada segura pela OMS. Recentemente, estudos avaliando a distribuição e acúmulo do metaloide em tecidos também identificaram a bexiga como o órgão que mais acumulou As em camundongos após tratamento pela via oral (SOUZA et al. 2017;LI et al 2017). Após exposição de diferentes doses (2,5; 5; 10 e 20 mg/kg) de arsenito de sódio ($NaAsO_2$), foi observado que a concentração urinária mais alta ocorria após uma hora de exposição, cessando após 72 horas da exposição, no entanto, ocorria um acúmulo do semimetal principalmente na bexiga (LI et al. 2007). Embora não tenhamos analisado a urina, o uso do tecido da bexiga pode fornecer informações importantes em relação à deposição de As, uma vez que a eliminação do metaloide ocorre principalmente pela urina e a bexiga armazena temporariamente a urina antes da excreção (LI et al. 2007).

As altas concentrações de As determinadas nas amostras de pelo foram superiores a 100 ng/g no grupo exposto As (+). As espécies do semimetal absorvidas podem se acumular em pelos e cabelos provavelmente devido à composição da proteína capilar (α queratina) que possui um grande número de aminoácidos contendo enxofre, como a cisteina e grupamentos sulfidrilas. Portanto, uma grande afinidade à ligação do As^{3+} aos grupamentos sulfidrilas da molécula de queratina pode ocorrer, levando a um acúmulo e excreção, este processo pode ser

caracterizado como uma possível forma de eliminação do organismo (BYRNE et al., 2010, HUGHES, 2006). Neste sentido, estudos na literatura utilizam o cabelo como um biomarcador de exposição ao semimetal, principalmente estudos que correlacionam à exposição ao As em áreas altamente contaminadas pela água de beber (MIDDLETON et al. 2016, WEI et al. 2017). Brahman et al. (2016a), determinaram a concentração de As total em água e cabelo de indivíduos que viviam em áreas com alta (52 a 235 µg/L) e baixa (2.63 a 4.46 µg/L) concentração de As em água. Uma correlação positiva entre As no cabelo e o semimetal presente na água de beber de indivíduos de área com alta exposição foi demonstrado e ainda estes indivíduos com alta concentração de As no cabelo possuíam um alto risco de efeitos não carcinogênicos e de carcinogênese em relação aos indivíduos que possuíam baixa concentração de As em cabelo.

Ainda, Brahman et al. (2016b) demonstraram que crianças de diferentes regiões de Bangladesh possuíam diferentes riscos de arsenicose, uma vez, que as crianças expostas as maiores concentrações de As em água possuíam maior concentração do metaloide nos cabelos. Além disso, outro estudo demonstrou a presença de As em cabelo de indivíduos que consumiam alimentos provenientes de uma área contaminada na Índia (SAMANTA, et al. 2004).

Ressalta-se ainda, uma correlação significativa e positiva entre a exposição ao As inorgânico e a determinação deste elemento em matrizes biológicas, como cabelos, urina e sangue (HUGHES et al., 2003).

Outro órgão que acumulou grande quantidade do semimetal foi o rim, a concentração no grupo As (+) foi 61±18 ng/g e no grupo As (-) 16 ± 6 ng/g ($p<0,05$). A alta concentração de As nos rins pode ser observada em estudos anteriores. Como por exemplo, após repetidas administrações de arsenato (0,5 mg As/kg)

durante 10 dias observou–se a distribuição do semimetal em diferentes tecidos, encontrando a maior distribuição de As inorgânico (57%) no rim (HUGES et al. 2003). Em outro estudo, onde houve exposição de camundongos à forma química As^{5+}, por meio da água de beber durante 12 semanas, observou-se o acúmulo de As nos rins em relação a outros órgãos estudados (MMA foi a forma química encontrada predominante) (KENYON et al. 2008).

Estudos tem demonstrado um importante acúmulo de As nos rins, sugerindo este como um órgão alvo para os efeitos tóxicos do metaloide, uma vez que uma grande fração do As absorvido é filtrado pelos rins, para ser excretado pela urina (ORR, BRIGDES, 2017). Neste sentido, após a administração oral de arsenito de sódio ($NaAsO_2$) (10 mg/kg por 2 dias) em camundongos foi observado um acúmulo do semimetal neste tecido que levaram a mudanças morfológicas nas células epiteliais dos rins (SINHA et al. 2008). De forma similar, Zheng et al. (2017) após a administração de $NaAsO_2$, 4 mg/kg, também observou alterações patológicas e dano ao DNA de camundongos expostos.

Evidências epidemiológicas ressaltam a associação entre exposição ao As e diminuição da função renal. Desta forma, uma associação positiva entre as concentrações de As urinário e N-acetil-β-d-glucosaminidase urinária, um indicador de diminuição da função renal, tem sido observada em indivíduos na Coréia e em uma área endêmica da China (EOM et al. 2011; WANG et al. 2009). Além disso, a exposição as espécies de As parece levar à metilação do DNA e à acetilação de histonas, o que, por sua vez, pode causar alterações epigenéticas nas células tubulares renais, resultando em alterações pro neoplásicas, como o aumento da proliferação e a desregulação do ciclo celular nas células renais, que podem representar etapas iniciais na progressão de certos tipos de câncer, como nos rins

(SCOTT et al. 1993; ORR, BRIGDES, 2017). Atualmente, vários estudos na literatura demonstram uma correlação positiva entre a exposição ao As e incidência de câncer renal (KUO et al. 2017; HSUEH et al. 2017, SAINT-JACQUES et al. 2017, SMITH et al. 2017).

O presente estudo demonstrou um acúmulo na concentração de As no baço dos animais As (+) 54 ± 9,8 ng/g quando comparado ao grupo As (-) 27 ± 1,4 ng/g ($p<0.05$). Recentemente, Soria et al. (2017) avaliaram a exposição de ratos a 100 µg/mL de arsenito de sódio na água potável durante 2 meses e observouaram um acúmulo de As nas polpas brancas e vermelhas do baço e identificou disfunções enzimáticas (que participam do mecanismo redox) em esplenócitos devido ao acúmulo do metaloide. Os autores sugerem que o As interrompe as vias imunes e a homeostase redox neste órgão.

Os testículos apresentaram uma concentração de 53 ±22 ng/g no grupo As (+) e 29 ± 4,8 ng/g, sugerindo que o testículo possa ser um órgão alvo ao metaloide. De fato, Silva et al. (2017) demonstraram que a exposição de trióxido de arsênio em ratos machos levou a alteração no processo espermatogênico como diminuição do número de espermatozoides, degeneração e esfoliação do epitélio seminífero de células germinativas e proporção alterada de núcleo/citoplasma de células de Leydig. Neste mesmo sentido, estudos têm demonstrado que o tratamento com substâncias contendo As diminuem os níveis plasmáticos de testosterona e interferem nos parâmetros do esperma, tais como concentração, motilidade e viabilidade. Ainda, pode levar a danos significativos aos espermatócitos, que pode estar associado à toxicidade testicular e consequente inibição da espermatogênese (CHIOU et al. 2008; GOLUB, MACINTOSH, BAUMRIND 1998; NAVA-HERNANDEZ et al. 2009; SOUZA et al. 2016).

Uma diferença significativa foi encontrada na pele dos animais As (+) 36 ± 7,8 ng/g em relação aos animais As (-)18 ± 6,2 ng/g ($p < 0,05$). As lesões na pele causadas pela exposição crônica ao As como, por exemplo, hiperpigmentação, hipopigmentação, ceratose, melanose mesmo em concentrações baixas da As em água, é amplamente reportada (GEMOLEC et al. 1998, MELKONIAN et al. 2013, KARAGAS et al. 2015). O acúmulo do semimetal na pele aumenta o risco de desenvolvimento de neoplasias neste tecido, através da estimulação crônica de fatores de crescimento derivados de queratinócitos (GEMOLEC et al. 1998). Sabe-se ainda que uma maior prevalência de doenças de pele foi relatada em indivíduos expostos com níveis que variam de 5 a 10 µg/L de As na água de beber (YOSHIDA et al., 2004).

Estudos epidemiológicos além de relacionar a exposição de As em água com lesões na pele também relacionam a exposição ao semimetal pelo consumo de arroz como no estudo realizado em Bangladesh, com 18.470 participantes, onde encontrou-se uma associação positiva na presença de lesão cutânea (por exemplo, hiperqueratose e melanose) com aumento do consumo de arroz (MELKONIAN et al. 2013). Em recente estudo realizado nos Estados Unidos foi observado que o consumo de arroz esteve relacionado à ocorrência de carcinoma de células escamosas na pele, especialmente entre aqueles que consumiam água com baixa concentração de As, demonstrando um risco a este tipo de câncer pela exposição ao As presente no arroz (GOSSAI et al. 2017).

Por fim, foi encontrada uma diferença significativa entre as concentrações de As no grupo As (-) 10 ± 3,6 ng/g com o grupo exposto As (+) 21 ± 7 ng/g no fígado dos camundongos *Swiss.* Vários trabalhos na literatura apontam o fígado como um importante órgão alvo na intoxicação por As (LI et al. 2017, SOUZA et al. 2017),

tendo em vista que os compostos de As são principalmente metabolizado no fígado dos seres humanos e na maioria dos roedores, o que controla a liberação do metaloide e suas formas químicas na corrente sanguínea (SATTAR et al. 2016). A exposição ao As pode levar a lesões hepáticas como a fibrose, cirrose e câncer de fígado (RAHMAN, NG, NAIDU, 2009). Estudos anteriores demonstram que após a bioacumulação de As no fígado, animais expostos ao semimetal apresentaram mudanças histopatológicas, alterações nas transaminases, alterações em enzimas do sistema antioxidante e dano mitocondrial (KOTYZOVÁ, BLUDOVSKÁ, EYBL, 2013, RANA et al. 2012, SOUZA et al. 2017, SEPAND et al. 2016). Mais detalhe de como este semimetal pode alterar as funções hepáticas são demonstrados no capítulo 2.

5 Conclusão

Estudos que avaliem a exposição ao As através da dieta principalmente em países como o Brasil, onde o arroz é um componente base da dieta, são de extrema importância. Neste estudo demonstramos pela primeira vez, a bioacessibilidade do As presente no arroz de um cultivar brasileiro com alta concentração de As inorgânico nos grãos e que na dieta administrada aos animais, as formas inorgânicas estavam mais de 50% bioacessíveis, com destaque para o As[5]

Também demonstramos que após uma dieta com diferentes concentrações de As, este pode se depositar em vários tecidos, destacando-se o acúmulo apresentado em bexiga, pelo, rim, baço, testículo, pele, fígado.

CAPÍTULO II

Capítulo II: Avaliação de parâmetros redox em fígado e alterações mitocondriais em músculo e fígado de camundongos *Swiss* decorrente do consumo de arroz contendo As

1 Introdução

A mitocôndria é uma organela extremamente importante para o metabolismo energético celular, uma vez que é a responsável por transformar a energia dos alimentos em energia útil e transportável ás células, através da molécula de adenosina trifosfato (ATP). Esta organela é fonte de energia primária indispensável para a vida celular da maioria dos organismos (TAHARA, NAVARETE, KOWALTOWSKI. 2009).

A estrutura mitocondrial é constituída por duas membranas e dois compartimentos por elas limitados. O compartimento mais interno, delimitado pela membrana mitocondrial interna, é denominado de matriz mitocondrial, onde estão presentes as enzimas do ciclo de Krebs, da beta-oxidação de ácidos graxos, da oxidação de aminoácidos, o complexo piruvato desidrogenase etc. O segundo compartimento, é denominado espaço intermembranar por estar localizado entre as membranas interna e externa (NELSON; COX, 2014).

Na membrana mitocondrial interna, os elétrons sucedidos das coenzimas reduzidas NADH e $FADH_2$ são transferidos para a cadeia transportadora de elétrons, formados por um complexo de proteínas que contem centros redox com aumento progressivo de afinidade por elétrons. A transferência de elétrons inicia-se com a oxidação do NADH e $FADH_2$ pela coenzima Q, catalisada respectivamente pelos complexos I (NADH desidrogenase) e complexo II (succinato desidrogenase),

gerando a forma reduzida da coenzima Q (UQH_2) O complexo III (ubiqquinona-citocromo c oxidoredutase), catalisa a oxidação da UQH_2 pelo citocromo C. Por fim, o complexo IV (citocromo oxidase) catalisa a oxidação do citocromo C reduzido, com redução de O_2 à água. Durante este processo ocorre a formação de um gradiente elétrico devido á diferença de carga elétrica nos dois lados da membrana interna. A energia conservada nesse gradiente eletroquímico é chamada de força próton-motriz sendo utilizada para sintetizar ATP pela ATP sintase (NELSON; COX 2014).

Vários xenobióticos, incluindo metais e metaloides, podem causar alterações e inibições no metabolismo mitocondrial (BLAJSZCZAK, BONINI, 2017). Isto pode ocorrer por diversos mecanismos tais como inibição do transporte de elétrons e/ou da fosforilação oxidativa. Ainda, danos estruturais na mitocôndria devido a alterações na membrana mitocondrial, conduzindo a alterações no potencial de membrana e formação de radicais livres pode levar a danos na organela (FLORA, 2011). Quando isto ocorre, o metabolismo energético fica prejudicado levando a doenças como o diabetes mellitus tipo 2 e afetando órgãos com maior demanda de energia, como fígado, rim, coração e músculo esquelético (BOLT, STEWART, 2012).

