

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

VIVIANE AMARAL PORTO

**TOXICIDADE DO METILARSINATO DE SÓDIO EM EMBRIÕES DE
ZEBRAFISH (*Danio rerio*): ESTUDO ECOTOXICOLÓGICO E ANÁLISE
METABOLÔMICA BASEADA EM RMN ¹H**

Maceió/AL
2023

VIVIANE AMARAL PORTO

**TOXICIDADE DO METILARSINATO DE SÓDIO EM EMBRIÕES DE
ZEBRAFISH (*Danio rerio*): ESTUDO ECOTOXICOLÓGICO E ANÁLISE
METABOLÔMICA BASEADA EM RMN ¹H**

Dissertação de Mestrado apresentada à Banca examinadora do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Mendonça de Aquino.

Co-orientador: Prof. Dr. Lázaro Wender Oliveira de Jesus.

Maceió/AL
2023

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

M929p Porto, Viviane Amaral.

Toxicidade do metilarsinato de sódio em embriões de *Zebrafish* (*Danio rerio*) : estudo ecotoxicológico e análise metabolômica baseada em RMN ¹H / Viviane Amaral Porto. – 2023.

131 f. : il. color.

Orientador: Thiago Mendonça de Aquino.

Co-orientador: Lázaro Wender Oliveira de Jesus.

Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2023.

Bibliografia: f. 103-122.

Apêndices: f. 124-131.

1. Arsênio. 2. Ecotoxicologia. 3. Biomarcadores. 4. Metabonômica. I. Título.

CDU: 615



Ata de Defesa de Dissertação

Aos cinco dias do mês de setembro de 2023, às nove horas, reuniu-se, via videoconferência, a banca examinadora composta pelos doutores, Thiago Mendonça de Aquino, Luciano Aparecido Meireles Grillo, Alessandre Carmo Crispim e Lázaro Wender Oliveira de Jesus, e pela docente doutora, Daniela Santos Anunciação para o **exame de defesa** da dissertação intitulada: “**Avaliação da toxicidade do metilarsinato de sódio em embriões de zebrafish (Danio rerio) por meio de estudo toxicológico e análise metabólica baseada em RMN 1H**”, elaboradora pelo mestranda **Viviane Amaral Porto**, regularmente matriculada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, nível mestrado, sob a orientação do **Prof. Dr. Thiago Mendonça de Aquino**. Em seguida, reunidos em sessão secreta às **9:55** horas, os examinadores consideram a dissertação (**X**) **APROVADA OU () APROVADA COM RESTRIÇÃO**, emitindo o seguinte parecer_____

Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada às **12:30** horas e eu, Daniel de Brito Ricarte, Secretário do PPGCF, Mestrado, lavrei a presente ata que segue assinada pela Banca Examinadora e pela mestranda.

Maceió, 05 de setembro de 2023

Presidente (Orientador): Prof. Dr. Thiago Mendonça de Aquino

Documento assinado digitalmente
gov.br THIAGO MENDONCA DE AQUINO
Data: 05/09/2023 16:24:03-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Examinador Interno: Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo

Documento assinado digitalmente
gov.br LUCIANO APARECIDO MEIRELES GRILLO
Data: 06/09/2023 16:00:07-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Examinador Externo: Prof. Dr. Alessandre Carmo Crispim

Documento assinado digitalmente
gov.br ALESSANDRE CARMO CRISPIM
Data: 06/09/2023 21:08:58-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Examinador Externo: Prof. Dr. Lázaro Wender Oliveira de Jesus

Documento assinado digitalmente
gov.br LAZARO WENDER OLIVEIRA DE JESUS
Data: 11/09/2023 10:30:57-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Examinadora Externa: Profa. Dra. Daniela Santos Anunciação

Documento assinado digitalmente
gov.br DANIELA SANTOS ANUNCIACAO
Data: 05/09/2023 16:38:49-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Mestranda: Viviane Amaral Porto

Documento assinado digitalmente
gov.br VIVIANE AMARAL PORTO
Data: 20/09/2023 22:02:06-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

RESUMO

Pesticidas e produtos veterinários contendo compostos orgânicos de arsênio, como o metilarsenato de sódio (MSMA), são amplamente utilizados na agricultura e pecuária para aumentar a produtividade. Neste estudo, foi investigado o impacto do MSMA em uma espécie aquática, o peixe *zebrafish*, combinando o estudo ecotoxicológico e a análise metabolômica baseada em ressonância magnética nuclear (RMN). A espécie modelo foi escolhida devido às suas características vantajosas como modelo de laboratório, incluindo semelhança genética com mamíferos, fácil manutenção, alta fecundidade e embriões transparentes. O estudo consistiu na exposição aguda (96h) dos embriões *zebrafish* utilizando diferentes concentrações de MSMA (0, 10, 30 e 60 mg L⁻¹), primeiramente para determinar a CL₅₀, e posteriormente avaliar a embriotoxicidade. Então, amostras (7n) de diferentes tratamentos foram selecionadas para análise metabolômica. A análise de embriotoxicidade mostrou que a exposição ao MSMA causou teratogenicidade, cardiotoxicidade, neurotoxicidade e mortalidade no *zebrafish*. O perfil metabolômico identificou 34 metabólitos associados a várias vias metabólicas impactadas pela exposição ao MSMA. Além disso, os resultados da análise multivariada revelaram metabólitos discriminantes, tais como (i) lactato, sugerindo potenciais alterações nas vias de metabolismo energético; (ii) glutatona, indicando distúrbios no sistema de proteção antioxidante celular; (iii) xantina, sugerindo impactos no metabolismo de purinas; (iv) glutamato: sugere efeitos neurotóxicos; (v) triptofano: potenciais impactos no metabolismo de aminoácidos e síntese de proteínas; (vi) acetoacetato, possíveis distúrbios no metabolismo energético e oxidação de ácidos graxos; e adenosina monofosfato (AMP), que pode indicar distúrbios no metabolismo energético celular. Esses resultados devem contribuir para o avanço do conhecimento sobre o impacto de contaminantes no organismo do *zebrafish*, facilitando avaliações de risco e desenvolvendo medidas de proteção ambiental. Ainda, a compreensão dos mecanismos de toxicidade deve possibilitar a identificação de alvos terapêuticos, auxiliando no desenvolvimento de estratégias para minimizar os efeitos adversos da exposição a contaminantes e beneficiando a saúde de animais e seres humanos.

Palavras chave: arsênio; ecotoxicologia; biomarcadores; metabonômica.

ABSTRACT

Pesticides and veterinary products containing organic arsenic compounds, such as sodium methyl arsenate (MSMA), are extensively used in agriculture and livestock farming to enhance productivity. However, it is crucial to analyze the effects of these substances on ecosystems and living organisms. This study investigated the impact of MSMA on aquatic species, specifically zebrafish, by combining ecotoxicological studies and metabolomics analysis based on nuclear magnetic resonance (NMR ^1H). Zebrafish species was chosen due to their advantageous characteristics as a versatile laboratory model, including genetic similarity to mammals, ease of maintenance, high fecundity, and transparent embryos. Zebrafish embryos were acutely exposed (96h) to varying concentrations of MSMA (0, 10, 30, and 60 mg L⁻¹) diluted in reconstituted water to determine the LC₅₀ and assess embryotoxicity. Subsequently, samples (7n) from different treatments were pooled for metabolomic analysis based on NMR ^1H spectroscopy. The embryotoxicity analysis showed that MSMA exposure led to teratogenicity, cardiotoxicity, neurotoxicity and mortality in zebrafish. Metabolomic profiling identified 34 metabolites associated with various metabolic pathways potentially impacted by MSMA exposure. Also, the multivariate analysis results revealed discriminant metabolites such as (i) lactate, suggesting potential alterations in energy metabolism pathways; (ii) glutathione, indicating disturbances in the cellular antioxidant protection system; (iii) xanthine, potentially disrupting purine metabolism; (iv) glutamate: suggests potential neurotoxic effects of MSMA on zebrafish; (v) tryptophan: potential impacts on amino acid metabolism and protein synthesis pathways; (vi) acetoacetate, to potential disruptions in energy metabolism and fatty acid oxidation and adenosine monophosphate (AMP), which suggested potential disturbances in cellular energy metabolism. These results should contribute to advancing knowledge about the impact of contaminants on zebrafish organism, facilitating risk assessments, and developing environmental protection measures. A better understanding of toxicity mechanisms may also enable the identification of therapeutic targets, assisting in developing strategies to minimize adverse effects of contaminant exposure and benefiting the health of animals and humans.

Keywords: arsenic; ecotoxicology; biomarkers; metabolomics.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, ao meu esposo, Prof. Dr. Ricardo Porto, que está sempre ao meu lado em todos os momentos, sendo meu maior incentivador e enfrentando comigo cada desafio, especialmente durante o mestrado. Agradeço também às minhas amadas filhas, Isadora e Larissa, pois são a razão e a força que nunca me permitiram desistir, mesmo nos momentos mais difíceis.

Expresso minha profunda gratidão ao meu orientador, Prof. Dr. Thiago Mendonça de Aquino, que acreditou em mim, forneceu sua orientação e compartilhou conhecimento, sugestões e me apresentou a amigos que fizeram toda a diferença em minha jornada como pós-graduanda. Aos amigos do Núcleo de Análise e Pesquisa em RMN (NAPRMN) IQB-UFAL, as técnicas Isabella e Carol, e, especialmente, Alexandre Crispim, Edmilson Rocha, Jeferson Ursulino e Tássia Brena, meu muito obrigada pelos ensinamentos, conversas inspiradoras, *feedbacks* e, acima de tudo, pela paciência que tiveram comigo. Vocês têm um valor inestimável!

Meu profundo respeito e agradecimento também ao meu professor e coorientador, Dr. Lázaro Wender O. de Jesus, por compartilhar sua estrutura de laboratório, me orientar em cada etapa do projeto e escrita do artigo. Sua parceria e ensinamentos foram cruciais para minha formação. Agradeço aos colegas do Laboratório de Morfofisiologia Animal Aplicada (LMAA), especialmente à Profa. Jerusa, Maxmiliano, João Pedro, João Paulo, Bianca, aos queridos Lúcio e Felipe, e a todos os outros amigos do laboratório, pelo apoio durante a realização dos testes de toxicidade e demais atividades do mestrado.

Estendo meu agradecimento ao Prof. Dr. Josué Carinhanha e a todos os alunos do Laboratório de Instrumentação e Desenvolvimento em Química Analítica (LINQA) UFAL pela parceria em análises e reagentes necessários. Não posso deixar de agradecer aos órgãos de fomento, FAPEAL e CAPES, pelos recursos destinados a esse projeto, e aos professores que compuseram as bancas julgadoras, pelas valiosas contribuições para o meu projeto e minha formação.

Por último, mas de forma alguma menos importante, minha eterna gratidão a meu Deus, que me sustenta e tem me guiado em cada passo de minha jornada nesta Terra. A Ele toda a honra e glória.

Viva como se fosse morrer amanhã. Aprenda como se fosse viver para sempre.

Mahatma Gandhi

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa da contaminação por arsênio no mundo.....	19
Figura 2. Metabolismo do arsênio em células humanas.....	20
Figura 3. Fórmula química estrutural do metilarsinato de sódio (MSMA).....	23
Figura 4. Imagem esquemática da relação entre a ecotoxicologia e demais áreas de estudo.....	25
Figura 5. Ciclo de vida do <i>zebrafish</i>	28
Figura 6. Representação comparativa das similaridades entre <i>zebrafish</i> e mamíferos.....	29
Figura 7. Estágios de desenvolvimento do embrião <i>zebrafish</i>	31
Figura 8. Ciências ômicas e seu papel fundamental na pesquisa.....	33
Figura 9. Esquema simplificado do processo de amostragem para RMN.....	39
Figura 10. Gráficos referência análise multivariada.....	44
Figura 11. Processo de preparo do <i>zebrafish</i> para a reprodução.....	51
Figura 12. Etapas do bioensaio de exposição aguda ao MSMA.....	54
Figura 13. Parâmetros de análise efeitos letais e subletais	55
Figura 14. Parâmetros referencial morfometria zebrafish.....	56
Figura 15. Esquema protocolo amostragem metabolômica.....	57
Figura 16. CL ₅₀ para exposição de embriões <i>zebrafish</i> ao MSMA.....	62
Figura 17. Taxas sobrevivência e eclosão zebrafish exposto 96 h.....	64
Figura 18. Número movimentos espontâneos e batimentos cardíacos.....	65
Figura 19. Embriões <i>zebrafish</i> analisados em 24 h.....	67
Figura 20. Larvas <i>zebrafish</i> analisadas em 96 hpe.....	68
Figura 21. Frequência de alterações morfológicas (10 mg L ⁻¹).....	69
Figura 22. Frequência de alterações morfológicas (30 mg L ⁻¹).....	70
Figura 23. Frequência de alterações morfológicas (60 mg L ⁻¹).....	71
Figura 24. Parâmetros morfológicos comprimento e cabeça zebrafish.....	72
Figura 25. Parâmetros morfológicos saco vitelínico e olhos zebrafish.....	73
Figura 26. Análise multivariada não supervisionada.....	77
Figura 27. Análise multivariada supervisionada.....	80
Figura 28. Esquema impacto e enriquecimento de vias metabólicas.....	87
Figura 29. Gráficos <i>box plot</i> (VIP PLS-DA).....	82
Figura 30. Gráfico <i>score plot</i> e <i>VIP score</i> (10 mg L ⁻¹) - OPLS-DA.....	83

Figura 31. Gráfico <i>score plot</i> e <i>VIP score</i> (30 mg L ⁻¹) - OPLS-DA.....	83
Figura 32. Gráfico <i>score plot</i> e <i>VIP score</i> (60 mg L ⁻¹) - OPLS-DA.....	84
Figura 33. Representação esquemática das vias metabólicas.....	86
Figura 34. Representação esquemática da via metabólica da biosíntese de aminoacil-tRNA.....	90
Figura 35. Representação esquemática da via metabólica da glicólise e gliconeogênese.....	95
Figura 36. Análise curva ROC (biomarcadores).....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais recursos em RMN e EM comparados.....	40
Tabela 2. Divisão em classes de metabólitos identificados.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