A mitocôndria tem sido reportada como um alvo primário na intoxicação pelo As. Este pode exercer seu efeito tóxico inibindo os complexos I e III mitocondrial, alterando o potencial de membrana, modificando a atividade catalítica de enzimas envolvidas na transferência elétrons, reações redox, síntese protéica e reparo de DNA (LEE et al., 2015; SAGE et al., 2017; ZHANG et al., 2014; SON et al., 2010).

Embora bem estabelecida à relação entre a exposição ao As e danos mitocondriais, estudos que avaliam a alterações na cadeia respiratória mitocondrial e posterior formação de EROs levando a danos e contribuindo com a toxicidade no

fígado e músculo pela exposição ao As através da dieta permanecem não elucidados.

2 Objetivos

Avaliar a sensibilidade à insulina entre os grupos As (-) e As (+).

Avaliar a respiração mitocondrial sustentada por diferentes substratos em tecido muscular e hepático.

Avaliar a formação de EROs em tecidos permeabilizados, alterações nas atividades enzimáticas e marcador de peroxidação lipídica.

3 Metodologia

3.1 Tratamento dos animais

O tratamento dos animais para este estudo foi realizado como descrito no capítulo 1 (seção 3.5), após a eutanásia foram retirados o fígado e o sóleo dos animais para a permeabilização e respiração tecidual, além de coletado o fígado para determinação de EROs e atividades das enzimas antioxidantes.

3.2 Avaliação da sensibilidade à insulina: ITT (Teste de tolerância à insulina)

Para a avaliação da sensibilidade a insulina *in vivo*, foi realizado um teste de tolerância à insulina (ITT). Após 90 dias de tratamento os camundongos foram mantidos em estado de jejum por 8 horas. Posteriormente, foi realizado um corte na

extremidade da cauda do animal para retirada do sangue que foi coletado em um glicosímetro de fita OneTouch® Ultra® (Johnson and JohnsonCompany, EUA) para as medidas de glicemia basal (tempo zero) e após a aplicação da insulina. A insulina utilizada para o preparo da solução foi Apidra® 1000 UI/mL (Sanofi Aventis Farmacêutica LTDA, Brasil) e foi aplicada via intraperitonial de forma que cada animal recebesse 0,25 UI/Kg e a glicemia foi medida 20 minutos após a aplicação. Ao final do teste foi administrada uma dose de 20 µL de solução de glicose 0,6 g/mL e disponibilizado água e ração ad libitum aos animais.

3.3 Ensaios utilizando tecidos permeabilizados

3.3.1 Meios utilizados

Para realizar os ensaios com os tecidos permeabilizados foram utilizados dois meios. O primeiro chamdo Biops, contendo 2 µg/mL de taurina, 20 µg/mL de imidazol, 0,5 µg/mL de ditiotreitol (DTT), 2,77 µg/mL de EGTA-Ca^{2+}, 6,56 µg/mL de $MgCl_2$, 50 µg/mL de K-MÊS, 7,23 µg/mL de EGTA-KOHe pH 7,1. No momento do uso, a 4°C, foi adicionado 5,77 µg/mL de ATP e 15 µg/mL de fosfocreatina. O segundo meio para a respiração dos tecidos foi o Mitomed R05 (MIR05), contendo 0,5 µg/mL de EGTA, 3 µg/mL de $MgCl_2$, 60 µg/mL de K-lactobionato, 20 µg/mL de taurina, 10 µg/mL de KH_2PO_4, 20 µg/mL de HEPES, 110 µg/mL de sacarose e 1g/L de BSA livre de ácido graxo em pH 7,1.

3.3.2 Permeabilização dos tecidos

3.3.2.1 Sóleo

O músculo sóleo foi totalmente retirado e inserido em 1 mL de meio Biops gelado e com auxílio de uma lupa e pinça de ponta fina, o músculo foi cortado em fatias e as fibras foram cuidadosamente separadas a fim de não danifica-las. Em seguida foram inseridas em meio Biops gelado acrescido de 1mL de uma solução de saponina 5 mg/mL, para permeabilização da membrana plasmática, mantido em banho de gelo sob leve agitação por 20 minutos.

3.3.2.2 Fígado

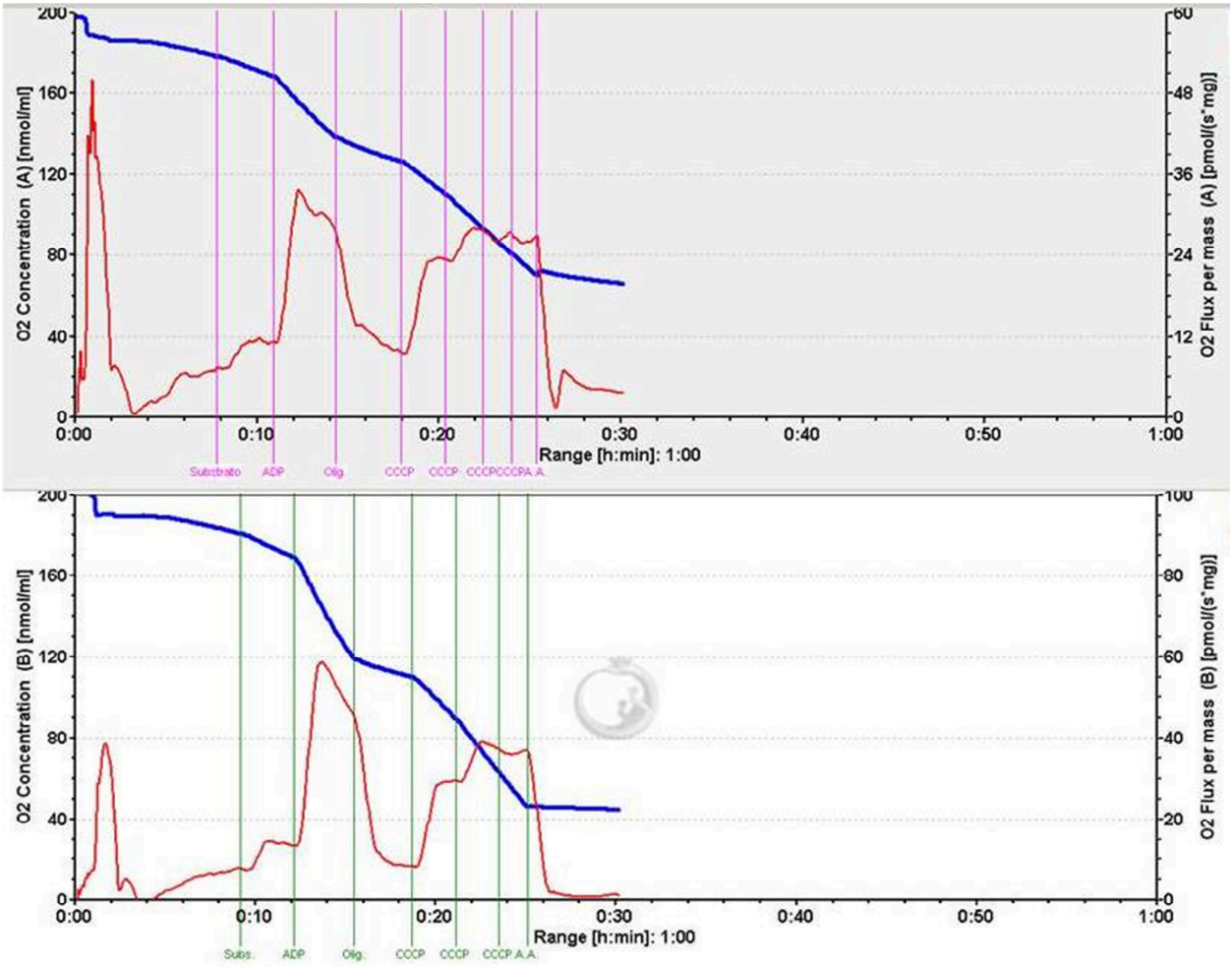
Uma pequena fatia do fígado foi extraída e inserida em 1 mL de meio Biops gelado e cortada em pedaços menores de aproximadamente 1 m^3. Em seguida os pedaços permaneceram em meio Biops gelado completando com 1 mL de uma solução de saponina5mg/mL, mantido em banho de gelo sob leve agitação por 5 minutos.

3.3.3 Determinação do consumo de oxigênio dos tecidos

Foi verificado o consumo de oxigênio por meio do eletrodo do tipo Clark ; modelo oxygraph-2K (Oroboros Instruments- High Resolution Respirometry, Áustria) com agitação magnética (300 rpm) e a 37ºC para ambos os tecidos. Na câmara do oxígrafo, foram colocados 2 mL de meio MIR 05 e foram inseridos as amostras

dos tecidos permeabilizados. Após o fechamento da câmara, iniciamos a mensuração da respiração com a adição de diferentes compostos. No músculo 10 µg/mL de piruvato, 2 µg/mL de malato e 9 µg/mL de glutamato. No fígado, foram realizados experimentos com a adição de 10 µg/mL de piruvato e concomitantemente sem a adição de piruvato, como substratos que proporcionam a ativação dos complexos I e II na cadeia transportadora de elétrons. Por outro lado, a adição de 200 µM de ADP, 1µg/mL de oligomicina, 1 µM de carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona (CCCP), 1 µg/mL de antimicina A foi igualmente incorporada em ambos os tecidos. Estudados. A Figura 8 representa um experimento típico, realizado com fígado.

Figura 8: Experimento demonstrando a respiração de fígado realizado no oxígrafo.



3.3.4 Estimativa da produção de espécies reativas de oxigênio

Nos tecidos permeabilizados a produção de EROs (H_2O_2) foi monitorada espectrofluorimetricamente pela conversão de amplex red (N-acetil-3,7-dihydroxyphenoxazine, 10 µM, Molecular Probes), na presença de peroxidase 0,025 µM, em resorufina, um composto altamente fluorescente. A fluorescência foi monitorada por 10minutos, usando os comprimentos de 563 nm e 587 nm, excitação/emissão respectivamente. A calibração foi realizada por meio de concentrações conhecidas de H_2O_2 (ZHOU et al., 1997). Os cálculos foram feitos subtraindo–se a fluorescência inicial da fluorescência final, posteriormente dividindo-se este valor pela variação do tempo neste intervalo e normalizando por proteínas totais.

3.4 Dosagem de proteínas

Para a normalização dos dados obtidos com tecidos, foram realizadas dosagens de proteínas totais pelo método de Bradford (1976). A técnica baseia-se na ligação das proteínas ao reagente Coomassie Brilliant Blue G-250 onde há mudança na absorção de 365nm para 595 nm (BRADFORD,1976). O reagente de Bradford (Bio-Rad®) foi diluído quatro vezes, assim como as amostras. A curva de calibração foi feita com BSA e a absorbância foi medida em um leitor de microplaca a 595nm.

3.5 Determinação da atividade da enzima citrato sintase

Os tecidos foram homogeneizados em banho de gelo, com um tampão contendo 250 µg/mL de sacarose, 1µg/mL de EGTA e 10 µg/mL de HEPES-KOH (pH 7,2), proporcionalmente a massa, ou seja, a cada 50 mg de tecido foi utilizado 1 mL de tampão. O homogenato resultante foi centrifugado a 12000 g por 10 minutos a 4ºC, sendo o sobrenadante coletado e utilizado para a quantificação de proteínas pelo método de Bradford (1976). Em uma placa de 96 poços, a cinética da citrato sintase foi determinada usando 50 µg de proteína e detectada em comprimento de onda de 412 nm por 2 minutos com intervalo de 10 segundos em temperatura ambiente. O meio reacional foi composto por 0,1 µg/mL de acetil-coA, 0,1 µg/mL de DNTB, 0,10% de Triton X-100, 0,2 µg/mL de oxaloacetato, 0,1M de tampão tris, pH 8,0 (KUZNETSOV; LASSNIG; GNAIGER, 2010).

3.6 Determinação da atividade da catalase

A atividade da enzima catalase foi determinada espectrofotométricamente pelo método descrito por Aebi (1984), que é com base na taxa de decomposição de peróxido de hidrogênio pela catalase. Uma unidade da enzima é definida como a quantidade de enzima que se decompõe 1 mmol de H_2O_2 em 1 min a 25 ° C. Resumidamente, 0,925mL de tampão fosfato 0,05 M foi transferido para uma cubeta e, em seguida, foram adicionados 0,035 mL de solução de peróxido de hidrogénio 0,3 M. Subseqüentemente, adicionou-se 0,05 mL do homogeneizado e a alteração na absorvância após 2 minuto foi gravado. A absorvância foi lida a 240 nm utilizando um ultravioleta / espectrofotômetro visível (UV / Vis) PerkinElmer (Shelton, CT, USA).

3.7 Determinação da atividade glutationa peroxidade

A atividade da glutationa peroxidase foi determinada espectrofotométricamente pelo método descrito por Paglia e Valentine (1967) com pequenas modificações.Em uma cubeta são colocada 880 µL da solução do sistema (NADPH 0,15 mM, GSH 1 mM, 0,1 U/mL de GR, 100 mM de azida, em tampão fosfato de potássio, pH 7,0) 20 µL de água, 20 µL da amostra e 100µL de 0,4 mM H_2O_2. A variação de absorção por minuto foi lida a 340 nm, utilizando um espectrofotômetro (UV / Vis) PerkinElmer (Shelton, CT, USA). e a atividade foi expressa como µmol NADPH/ min/mg de proteína.

3.8 Determinação do Malondialdeído

O ensaio para a determinação da peroxidação lipídica foi avaliado utilizando o ensaio TBARS (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico) (DRAPUR, HODLEY, 1990). Resumidamente, 200 µL do homogeneizado de fígado foram misturados com 500 µL de ácido tiobarbitúrico 0,8%, 500 µL de tampão de ácido acético, 200 µL de SDS 8,1% e 100 µL de água. Estas amostras foram incubadas durante 2 h a 95 °C e deixadas arrefecer até à temperatura ambiente. A leitura foi medida a 532 nm.

3.9 Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em duplicata ou triplicata. Os resultados foram expressos em média ± erro-padrão da média. As análises estatísticas da respiração do músculo e fígado e marcadores do estado redox do fígado foram

conduzidas, utilizando–se o test *t*, pelo software estatístico *GraphPad Prisma*® versão 5.0 . Foram considerados significativos somente valores com $p < 0,05$.

4 Resultados e discussão

Este é o primeiro estudo que avaliou possíveis alterações em mitocôndrias e formação de EROs em fígado e músculo de camundongos Swiss, expostos ao As por meio da dieta.

4.1 Músculo esquelético sóleo.

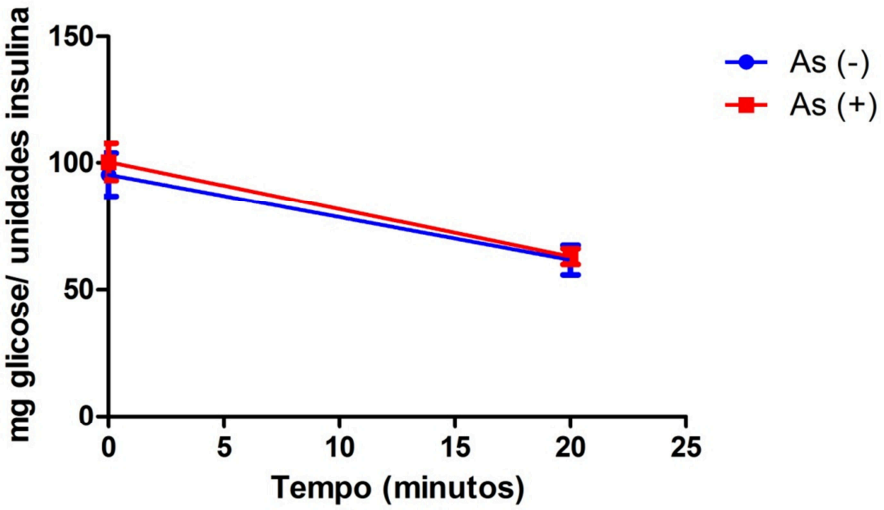
O sóleo é um músculo esquelético que tem sido utilizado para estudos das alterações oxidativas por predominarem, em sua constituição, as fibras tipo I que são de contração mais lenta, sendo considerado um modelo sensível a alterações energéticas e ao estresse oxidativo, uma vez que este músculo é constantemente submetido a demandas mecânicas e energéticas o que requer grande quantidade de substratos energéticos para produzir ATP e possuem um grande número de mitocôndrias (BOSMA, 2016). Além disso, o músculo esquelético é o mais importante tecido periférico responsável pela absorção de glicose em condições estimulantes da insulina (LUZI, PETRIDES, FRONZO, 1993).

Estudos epidemiológicos tem demonstrado que a exposição crônica ao As está associada com um aumento na prevalência ou incidência de diabetes mellitus (NAVAS-ACIEN et al. 2006; KUO et al. 2017, MAULL et al. 2012; SUNG, HUANG, GUO, 2015). Estudos laboratoriais sugerem que vários mecanismos podem estar associados aos efeitos diabetogênicos da exposição ao As inorgânico, principalmente pela exposição

pela água de beber. Estes mecanismos incluem: inibição sinalização da insulina (que leva à resistência à insulina) no metabolismo da glicose nos tecidos periféricos, inibição da secreção de insulina por células β pancreáticas, e desregulação da metilação ou expressão de genes envolvidos na manutenção da glicose ou metabolismo e função da insulina (DOUILLET et al. 2013, PARK et al. 2016, XUE et al. 2011).

Neste sentido nós avaliamos através do teste de intolerância a insulina (ITT), o decaimento da glicose ao longo de 20 minutos. A interpretação do ITT se baseia em quanto mais rápida e intensa for a inclinação da curva glicêmica, mais sensível o indivíduo será à insulina. A figura 10 representa o decaimento da glicose nos grupos estudados, demonstrando que não houve diferença estatística entre que o grupo As (-) e As (+), p>0,05. Nosso resultado sugere que esta concentração de As presente na dieta dos animais, não foi capaz de levar a supressão da produção hepática de glicose e não interferiu na captação de glicose pelos tecidos insulinosensíveis como o músculo esquelético (GELONEZE, TAMBASCIA, 2006).

Figura 9: Curva de decaimento da concentração de glicose plasmática nos animais dos grupos As (-) e As (+) nos primeiros 20 minutos após a injeção de insulina.



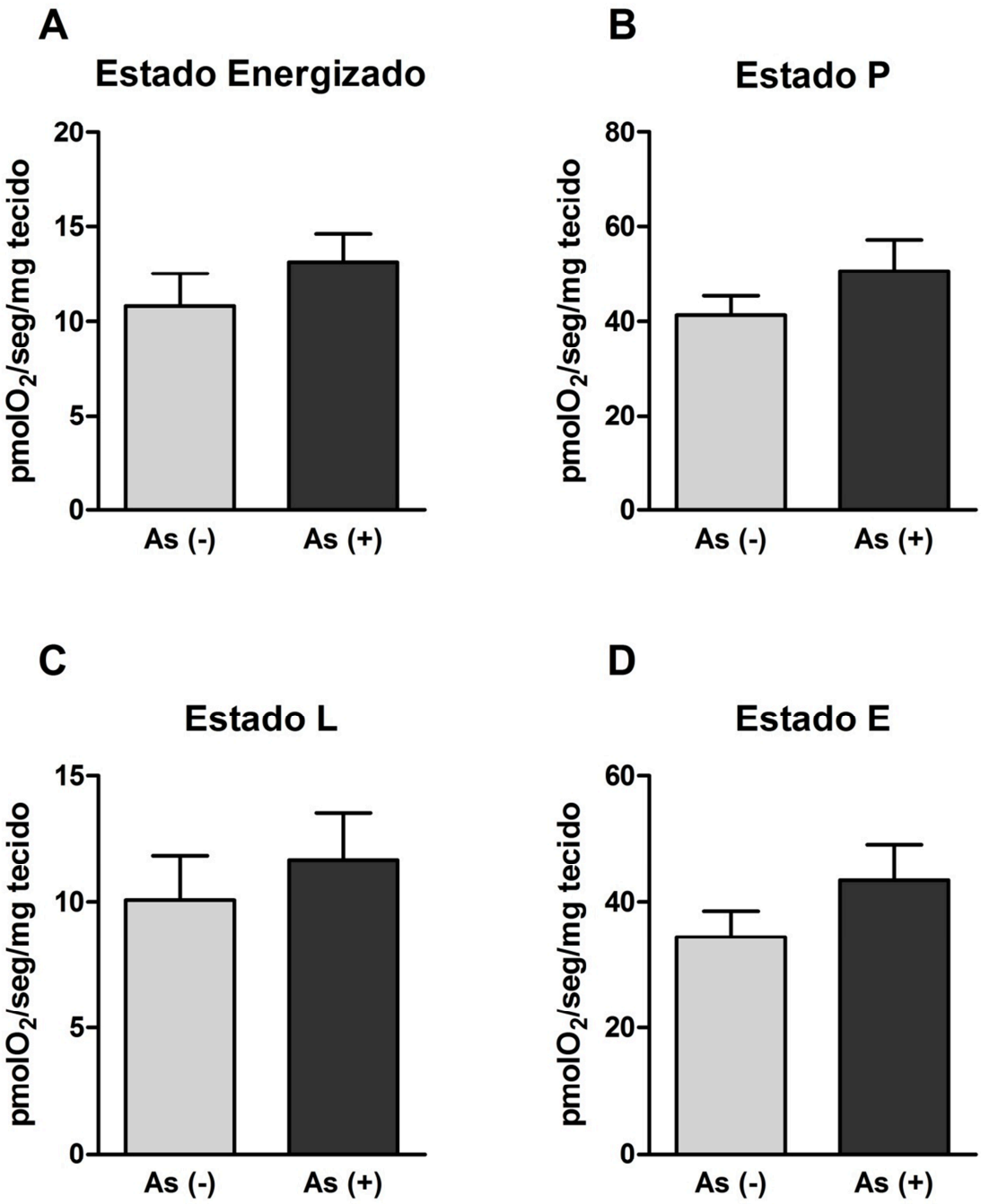
Legenda: Não foi observada diferença estatística entre os grupos As (-) e As (+), p> 0,05.

No músculo esquelético, a resistência à insulina pode coexistir com alterações mitocondriais, tais como a baixa densidade mitocondrial, mudanças na expressão gênica de proteínas, etc (MOOTHA et al., 2003; MORINO et al., 2005; SZENDROEDI et al., 2007). Sendo assim, foi realizado a biopsia do músculo sóleo, para verificar se o As promoveu mudanças no metabolismo mitocondrial e afetou a resposta do consumo de oxigênio. Foram avaliados os estados: Energizado (estado no qual o substrato presente no meio utilizado para o experimento e os substratos endógenos suportam a respiração e cuja a taxa depende da demanda de ATP celular), Figura 10A. O estado *Coupled* (estado P, é quando se adiciona o ADP para a determinação do estado de fosforilação) (Figura 10B). O estado *Leak* (estado L, no qual a fosforilação oxidativa é inibida por oligomicina e o consumo de oxigênio reflete o desacoplamento intrínseco), Figura 10C. O estado máximo de respiração ou *Noncoupled* (estado E, no qual o desacoplador químico CCCP promove o retorno de H^+ para a matriz através da membrana mitocondrial interna, reduzindo o potencial eletroquímico de H^+ e consequentemente estimulando a máxima velocidade de transferência de elétrons e consumo de oxigênio), Figura 10D.

Os resultados das respirações de biópsias estão representados através do cálculo das razões: P/L (Figura 11 A), L/E (Figura11B) e P/E (Figura 11C). Em nenhuma das análises houve diferença significativa entre os grupos estudados.

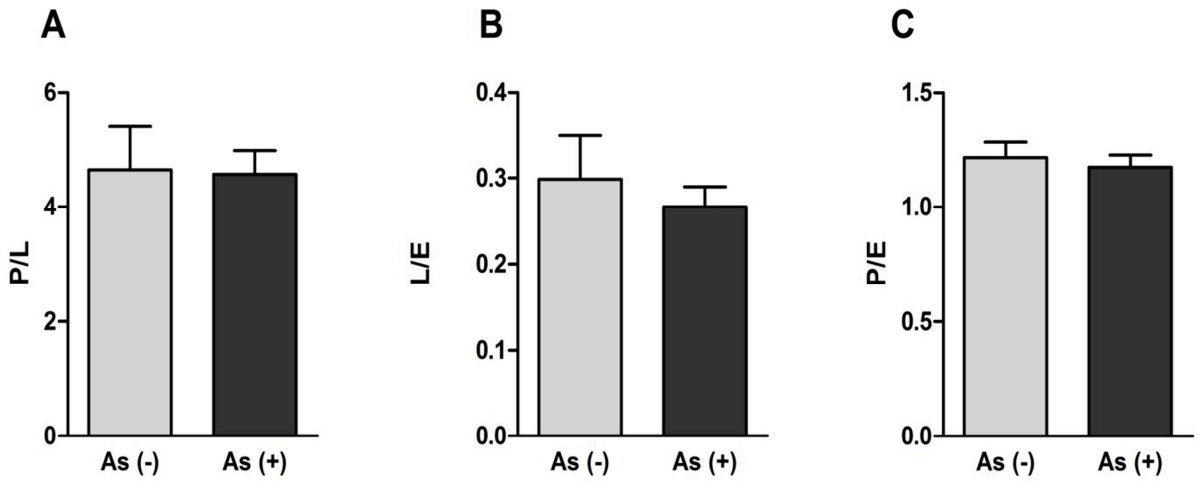
Embora em um estudo realizado com camundongos recebendo As (100 µg/L) por 6 semana pela água, foi observado um aumento do consumo de oxigênio mitocondrial por células progenitoras musculares isoladas de camundongos expostos quando comparados a células isoladas de camundongos controle não exposto (AMBROSIO et al. 2014), não foram observadas diferenças significativas quanto aos parâmetros estudados através da biópsia de sóleo.

Figura 10: Taxas respiratórias do músculo sóleo nos estados



Legenda A) Estado Routine B) Estado acoplado (P) C) Estado Leak (L), D) estado desacoplado (E). Os gráficos representam os valores da média ± erro padrão da média, p> 0,05.