As	Arsênio
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AUC	Área sob da curva (<i>area under curve</i>)
CBN	Canabinol
CG	Cromatografia Gasosa
CL	Concentração letal
CLAE-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas
CLUE-EM	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectroscopia de Massas
D ₂ O	Água deuterada
DCA	3,4-dicloroanilina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EM	Espectrometria de Massas
EPA	Agência de Proteção Ambiental (do inglês - <i>Environment Protection</i>)
GABA	Ácido gama-aminobutírico
HPE (hpe)	Horas pós fertilização
MSMA	Metilarsinato de sódio
NOESY	Espectroscopia de Efeito Nuclear Overhouser (Tradução livre do inglês - <i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>)
OPLS-DA	Projeções ortogonais para análise discriminante de estruturas latentes (do inglês - <i>Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis</i>)
PC	Componente principal (do inglês - <i>Principal Component</i>)
PCA	Análise de componentes principais (do inglês - <i>Principal Component Analysis</i>)
PLS-DA	Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (do inglês - <i>Partial Least Squares Discriminant Analysis</i>)
Q2	Capacidade Preditiva
R2Y	Coefficiente de Determinação
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (¹ H)

RMN ³¹ P	Ressonância Magnética Nuclear de Fósforo (³¹ P)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
ROC	Característica de operação de receptor
TGI	Trato gastrointestinal
ZF	<i>Zebrafish</i>

SUMÁRIO

1. Introdução.....	15
2. Fundamentação teórica.....	18
2.1. Arsênio: forma química, ocorrência e toxicidade.....	18
2.2. Metilarsinato de sódio (MSMA)	22
2.3. Ecotoxicologia.....	24
2.3.1. <i>Zebrafish</i> como modelo experimental em ecotoxicologia...27	
2.3.2. Embriogênese do <i>zebrafish</i>	30
2.4. Ciências ômicas.....	32
2.5. Metabonômica x Metabolômica: conceitos e definições.....	34
2.5.1. Metabolômica com foco na pesquisa ambiental.....	35
2.5.2. Metabolômica baseada em espectroscopia de RMN ¹ H e outras ferramentas analíticas.....	37
2.5.3. Métodos estatísticos para a análise metabolômica.....	41
3. Hipótese.....	46
4. Objetivos.....	48
4.1. Objetivo Geral.....	48
4.2. Objetivos Específicos.....	48
5. Materiais e Métodos.....	50
5.1. Agentes de exposição.....	50
5.2. Solventes para amostragem.....	50
5.3. Estudo ecotoxicológico.....	51
5.3.1. Reprodução, análise e coleta de embriões <i>zebrafish</i>	51
5.3.2. Experimento e análise estatística para CL ₅₀	52
5.3.3. Teste de embriotoxicidade (FET).....	53
5.3.4. Análise morfométrica.....	55
5.3.5. Análise estatística (ZET).....	56
5.4. Bioensaio para estudo metabolômico.....	57
5.4.1. Amostragem para espectroscopia de RMN ¹ H.....	57

5.5. Pré-processamento de dados metabolômicos.....	58
5.5.1. Análise de dados espectrométricos e estudo estatístico	58
6. Resultados e Discussão.....	61
6.1. Avaliação ecotoxicológica.....	61
6.1.1. Determinação da CL ₅₀	61
6.1.2. Embriotoxicidade.....	63
6.1.3. Análise morfométrica.....	66
6.2. Estudo metabolômico.....	75
6.2.1. Análise multivariada não supervisionada.....	75
6.2.2. Análise multivariada supervisionada.....	79
6.2.3. Metabolismo de aminoácidos.....	89
6.2.4. Metabolismo de aminoácidos: estresse oxidativo.....	91
6.2.5. Metabolismo energético.....	92
6.2.6. Metabolismo de glutathione.....	96
6.3. Potenciais biomarcadores de toxicidade.....	97
7. Conclusões e perspectivas.....	101
8. Referências Bibliográficas.....	103
Apêndices.....	124

INTRODUÇÃO

1. Introdução

Inúmeras substâncias químicas vêm sendo utilizadas com o intuito de minimizar os danos causados pelas pragas agrícolas, tais como ervas daninhas, insetos e fungos (HAZRA & PURKAIT, 2019). A ausência do devido manejo correto destes agentes pode trazer impactos na produção agrícola e de alimentos, bem como desequilíbrios sociais e econômicos (RAHMAN et al., 2019). Dentre os contaminantes ambientais encontrados no solo, destaca-se o arsênio (As), o qual pode ser encontrado na água e no ar, e que tem sido amplamente estudado devido aos seus efeitos cancerígenos e genotóxicos em humanos (OZTURK et al., 2021).

De acordo com Khan et al. (2020), a ligação de arsênio inorgânico a biomoléculas, que causa perturbações nos processos bioquímicos das células, pode ser considerada como o mais relevante mecanismo de toxicidade deste elemento (KHAN et al., 2020). A exposição a qualquer quantidade de arsênio é preocupante, pois este elemento tem sido associado a vários resultados adversos à saúde, incluindo impactos negativos no desenvolvimento neurológico, surgimento de doenças cardiovasculares, diabetes e incidência de câncer (NAUJOKAS et al., 2013).

O metilarsinato de sódio (MSMA) é um composto orgânico de arsênio que está presente na formulação de medicamentos de uso veterinário, bem como em diversos agrotóxicos (SPIEWAK, R., 2001; ANDRADE, G., et al., 2016). Contudo, em relação às pesquisas sobre a contaminação por compostos de arsênio no ambiente e em organismos, sabe-se que apesar deste composto não apresentar relevante impacto ao longo das cadeias tróficas, sua bioacumulação ainda é observada em diversas espécies terrestres e aquáticas (KUMARI et al., 2017). Neste sentido, peixes podem ser modelos úteis no estudo e avaliação dos efeitos da contaminação de ecossistemas aquáticos (HONG & ZHA, 2019).

Isto se justifica devido à exposição destes animais ao arsênio e seus compostos, que podem adentrar nos peixes por meio das brânquias, pelo tegumento ou pela ingestão de alimentos que contenham o elemento (JU-WOOKLE et al., 2019). De forma geral, os peixes são organismos ideais em estudos de toxicogenômica devido à eficiência dos modelos experimentais na descoberta de biomarcadores de exposição (DALZOCHIO et al., 2017). Da

mesma maneira, vale mencionar que o consumo de peixes contaminados com arsênio e seus compostos pode resultar na exposição e o posterior surgimento de efeitos nocivos à saúde humana (KAR et al., 2011).

Conferida a importância do estudo sobre os níveis de toxicidade do MSMA, bem como seu impacto nos processos metabólicos dos organismos envolvidos em potencial contaminação de águas, o estudo metabolômico apresenta-se como ferramenta de inovação e alta especificidade em pesquisa. Neste contexto, a análise metabolômica possui foco no estudo dos metabólitos endógenos presentes em uma amostra biológica, utilizando técnicas e ferramentas analíticas (SAMUELSSON & LARSSON, 2008).

Este método de estudo pode ser aplicado como ferramenta de triagem para perfil metabólico ou para detectar mudanças no metaboloma provocadas por agentes internos ou externos (GUIJAS, C., 2018). Contudo, alterações no metaboloma podem refletir em mudanças significativas nas funções orgânicas, sendo estes, fatores que fomentam as pesquisas nesta área, bem como subsidiam estudos toxicológicos (RAMIREZ et al., 2013), diagnóstico clínico de doenças, qualidade de alimentos, entre outros (ARAÚJO et al., 2021). Deste modo, a relevância do uso do MSMA como substância presente em pesticidas e produtos veterinários, bem como a ocorrência de seus subprodutos de degradação em rios, lagos e em lençóis freáticos justifica o estudo da toxicidade e dos impactos causados pelo contato dessas espécies arsênicas com organismos aquáticos. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo investigar a toxicidade do MSMA, por meio de estudo ecotoxicológico, utilizando embriões de *zebrafish* como modelo experimental, seguido de análise metabolômica baseada em espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H) com posterior estudo estatístico e de impacto bioquímico.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2. Fundamentação teórica

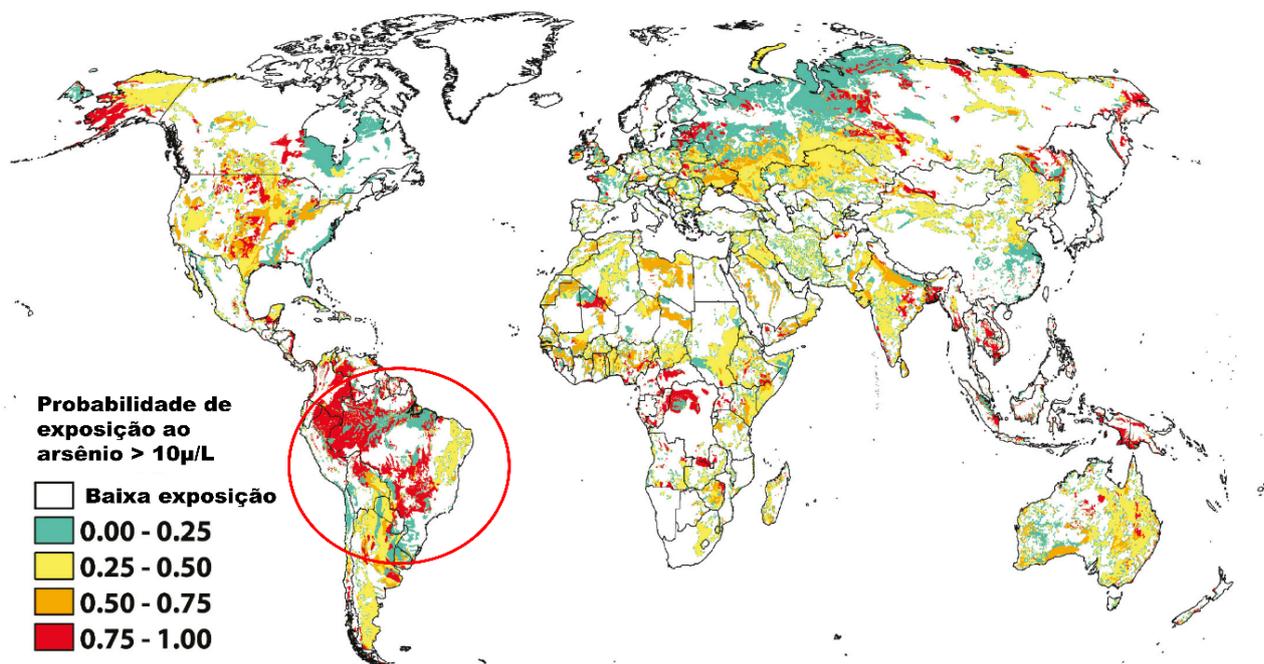
2.1. Arsênio: forma química, ocorrência e toxicidade

O arsênio (As) é um elemento presente em toda a natureza e é classificado em diferentes formas químicas, sendo predominantes as trivalentes (III) e as pentavalentes (V) (GENCHI et al., 2022). O As é também encontrado em formas orgânicas e inorgânicas, com valores de valência variando de III a V. O As III, ou arsenito, é mais tóxico se comparado ao arsenato ou As V. Desta forma, conclui-se que a forma química ou valência pode determinar a toxicidade do elemento (WANG et al., 2021).

O As é encontrado geralmente em regiões rochosas e de mineração. Sua liberação se dá durante o processo de extração de minérios, quando o material fundido resulta em arsênio elementar e também em trióxido de arsênio. Ainda, vulcões e termas são fontes naturais de contaminação por este metal. As atividades de mineração, de indústrias químicas de pesticidas e medicamentos veterinários, bem como a indústria de petróleo são fontes antropogênicas mais comuns de contaminação por espécies arsênicas (HASANUZZAMAN et al., 2015; SOZA-RIED et al., 2019). No meio ambiente, o As geralmente existe na forma pentavalente, forma em que os microrganismos do solo realizam o processo de metilação arsênica (REID et al., 2020; GENCHI et al., 2022).

A exposição a compostos de arsênio inorgânicos e orgânicos representa um problema importante para a saúde pública e para o bem-estar de centenas de pessoas em todo o mundo (OMS, 2008). A diretriz provisória para limites de As na água, conforme estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) ainda em 1993, é de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, o que está de acordo com o total sugerido de $15 \mu\text{g L}^{-1}$ de ingestão de As inorgânico por quilograma de peso corporal. Em 2001, com base nas avaliações dose-resposta de câncer de bexiga e câncer de pulmão induzidos por As, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos revisou o limite máximo de contaminação da água potável de $50 \mu\text{g L}^{-1}$, conforme estabelecido pelo Conselho Nacional de Pesquisa em 1999, para $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (EPA, 2001). Diversos trabalhos em mais de 70 países revelaram que, em águas subterrâneas, a concentração deste metal pode variar de 0,5 a 5.000 partes por bilhão (ppb) (Figura 1), de acordo com a região pesquisada (RAVENS-CROFT et al., 2011; CHENG et al., 2016).

Figura 1. Mapa da contaminação por arsênio no mundo. A figura ilustra a extensão da contaminação nos diferentes continentes. No Brasil, as áreas mais afetadas se localizam nas regiões norte e centro-oeste do país.



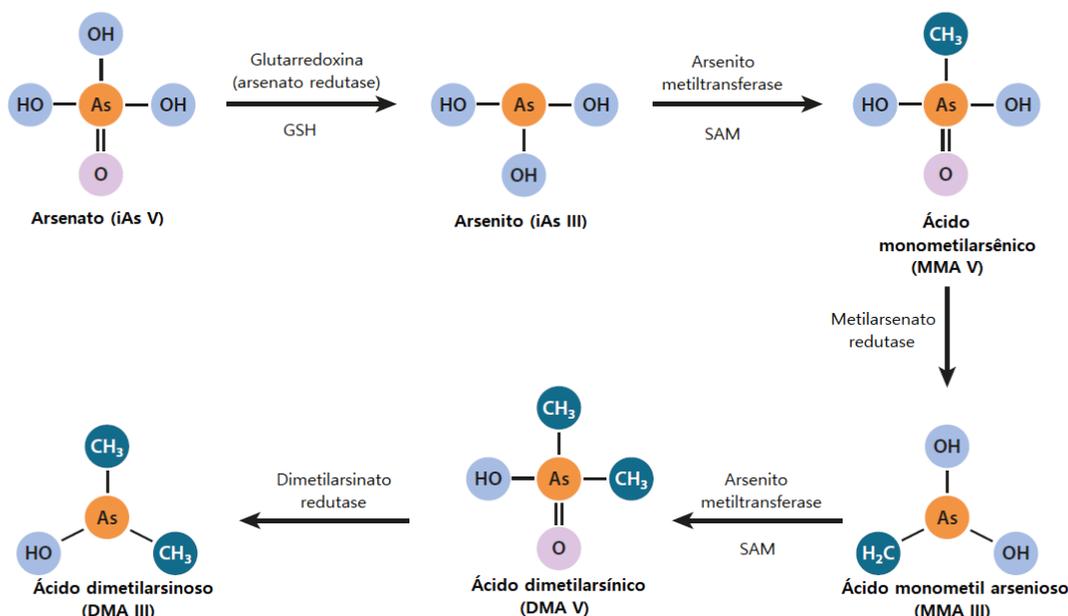
Fonte: EAWAG, 2021 (<http://www.eawag.ch>) Acesso em 26/12/2022.