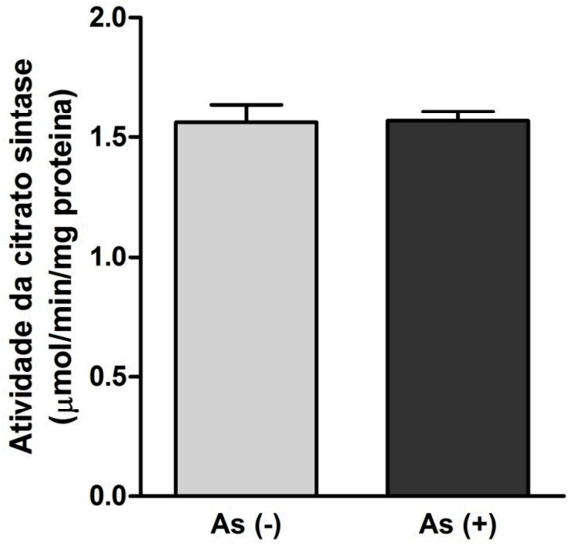
Figura 11: Razões entre as velocidades de ATP, oligomicina e CCCP obtidas da respiração do músculo sóleo permeabilizado.



Legenda: A) P/L B) L/E C) P/E.

Foi avaliado também a atividade da enzima citrato sintase que é utilizada como um marcador enzimático quantitativo para o conteúdo das mitocôndrias intactas, relacionando-se a atividade com a massa de mitocôndrias. Como mostrado na Figura 12, não houve diferença estatística (p>0,05) da atividade de citrato sintase no sóleo.

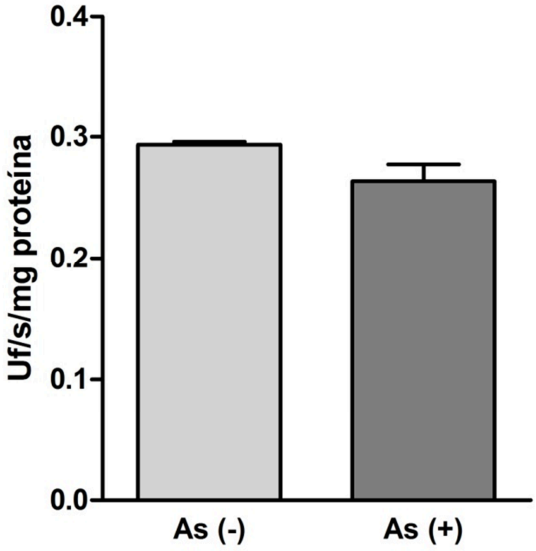
Figura 12: Atividade da citrato sintase no sóleo de camundongos



Legenda: Os gráficos representam os valores da média ± erro padrão da média, comparando os grupos As (-) e As (+), p>0,05.

Por fim, foi avaliada a formação de Eros no sóleo e não houve diferença significativa entre os grupos como mostra a figura 13.

Figura 13: Geração de EROs no sóleo.



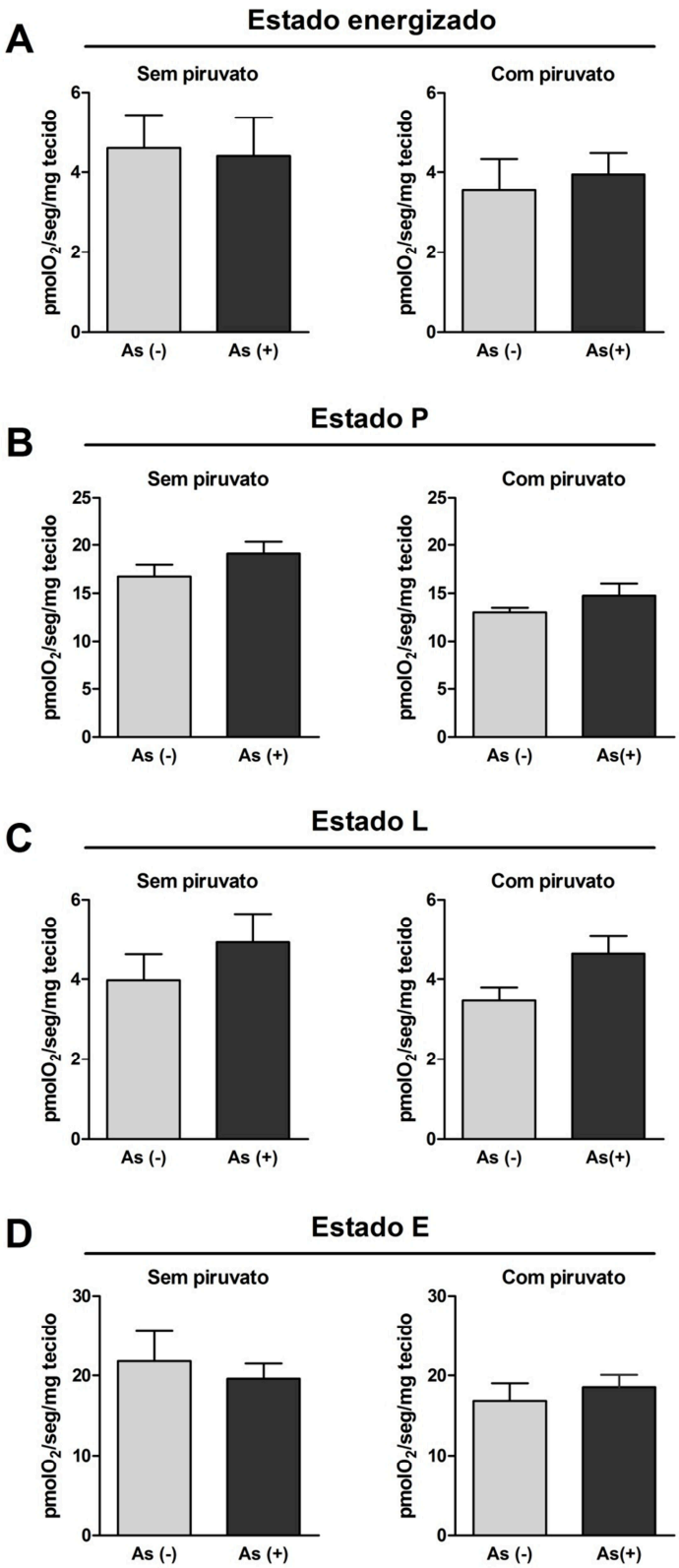
Legenda: Os gráficos representam os valores da média ± erro padrão da média, comparando os grupos As (-) e As (+), p>0,05.

4.2 Fígado

Foram encontrados que os níveis de As no fígado dos animais expostos As (+) foram significativamente maiores do que nos animais controle As (-), como mostrado no capítulo I desta tese (Figura 7H), indicando que o modelo era adequado para estudar o efeito tóxico do As em mitocôndrias deste tecido.

Vários estudos na literatura mostram que o As leva a disfunções mitocondriais e alterações na respiração. Portanto, foram realizadas biópsias de respiração do fígado como demonstrado na figura 14.

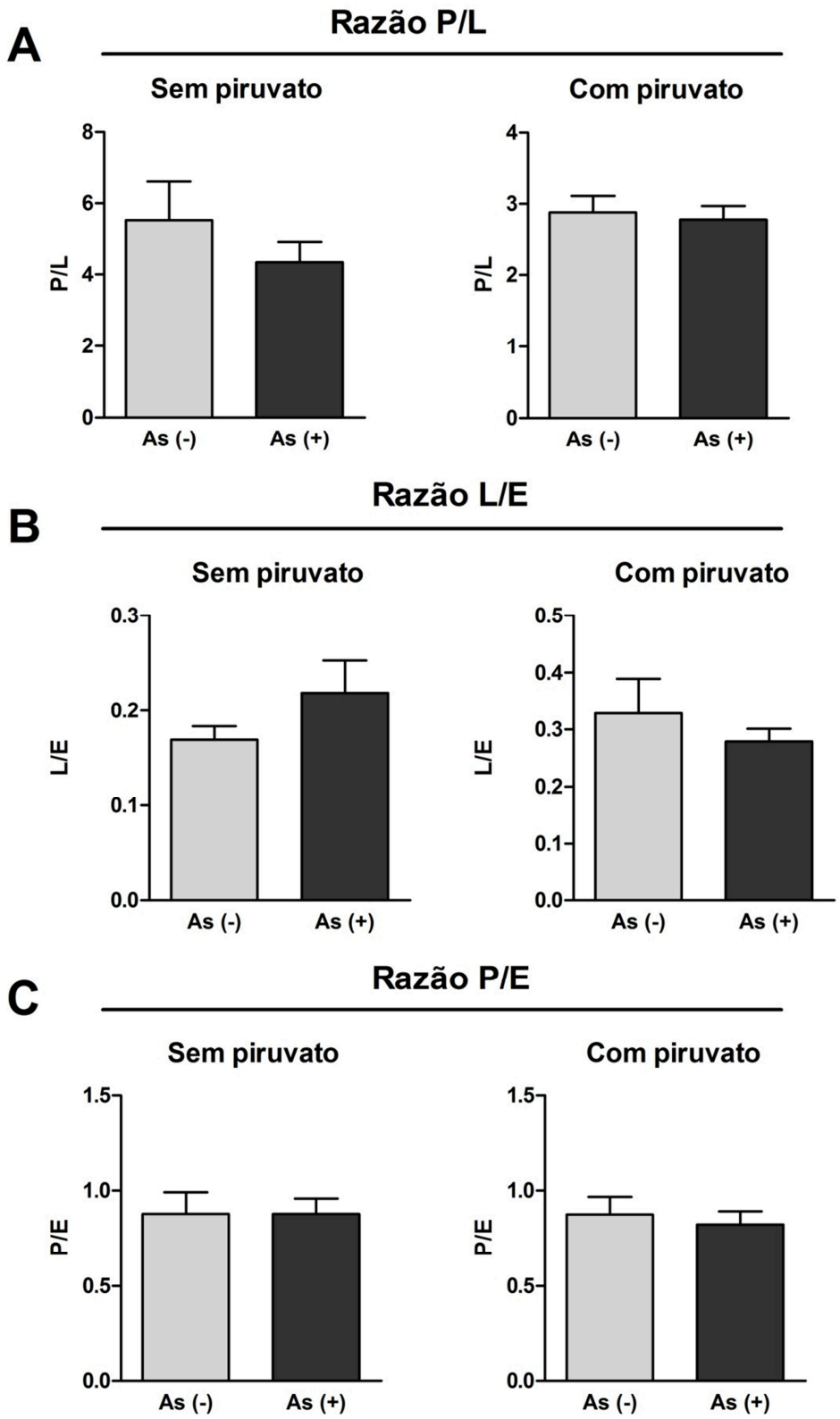
Figura 14: Taxas respiratórias do fígado nos estados



Legenda: A) Estado Energizado B) Estado acoplado (P). C) Estado Leak (L). D) Estado desacoplado (E). p> 0,05.

Além disso, foram calculadas as razões entre os estados respiratórios. A figura 15A mostra a razão entre as velocidades de respiração com ADP (estado P) e oligomicina (estado L). Estes resultados indicam que não houve diferença significativa entre as razões de respiração do grupo As (-) e As (+) (quando a respiração é realizada sem piruvato) e As (-) e As (+) (realizando a respiração com piruvato), $p>0.05$. Esta razão P/L demonstra que não há diferença no acoplamento da respiração mitocondrial quando realizado com diferentes substratos. Outra forma de se avaliar o acoplamento é através da razão entre o estágio L e estágio P, como demonstrado na figura 15B, também não encontramos diferenças significativas entre as razões quando comparados os grupos As (-) e As (+) na presença ou ausência de piruvato. Foi também realizada a razão P/E como exibido na Figura 15C. No entanto, não houve diferença estatística significativa entre os grupos neste parâmetro.

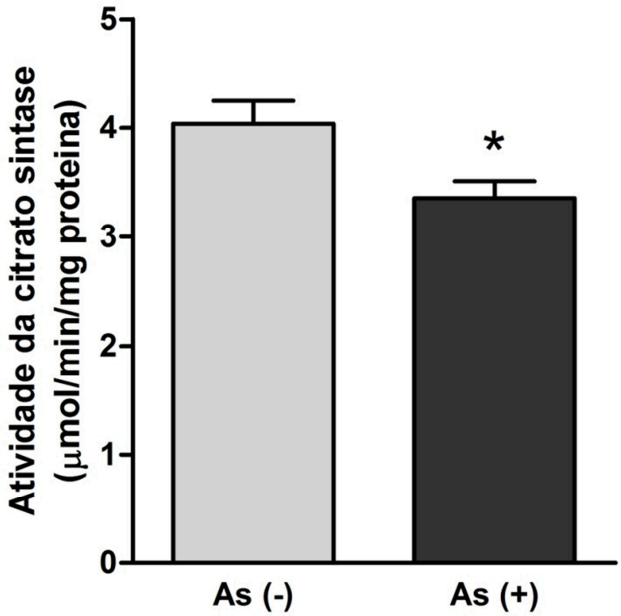
Figura 15: Razões entre as velocidades de ATP, oligomicina e CCCP obtidas da respiração do tecido hepático permeabilizado



Legenda:. A) P/L, diferença entre As (-) SP e As (-) CP ($p<0,05$); As (-) SP e As (+) CP ($p<0,05$); B) L/E As (-) SP e As (-) CP ($p<0,05$). C) P/E.