Em todo o mundo, os níveis de contaminação mais graves foram encontrados no Brasil, Camboja, Afeganistão, Austrália e Bangladesh (SHANKAR et al., 2014). Pesquisas recentes demonstram que o As é capaz de causar disfunções em diversos órgãos do corpo humano, por meio do produto do metabolismo do metal (Figura 2). A exposição crônica ao As demonstrou provocar inúmeras complicações clínicas, incluindo doenças de pele, diabetes mellitus, doença cardiovascular, neuropatia periférica, comprometimento cognitivo, distúrbios hepáticos e renais, além de disfunções e complicações reprodutivas. Demonstrou-se ainda que, o acúmulo de As é mais proeminente no fígado, rins e músculos. Além disso, altas concentrações do metal levaram ao câncer de bexiga, de pulmão, pele, rim e próstata (CHEN et al., 2019).

Contudo, estudos aprofundados sobre a resposta à dose, bem como estudos longitudinais em larga escala ainda são necessários para compreender seus efeitos tóxicos. Na Índia, níveis baixos ($< 50 \mu\text{g L}^{-1}$) de As foram detectados em numerosos aquíferos, entretanto, as populações expostas não apresentaram

lesões cutâneas (CHAKRABORTI et al., 2019). No entanto, lesões de pele como a doença do pé preto, melanose e ceratose geralmente se desenvolvem 5 a 10 anos após a exposição crônica ao metal; portanto, estudos de acompanhamento são necessários. Além disso, há evidências de que a exposição a mais 10 µg/L de As pode levar a uma incidência de câncer de 0,1 a 0,3% (IARC, 2012). Um estudo relatou que, desde 2000, a exposição a 10 µg/L de As levou a um aumento de cerca de 5% e 3% em casos de câncer de pulmão e bexiga por 1.000.000 de pessoas, respectivamente (ANTONELLI et al., 2014; SINHA & PRASAD, 2020).

Figura 2. Metabolismo do As em células humanas. A figura descreve a via metabólica do arsênio no corpo humano. GHS: glutatona; SAM: S-adenosil-metionina.



Fonte: Adaptado de CHEN & COSTA, 2021.

As variadas formas do As podem gerar diferentes tipos de intoxicações. O As inorgânico e a forma orgânica trivalente (III) podem causar síndromes caracterizadas pelo efeito tóxico no trato gastrointestinal (TGI) incluindo disfunções na veia porta hepática e vasos capilares. Em doses extremamente baixas, os organismos tendem a desenvolver certa tolerância ao arsênio. As formas orgânicas pentavalentes (V) produzem síndrome neurológica. Existem muitos fatores que influenciam a absorção de compostos arsênicos (SODHI et al., 2019). Entre essas variáveis, estão a forma do metal, o tamanho da partícula, a pureza, a solubilidade, as espécies afetadas e a condição física dos

organismos expostos. A suscetibilidade a compostos arsênicos inorgânicos varia entre as espécies, sendo maior em humanos, seguido por cães, ratos e camundongos (NURCHI et al., 2020).

Então claramente existem muitas variáveis que afetam a absorção e toxicidade deste metal, o que dificulta a mensuração exata das concentrações letais (CL). Contudo, os compostos arsênicos orgânicos pentavalentes apresentam maior potencial de absorção pelo organismo do que as formas trivalentes, principalmente através do TGI. Pequenas quantidades de ambas as formas podem ser absorvidas mesmo pelo tecido epitelial íntegro (pele intacta), mas geralmente não ultrapassa a derme. No entanto, esta absorção é limitada pelo tamanho da molécula de arsênico. Se a molécula arsênica for muito grande, sua absorção pode ser prejudicada. Assim, um composto arsênico mais tóxico pode não ser absorvido devido ao tamanho de sua partícula, fator que o torna menos tóxico (KOBAYASHI & AGUSA, 2019).

Contudo, uma vez que o arsênio é absorvido, a distribuição ocorre por meio da corrente sanguínea e segue para todos os órgãos do corpo. Desta forma, o As que fica acumulado no fígado é lentamente distribuído para os outros tecidos do corpo. Baço, rins e pulmões podem acumular grandes quantidades de arsênio (REHMAN et al., 2021). Além disso, este metal mostrou alta capacidade de atravessar a barreira placentária, fato comprovado a partir de testes de toxicidade em macacos e hamsters. Os resultados demonstraram que as espécies expostas a doses crônicas, apresentaram acumulação de arsênio nos ossos, tecido epitelial, bem como outros tecidos queratinizados, como cabelos e unhas (TWADDLE et al., 2019; REHMAN et al., 2021).

A biotransformação dos compostos arsênicos ainda é pouco compreendida. Sabe-se que ocorre a conversão da forma V para a forma III, mas o equilíbrio redox (oxirredução) favorece a forma III. Sua metilação ocorre através de microrganismo no solo, mas as formas inorgânicas também podem sofrer processo de metilação no organismo de vertebrados. A transformação arsênica *in vivo* pode contribuir no processo de desintoxicação. Entretanto, nos rins, o As V pode ser transformado na forma trivalente, que é mais tóxica. Compostos arsênicos são excretados através de diversos processos. Na maioria das espécies, entre 40% e 70% da quantidade de As pentavalente absorvida, a excreção ocorre pela urina, dentro de 48 horas. A excreção pode ocorrer também

pelas glândulas sudoríparas, bile (neste caso, o composto é excretado de forma mais lenta) e então, pelas fezes (WANG et al., 2021).

Neste contexto, vale mencionar o modo peculiar de absorção de substâncias presentes nas águas por animais aquáticos, em especial, algumas espécies de peixes. Os peixes, incluindo espécies com e sem escamas, podem absorver compostos arsênicos através da pele, embora a extensão dessa absorção possa variar entre as espécies. Peixes com escamas possuem uma camada protetora que atua como uma barreira física contra a absorção de substâncias. As escamas reduzem o contato direto entre a pele e a água circundante, limitando assim a absorção. No entanto, importa observar que as escamas não são completamente impermeáveis, e certas substâncias, incluindo metais potencialmente tóxicos, ainda podem penetrar pelas lacunas entre as escamas ou por locais de absorção especializados, como as brânquias (RASHED, 2001; OMAR et al., 2019).

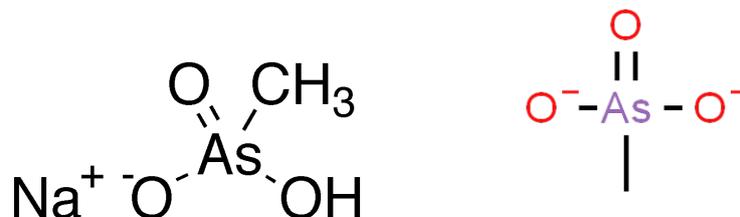
Por outro lado, peixes sem escamas, possuem tegumento mais permeável, o que os torna mais suscetíveis à absorção de diversas substâncias. Neste caso, o As pode penetrar diretamente na pele e entrar diretamente na corrente sanguínea. Essa maior suscetibilidade à absorção se deve à ausência de uma camada protetora de escamas que, de outra forma, reduziria o contato direto entre a pele e a água circundante (JÄRUP, 2003; SHAIKHIEV et al., 2020). Além do tegumento, os peixes também assimilam o As por meio de suas brânquias. As brânquias servem como um local primário para a respiração, mas também têm o potencial de facilitar a absorção de várias substâncias, incluindo o As presente na água. Com isto, o metal e seus compostos podem ser absorvidos pelas finas membranas das brânquias, entrando na corrente sanguínea do peixe, independentemente de o peixe possuir escamas ou não (PEDLAR & KLAVERKAMP, 2002).

2.2. Metilarsinato de sódio (MSMA)

Compostos Arsênicos, tanto inorgânicos quanto orgânicos, têm sido usados na agricultura em diversas regiões do planeta por mais de um século (MATTESON et al., 2014). Historicamente, o uso de pesticidas e ou herbicidas contendo As inorgânico em sua fórmula foi amplamente substituído por compostos metilados (orgânicos), como por exemplo o ácido metilarsênico

monossódico ou metilarsinato de sódio (MSMA) (Figura 3), que ainda está em uso como um herbicida (*Ancosar*®720) para manutenção de gramados e campos, lavouras, áreas públicas, canteiros de rodovias e controle de ervas daninhas em campos de algodão.

Figura 3. Fórmula química estrutural do metilarsinato de sódio (MSMA).



Fonte: A autora, 2022.

Adicionalmente, o MSMA está presente na fórmula de fármacos de uso veterinário, tais como o *Phenodral*®, que atua como estimulante de funções vitais no metabolismo animal (ANDRADE et al., 2016). É também utilizado como herbicida de contato, sendo comercializado sob os nomes *Ansar*®, *Ditac*®, entre outros (SPIEWAK, 2001).

O MSMA, juntamente com outros pesticidas tais como metilarsinato dissódico, ácido dimetilarsínico e metilarsinato de cálcio, formam uma fonte antropogênica bastante comum de As comumente liberados no meio ambiente (CAMPBELL & NORDSTROM, 2014). Estima-se que nos Estados Unidos, por exemplo, mais de três mil toneladas métricas destes pesticidas sejam aplicadas anualmente nos campos de algodão. Bednar e colaboradores (2002) encontraram altos valores (>10 µg As/L) para a concentração destas espécies arsênicas em amostras de águas superficiais nas áreas de produção de algodão (BEDNAR et al., 2002).

Adicionalmente, verificou-se que, no Brasil, compostos de As em sua formulação são amplamente encontrados em herbicidas aplicados em plantações de café, algodão, cana-de-açúcar e frutas cítricas (NOBRE & NOBRE, 2011). O princípio ativo MSMA é classificado pela Portaria Normativa do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

(IBAMA), nº84, de 15 de outubro de 1996, como “muito perigoso”, quanto ao potencial de periculosidade ambiental. A ANVISA fez uma nota técnica, em 2002, para a reavaliação toxicológica do ingrediente ativo MSMA e, sendo ele um composto arsênico orgânico, uma pequena exposição já pode causar risco a saúde animal e humana. Após 2002, muitos estudos já foram feitos e novas evidências apontam a necessidade de uma nova reavaliação desse ingrediente ativo no Brasil. O MSMA apresenta potencial de efeitos tóxicos crônicos que, segundo a lei brasileira, podem levar a maiores restrições do uso ou indicar a proibição do seu consumo no Brasil, principalmente por conta da possibilidade de degradação em metabólitos mais tóxicos. Em 2011, a EPA registrou o MSMA para uso em culturas de algodão, no entanto, decidiu cancelar o seu uso nos campos de golfe e em canteiros de rodovias (US EPA, 2013).

2.3. Ecotoxicologia

A ecotoxicologia é a ciência que estuda o impacto das substâncias químicas que são liberadas no ambiente, bem como o impacto que estas substâncias exercem nos seres vivos aquáticos e terrestres (VASSEUR et al., 2021). Esta influência pode ser crônica ou aguda e, portanto, a ecotoxicologia vem como ferramenta de análise e estudo para compreender os níveis de poluentes no solo, ar e água. Os sistemas biológicos atuam como eficientes bioindicadores de contaminação ambiental, fornecendo dados importantes sobre a qualidade do meio ambiente (PROKIĆ et al., 2019).

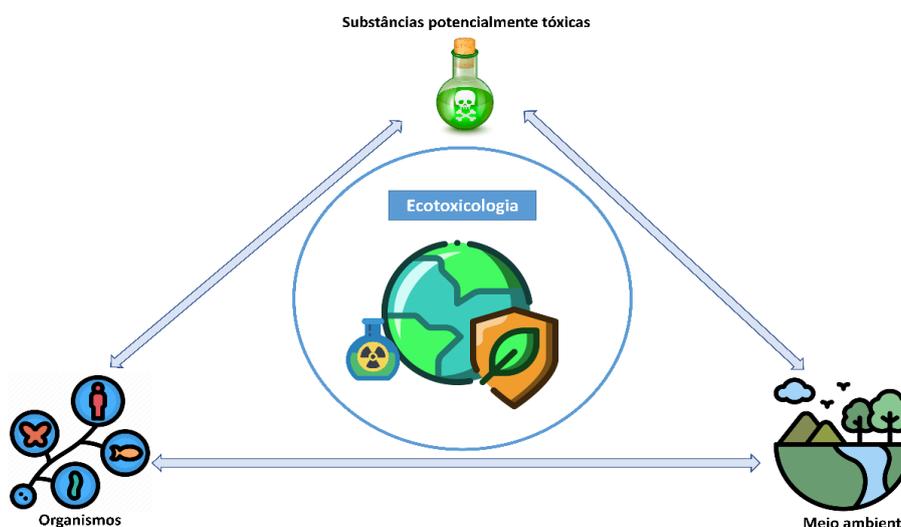
Enquanto as análises químicas identificam e quantificam as concentrações das substâncias tóxicas, a toxicologia avalia o efeito e risco dessas substâncias na biota. O monitoramento por métodos físicos e químicos abarca o tipo e intensidade dos fatores influenciadores. Já o biomonitoramento fornece dados sobre a influência exercida no sistema biológico como um todo, considerando a inter-relação destes sistemas e a influência de substâncias químicas no ambiente e organismos (Figura 4). A soma dessas duas técnicas confere ao estudo ecotoxicológico maior eficiência e eficácia da elucidação de processos e fatores de contaminação do meio (ABAS, 2021).

Contudo, é importante esclarecer alguns conceitos em ecotoxicologia; como exemplos, têm-se os termos poluição e contaminação. O termo “poluente” é tomado para indicar que o composto químico que ele descreve está causando

danos ambientais, enquanto que o termo “contaminante” implica que o composto não é necessariamente prejudicial (COSTA et al., 2008; NASIR et al., 2023). Os poluentes presentes na superfície da água existem em diversos estados. Podem estar em solução ou em suspensão. O material em suspensão pode estar em forma de gotículas ou partículas e podem ser transportados pelas águas em distâncias muitos grandes. Em geral a concentração desses poluentes pode variar ou cair com conforme se distancia do local inicial de despejo (BHATT et al., 2021).

Portanto, os princípios básicos de toxicidade aquática são similares aos utilizados com organismos terrestres; entretanto há particularidades em relação às rotas de captação, que podem variar de acordo com a fisiologia do animal em exposição.

Figura 4. Imagem esquemática da exposição aos diferentes xenobióticos, englobando a inter-relação natural do meio ambiente e dos organismos que nele habitam, demonstrando a conexão em que o impacto em um (ambiente), gera impacto no outro (organismos).



Fonte: A autora, 2023.

Neste contexto, a aplicação dos princípios de ecotoxicologia demanda a seleção de um organismo teste e, para essa escolha, estes devem ser abundantes, de significativa representação ecológica dentro das biocenoses, sensibilidade constante e apurada, serem de fácil cultivo e, se possível, serem nativos. Organismos aquáticos apresentam alta sensibilidade às substâncias químicas e isto os torna interessantes para análises toxicológicas; entretanto é preciso atentar para os fatores bióticos como estágio de desenvolvimento, tempo

de vida, tamanho, estado nutricional, etc., pois estes fatores influenciam na obtenção dos resultados (HONG & ZHA, 2019).

Para que uma pesquisa tenha uma confiabilidade maior sobre a toxicidade de seu objeto de estudo, é recomendável a utilização de mais de um organismo-teste e, se possível, de níveis tróficos diferentes, pois cada organismo possui uma sensibilidade diferente a tais compostos, e não seria sensato inferir os resultados dos efeitos tóxicos sobre uma espécie como sendo para outra, mas se testes são realizados com vários organismos, e estes respondem de maneira parecida aos compostos, então realmente os resultados podem dar uma resposta mais abrangente do que está ocorrendo no ambiente. Um bom exemplo está na pesquisa realizada por Novelli et al., 2012, em que os autores utilizaram três organismos de táxons diferentes (*Daphnia similis*, *Chironomus xanthus* e *Danio rerio*) para avaliar os efeitos de uma substância química em ecossistemas aquáticos (NOVELLI et al., 2012).

Na última década, o número de trabalhos em ecotoxicologia vêm crescendo, fato que subsidia a necessidade do biomonitoramento eficiente dos corpos hídricos. Neste cenário, são vários os organismos que podem ser utilizados em testes ecotoxicológicos, mas há certa tendência na escolha de algumas espécies, e vemos isso em trabalhos os quais predominam organismos testes como *Daphnia similis* (EGLER et al., 2023), *Ceriodaphnia dubia* (NUGNES et al., 2022) e *Ceriodaphnia silvestrii* (CASTELHANO et al., 2021), possivelmente por serem de fácil cultivo e sensíveis às mudanças físicas e químicas do meio. Ensaios com microrganismos também são largamente utilizados e podem fornecer dados importantes sobre efeitos contaminantes e poluentes.

Por fim, conclui-se que os estudos ecotoxicológicos são cruciais para a avaliação da toxicidade de diversos compostos em diferentes ambientes do planeta. Seus resultados demonstram o potencial tóxico das amostras estudadas, através da utilização de organismos bioindicadores, em que vários parâmetros são analisados. Os resultados podem ser utilizados como subsídios para os tomadores de decisão em relação às políticas públicas de meio ambiente, dessa forma influenciando nos contextos relacionados a um maior controle do despejo de poluentes nos corpos hídricos e fiscalização eficaz dos mesmos pelas agências ambientais. Com o aumento da população, bem como o avanço de cidades e indústrias em áreas onde existem bacias e biomas

importantes, a poluição desses ambientes tem crescido. Assim, a utilização de técnicas eficientes para o biomonitoramento dos riscos e impactos naturais é atualmente considerada como obrigatória (VASSEUR et al., 2021).

Felizmente, no Brasil, as pesquisas em ecotoxicologia estão em um nível bastante adiantado, entretanto o país ainda carece de normas e legislação sólidas para um real controle dos processos de despejo e utilização dos recursos naturais disponíveis. Os estudos ecotoxicológicos, neste caso, podem contribuir para a criação de projetos e normatizações a fim de reduzir os danos que o desenvolvimento gera para o ambiente (De SOUZA et al., 2020).

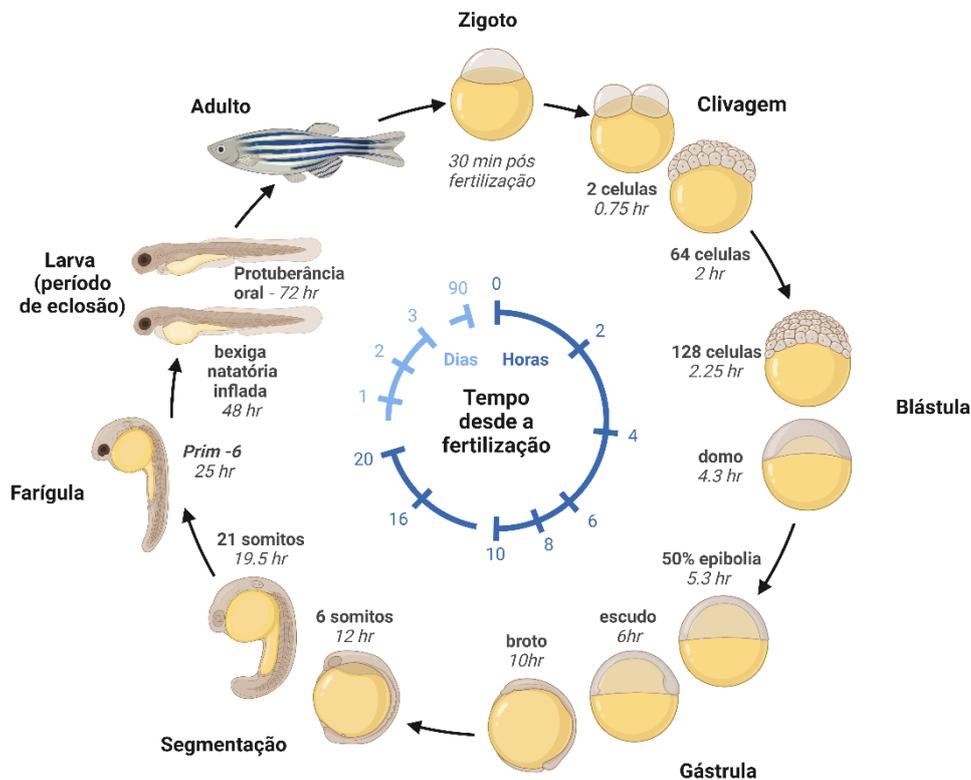
2.3.1. *Zebrafish* como modelo experimental em ecotoxicologia

Zebrafish (*Danio rerio*), peixe-zebra ou “paulistinha” (como é mais conhecido no Brasil), um teleósteo ciprinídeo, é considerado um modelo ideal para experimentos laboratoriais. Este vertebrado é também conhecido por suas aplicações em estudos toxicológicos e avaliações de risco de uma gama de produtos químicos (DEN BROEDER et al., 2015; WANG et al., 2017). Ademais, é altamente eficaz em estudos sobre ecologia e ambiente, monitoramento e avaliações múltiplas de poluentes, como metais pesados tóxicos, desreguladores endócrinos e poluentes orgânicos (CAPPELLO et al., 2016; TENG et al., 2018; GONÇALVES et al., 2020). Com isto, seu uso em pesquisa teve um aumento notável nos últimos anos (PORTO et al., 2023; GANESAN et al., 2022; JIA et al., 2018).

Neste contexto, vale mencionar as características vantajosas do *zebrafish* como modelo experimental: tamanho (pequeno o suficiente, facilitando manuseio, criação e estudo), fecundação externa, ciclo reprodutivo curto (Figura 5) e embriões transparentes, fácil reprodução em larga escala, bom custo benefício e fácil manutenção de biotério (LAPWORTH et al., 2012). Além disso, o genoma do *zebrafish* foi totalmente sequenciado, mostrando que a sequência de DNA deste peixe é homóloga a mamíferos e roedores, o que o torna um organismo modelo bastante popular em pesquisa (BUGEL et al., 2014). Do mesmo modo, esta espécie compartilha um alto grau de homologia (Figura 6) com o genoma humano (em torno de 70%) (BAMBINO & CHU, 2017). Em 1981, Streisinger e colaboradores relataram métodos para produzir *zebrafish* diploides homozigóticos utilizando pressão hidrostática ou choque térmico. Este estudo

contribuiu amplamente para o desenvolvimento de análises genéticas com esta espécie (STREISINGER et al., 1981).

Figura 5. Ciclo de vida do *zebrafish*. Representação de cada etapa desde a fecundação até a formação do indivíduo adulto.

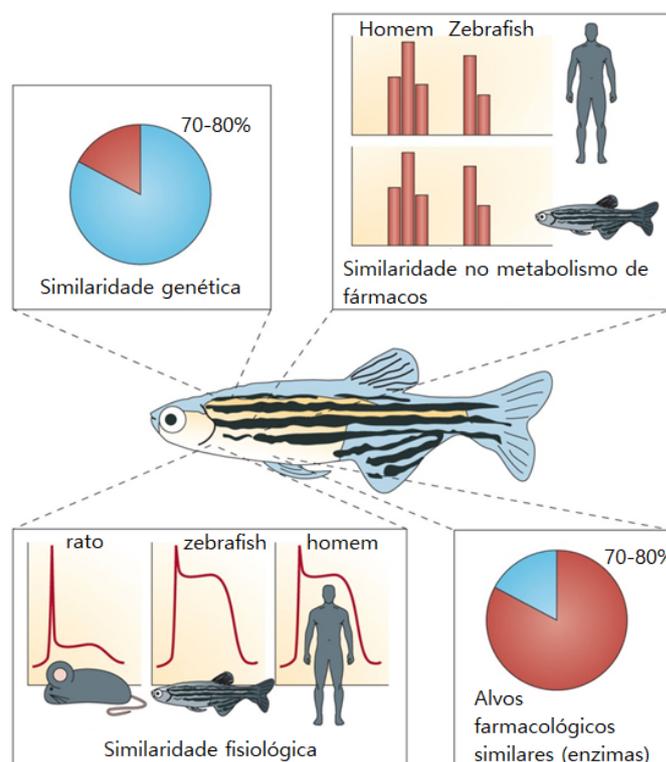


Fonte: Adaptado de KIMMEL et al., 1995.

Em 1996, Driever e colaboradores, juntamente de Haffter e colaboradores, desenvolveram análises substanciais de sequenciamento genético para mutações no *zebrafish*. Os autores identificaram inúmeras mutações e também analisaram genes específicos e suas funções na embriogênese do peixe (DRIEVER et al., 1996). Esses resultados forneceram uma base poderosa para estudos sobre o desenvolvimento embrionário utilizando o *zebrafish* como organismo modelo (KIMMEL et al., 1995). Assim, o *zebrafish* tem sido considerado um organismo modelo promissor para estudos em genética (CANEDO et al., 2021), embriogênese (TRIGUEIRO et al., 2020), toxicologia ambiental (TENG et al., 2018b), farmacologia (ROSA et al., 2022), estudos clínicos sobre diversas doenças (Figura 6) (MacRAE & PETERSON,

2015). Consequentemente, o *zebrafish* preenche importantes lacunas dos modelos tradicionais de mamíferos e ensaios baseados em células, fatores que colocam a espécie na vanguarda dos estudos toxicológicos (BOWMAN & ZON, 2010).

Figura 6. Representação comparativa das similaridades fisiológicas e metabólicas entre *zebrafish* e mamíferos, destacando as vantagens do *zebrafish* como modelo experimental para estudo de doenças humanas.



Fonte: Adaptado de MacRAE & PETERSON, 2015.

Como alternativa ao uso do *zebrafish* adulto como organismo modelo nos testes de toxicidade, o animal em seu estágio de vida embrio-larval é vantajoso em bioensaios. Neste sentido, elegem-se três razões principais; primeiramente, na fase de vida embrio-larval, este peixe apresenta alta vulnerabilidade e sensibilidade ao estresse químico, principalmente no fígado e nos rins. Neste caso, os dados de toxicidade obtidos seriam aplicáveis a todos os estágios de vida da espécie (PARNG, 2005). Em segundo lugar, nos estágios iniciais do ciclo de vida, os processos de desenvolvimento envolvendo sinalização molecular, comunicação celular coordenada e conservada evolutivamente podem refletir as

respostas tóxicas às perturbações químicas (KALUEFF et al., 2014; BAMBINO & CHU, 2017). Por fim, um desenvolvimento ainda incompleto do sistema nervoso no estágio embrio-larval confere menor sensibilidade à dor durante os testes *in vivo*, comparando-se com *zebrafish* adulto, ainda assim apresentando resultados de toxicidade semelhantes (KNÖBEL et al., 2012).

Portanto, com o objetivo de resguardar os animais utilizados em estudos científicos, o embrião *zebrafish* é um modelo de substituição interessante. Apesar da vantagem do modelo *zebrafish* em testes toxicológicos, como um peixe teleosteo, existem certas limitações. Por exemplo, o *zebrafish* é hiperlipidêmico e seu organismo tende a preferir utilizar lipídios em vez de carboidratos como fonte de energia (KA & JIN, 2021).