A atividade da citrato sintase, um marcador de densidade mitocondrial, também foi avaliada no fígado dos animais e conforme demonstrado na figura16. Houve uma diminuição da atividade desta enzima no grupo As (+) em relação ao grupo As (-) ($p<0,05$), indicando um menor conteúdo das mitocôndrias nos animais que receberam uma dieta contendo As em maior concentração.

Figura 16: Atividade da citrato sintase no fígado.



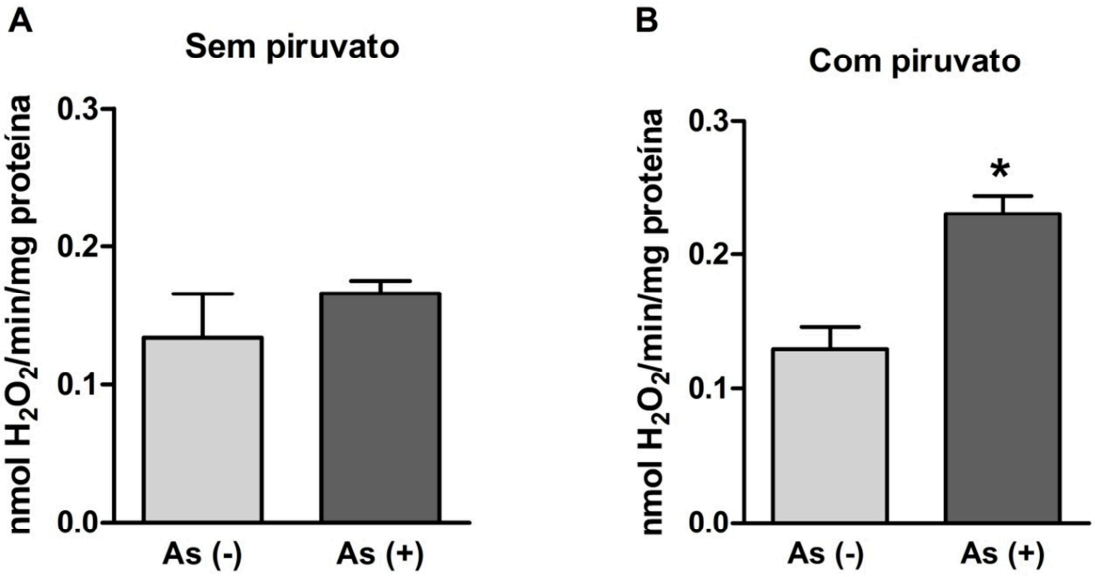
Legenda: Os gráficos representam os valores da média ± erro padrão da média. Demonstrando menor atividade no Grupo As (+) comparado ao grupo As (-), * $p< 0,05$.

Embora estudos na literatura demonstrem papel fundamental na inibição do complexo I mitocondrial, uma vez que como mencionado anteriormente, o piruvato é o substrato para o complexo I e que a piruvato desidrogenase é frequentemente considerada um alvo primário para as ações tóxicas de substâncias contendo As, uma vez, que esta enzima catalisa a descarboxilação oxidativa do produto final da glicólise, o piruvato, para formar acetil CoA enquanto reduz NAD^+ para NADH. Qualquer ruptura de ação desta enzima provoca a diminuição da capacidade celular

para atender às suas necessidades energéticas resultando em danos celulares. A inibição da atividade da enzima por As é considerada uma consequência da ligação do metaloide aos ditióis no componente lipoamida do complexo multi enzimático (ADAMSON, STEVENSON, 1981). Este estudo não encontrou diferenças significativas, utilizando as concentrações comumente encontradas em arroz, na respiração de fígado, com a presença ou ausência de piruvato como substrato, indicando que essa concentração não afetou os parâmetros de respiração mitocondrial estudados.

Estudos prévios têm indicado que a inibição do complexo I pelo As, pode resultar na formação excessiva de EROs, levando a alterações funcionais e estruturais nas mitocôndrias (FLORA, 2011; PRAKASH, KUMAR, 2016). Portanto, foi avaliada a produção de EROs pela quantificação de H_2O_2 na presença e ausência de piruvato. Foram observadas diferenças significativas entre os grupos As (-) e As (+) (quando adicionado piruvato como substrato), demonstrando que o grupo que consumiu uma maior concentração de As pela dieta apresenta uma maior formação de EROs nesta condição exprimental (Figura 17B). Em concordância com nossos resultados, Hosseini et al. (2013) demonstrou um aumento de EROs, na presença de piruvato quando o complexo I da mitocôndria estava inibido. Por outro lado, não foi observado diferença significativa entre os grupos para a formação de EROs, quando o experimento é realizado sem piruvato.

Figura 17: Formação de EROs no tecido hepático permeabilizado.



Legenda: Os gráficos representam os valores da média ± erro padrão da média. A) Formação de Eros na ausência de piruvato, não apresenta diferença entre As (-) e As (+) ($p>0,05$). B) Formação de Eros na presença de piruvato, apresenta diferença estatística entre As (-) e As (+), *$p<0,05$.

A maioria dos estudos sobre os mecanismos de formação de EROs nas mitocôndrias sugerem que a cadeia de transporte de elétrons é o principal fonte de EROs, e o radical anion superóxido é a espécie reativa primária produzido em mitocôndrias (LOPEZ-FABUEL et al., 2016; KOOPMAN et al.2005; MURPHY, 2009).

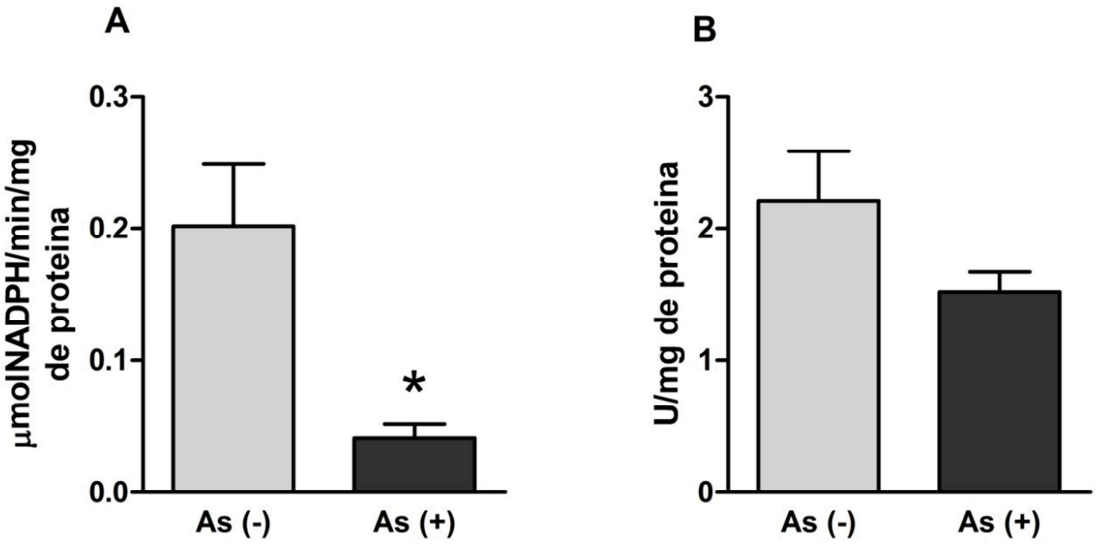
As mitocôndrias são fontes substanciais de espécies reativas de oxigênio na célula porque cerca de 1-2% de anion superóxido na cadeia respiratória mitocondrial sofre uma rápida conversão em H_2O_2 através da superoxido dismutase mitocondrial (SOD) (HOSSEINI et al., 2013).

As enzimas antioxidantes CAT e GPx estão envolvidas no controle redox das células que convertem o H_2O_2 formado em H_2O e O_2 (HALLIWELL, CHIRICO 1993). O As pode ativar o sistema de defesa antioxidante e aumentar a expressão de moléculas como a catalase e glutationa peroxidase que removem o excesso de radicais livres e H_2O_2 formados (SANTRA et al. 2000). No entanto, se o grau de

oxidação exceder a capacidade dessas moléculas antioxidantes, os níveis de atividade das enzimas podem diminuir (SANTRA et al. 2000).

Este estudo demonstrou uma diminuição significativa na atividade de glutationa peroxidase no grupo As (+) quando comparado ao grupo As (-) ($p < 0,05$). Por outro lado, não houve diferença estatística na atividade da catalase entre os grupos estudados. Estes resultados estão mostrados nas Figuras 18 A e 18B, respectivamente.

Figura 18: Atividade das enzimas antioxidantes



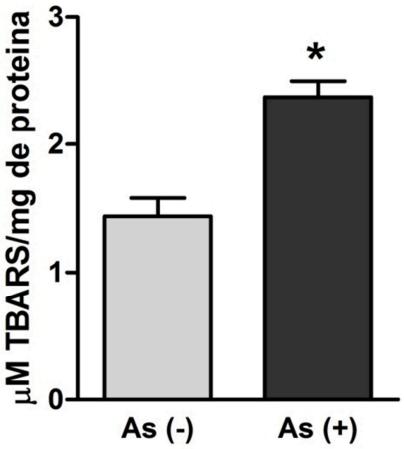
Legenda: Os gráficos representam os valores da média ± erro padrão da média A) Glutationa peroxidade As (-) e As (+) * $p<0,05$. B) Catalase As (-) e As (+) $p>0,05$.

Em recente metanálise Xu et al. (2017) mostrou uma correlação entre a diminuição de glutationa peroxidade e aumento de Eros e peroxidação lipídica pelo aumento do MDA, os autores sugerem que estes resultados se correlacionem com o acúmulo de As no fígado.

A peroxidação lipídica foi avaliada neste estudo pela formação do ácido tiobarbitúrico tecidual. Como mostrado na Figura 19, os níveis de MDA no grupo As

(+) foram significativamente maiores que no grupo As (-), sugerindo que a dieta com arroz contendo As em maior quantidade pode favorecer a peroxidação lipídica.

Figura 19: Peroxidação lipídica.



Legenda: Dados estão apresentados média ± erro padrão da média. Aumento de MDA no grupo As (+) em relação ao As (-), *p>0,05.

5 Conclusão

Pela primeira vez, foi avaliada a respiração de biopsias de músculo e fígado em camundongos *Swiss* após uma dieta contendo As. Embora os resultados das respirações no músculo e no fígado não tenham apresentado diferenças estatisticamente significativas, uma menor produção de EROs na presença de piruvato no grupo As (+) no fígado foi maior em relação ao grupo As (-), juntamente com uma menor atividade de citrato sintase, demonstrando que o As diminui a densidade mitocondrial mas leva a uma maior formação de EROs. Também constatamos que o grupo de animais que consumiram uma maior concentração de As através do arroz contendo As pela dieta apresentaram diminuição na atividade da glutationa peroxidase e um aumento na peroxidação lipídica. Esses dados sugerem

que uma dieta contendo arroz com concentrações de As comumente consumida pela população em geral pode levar a alterações na homeostase redox em hepatócitos.

CONCLUSÃO GERAL

Até o presente momento este é o primeiro trabalho onde plantou-se o arroz para mimetizar uma dieta para camundongos contendo arroz com diferentes concentrações de As. Em seguida, o estudo de bioacessibilidade de As neste arroz, mostrou que as espécies mais bioacessíveis são as formas inorgânicas, consideradas mais tóxicas. Destacando-se o As^{5+}, um inibidor da fosforilação oxidativa. Observou-se também uma ampla distribuição do semimetal nos tecidos dos camundongos *Swiss*. Foi realizado um estudo para verificar possíveis alterações na respiração de tecidos permeabilizados e alterações nos parâmetros redox, onde não se observou diferenças na respiração mitocondrial de músculo e fígado entre os grupos estudados. No entanto, houve uma maior formação de EROs no fígado dos animais que consumiram uma maior concentração de As na presença de piruvato. Ainda, a diminuição na atividade antioxidante e maior peroxidação lipídica foi observada nos animais expostos ao As pelo arroz na maior concentração contido na dieta, demonstrando que a concentração de arroz comumente consumida pode levar a alterações nos parâmetros redox em hepatócitos.

Tomados em conjunto, esses resultados abrem novos horizontes e perguntas sobre os possíveis efeitos gerados pelo consumo de arroz contendo As, uma vez, que as formas inorgânicas mais tóxicas estão bioacessíveis e o consumo de arroz com arsênio em valores comumente encontrados no grão está associado a desequilíbrio na homeostase redox.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in enzymology,** New York, v.105, p.121–126, 1984.

ADAMSON, S. R.; STEVENSON, K. J. Inhibition of pyruvate dehydrogenase multienzyme complex from *Escherichia coli* with a bifunctional arsenoxide: selective inactivation of lipoamide dehydrogenase. **Biochemistry**; Washington, v.20, n. 12, p. 3418-3424,1981.

ADEYEMI, J. A., et al. Arsenic speciation in rice consumed in south-western Nigeria, and estimation of dietary intake of arsenic species through rice consumption. **Toxicological & Environmental Chemistry**; Bayreuth, v. 99, n. 5-6, p.1-8, 2017.

ALAVA, P., et al. Arsenic bioaccessibility upon gastrointestinal digestion is highly determined by its speciation and lipid-bile salt interactions**. Journal of Environmental Science and Health, Part A**, New York, v. 48, n. 6, p. 656-665, 2013.