Este fator pode dificultar análises comparativas sobre gasto energético e cálculo de taxa de metabolismo basal entre *zebrafish* e humanos. Além disso, a ausência de órgãos como pulmões e estômago faz com que sua resposta biológica a estressores ambientais não seja idêntica à dos humanos (MacRAE & PETERSON, 2015). Assim, ao utilizar a espécie na análise de doenças que ocorrem em mamíferos e humanos, as diferenças anatômicas e fisiológicas devem ser consideradas, de acordo com o objetivo do estudo.

Contudo, embriões *zebrafish* têm sido usados com sucesso como modelo para examinar os efeitos letais e subletais do As. Os efeitos morfológicos da exposição à compostos arsênicos inorgânicos incluíram alta mortalidade, retardo de eclosão, retardo na formação de otólitos e olhos, bem como despigmentação (HALLAUER et al., 2016). Adicionalmente, estudos abordando toxicologia de pesticidas e análise metabolômica com *zebrafish* verificaram efeitos neurotóxicos, alterações no metabolismo energético e na composição de ácidos graxos, dano celular e na estrutura do DNA, estresse oxidativo, disfunções no metabolismo hepático e no sistema imunitário (YOON et al., 2016; CHEN et al., 2021; ARAÚJO et al., 2021).

2.3.2. Embriogênese do *zebrafish*

A eclosão do embrião do *zebrafish* geralmente ocorre após 48 horas pós-fertilização (hpe), entretanto, a histogênese da maioria dos sistemas estará completa em 24 hpe. A primeira clivagem ocorre 40 minutos após a fertilização

e inicia as divisões mitóticas no pólo animal. A fase de blástula ou esfera inicia-se ~3 hpe; 128 blastômeros em ~6 hpe, início da gastrulação e 50% de epibolia (segmentação). Na fase blástula ocorre a formação de espaços irregulares entre as células, constituindo o blastoderma. As clivagens continuam, porém em um ritmo menos acelerado e entram em evidencia os movimentos morfogênicos de involução e convergência que darão origem ao epiblasto, hipoblasto e eixo embrionário (KIMMEL et al., 1995; KNÖBEL et al., 2012).

A fase celular de esfera inicia-se aproximadamente em 4 hpe. Nessa fase, os movimentos mais proeminentes são de epibolia, em que células do blastoderma se movem e recobrem toda superfície do vitelo; alcançando 50% de epibolia, se inicia também o processo de gastrulação, no qual é formada a placa neural, os somitos (estrutura embrionária que dá origem ao esqueleto axial e ao músculo esquelético do tronco) (STICKNEY et al., 2000), cartilagem vertebral e vesículas ópticas. O embrião completa o processo de gastrulação e epibolia em aproximadamente 10 hpe (JARQUE et al., 2020) (Figura 7). O período de segmentação inicia-se entre 10 e 24 hpe e nesta etapa a maioria dos órgãos já são visíveis. Assim como os somitos, vesícula óptica, a cauda se torna mais proeminente e os primeiros movimentos involuntários podem ser registrados. Assim, até a fase de segmentação em 24 horas após a fertilização, o embrião está completamente formado (KIMMEL et. al, 1995).

Figura 7. Estágios de desenvolvimento do embrião *zebrafish* (iniciando em 1 célula >1 hpe até estágio larval (48-96 hpe). Esquema abrangendo fases esfera (~3 hpe) e epíbole.



Fonte: Elaborado de acordo com KIMMEL et al., 1995.

Os eventos que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário do *zebrafish* no período de segmentação em 24h, podem ser comparados aos que ocorrem em humanos (segmentação por volta de 8 semanas de gestação ou 1.344 h). Contudo, ambos passam por processos idênticos na fase que engloba o desenvolvimento embrionário, a morfogênese e a diferenciação celular (KIMMEL et al., 1995; JARQUE et al., 2020). O estágio denominado faríngula é o período de desenvolvimento embrionário que ocorre entre 24 e 48 hpe, estágio em que é possível melhor comparar a morfologia dos embriões de diversos vertebrados. O desenvolvimento dos arcos faríngeos, otólito, pigmentação de melanócitos na cabeça, cauda e tronco se tornam bastante evidentes. Ocorre a formação das nadadeiras, endireitamento do angulo da cabeça e do esqueleto axial (STICKNEY et al., 2000).

Por fim, a formação do sistema circulatório e das câmaras cardíacas, bem como o desenvolvimento do sistema nervoso central e periférico (KIMMEL et al., 1995). Neste sentido, o período de eclosão se dá aproximadamente dentro de 48 a 96 hpe. Nesta fase, as nadadeiras peitorais estão bastante alongadas. Os melanócitos estão bem definidos ao longo da linha média da cabeça, tronco e cauda do embrião ou larva. Inicia-se o consumo do saco vitelínico e formação da bexiga natatória. Por fim, seguem as formações das cartilagens dos arcos da faringe, mandibulares e hioide; bem como o desenvolvimento do *cleithrum*, o primeiro osso visível no *zebrafish* (KIMMEL et al., 1995; KAGUE et al., 2012).

2.4. Ciências ômicas

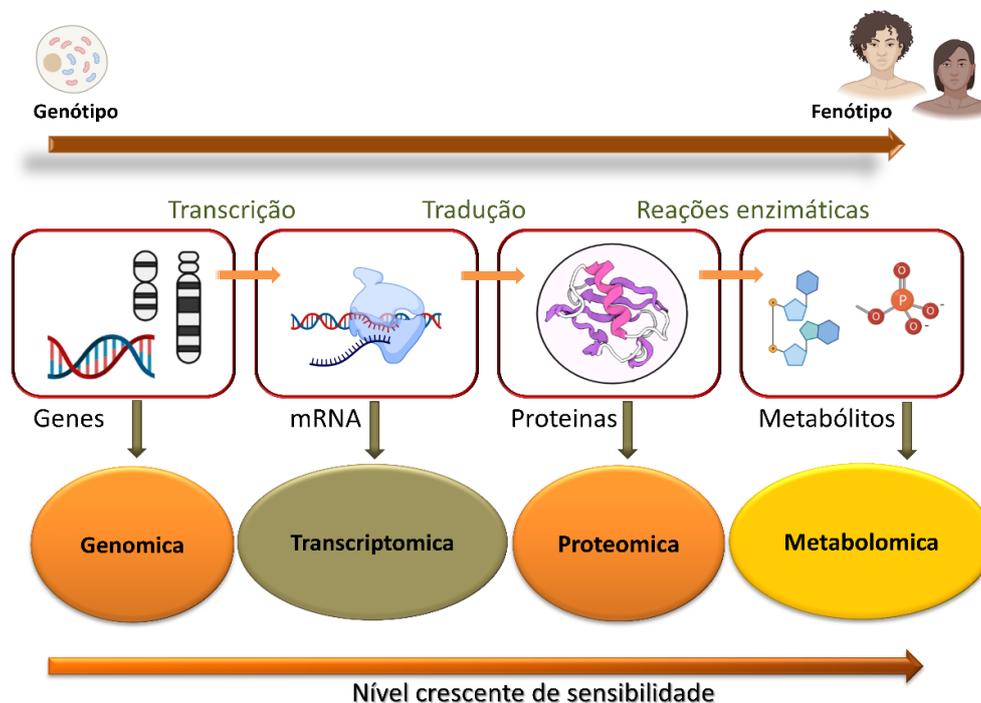
No início do século XXI, com o advento do genoma humano, também se iniciavam as discussões e as ações para uma nova era da biologia, a “era pós-genômica”. Neste contexto, promoveu-se o desenvolvimento e o aperfeiçoamento das técnicas que elicitaram os avanços de novas ciências ômicas, como a transcriptômica, proteômica e metabolômica (Figura 8), com o objetivo de isolar e caracterizar o RNA, as proteínas e os metabólitos, respectivamente (HAAS et al., 2017). Contudo, é importante destacar que este avanço do conhecimento em técnicas ômicas se deu em grande parte graças ao desenvolvimento da bioinformática (BARTLETT et al., 2016).

A análise dos genes, RNAs, proteínas e metabólitos presentes em uma determinada amostra, por meio de uma abordagem ômica, pode fornecer dados

necessários para prever respostas sobre exposição às substâncias tóxicas, com base nas principais alterações no RNA, proteínas ou metabólitos. Desta forma, o mecanismo de toxicidade de vários xenobióticos pode ser previsto pela alteração específica nas vias metabólicas e nos metabólitos envolvidos nela (HAAS et al., 2017).

Neste sentido, verifica-se que as ciências ômicas têm sido cada vez mais utilizadas a fim de compreender os efeitos biológicos adversos dos xenobióticos. A biologia moderna frequentemente envolve a análise de populações de biomoléculas dentro de um organismo definido (célula, tecido ou compartimento celular). Como as novas abordagens ômicas geram grandes quantidades de dados, foi necessário o desenvolvimento de técnicas de bioinformática a fim de processar esses dados de forma eficiente, conferindo o mais alto índice de confiabilidade possível para o estudo (WOOD et al., 2014).

Figura 8. Ciências ômicas e seu papel fundamental na pesquisa em saúde e meio ambiente. A metabolômica mostra as interações globais no sistema biológico e a sensibilidade dos metabólitos demonstra as possíveis influências no fenótipo do organismo.



Fonte: Extraído de PORTO et al., 2023.

2.5. Metabonômica x Metabolômica: conceitos e definições

A metabonômica foi descrita pela primeira vez em 1999, enquanto a metabolômica teve seu marco formal em 2001. Não há diferenças significativas entre essas duas palavras, porém, alguns autores podem utilizar uma ou outra de acordo com o objetivo do estudo e também o instrumento analítico aplicado. Neste contexto, Nicholson et al. (1999) definiram a metabonômica como a avaliação quantitativa e ampla da resposta metabólica multiparamétrica a estímulos fisiopatológicos e ambientais ou modificações genéticas em amostras de fluidos biológicos (NICHOLSON et al., 1999).

Posteriormente, Oliver Fiehn (2001) introduziu e definiu "metabolômica" como a identificação específica e quantitativa de todos os metabólitos presentes em um organismo de forma absoluta, objetivando uma análise estrutural relacionada à resposta frente ao agente externo (FIEHN, 2001).

Resumidamente, a metabonômica corresponde à análise não direcionada ou global, a fim de entender as alterações sistêmicas causadas por um agente externo. Nesse sentido, a espectroscopia de RMN pode ser a ferramenta analítica preferida em tais investigações. Por conseguinte, a escolha dos sinais, detectados na espectroscopia de RMN, pode ocorrer tanto de forma arbitrária quanto a partir dos dados obtidos via ferramenta analítica. Por outro lado, estudos metabolômicos focam no isolamento detalhado de um grupo específico de analitos, abordagem direcionada que pode ser desenvolvida por meio de ferramentas como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, acoplada à Espectrômetria de Massas (CLAE-EM) ou Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrômetria de Massas (CG-EM), por exemplo (WISHART, 2011; BISPO et al., 2021).

Considerando as diferentes ciências "ômicas", a metabolômica pode representar melhor o fenótipo molecular. Do ponto de vista da metabolômica, as alterações metabólicas podem ser descritas como resultado das condições fenotípicas de um organismo, que dependem de seus hábitos e comportamento (FIEHN, 2001). Isso se deve à sensibilidade externa (ou seja, ambiental) e interna (ou seja, fisiológica e intracelular) dos metabólitos aos estímulos, que refletem diretamente a atividade bioquímica e o estado físico das células. Assim, o metaboloma é uma sonda útil para a leitura do fenótipo, principalmente por meio de vias metabólicas fundamentais, como metabolismo energético, de

carboidratos, de aminoácidos e lipídico (WISHART, 2019). No que se refere à metabonômica, é possível considerar como um estudo que aplica técnicas analíticas modernas para medir e construir padrões de precisão a partir de amostras biológicas, permitindo uma visão abrangente do sistema vivo. Dessa forma, independente dos conceitos de metabonômica e metabolômica, essas abordagens são essenciais para entender a relação entre as alterações do metabolismo e o desenvolvimento de diversas condições que interferem na vida e na saúde (BJERRUM et al., 2021).

Portanto, ao fornecer informações detalhadas sobre o que pode estar ocorrendo no metaboloma, a metabolômica (ou metabonômica) é extremamente útil em estudos incluindo nutrição (RÅDJURSÖGA et al., 2019), meio ambiente, vegetais, alimentos (KIM et al., 2010), contaminantes químicos (YOON et al., 2017b; TIAN et al., 2021), micro plásticos (LU et al., 2016; QIAO et al. 2019) e exposição a nanomateriais (GANESAN et al., 2018; CHATZIMITAKOS et al., 2021).

2.5.1. Metabolômica com foco na pesquisa ambiental

A metabolômica ambiental concentra-se na compreensão das respostas bioquímicas dos organismos, as quais foram desencadeadas devido à sua interação com xenobióticos e outros agentes estressores liberados no ambiente. Todavia, dois métodos orientam a metabolômica ambiental: i) Estudos controlados em laboratório, com o uso de modelos animais *in vivo*, objetivando conhecer e entender as perturbações metabólicas causadas pela exposição à determinadas substâncias químicas; ii) Estudos de campo, que são realizados através de amostras coletadas *in situ*, para compreender a resposta metabólica daqueles organismos frente ao estresse ambiental. Geralmente, o objetivo da pesquisa metabolômica ambiental é a avaliação de risco e biomonitoramento, analisando organismos-chave ou bioindicadores, que desempenham papéis essenciais no ecossistema (ARAÚJO et al., 2021).

Não obstante, o desenvolvimento do fluxo de trabalho neste tipo de pesquisa é vital para atingir os objetivos. As etapas gerais são baseadas no desenho do estudo, coleta e preparação da amostra, experimentos espectroscópicos ou espectrométricos, análise estatística e interpretação biológica dos dados analisados. Nesse sentido, muitos estudos demonstram que

os produtos químicos podem ser encontrados em diferentes concentrações em águas superficiais, estações de tratamento de água, estuários, habitats de água doce e outros estratos ambientais (CHOUSIDIS et al., 2020; CHAGAS et al., 2019).

Conseqüentemente, pode-se afirmar que a metabolômica é capaz de fornecer informações detalhadas sobre a saúde do organismo e as condições ecológicas em um determinado habitat (MARTI et al., 2013). Além disso, o mecanismo de ação de vários agentes estressores, incluindo espécies de metais tóxicos (CAPPELLO et al., 2016), bifenilos policlorados (PCB's) (SHI et al., 2012), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH's) (HONG et al., 2014), atmosfera hiperbárica (TRANFO et al., 2020) e pesticidas podem ser compreendidos quando associando dados de ecotoxicologia e metabolômica (SONG et al., 2022).