ALAVA, P., et al. Westernized diets lower arsenic gastrointestinal bioaccessibility but increase microbial arsenic speciation changes in the colon. **Chemosphere**; New York, v.119, p. 757-762, 2015.

AMBROSIO, F., et al. Arsenic induces sustained impairment of skeletal muscle and muscle progenitor cell ultrastructure and bioenergetics**. Free Radical Biology and Medicine;** Tarrytown**,** v.74, p. 64-73, 2014.

APOSHIAN, H. V.; APOSHIAN, M. M. Arsenic toxicology: five questions. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v.19, n.1, p.1-15, 2006.

APOSTOLI, P. et al.. Biological monitoring of occupational exposure to inorganic arsenic**. Occupational and Environmental Medicine;** London, v. 56, n. 12, p.825-832, 1999.

ARSLAN, B., DJAMGOZ, M. B., AKÜN, E. Arsenic: A Review on Exposure Pathways, Accumulation, Mobility and Transmission into the Human Food Chain. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**; New York, v. 243, p., 2017.

ATSDR: Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). "Toxicological Profile for Arsenic." Prepared for the U.S. Department of Health and Human Services.2013

BARRA, C. M. Especiação de arsênio - uma revisão. **Química Nova**; v. 23, n. 1, p. 58–70, 2000.

BERTOMEU-SÁNCHEZ, J. R.. From forensic toxicology to biological chemistry: Normal arsenic and the hazards of sensitivity during the nineteenth century. **Endeavour**; London, v. 40, n. 2, p. 82-92, 2016.

BATISTA, B. L. et al. Rapid sample preparation procedure for As speciation in food samples by LC-ICP-MS. **Food Additives and Contaminants;** London, v. 29, n.5, p. 780-788, 2012.

BATISTA, B. L. et al. Speciation of arsenic in rice and estimation of daily intake of different arsenic species by Brazilians through rice consumption. **Journal of Hazardous Materials**; Amsterdam, v. 191, n. 1-3, p. 342-348, 2011.

BATISTA, B. L. et al. Determination of trace elements in biological samples by inductively coupled plasma mass spectrometry with tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature. **Analytica Chimica Acta**; Amsterdam, v.646, n. 1-2, p. 23-29, 2009.

BATISTA, B. L. et al. 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**; Amsterdam, v.639, n.1-2, p. 13-18, 2009.

BASU, A. et al. Genetic toxicology of a paradoxical human carcinogen, arsenic: a review **Mutation Research**; Amsterdam v. 488, n. 2, p. 171-194, 2001.

BHOWMICK, S., et al. Arsenic in groundwater of West Bengal, India: A review of human health risks and assessment of possible intervention options. **Science of The Total Environment**; Amsterdam, v.612, n.15, p. 148-169, 2018

BHOWMICK, S., et al. Is saliva a potential biomarker of arsenic exposure? A case–control study in West Bengal, India. **Environmental Sciense and Technology**, Washington, v. 47, n. 7, p. 3326–3332, 2013.

BLAJSZCZAK, C.; BONINI, M. G. Mitochondria targeting by environmental stressors: implications for redox cellular signaling. **Toxicology**; Amsterdam, v. 391, n. 1, p. 84-89, 2017.

BOLAN, S, et al. Sources, distribution, bioavailability, toxicity, and risk assessment of heavy metal (loid) s in complementary medicines. **Environment International**; Oxford, v.108, p. 103-118, 2017

BOLT, H.M.; STEWART, J.D. Antioxidant activity of food constituents: relevance for the risk of chronic human diseases. **Archives of Toxicology**; Berlin, v. 86, n. 3, p. 343-3544, 2012.

BORBA, R. P. et al. Determination of total as and inorganic arsenic species for the environmental quality monitoring of groundwaters. **Química Nova**; v. 32, n. 4, p. 970-975, 2009.

BOSMA, M. Lipid droplet dynamics in skeletal muscle. **Experimental cell research**; New York**;** v.340, n. 2, p. 180-186, 2016.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, San Diego, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRAHMAN, K. D., et al. Toxic Risk Assessment of Arsenic in Males Through Drinking Water in Tharparkar Region of Sindh, Pakistan. **Biological Trace Element Research**; London v.172, n. 1, p. 61-71, 2016.

BRAHMAN, K. D., et al. Exposure of children to arsenic in drinking water in the Tharparkar region of Sindh, Pakistan. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v.544, n.15, p. 653-660, 2016.

BRINKEL, J.; KHAN, M. M. H.; KRAEMER, A. A systematic review of arsenic exposure and its social and mental health effects with special reference to Bangladesh. **International Journal of Environmental Research and Public Health**; Basel**,** v. 6, n. 5, p. 1609–1619, 2009.

BRASIL. **MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO: AGROFIT, Secretaria de Defesa Agropecuária**, Brasília, DF, 2004.

BUCHET, J. P., LAUWERYS, R., ROELS, H. Comparison of the urinary excretion of arsenic metabolites after a single oral dose of sodium arsenite, monomethylarsonate or dimethylarsinate in man. **International archives of occupational and environmental health,** Berlin, v. 48, n. 1,p. 71-79, 1981.

BYRNE, S., Were Chinchorros exposed to arsenic? Arsenic determination in Chinchorro mummies' hair by laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry (LA–ICP-MS), **Microchemical Journal**; Amsterdam, v. 94, n. 1, p. 28–35, 2010.

CASCIO, C.; et al. The impact of a rice based diet on urinary arsenic. **Journal of Environmental Monitoring**, Cambridge, v. 13, n. 2, p. 257-265, 2011.

CHEN, C. J.; et al. Cancer potential in liver, lung, bladder and kidney due to ingested inorganic arsenic in drinking water. **British Journal of Cancer**; London, v. 66, n.5, p. 888–892; 1992.

CHEN, C.J. et al. Biomarkers of exposure, effect, and susceptibility of arsenic-induced health hazards in Taiwan. **Toxicology and Applied Pharmacology,** New York**,** v. 206, p. 198-206, 2005.

CHIOU, H. Y.; et al. Arsenic methylation capacity, body retention, and null genotypes of glutathione S-transferase M1 and T1 among current arsenic-exposed residents in Taiwan. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 386, n. 3, p. 197-207, 1997.

CHIOU, T. J. et al. Arsenic trioxide impairs spermatogenesis via reducing gene expression levels in testosterone synthesis pathway. **Chemical Research in Toxicology,** Washington, v. 21, n. 8, p. 1562–1569, 2008.

CIMINELLI, V. S., et al. Dietary arsenic exposure in Brazil: The contribution of rice and beans. **Chemosphere**, Amsterdam, v.168, p. 996-1003, 2017.

CONCHA, G.; NERMELL, B; VAHTER, M. Metabolism of inorganic arsenic in children with chronic high arsenic exposure in northern Argentina. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 106, n. 6, p. 355-359, 1998.

DOUILLET C. et al. Methylated trivalent arsenicals are potent inhibitors of glucose stimulated insulin secretion by murine pancreatic islets. **Toxicology and Applied Pharmacology,** New York, v. 267, n. 1, p.11–15, 2013.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. **Methods in enzymology**, New York, v. 186, p. 421-431, 1990.

EDMUNDS, W. M.; AHMED, K. M.; WHITEHEAD, P. G.. A review of arsenic and its impacts in groundwater of the Ganges–Brahmaputra–Meghna delta, Bangladesh. **Environmental Science: Processes & Impacts**, Cambridge, v. 17, n. 6, 1032-1046, 2015.

European Food Safety Authority (EFSA) (2009) Scientific opinion on As in food. Panel on contaminants in the food chain (CONTAM). EFSA J 7(10):1351

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, disponível em: http://www.cnpaf.embrapa.br, acessado em 13 de julho de 2014.

EOM, S. Y. et al. Effects of low-level arsenic exposure on urinary N-acetyl-β-D-glucosaminidase activity. **Human & Experimental Toxicology**, London, v. 30, n. 12, p. 1885-189, 2011.

ERCAL, N.; GURER-ORHAN, H.; AYKIN-BURNS, N. Toxic metals and oxidative stress.Part I. Mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 1, n. 6, p. 529–539, 2001.

FISKUM, G.; MURPHY, A. N.; BEAL, M. F. Mitochondria in neurodegeneration: acute ischemia and chronic neurodegenerative diseases. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**., v. 19, n. 4, p. 351-69, 1999.

FLORA, S. J. S. Arsenic induced oxidative stress and its reversibility. **Free Radical Biology and Medicine**, Tarrytown, v. 51, n. 2, p. 257-281, 2011.

GARAI, R. et al. Chronic arsenic poisoning from tube-well water. **Journal of the Indian Medical Association**, Calcutta, v. 82, n. 1, p. 34–35, 1984.

GELONEZE, B.; TAMBASCIA, M. A. Avaliação laboratorial e diagnóstico da resistência insulínica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia Metabologia**; Rio de Janeiro, v. 50, n. 2, p. 208-215, 2006.

GERMOLEC, D. R. et al. Arsenic enhancement of skin neoplasia by chronic stimulation of growth factors. **The American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 153, n. 6, p. 1775-1785, 1998.

GIBSON, G. E. et al. Deficits in the mitochondrial enzyme alpha-ketoglutarate dehydrogenase lead to Alzheimer's disease-like calcium dysregulation. **Neurobiology of Aging**, Fayetteville, v. 33, n. 6, p. 1121.e13–1121.e24, 2012

GOLUB, M. S.; MACINTOSH, M. S.; BAUMRIND, N. 1998. Developmental and reproductive toxicity of inorganic arsenic: Animal studies and human concerns. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B,** Washington, v.1, n.3, p. 199–237, 1998.

GOMES, A. S.; MAGALHÃES JÚNIOR, A. M. Arroz Irrigado no Sul do Brasil. 1ª Ed., EMBRAPA Informação Tecnológica: Brasília, 2004.

GOPALKRISHNAN, A.; RAO, M. V. Amelioration by vitamin A upon arsenic induced metabolic and neurotoxic effects. **Journal of Health Sciense**, v. 52, n. 5, p. 568–577, 2006

GOSSAI, A., et al. Rice Consumption and Squamous Cell Carcinoma of the Skin in a United States Population. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 125, n. 9, 97005, 2017.

GREEN, D. R.; REED, J. C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, New York, v. 281, n. 28, p. 1309–1312, 1998.

GUHA MAZUMDER, D. N. et al. Arsenic levels in drinking water and the prevalence of skin lesions in West Bengal, India. **International Journal of Epidemiology**, London, v. 27, n. 5, p. 871-877, 1998.

HALLIWELL, Barry; CHIRICO, Susanna. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 57, n. 5, p. 715S-724S, 1993.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage invivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**,London v. 142, n. 2 , p.231–255; 2004.

HAQUE, R., et al. 2003. Arsenic in drinking water and skin lesions: dose–response data from West Bengal, India. **Epidemiology;** Hagerstown, v.14, n. 2, p. 174–182, 2003.

HE, Yi et al. Bioaccessibility of arsenic in various types of rice in an in vitro gastrointestinal fluid system. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, New York, v. 47, n. 2, p. 74-80, 2012.

HSUEH, Y. M. et al. The polymorphism XRCC1 Arg194Trp and 8-hydroxydeoxyguanosine increased susceptibility to arsenic-related renal cell carcinoma. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v.*332*, n. 1, p.1-7, 2017.

HOPENHAYN, C. et al. Profile of urinary arsenic metabolites during pregnancy. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 111, p.1888-1891, 2003.

HOSSAIN, M. A. Water consumption patterns and factors contributing to water consumption in arsenic affected population of rural West Bengal, India. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 463–464, p. 1217–1224, 2013

HOSSEINI, M. J. et al. Toxicity of arsenic (III) on isolated liver mitochondria: a new mechanistic approach. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research,** Tehran v.12(Suppl), p. 121-138, 2013.

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

HUGHES, M. F. et al. Accumulation and metabolism of arsenic in mice after repeated oral administration of arsenate, **Toxicology and Applied Pharmacology**; New York, v. 191, n.3, 202-210, 2003.

HUGHES, M. F. Biomarkers of Exposure: A Case Study with Inorganic Arsenic. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 1790, n. 11, p. 1790–1796.

IBGE; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. ***Aquisição alimentar domiciliar per capita anual, por Grandes Regiões, segundo os produtos**, período 2008-2009,* 2013

ISLAM, S., et al. Variation in arsenic bioavailability in rice genotypes using swine model: An animal study. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v.599, p. 324-333, 2017.

JOLLIFFE, D. M.; BUDD, A. J.; GWILT, D. J. Massive acute arsenic poisoning. **Anaesthesia, Oxford, v. 46, n. 4, p. 288-290, 1991.**

JOMOVA, K., et al. Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. **Journal of Applied Toxicology**, Philadelphia, v. 31, n. 2, p. 95-107, 2011.

JOSEPH, T., DUBEY, B., McBEAN E. A. A critical review of arsenic exposures for Bangladeshi adults. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 527, p. 540-551, 2015.

JUHASZ, A. L. et al. In vivo assessment of arsenic bioavailability in rice and its significance for human health risk assessment. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park. v.114, n.12, 1826–1831, 2006.

KADONO, T. et al. Skin manifestations of arsenicosis in two villages in Bangladesh. **International Journal of Dermatology,** Oxford, v.41, n. 12, p**.** 841-846, 2002.

KARAGAS, M. R., et al. Drinking water arsenic contamination, skin lesions, and malignancies: a systematic review of the global evidence. **Current Environmental Health Reports**; v.2, n.1, p. 52-68, 2015.

KENYON, E.; HUGHES, M.; ADAIR, B. 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**, New York, v.232, n.3, p. 448–55, 2008.

KITCHIN, K. T. Recent advances in arsenic carcinogenesis: modes of action, animal model systems, and methylated arsenic metabolites. **Toxicology and Applied Pharmacology,** New York, v. 172, p. 249–261; 2001.

KITCHIN, K. T.; CONOLLY, R. Arsenic-induced carcinogenesis—oxidative stress as a possible mode of action and future research needs for more biologically based risk assessment. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 23, n. 2, p.327–335; 2010

KLAASSEN, C. D. **Casarett and Doull's Toxicology:** The Basic Science of Poisons. USA, McGraw-Hill, 2008.

KOCH, I. et al. Bioaccessibility and excretion of arsenic in Niu Huang Jie Du Pian pills. **Toxicology and applied pharmacology,** New York, v. 222, n. 3, p. 357-364, 2007.

KOCH, I., et al. Bioaccessibility of lead and arsenic in traditional Indian medicines. **Science of The Total Environment**; Amsterdam, v.409, n. 21, p. 4545-4552, 2011.

KOOPMAN, W. J. H. et al. Inhibition of complex I of the electron transport chain causes O 2−·-mediated mitochondrial outgrowth. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, Bethesda, v. 288, n. 6, p. 1440-1450, 2005.

KOTYZOVÁ, D.; BLUDOVSKÁ, M.; EYBL, V. Differential influences of various arsenic compounds on antioxidant defense system in liver and kidney of rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**; Amsterdam, v. 36, n. 3, p.1015–1021, 2013.

KOYA, R. C. et al. Gelsolin inhibits apoptosis by blocking mitochondrial membrane potential loss and cytochrome c release. **The Journal of Biological Chemistry,** Baltimore**,** v. 275, n. p.15343–15349, 2000.

KROEMER, G. Mitochondrial control of apoptosis: an overview. **Biochemical Society symposium**, Cambridge, v. 66, p. 1–15, 1999.

KUO, C. C et al. The association of arsenic metabolism with cancer, cardiovascular disease and diabetes: a systematic review of the epidemiological evidence environmental health perspectives. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 125, n. 8, p., 1-15, 2017.

LAPARRA, J. M. et al. Bioavailability of inorganic arsenic in cooked rice: practical aspects for human health risk assessments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**; Amsterdam v. 53, n. 22, p. 8829–8833, 2005

LEE, C.U. et al. Redox modulation of PTEN phosphatase activity by hydrogen peroxide and bisperoxidovanadium complexes. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 54, n. 46, p. 13796-13800, 2015.

LI, J., et al. Tissue-specific distributions of inorganic arsenic and its methylated metabolites, especially in cerebral cortex, cerebellum and hippocampus of mice after a single oral administration of arsenite. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology,** Stuttgart, v. 43, p. 15-22, 2017.

LIAO, X. et al. Soil As contamination and its risk assessment in areas near the industrial districts of Chenzhou City, Southern China. **Environment International**, Amsterdam, v. 31, n. 6, p. 791-798, 2005.

LIU J.; KILLILEA, D. W.; AMES, B. N. Age-associated mitochondrial oxidative decay: improvement of carnitine acetyltransferase substrate binding affinity and activity in brain by feeding old rats acetyl-L-carnitine and/or R-alpha-lipoic acid. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America;** Washington, v. 99, n. 4, p. 1876–188, 2002.

LOBO, V. et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy reviews**; Mumbai, v. 4, n. 8, p. 118–126, 2010.

LOPEZ-FABUEL, I. et al. Complex I assembly into supercomplexes determines differential mitochondrial ROS production in neurons and astrocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington v.133, n. 46, p. 13063-13068, 2016.

LU, Y. et al. Baseline soil variation is a major factor in As accumulation in bengal delta paddy rice. **Environmental Science and Technology***,* Washington, v. 43, n. 6, p. 1724-1729, 2009.

LUZI L, PETRIDES AS, DE FRONZO RA. Different sensitivity of glucose and amino acid metabolism to insulin in NIDDM. Diabetes 1993; 42:1868–1877.

LUZI L, PETRIDES AS, DE FRONZO RA. Different sensitivity of glucose and amino acid metabolism to insulin in NIDDM. Diabetes 1993; 42:1868–1877.

LUZI L, PETRIDES AS, DE FRONZO RA. Different sensitivity of glucose and amino acid metabolism to insulin in NIDDM. Diabetes 1993; 42:1868–1877.

LUZI, L., PETRIDES, A. S.; DE FRONZO, R. A. Different sensitivity of glucose and amino acid metabolism to insulin in NIDDM. **Diabetes,** Alexandria**,** v. 42, n. 12, p.1868-1877, 1993.

LYNCH, H. N. et al.. Quantitative assessment of lung and bladder cancer risk and oral exposure to inorganic arsenic: Meta-regression analyses of epidemiological data. **Environment International**; Amsterdam, *In press,* 2017.

MANDAL, B.K., SUZUKI, K.T., ANZAI, K., Impact of arsenic in foodstuffs on the people living in the arsenic-affected areas of West Bengal, India. **Journal of environmental science and health. Part A**, New York, v.42,n. 12, p. 1741–1752, 2007.

MARAFANTE, E.; VAHTER, M. The effect of methyltransferase inhibition on the metabolism of [^{74}As] arsenite in mice and rabbits. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v. 50, n. 1, p.49-57,1984.

MARAFANTE, E.; VAHTER, M.; ENVALL, J. The role of the methylation in the detoxication of arsenate in the rabbit. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v. 56, n. 2-3, p.225-238, 1985.

MARAFANTE, E.; VAHTER, M. Solubility, retention and metabolism of intratracheally and orally administered inorganic arsenic compounds in the hamster. **Environmental Research**, Amsterdam, v. 42, n. 1, p.72- 82, 1987.

MAHATA, J. et al. Effect of selenium and vitamin E supplementation on plasma protein carbonyl levels in patients with arsenic-related skin lesions. **Nutrition and Cancer**, Philadelphia, v. 60, n. 1, p.55–60, 2008.

MATTIASSON**,** G. et al. Flow cytometric analysis of mitochondria from CA1 and CA3 regions of rat hippocampus reveals differences in permeability transition pore activation. **Journal of neurochemistry**, Oxford, v. 87, n. 2, p. 532-44, 2003

MAULL, E. A., et al. Evaluation of the association between arsenic and diabetes: a National Toxicology Program workshop review. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park , v. 120, p. 1658–1670, 2012.

MAZUMDER, D. G. Chronic arsenic toxicity & human health**. The Indian Journal of Medical Research**. v.128, n. 4, p. 436-447, 2008.

MEHARG**,** A. A.; et al. Variation in rice cadmium related to human exposure. **Environmental Science and Technology**, Washington, v. 47, n. 11, p. 5613-5618,. 2013

MEHARG, A. A. et al. Geographical variation in total and inorganic As content of polished (white) rice. **Environmental Science and Technology**, Washington v. 43, n. 5, p. 1612-1617, 2009.

MEHARG, A. A. et al. Speciation and localization of arsenic in white and brown rice grains. . **Environmental Science and Technology**, Washington, v. 42, n.4, p.1051-1057, 2008.

MELKONIAN S. et al. Urinary and dietary analysis of 18,470 Bangladeshis reveal a correlation of rice con- sumption with arsenic exposure and toxicity. **PLoS One,** San Francisco**,** v. 8, n. 11, p. e80691, 2013.

MIDDLETON, D. R. et al. Prolonged exposure to arsenic in UK private water supplies: Toenail, hair and drinking water concentrations. **Environmental Science: Processes & Impacts**, Cambridge, v. 18 n. 5, p. 562-574, 2016

MISHRA, D.; MEHTA, A.; FLORA, S. J. S. Reversal of arsenic-induced hepatic apoptosis with combined administration of DMSA and its analogues in guinea pigs: role of glutathione and linked enzymes. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 21, n. 2, p. 400–407, 2008.

MONDAL, D.; POLYA, D. A. Rice is a major exposure route for arsenic in Chakdaha block, Nadia district, West Bengal, India: A probabilistic risk assessment. **Applied Geochemistry**, Amsterdam,v. 23, n. 11, p. 2987-2998, 2008.

MOOTHA, V. K. et al. PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. **Nature Genetics**, New York, v.34, n. 3 p. 267–273, 2003.

MORINO, K. et al. Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin resistant offspring of type 2 diabetic parents. **The Journal of clinical investigation,** New Haven, v. 115, n. 12 p. 3587–3593, 2005.

MULLER, F. L.; LIU, Y.; VAN REMMEN, H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore v. 279, p.49064–49073, 2004.

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochemical Journal**, London, v. 417, n. 1, p. 1-13, 2009.

NACANO, L. R., FREITAS, R.; BARBOSA JR, F. 2014. Evaluation of seasonal dietary exposure to arsenic, cadmium and lead in schoolchildren through the analysis of meals served by public schools of Ribeirão Preto, Brazil. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, Ottawa, v. 77, n.7, p.367-374, 2014.

NADIMI-GOKI, M. et al. Assessment of total soil and plant elements in rice-based production systems in NE Italy. **Journal of Geochemical Exploration**, Amsterdam, v. 147, p. 200–214, 2014.

NARDI, E. P.; et al, 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,** v. 112, n. 3, p. 727, 2009

NASRREDINE, L.; PARENT-MASSIN, D. Food contamination by metals and pesticides in the European Union. Should we worry? **Toxicology Letters**, Amsterdam, v.127, n. 1-3, p. 29–41, 2002.

NAVA-HERNANDEZ, M. P. et al. Lead, cadmium, and arsenic-induced DNA damage in rat germinal cells. **DNA and Cell Biology,** Larchmont, v. 28, n. 5, p. 241–248, 2009.

NAVAS-ACIEN, A. et al. Arsenic exposure and type 2 diabetes: a systematic review of the experimental and epidemiological evidence. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park , v. 114, p. 641–648, 2006

NAVAS-ACIEN, A. et al. Seafood intake and urine concentrations of total arsenic, dimethylarsinate and arsenobetaine in the US population. **Environmental research**, Amsterdam v.111, n.1, p. 110-118, 2011.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: princípios de bioquímica**. 6 ed. Porto Alegre. Editora Artmed. 1336p. 2014

NEMETI, B.; GREGUS, Z. Reduction of arsenate to arsenite in hepatic cytosol. **Toxicological Sciences**, v. 70, n. 1, p. 4–12, 2002.

NICHOLLS DG. **Bioenergetics**. An introduction to the chemiosmotic theory, first ed. Academic Press, London, 1982.

NORDSTROM, D. K. Public health. Worldwide occurrences of arsenic in ground water. **Science**, New York, v. 296, p.213-215, 2002.

NRC, 2003. Bioavailability of Contaminants in Soils and Sediments - Processes, Tools and Applications. The National Academies Press, Washinton DC.

ORR, S. E.; BRIDGES, C. C. Chronic Kidney Disease and Exposure to Nephrotoxic Metals. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v.18, n.5, p.1039, 2017

ORRENIUS, S., ZHIVOTOVSKY, B., NICOTERA, P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. **Nature reviews. Molecular cell biology,** London v.4, n.7, p. 552–565, 2003.

PARK, S. K. et al. Arsenic exposure is associated with diminished insulin sensitivity in non-diabetic Amish adults**. Diabetes Metabolism Research and Reviews** , Oxford, v. 32, n.6, p. 565–571, 2016.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitati characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, New York, v. 70, n. 1, p. 158-169, 1967.

PEDERSEN, P. L. et al. Preparation and characterization of mitochondria and submitochondrial particles of rat liver and liver derived tissues, **Methods in Cell Biology,** New York**,** v.20, p.411–481, 1978.

PENG, H. et al. Methylated Phenylarsenical Metabolites Discovered in Chicken Liver. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 56, n. 24, p. 6773-6777, 2017.

PETROPULU, M. O.; VARSAMIS, J.; PARISSAKIS, G. Speciation of arsenobetaine in marine organisms using a selective leaching/digestion procedure and hydride generation atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 337, n. 3, p. 323-327, 1997.

POLO, A. et al. Environment and bladder cancer: molecular analysis by interaction networks. **Oncotarget,** Albany, v. 15, p. 65240-6525. 2017.

PRAKASH, C., SONI, M., KUMAR, V. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in arsenic neurotoxicity: A review. **Journal of Applied Toxicology**, Philadelphia, v. 36, n.2, p. 179-188, 2016.

PRAKASH, C.; KUMAR, V. Chronic arsenic exposure-induced oxidative stress is mediated by decreased mitochondrial biogenesis in rat liver. **Biological Trace Element Research**, London, v. 173, n. 1, p. 87-95, 2016.

PULIDO, M. D.; PARRISH, A. R. Metal-induced apoptosis: mechanisms. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 533, p. 227–241; 2003

QUATREHOMME, G. et al.; Acute arsenic intoxication: forensic and toxicologic aspects (an observation). **Journal of Forensic Sciences**, Malden, v. 37, n.4, p. 1163-1171, 1992.