De fato, a metabolômica também tem sido aplicada em estudos de toxicologia para encontrar biomarcadores e avaliar a farmacodinâmica de drogas recém-desenvolvidas. Nesse campo, a toxicometabolômica entra como uma divisão da metabolômica, possuindo um sólido potencial para esclarecer o modo de ação bioquímico e os efeitos de uma extensa gama de compostos potencialmente tóxicos, muitos dos quais são frequentemente encontrados no meio ambiente (ARAÚJO et al., 2021).

Além disso, por meio da detecção de biomarcadores em nível molecular, a toxicometabolômica pode revelar "fatores prognósticos" de um distúrbio específico ou potencial estressor externo mais rapidamente do que nos achados de biomarcadores em nível macro (quando um organismo ou população já está afetado). Este aspecto é confirmado pela acurácia que se alcança por meio de abordagens toxicometabolômicas na investigação de metabólitos que auxiliem na detecção precoce de processos degenerativos. Neste sentido, a detecção precoce dos efeitos dos poluentes no meio ambiente e nos organismos é essencial para a descoberta mais rápida e eficiente de biomarcadores potencialmente ligados a diferentes patologias, questão fundamental para o diagnóstico clínico e tratamento de inúmeras patologias (LANKADURAI et al., 2013).

2.5.2. Metabolômica baseada em espectroscopia de RMN ^1H e outras ferramentas analíticas

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica espectroscópica que utiliza a transição energética dos spins nucleares na presença de um forte campo magnético. Desde o primeiro espectro de RMN publicado na década de 1940, seu uso como uma ferramenta de química analítica se estendeu para diversas outras áreas (MOCO, 2022). O aparelho de RMN provou ser uma ferramenta essencial nas ciências da vida, incluindo a identificação e elucidação da estrutura de moléculas orgânicas e especificamente metabólitos; no estudo da dinâmica de macromoléculas como proteínas e ácidos nucleicos; e mais recentemente no campo da metabolômica (VIGNOLI et al., 2019).

Devido à eficiência da espectrometria de RMN para análise de moléculas presentes em uma amostra, esta ferramenta se torna relativamente sensível ao ambiente químico, provendo informações químicas seletivas sobre tais moléculas, bem como seu estado fisiológico. O uso de RMN em estudos metabólicos tem uma longa história. A RMN ^{31}P foi utilizada pela primeira vez para monitorar metabólitos contendo fósforo, como nucleotídeos e fosfatos de açúcar, incluindo espécies reativas de oxigênio e também células e tecidos (SHULMAN et al., 1979; GADIAN & RADDA, 1981).

No final da década de 1970, pesquisadores afirmaram com otimismo que "agora é possível obter, em dados de metabólitos *in vivo*, informações detalhadas sobre estrutura, movimento, taxas de reação e locais de ligação, que antes eram possíveis somente via análises de biomoléculas purificadas em solução" (SHULMAN et al., 1979). Muitos desses tópicos ainda são atualmente objeto de pesquisa, visando o aperfeiçoamento das metodologias e técnicas em RMN. Neste contexto, as técnicas mais comumente aplicadas para a análise metabolômica são baseadas em EM (BEALE et al., 2018) e RMN (BINGOL, 2018).

Os estudos fundamentados em CG-EM bem como CLAE-EM fornecem abordagens que podem conferir uma plataforma combinada de alta sensibilidade (10 a 100 vezes mais que RMN) e seletividade para pesquisa metabólica (MARKLEY et al., 2017). No entanto, apesar de consideradas excelentes técnicas analíticas, as análises baseadas em EM são destrutivas; em algumas

aplicações, a derivatização é necessária e pode haver alto consumo de solventes orgânicos (para aparelhos de CL-EM, por exemplo). Além disso, o desgaste natural e a potencial contaminação da coluna podem levar a deficiências no tempo de retenção e/ou co-eluição de pico, impedindo a reprodutibilidade dos dados (REN et al., 2018).

Por outro lado, como técnica quantitativa, a espectroscopia de RMN pode usar etapas de preparação de amostras de forma mais direta e simplificada (Figura 9). Esse recurso permite etapas de amostragem mais curtas, o que reduz erros devido às repetições no processo de preparo. Além disso, a necessidade de grandes quantidades de solventes pode tornar o processo de amostragem uma etapa trabalhosa e demorada, como é o caso de CLAE-EM. Por outro lado, para o preparo de amostras de fluidos biológicos em RMN, utiliza-se pouco ou nenhum solvente e, ainda assim, garante-se alta reprodutibilidade nas análises (ARAÚJO et al., 2021).

Outra vantagem para o uso da RMN é a possibilidade de obter informações adicionais de uma determinada amostra por meio da aquisição de espectros de núcleos distintos, separadamente ou simultaneamente. Isto pode ser alcançado por meio de sequências de pulso 2D homonucleares e heteronucleares, como ^1H - ^1H *J*-resolvido (*J*-Res), ^1H - ^1H *Correlation Spectroscopy* (COSY), ^1H - ^1H *Total Correlation Spectroscopy* (TOCSY), ^1H - ^{13}C *Heteronuclear Single-Quantum Coherence* (HSQC), com e sem edição de multiplicidade e, *Heteronuclear Multiple Bond-Correlation* ^1H - ^{13}C (HMBC), os quais podem fornecer informações específicas relacionadas às constantes de acoplamento (MOCO, 2022).

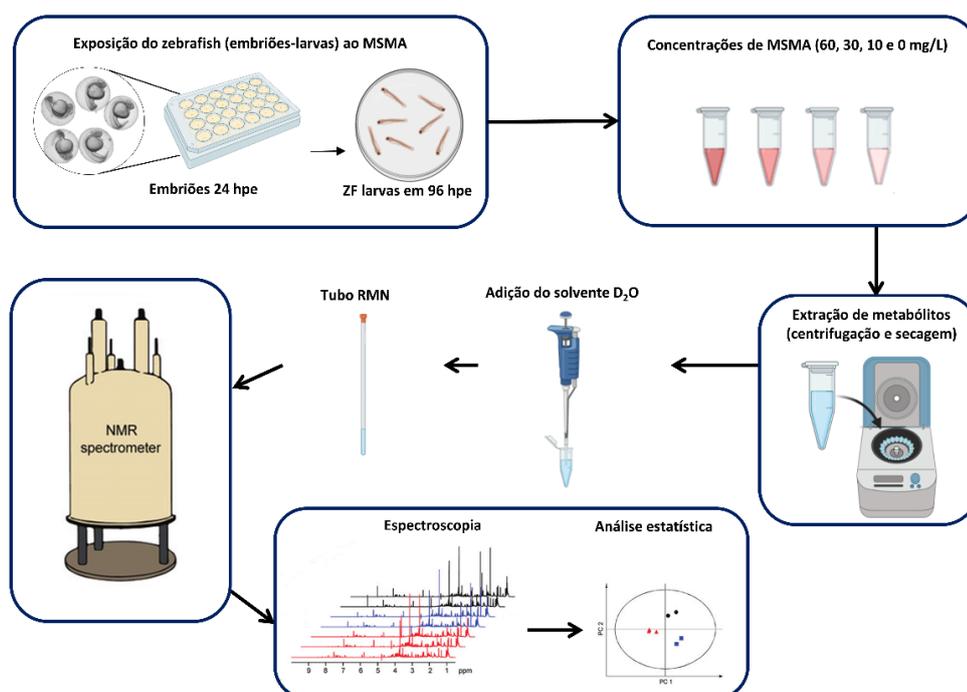
Além disso, as correlações ^1H - ^1H e ^1H - ^{13}C podem contribuir para a identificação de elementos de difícil ionização via EM, detectando metabólitos por meio de fluidos biológicos intactos, extratos de células e tecidos sem a necessidade de purificação da amostra. Isto é altamente conveniente para análise de tecidos intactos, órgãos e amostras sólidas. (BINGOL, 2018; EMWAS et al., 2019; GARCIA-PEREZ et al., 2020).

Naturalmente, não existe a melhor ou pior técnica analítica quando comparadas todas as possibilidades, pois é sabido que duas ou mais estratégias conjugadas são úteis e se complementam (Tabela 1), oferecendo informações biológicas amplas e significativas. No entanto, é fundamental enfatizar que a

decisão por uma determinada plataforma muitas vezes é determinada pela expertise do pesquisador, bem como a acessibilidade ao equipamento e o custo (EMWAS et al., 2019). Vale mencionar que, diversos pesquisadores aplicam a abordagem combinada, ou seja, o uso de uma ou mais ferramentas analíticas, o que lhes permite aprimorar a identificação de analitos desconhecidos ampliando o escopo da análise metabolômica. A este respeito, Jang e colaboradores (2012) estudaram o perfil metabólico de amostras do fígado do *zebrafish*, induzido à intoxicação alcoólica, através das técnicas de RMN ^1H e CG-EM (JANG et al., 2012).

Curiosamente, os resultados dos autores demonstraram que o RMN permitiu avaliar numerosos metabólitos desconhecidos, por meio da análise metabolômica não direcionada. Neste estudo, RMN e CG-EM foram combinados para obter os compostos desconhecidos e os analitos específicos (análise direcionada), respectivamente. Dessa forma, as técnicas combinadas foram úteis para identificar metabólitos específicos relacionados a vias metabólicas subjacentes, que podem estar associados a alterações patológicas observadas em diversas condições, como a doença hepática gordurosa (JANG et al., 2012).

Figura 9. Esquema simplificado do processo de amostragem para RMN, incluindo experimento de exposição e etapa de extração de metabólitos de tecido/organismo inteiro (larvas de *zebrafish*).



Fonte: A autora, 2022.

Da mesma forma, usando RMN ^1H e metabolômica baseada em CLUE-EM, Chousidis e colaboradores (2020) detectaram várias alterações de metabólitos em embriões de *zebrafish* expostos ao canabinol (CBN), em comparação com o grupo controle. Os autores aplicaram ambas as técnicas realizando análises metabolômicas não direcionadas e direcionadas. Foi sugerido que a exposição ao CBN afetou os processos metabólicos relacionados à energia, como a função dos hepatócitos e o metabolismo da glicose (CHOUSIDIS et al., 2020). Nessa abordagem, a técnica combinada foi eficaz para a análise de vias metabólicas específicas, bem como a identificação de quais disfunções poderiam estar relacionadas a elas.

Tabela 1. Principais recursos em RMN e EM comparados (aplicados à análise metabolômica).

TECNOLOGIA	RMN	EM
Reprodutibilidade	Muito alta	Suficiente
Limite de detecção	Faixa micro molar	Faixa pico molar
Preparo de amostra	Mínimo	Várias etapas: separação cromatográfica e derivatização
Volume de amostra	0.1 a 0.5 mL	0.01 a 0.2 mL
Moléculas detectáveis	Todas as moléculas alcançadas no núcleo ativo do RMN	Maioria de origem orgânica e algumas de origem inorgânica
Tipo de experimento	Experimentos em 1D e 2D, COSY, J-Res, entre outros	Experimentos têm foco em classes de moléculas e não em apenas uma molécula específica
Resultados problemáticos	Origem: compostos com fortes alterações químicas e degradação; alta variabilidade de condições físico-químicas (pH, temperatura, força iônica); sobreposições de picos e ruídos. Abordagem experimental: experimentos 2D	Origem: compostos (ex.: isômeros) que combinam com determinada composição atômica. Abordagem experimental: LC-EM/ EM

Fonte: Adaptado de Vignoli et al., 2019

2.5.3. Métodos estatísticos para a análise metabolômica

Os métodos estatísticos utilizados na metabolômica, incluindo abordagens univariada e multivariada, visam destacar os metabólitos que melhor discriminam os grupos sujeitos (VINAIXA et al., 2012). Esses métodos fornecem informações que explicam o perfil metabólico de uma determinada população ou amostra e sugerem potenciais biomarcadores para condições de saúde (ZACHARIAS et al., 2018).

Nesse contexto, Zakaria e colaboradores (2021) aplicaram um método estatístico univariado para avaliar perturbações no metabolismo do *zebrafish* adulto, por meio de amostras com tecidos do cérebro. Neste caso, os autores utilizaram o teste de *Kruskal-Wallis*, um teste não paramétrico equivalente à ANOVA, útil na avaliação de três ou mais grupos. Desta forma, o teste de *Kruskal-Wallis* foi utilizado para identificar os metabólitos com diferenças significativas entre os grupos de *zebrafish* expostos a diferentes concentrações de reserpina, em comparação com um grupo controle. Como resultado, os pesquisadores encontraram diferenças estatisticamente significativas em metabólitos como valina, β -hidroxivalerato, glutamato, glutamina, GABA e histamina no cérebro do *zebrafish* exposto à substância, em comparação com o grupo controle (ZAKARIA et al., 2021).

Além disso, estudos demonstraram a eficiência da metabolômica e as estratégias quimiométricas envolvidas na análise minuciosa de sistemas biológicos a partir da correlação dos dados metabolômicos (ROSATO et al., 2018; DILEO et al., 2011). Por exemplo, Yoon e colaboradores (2016) aplicaram a correlação de *Pearson* para avaliar a relação entre os metabólitos. O experimento consistiu na exposição do *zebrafish* ao *methomyl* (um inseticida *N*-metil carbamato) e ao *methidathion* (um inseticida organofosforado). Os dados estatísticos demonstraram que no grupo controle houve correlação positiva entre metabólitos como colina, acetato e betanina, indicando uma interação entre esses metabólitos. No entanto, no grupo exposto aos agrotóxicos, os coeficientes de correlação diminuíram significativamente, mostrando mudanças na interação desses metabólitos no organismo dos peixes (YOON et al., 2016).

Visando a compreensão das diferenças metabólicas gerais em grupos expostos, os métodos multivariados são os mais informativos em estudos

metabolômicos (LEE et al., 2020; CHEN et al., 2021). Além disso, para explorar as diferenças metabólicas em grupos expostos, os métodos multivariados são os estudos preferidos, em metabolômica (LEE et al., 2020).

Desta forma, a análise de componentes principais (PCA) é um método multivariado não supervisionado usado para criar variáveis latentes denominadas componentes principais (PC) que resume a informação de vários metabólitos em um pequeno conjunto de novas variáveis, diminuindo o número de dimensões necessárias para explicar os dados metabolômicos (Figura 10A). Assim, cada PC explica uma parte da variabilidade total dos dados enquanto são ortogonais entre si, significando que as informações mantidas em cada PC são únicas e podem apresentar diferentes efeitos amostrais, como é possível verificar numa análise de um gráfico de pesos das variáveis nas PC's (Figura 10B). Nestes termos, vale mencionar um estudo em que os autores utilizaram o PCA para discriminar os metabólitos afetados pela exposição a diferentes concentrações do canabinóide Δ^9 -THC no *zebrafish*. Os achados dos autores demonstraram que com o aumento da concentração de Δ^9 -THC, as amostras formaram aglomerados a cada concentração, evidenciando as diferenças metabólicas entre os grupos (AKHTAR et al., 2016).

Contudo, embora adequados, métodos não supervisionados, como o PCA, não são ideais para classificar os grupos de amostra quando a diferença entre grupos não é a fonte primária de variação (CIUCCI et al., 2017); nesses casos, a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) (Figura 10C) tende a ter melhor desempenho na discriminação de grupos devido ao seu perfil supervisionado e excelente desempenho na modelagem de dados ruidosos (LIU et al., 2016).

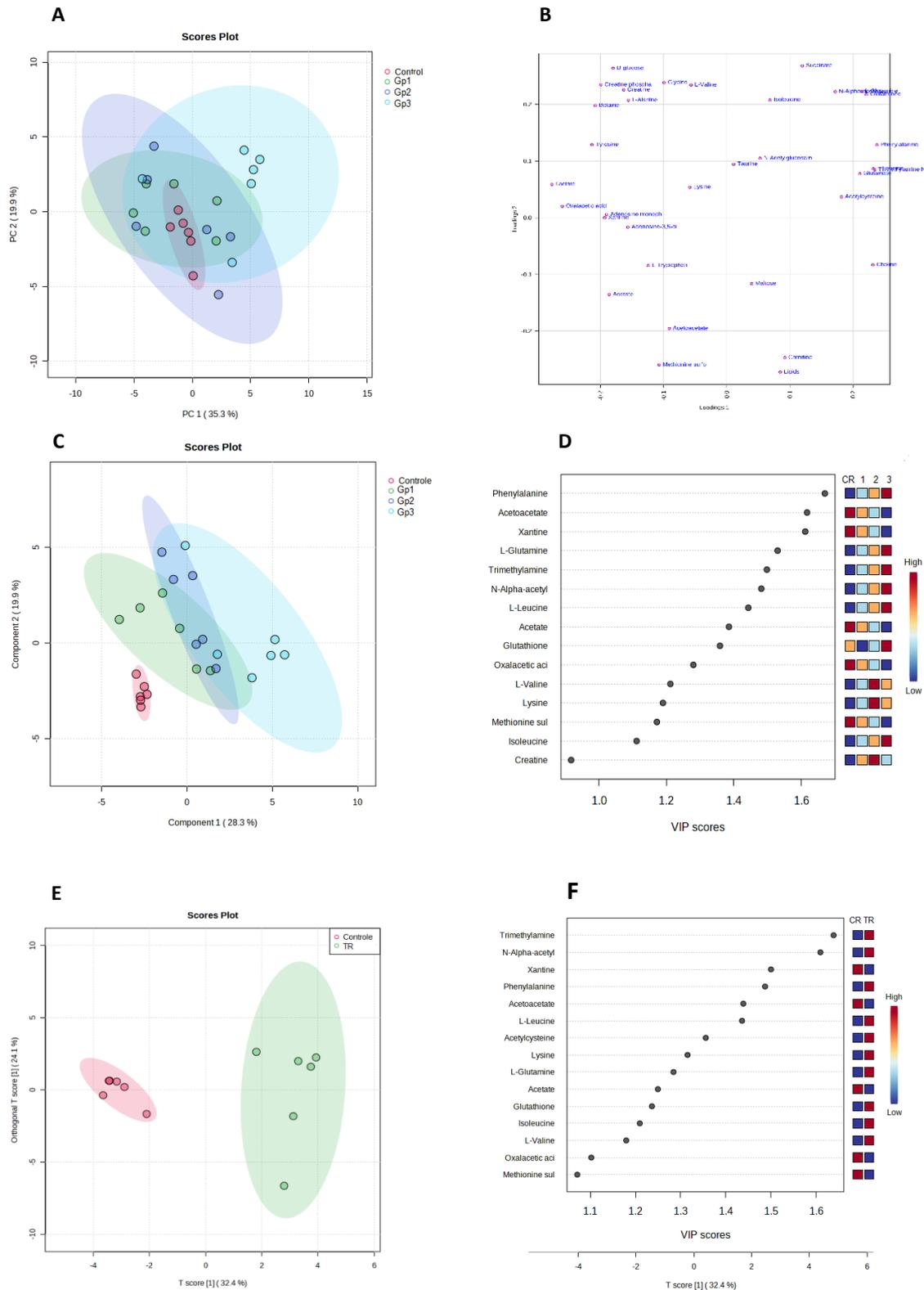
As técnicas não supervisionadas incluem aquelas que não aplicam um rótulo de classe das amostras para criar o modelo, mas apresentam o agrupamento natural das amostras em função das componentes principais (PC). Assim, modelos supervisionados, tais como análise PLS-DA aplicam ativamente o rótulo de classe para gerar o modelo, sendo mais sensíveis a diferenças de grupo e mais eficientes em encontrar metabólitos discriminantes. No entanto, são propensos ao *overfitting*, tornando a validação do modelo uma etapa essencial para garantir um modelo confiável (GHOSH et al., 2020).

Uma eficiente ferramenta, frequentemente utilizada na análise PLS-DA, é o gráfico *VIP score* (*Variable Importance in Projection*) (Figura 10D). O *VIP score* é uma medida estatística que indica a importância relativa de cada variável independente (x) para a discriminação entre as classes no modelo PLS-DA (MEHMOOD et al., 2012). Com essa informação, é possível priorizar a interpretação das variáveis mais importantes e direcionar esforços adicionais para investigar suas implicações biológicas (LOTTERING et al., 2020).

Em estudos com misturas complexas de amostras, frequentes na metabolômica, a grande quantidade de informações nos sinais espectrais pode ser avaliada por meio da análise discriminante de mínimos quadrados ortogonal parcial (OPLS-DA) (Figura 10E) (BOCCARD & RUTLEDGE, 2013). Considerando esta técnica, Chen et al., 2021 utilizaram OPLS-DA a fim de identificar as diferenças entre os grupos de *zebrafish* expostos à um inseticida. O modelo indicou diferenças significativas nos deslocamentos químicos entre os tratamentos. Assim, de acordo com o nível de separação dos grupos, os dados sugeriram perturbação no metabolismo hepático, bem como neurotoxicidade após a exposição do peixe ao xenobiótico. Neste caso, os dados foram analisadas por meio de uma combinação de OPLS-DA e *t* de Student (CHEN et al., 2021).

Adicionalmente, assim como na análise PLS-DA, que fornece a ferramenta gráfico *VIP score*, na análise OPLS-DA também foi possível utilizar o gráfico *VIP score* (Figura 10 F) para identificar metabólitos discriminantes e possivelmente biomarcadores. Meng et al., 2022 sugeriram biomarcadores de toxicidade pela exposição ao pesticida clorantraniliprole, utilizando *zebrafish* como modelo. Os grupos estudados apresentaram boa separação de acordo com os gráficos *score plot* OPLS-DA, possibilitando assim a verificação de alterações significativas em enzimas associadas ao estresse oxidativo bem como alterações na expressão gênica do peixe. Portanto, comparado com o PLS-DA, o método OPLS-DA fornece uma interpretação mais eficiente ao concentrar os dados discriminantes em apenas um eixo do gráfico de escores (PORTO et al., 2023). Por outro lado, é importante considerar que este método é funcional com até dois grupos comparados. Para mais de dois grupos, aplica-se a PCA e PLS-DA (WORLEY & POWERS, 2016).

Figura 10 – A) Gráfico Score Plot análise PCA; B) Gráfico de pesos (loadings) das variáveis em cada componente (PC's); C) Gráfico Score Plot análise PLS-DA; D) Gráfico VIP Score análise PLS-DA; E) Gráfico Score Plot da análise OPLS-DA; F) Gráfico VIP Score da análise OPLS-DA.*Imagens representativas.



Fonte: A autora, 2023.

HIPÓTESE

3. Hipótese

No contexto deste trabalho, apresenta-se a hipótese de que o estudo ecotoxicológico e a análise metabolômica baseada em RMN ^1H , emerge como uma estratégia eficiente no fornecimento de dados para a compreensão da toxicidade de pesticidas à base de As em organismos aquáticos. A associação dessas duas metodologias de análise proporciona a obtenção tanto de dados toxicológicos por meio da análise de toxicidade e estudo morfológico, como de dados metabólicos/ bioquímicos, gerados à partir da análise metabolômica. Esta estratégia deve contribuir para a compreensão ampla e detalhada dos potenciais impactos de xenobióticos em organismos e no meio ambiente.

OBJETIVOS

4. Objetivos

4.1. Objetivo Geral

Analisar o impacto biológico causado pela exposição do MSMA em embriões *zebrafish* (*Danio rerio*).

4.2. Objetivos Específicos

- Determinar a concentração letal média (CL₅₀) do MSMA, para ensaios com embriões de *zebrafish*;
- Avaliar os efeitos da exposição do *zebrafish* ao MSMA por meio de testes de embriotoxicidade;
- Obter os espectros de RMN ¹H e identificar dos metabólitos presentes;
- Detectar as diferenças entre metabólitos nos grupos controle e expostos por meio de estudo estatístico com análises univariada e multivariada;
- Identificar as vias metabólicas, bem como seus metabólitos específicos, que apresentaram alterações significativas após exposição ao MSMA;
- Formular análise e interpretação bioquímica, explicando os perfis metabólicos apresentados.

MATERIAIS & MÉTODOS

5. Metodologia

Esta pesquisa se desenvolveu por meio da colaboração entre o Instituto de Química e Biotecnologia (IQB) e do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Os experimentos de exposição dos embriões ao MSMA para determinação de CL₅₀, testes de embriotoxicidade e teratogenicidade, e amostragem para análise metabolômica foram realizados com o suporte e estrutura do Laboratório de Morfofisiologia Animal Aplicada (LMAA), no ICBS.

As análises de RMN, bem como o estudo metabolômico foram realizados com o apoio e estrutura do Núcleo de Análises e Pesquisa em Ressonância Magnética Nuclear (NAPRMN) da UFAL. Em todo o processo de criação, reprodução e experimentação dos peixes utilizados nesta pesquisa foram observados os critérios estabelecidos no guia n° 236 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 2013).

O projeto contou com aprovação prévia do Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (CEUA-UFAL), protocolo n° 14/2021, aprovado em 11/2021, conforme documento anexo. Os procedimentos para a criação e manutenção do biotério do *zebrafish*, desenvolvimento dos experimentos, incluindo as fases de exposição ao produto químico, bem como a obtenção das amostras para análise seguem descritos nos itens a seguir:

5.1. Agentes de exposição

- MSMA pureza 98% (Sigma-Aldrich Labs®);
- Água destilada autoclavada;
- Corante azul de metileno;
- Meio para embrião/*egg-water* (750 mM KH₂PO₄; 250 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM NaCl; 50 mM KCl; 500 mM CaCl₂+2H₂O; 350 mM NaHCO₃);
- 3,4-dicloroanilina (DCA) (Sigma-Aldrich Labs®);
- Etanol PA 70% (Sigma-Aldrich Labs®).

5.2. Reagentes para amostragem

- Nitrogênio líquido (neutralização metabólica);
- Metanol PA (Sigma-Aldrich Labs®) (extração metabólica);
- Tampão fosfato (D₂O + TSP 98% – pH 7.4).

O procedimento para preparação do tampão fosfato (pH 7,4) foi realizado a partir de uma mistura de 28,85 g de fosfato dissódico anidro (Na_2HPO_4 99,0%; Sigma-Aldrich), 5,25 g de fosfato monossódico anidro (NaH_2PO_4 99,0%; Sigma-Aldrich), 0,146 g de 3-trimetilsilil-2,2,3,3-propionato-d4 de sódio (TSP 98%; Sigma-Aldrich) e 1000 mL de água deuterada (D_2O 99,8%; Sigma-Aldrich) (BECKONERT et al., 2007).

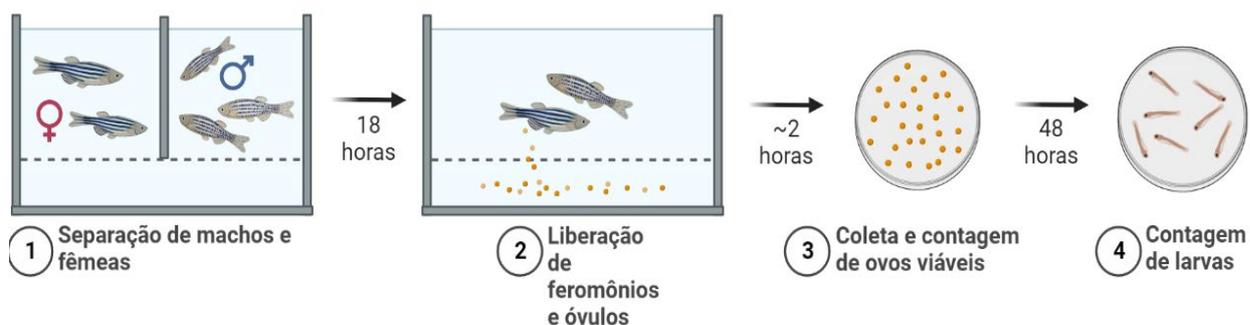
5.3. Estudo ecotoxicológico

5.3.1. Reprodução, análise e coleta de embriões *zebrafish*

Exemplares adultos da espécie *Danio rerio*, machos e fêmeas, foram adquiridos comercialmente (com aproximadamente 5 meses de idade). Os animais foram mantidos no Biotério de *Zebrafish* do Laboratório de Morfofisiologia Animal Aplicada do ICBS/UFAL.