QUAZI, S.; SARKAR, D.; DATTA, R. J. Human health risk from arsenical pesticide contaminated soils: a long-term greenhouse study. **Journal of hazardous materials**, Amsterdam, v. 262 , p. 1031-1038, 2013.

RAHMAN, M. M.; OWENS, G.; NAIDU, R. Arsenic levels in rice grain and assessment of daily dietary intake of As from rice in As-contaminated regions of Bangladesh - implications to groundwater irrigation. **Environmental Geochemistry Health**, Dordrecht, v. 31, p. 179 -187,2009.

RAHMAN, M. M.; NG, J. C.; NAIDU, R. Chronic exposure of arsenic via drinking water and its adverse health impacts on humans. **Environmental Geochemistry Health,** Dordrecht,v. 31 S1, p.189–200, 2009.

RAHMAN, M.; et al. Hypertension and arsenic exposure in Bangladesh. **Hypertension**, Dallas, v. 33, n. 1, p.74–78; 1999.

RAHMAN, M. et al. Diabetes mellitus associated with arsenic exposure in Bangladesh. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v. 148, p. 198–203; 1998.

RANA, T. et al. Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in male Wistar rats. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, New York, v. 26, p.109–116, 2012.

RATNAIKE, R. N. Acute and chronic arsenic toxicity. **Postgraduate Medical Journa**l. London, v.79, p. 391-396, 2003.

ROSSMAN, T. G. Mechanism of arsenic carcinogenesis: an integrated approach. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 533, p. 37–65, 2003.

ROSTAMI, I.; JUHASZ, A.L. Assessment of persistent organic pollutant (POP) bioavailability and bioaccessibility for human health exposure assessment: a critical review**. Critical Reviews in Environmental Science and Technology,** 41 n. 7, p. 623–656, 2011

SAGE, A.P., et al. Oncogenomic disruptions in arsenic-induced carcinogenesis. **Oncotarget,** Albany**,** v. 8, n. 15, p. 25736–25755, 2017

SAHA, G. C.; ALI, M. A. Dynamics of arsenic in agricultural soils irrigated with arsenic contaminated groundwater in Bangladesh. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 379, p. 180-189, 2007

SAHA, K. C.; PODDAR, D., Further studies on chronic arsenical dermatosis. **Indian Journal of Dermatology**, Calcutta, v. 31, p. 29–33, 1986.

SAMANTA, G. et al. Arsenic and other elements in hair, nails, and skin-scales of arsenic victims in West Bengal, India. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 326, n. 1-3, p. 33–47, 2004.

SANTOS, E. C. O. et al. Exposição ao mercúrio e ao arsênio em Estados da Amazônia: síntese dos estudos do Instituto Evandro Chagas/FUNASA. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, Rio de Janeiro, v. 6, p. 171-185, 2003

SANTRA, A. et al. Arsenic induces apoptosis in mouse liver is mitochondria dependent and is abrogated by *N*-acetylcysteine. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 220, n. 2, p. 146–155, 2007

SANTRA, A. M. A. L. et al. Oxidative stress in liver of mice exposed to arsenic-contaminated water. **Indian Journal of Gastroenterology**, Bombay, v. 19, n. 3, p. 112-115, 2000.

SATTAR A, et al. Metabolism and toxicity of arsenicals in mammals. **Environmental Toxicology and Pharmacology,** Amsterdam, v.48, p. 214–224, 2016.

SCHOOF, R. A. et al. A market basket survey of inorganic arsenic in food. **Food and chemical toxicology,** New York**,** v. 37, p. 839-846, 1999

SCHOOLMEESTER, W. L.; WHITE, D. R.; Arsenic poisoning **Southern Medical Journal.,** Birmingham, v. 73, n. 2, p. 198- 208, 1980

SCOTT, N. et al. Reactions of arsenic (III) and arsenic (V) species with glutathione. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 6, n. 1, p. 102-106, 1993.

SEGURA, F. R., et al. Arsenic speciation in Brazilian rice grains organically and traditionally cultivated: Is there any difference in arsenic content?. **Food Research International**, Ottawa, v.89, p.169-176, 2016.

SEPAND, M. R. et al. Effect of acetyl-L-carnitine on antioxidant status, lipid peroxidation, and oxidative damage of arsenic in rat. **Biological Trace Element Research**, London, v. 171, p. 107–115, 2016.

SHI, H.; SHI, X.; LIU, K.J. Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis. **Molecular and Cellular Biochemistry,** The Hague**,** v. 255, p. 67-78, 2004.

SILBERGELD, E. K.; NACHMAN, K. The Environmental and Public Health Risks Associated with Arsenical Use in Animal Feeds. **New York Academy of Sciences**, v. 1140, p. 346-357, 2008

SILVA, R. F., et al. Arsenic trioxide exposure impairs testicular morphology in adult male mice and consequent fetus viability. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A,** Ottawa, v. 80, n. 19-21, p. 1166-1179, 2017.

SINHA, M., MANNA, P., SIL, P. C. Arjunolic acid attenuates arsenic-induced nephrotoxicity. **Pathobiology**, Amsterdam, v.15, p.147–156, 2008.

SIROT, V., et al. Dietary exposure and biomarkers of arsenic in consumers of fish and shellfish from France. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 407, n. 6, 1875–1885, 2009

SMITH, A. H., et al. Lung, Bladder, and Kidney Cancer Mortality 40 Years After Arsenic Exposure Reduction. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute,** Oxford, In press, 2017

SOIGNET, S. L., et al. United States multicenter study of arsenic trioxide in relapsed acute promyelocytic leukemia. **Journal of Clinical Oncology,** v.19, n.18, p. 3852–60, 2001.

SON, Y. O. et al. Cr (VI) induces mitochondrial-mediated and caspase-dependent apoptosis through reactive oxygen species-mediated p53 activation in JB6 Cl41 cells. **Toxicology and applied pharmacology**, New York, v. 245, n. 2, p. 226-235, 2010

SORIA, E. A. et al.. Immunotoxicological effects of arsenic bioaccumulation on spatial metallomics and cellular enzyme response in the spleen of male Wistar rats after oral intake. **Toxicology letters**, Amsterdam, v. 266, 65-73, 2017.

SOUZA, J. M.; et al. Arsênio e arroz: toxicidade, metabolismo e segurança alimentar. **Química Nova**, v. 38, n. 1, p.118-127, 2015

SOUZA, A. C. et al. Effects of sodium arsenate and arsenite on male reproductive functions in Wistar rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A,** Ottawa**,** v. 79, p. 274–286, 2016.

SUN, G. X. et al. Arsenic in cooked rice: effect of chemical, enzymatic and microbial processes on bioaccessibility and speciation in the human gastrointestinal tract. **Environmental Pollution**, Barking, v. 162, p. 241–246, 2012.

SUNG, T. C.; HUANG, J. W.; GUO, H. R. Association between arsenic exposure and diabetes: a meta-analysis. **Biomed Research International**, New York, 368087, 2015.

SUZUKi, K. T. et al. Distributions and chemical forms of arsenic after intravenous administration of dimethylarsinic and monomethylarsonic acids to rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 198, n. 3, p. 336–44, 2004.

TAHARA, E. B.; NAVARETE, F. D. T; KOWALTOWSKI, A. J. Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. **Free Radical Biology and Medicine**, Tarrytown, v. 46, n. 9, p. 1283-1297, 2009.

TOKAR E. J.; et al. Cancer in experimental animals exposed to arsenic and arsenic compounds. **Critical Reviews in Toxicology**, London, v. 40, n. 10, p. 912–927, 2010

TRENARY, H. R., et al. An in vitro assessment of bioaccessibility of arsenicals in rice and the use of this estimate within a probabilistic exposure model. **Journal of Exposure . Sciense and Environmental Epidemiology**, New York, v. 22, n. 4, p.369–375, 2012.

TSENG, C. H. et al. Long-term arsenic exposure and incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus: a cohort study in arseniasis-hyperendemic villages in Taiwan. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v.108, p.847–851; 2000

VALKO, M. et al. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence**.** **Molecular and Cellular Biochemistry**, The Hague, v. 266, n. 1-2, p.37–56; 2004.

VAHTER, M.; et al. A unique metabolism of inorganic arsenic in native Andean women. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam,, v. 293, n. 4, p. 455-462, 1995

VAHTER, M.; CONCHA, G.; NERMELL, B. Factors influencing arsenic methylation in humans. **Journal of Trace Elements in Experimental Medicine**, v. 13, p. 173-184, 2000

VAHTER, M.; et al. Differences in the disposition and toxicity of metals. **Environmental Research**, Amsterdam, v.104, p.85-95, 2007

VIZCAYA-RUIZ, A.; et al.. Biomarkers of oxidative stress and damage in human populations exposed to arsenic**. Mutation Research**, Amsterdam, v. 674, p. 85–92, 2009.

WAALKES, M. P. et al. Estrogen signalling in livers of male mice with hepatocellular carcinoma induced by exposure to arsenic in utero. **Journal of the National Cancer Institute**, Oxford, v. 96, n. 6, p. 466–474, 2004.

WANG, J. P., et al. Association of arsenic and kidney dysfunction in people with diabetes and validation of its effects in rats. **Environment International**, Amsterdam, v.35, n. 3, p. 507-511, 2009.

WANG, C. H.; et al. A review of the epidemiologic literature on the role of environmental arsenic exposure in cardiovascular diseases. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 222, n. 3, p. 315–326, 2007.

WANG, X; MICHAELIS, E. K. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. **Frontiers in Aging Neuroscience**, Lausanne, v. 2, p. 1-13, 2010

WATANABE, T.; HIRANO, S. Metabolism of arsenic and its toxicological relevance. **Archives of Toxicology**, Berlin, v. 87, n.6, p. 969–979, 2013.

WEI, B. et al. Trace Metals in the Urine and Hair of a Population in an Endemic Arsenism Area. **Biological Trace Element Research**, London, In press, 2017.

WHO, World Health Organization.Enviromental Health Criteria 224: Arsenic and arsenic compounds. Geneva, 2001.

WILLIAMS, P.N. et al. Variation in arsenic speciation and concentration in paddy rice related to dietary exposure. **Environmental Science and Technology,** Washington, v. 39, p. 5531–5540, 2005.

WILLIAMS, P.N.; et al. Increase in rice grain As for regions of Bangladesh irrigating paddies with elevated As in groundwaters. **Environmental Science and Technology**, Washington, v. 40, p. 4903-4908, 2006

XIAO, X. et al. Mapping paddy rice agriculture in southern China using multi-temporal MODIS images. **Remote Sensing of Environment**, Amsterdam v. 95, n. 4, p. 480-492, 2005.

XU, X. Y. et al. Growing rice aerobically markedly decreases As accumulation. **Environmental Science and Technology**, Washington, v. 42, p. 5574-5579, 2008.

XU, M., et al. Oxidative Damage Induced by Arsenic in Mice or Rats: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Biological Trace Element Research**, London, v. 176, n.1, p. 154-175, 2017.

XUE, P. et al. Prolonged inorganic arsenite exposure suppresses insulin-stimulated AKT S473 phosphorylation and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes: involvement of the adaptive antioxidant response. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, n v. 407, n. 2, p.360–365, 2011.

YAMANAKA, K. et al. Mutagenicity of dimethylated metabolites of inorganic arsenics. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 37, n. 10, p.2753–2756; 1989.

YAMANAKA, K. et al. Induction of DNA damage by dimethylarsine, a metabolite of inorganic arsenics,is for the major part likely due to its peroxyl radical. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 168, n. 1, p. 58–64; 1990.

YOSHIDA, T.; YAMAUCHI, H.; SUN, G. F. Chronic health effects in people exposed to arsenic via the drinking water: dose–response relationships in review. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v.198, n. 3, 243-252, 2004.

ZAVALA, Y. J. et al. Arsenic in Rice: II. Arsenic Speciation in USA Grain and Implications for Human Health. **Environmental Science and Technology**, Washington,v. 42, p. 3861-3866, 2008.

ZHANG, F. et al. Arsenite binds to the RING finger domains of RNF20-RNF40 histone E3 ubiquitin ligase and inhibits DNA double-strand break repair. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 136, n. 37, p. 12884-12887, 2014.

ZHENG, Y., et al. Protection of Taurine against arsenic-induced DNA damage of mice kidneys. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 975, p. 917-927, 2017.

ZHOU, M. et al. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases**. Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 15, n. 2, p. 162–168, 1997.

ANEXO

ANEXO – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação de parâmetros bioquímicos e toxicológicos em camundongos decorrentes do consumo de arroz contendo arsênico", protocolo nº 15.1.486.60.0, sob a responsabilidade de Airton da Cunha Martins Junior e do Prof. Fernando Barbosa Junior, que envolve manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto º 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado *ad referendum* pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP) na data de 19/04/2016.

Vigência do Projeto	07/08/2015 a 07/08/2017
Espécie/Linhagem	Camundongo isogênico Swiss
Nº de animais	32
Peso/Idade	15-20g/ 30 dias
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central USP RP

Ribeirão Preto, 19 de abril de 2016.

Profa. Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui
Presidente da CEUA-FCFRP

Avenida do Café S/Nº - Monte Alegre – CEP 14040-903 – Ribeirão Preto – SP
Comissão de Ética no Uso de Animais – ceua@fcfrp.usp.br
Fone: (16) 3315-8559 – Fax: (16) 33152-4892