Os animais passaram por processo de aclimação durante duas semanas, mantidos em aquários de vidro de 5L, contendo até 05 peixes para cada litro, em água reconstituída a 26°C (ISO, 1996), com aeração constante, sob fotoperíodo em ciclos claro/escuro constante de 14:10 horas e alimentados três vezes ao dia com ração comercial para peixes. No preparo dos animais para a reprodução, um grupo de 05 animais, (sendo 02 fêmeas e 03 machos) foi selecionado e transferido para tanques de desova algumas horas antes do início do período escuro, no dia anterior ao teste. Diferentes indivíduos adultos foram utilizados em cada replicata experimental (n=3) (Figura 11).

Figura 11. Processo de preparo do *zebrafish* para a reprodução.



Fonte: A autora, 2023.

5.3.2. Experimento e análise estatística para determinação da CL₅₀

Para o teste de determinação da CL₅₀, realiza-se a desinfecção dos embriões. A desinfecção dos embriões foi realizada via terapia fotodinâmica (TFD), com o uso do corante azul de metileno. O modo de ação da terapia fotodinâmica corresponde a um processo em que uma substância fotossensibilizante (neste caso, o azul de metileno) é ativada por uma luz em determinado comprimento de onda, produzindo espécies reativas capazes de causar a morte celular bacteriana. Desta forma, em termos de desinfecção, esta substância auxilia na redução de microorganismos presentes nos embriões recém fertilizados (WAINWRIGHT, 2000). Após a coleta e desinfecção dos embriões, estes foram encaminhados para análise de viabilidade com o auxílio de uma lupa.

O ensaio de toxicidade aguda utilizando animais em estágio embrionário (~2 a 96 horas) de *zebrafish* teve início após a coleta de 270 ovos fertilizados e viáveis em estágio de blástula, que foram distribuídos em 8 placas para cultura com 24 poços, uma para cada tratamento com MSMA aos grupos expostos e controles. Os ovos foram dispostos individualmente em cada poço da placa contendo 2,0 mL do meio de exposição. Os tratamentos foram compostos por 01 controle negativo (meio para embrião/*egg-water*) e 06 grupos expostos em concentrações de MSMA como segue: 5, 15, 30, 45, 75 e 100mg L⁻¹, e ao controle positivo (3,4-dicloroanilina 4%). A exposição foi do tipo semi-estática, com trocas dos tratamentos a cada 24 horas pós exposição (hpe). O experimento foi realizado em triplicata (n=3).

A seleção dos valores mínimos e máximos das concentrações de MSMA obedeceu aos critérios estabelecidos pelo guia OECD n° 236, em que se preconiza a utilização de doses não superiores a 100mg L⁻¹ como limite superior para bioensaios de exposição com embriões de *zebrafish* (OECD, 2013). Os embriões foram incubados em estufa BOD por 96 horas, sob temperatura de 26°C e fotoperíodo de 14:10. Durante a exposição, a cada 24 horas, os embriões foram checados, com o uso de uma lupa, para o cálculo da taxa de mortalidade, de acordo com o guia OECD 236, 2013. Ao final dos experimentos, os embriões foram eutanasiados com nitrogênio líquido e acondicionados em tubos de eppendorf de 1,5 mL contendo formaldeído 4%, por 24 horas e após isto,

retirados do formol e imersos em novos tubos com etanol PA 70% e mantidos em freezer (temperatura -20°C). Para a análise estatística, o cálculo da CL_{50} foi realizado por meio de regressão Probit, via *software Excel (MSOffice®)*. Para calcular a CL_{50} por Probit, os valores de concentrações obtidos do teste definitivo foram convertidos em log de concentração % com as devidas correções. A percentagem de mortalidade de 0 a 100 foi corrigida antes do cálculo para determinação da dosagem média de mortalidade (a dose em que se obtém 50% de mortalidade no grupo tratado) conforme segue: fórmula corrigida em percentuais (%) - para cada 1 mortalidade, 10% no cálculo. Em 0% de mortalidade: $100 (0,25/n)$ e para 100% de mortalidade: $100 (n-0,25/n)$, em que “n” refere-se ao número de peixes utilizados no experimento. Os valores *Probit* em % de mortalidade correta foram obtidos através da Tabela de transformação *Probit*.

5.3.3. Teste de embriotoxicidade (FET)

Para o experimento de embriotoxicidade (*Fish embryo acute toxicity – FET*), os embriões foram expostos a cinco tratamentos, contendo 10 embriões em cada grupo, alocados em placas de 24 poços, um embrião em cada poço. A exposição obedeceu os limites inferior e superior de concentrações de MSMA, isto é, 10mg L^{-1} para a concentração mínima de MSMA e 60mg L^{-1} para a concentração máxima.

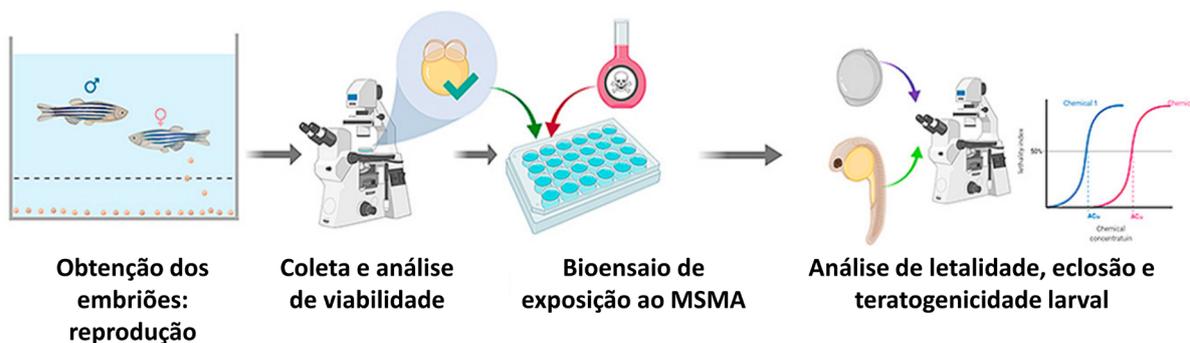
A escolha das concentrações foi realizada conforme resultados do teste para determinação de CL_{50} obtidos neste estudo. Os grupos foram divididos em controle positivo (3,4-dicloroanilina 4%), controle negativo (meio para embrião) e 03 grupos expostos em concentrações seriadas de MSMA, sendo: 10 mg L^{-1} , 30 mg L^{-1} e 60 mg L^{-1} . O grupo controle positivo, exposto apenas com DCA teve como finalidade a confirmação da mortalidade entre 20 e 80%, validando assim o teste de exposição após 96h, conforme o teste n° 236 do guia OECD, 2013.

O experimento foi realizado em triplicata ($n=3$), totalizando 30 larvas para cada tratamento. Ao final, as larvas foram eutanasiadas com nitrogênio líquido e alocadas em tubos de eppendorf com formaldeído 4% e após 24 horas, acondicionados em novos tubos contendo etanol PA 70%, para posterior análise

morfológica. O total de embriões utilizados neste experimento foi de 150. A figura 12 apresenta um esquema sucinto das principais etapas do FET.

Durante a exposição ao MSMA, os embriões e larvas foram avaliados a cada 24 horas considerando os seguintes parâmetros: mortalidade, taxa de eclosão, número de batimentos cardíacos, número de movimentos espontâneos, desprendimento caudal, malformações, pigmentação e presença de somitos e otólitos. Para a avaliação da taxa de movimentos espontâneos e aferição de batimentos cardíacos foram utilizados um cronômetro digital e um contador manual mecânico, respectivamente, respeitando o cronômetro de 60 segundos. Esta primeira análise ocorreu no período de 24 horas pós exposição (hpe).

Figura 12. Esquema das etapas resumidas do bioensaio com exposição do *zebrafish* ao MSMA.



Fonte: A autora, 2023.

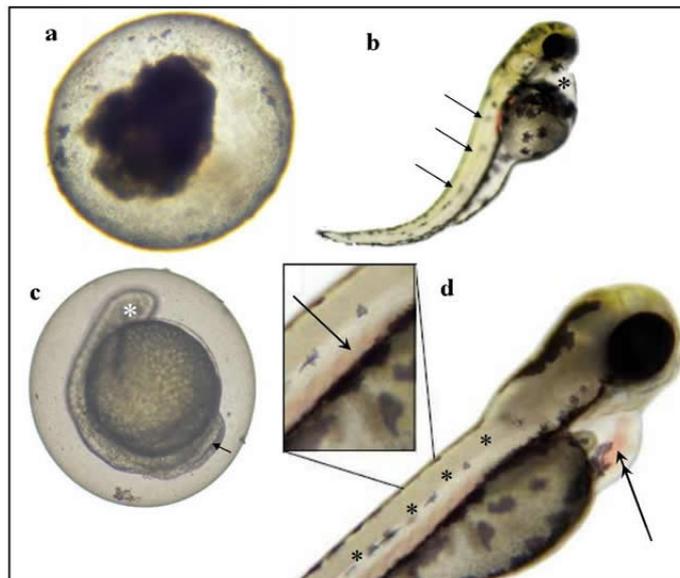
Na avaliação da taxa de batimentos cardíacos foram utilizados os mesmos equipamentos descritos acima, sendo que esta análise foi executada nos períodos de 48 e 72 horas pós exposição. Em todos os experimentos de exposição aguda ao MSMA, com duração total de 96 horas, os embriões/larvas foram analisados em um estereomicroscópio binocular (lente 40x) e uma lupa, a cada 24 horas, considerando os parâmetros **A**, **B** e **C** (Figura 13), como segue abaixo (de acordo com recomendações OECD n° 236/2013):

A - Parâmetros não letais: Taxa de eclosão (24, 48, 72, 96 h); Movimento espontâneo (24 h); Batimento cardíaco (48 h); Pigmentação e despigmentação do embrião/larva (24, 48, 72, 96 h);

B - Parâmetros letais: Coagulação do embrião (0 e 24 h); cauda não isolada (24, 48, 96 h); presença/formação de somitos (24, 48, 96 h);

C - Efeitos teratogênicos: Presença de escoliose (24, 48, 96 h); raquitismo (24, 48, 96 h); deformação do vitelo (24, 48, 96 h); retardo do crescimento e desenvolvimento geral do animal (24, 48, 72, 96 h).

Figura 13. Parâmetros de análise do *zebrafish* em experimento de ecotoxicidade; **a)** efeito letal: embrião coagulado/morte; **b)** efeito teratogênico: presença de lordose espinhal e edema cardíaco **c)** efeitos não letais: ausência de separação entre o pedúnculo caudal e o saco vitelínico; **d)** ausência de somitos e presença de edema cardíaco.



Fonte: Extraído e adaptado de

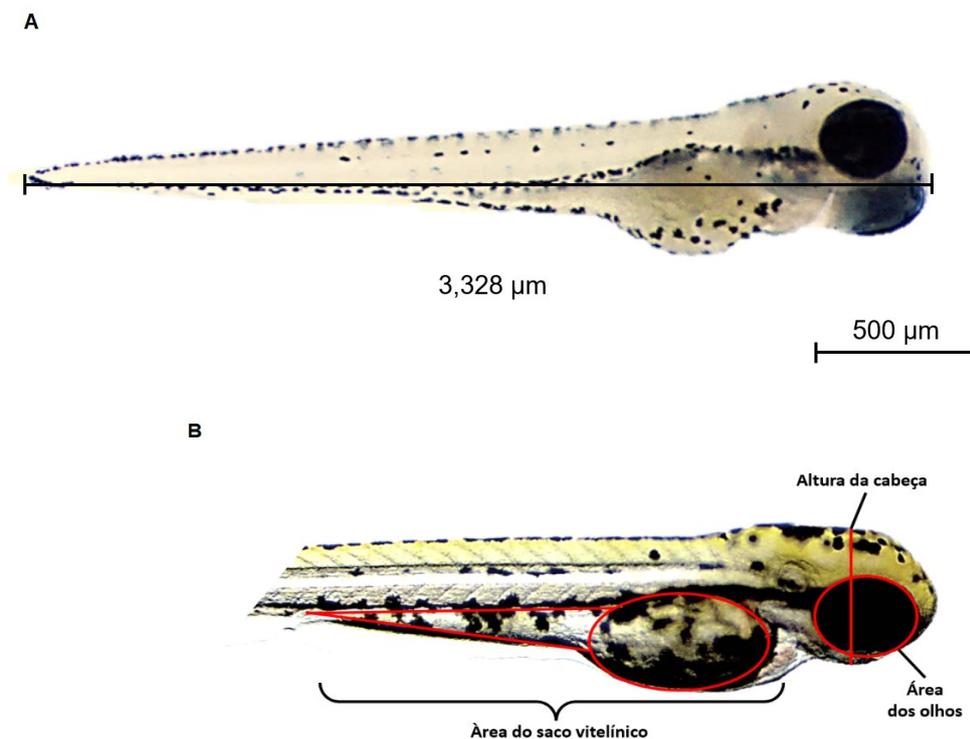
<http://www.biologico.sp.gov.br/publicacoes/comunicados-documentos-tecnicos/comunicados-tecnicos/uso-de-embri%C3%B5es-de-peixe-zebra-em-ecotoxicologia>, acesso em 28/01/2023.

5.3.4. Análise morfométrica

Para o estudo morfométrico foram obtidas fotomicrografias das larvas por meio de um microscópio de luz acoplado à câmera digital do computador, utilizando do *software* Opticam™ (Figura 14A e B). A avaliação morfométrica foi realizada com o uso do *software* ImageJ e a análise estatística foi feita no *software* Prism 8.0 GraphPad®. Todas as fotomicrografias foram realizadas nos períodos de 24 e 96 hpe. As análises consistiram na aferição do comprimento total das larvas (Figura 14A), da altura da cabeça em eixo longitudinal (região do

encéfalo até a boca), área dos olhos e área do saco vitelínico (escala em μm^2) (Figura 14 B) (KIMMEL et al., 1995; JARQUE et al., 2020).

Figura 14. Parâmetros morfométricos avaliados nas larvas de zebrafish expostas ao MSMA por 96h. A) Comprimento total (escala em μm). B) Altura da cabeça (μm), área de saco vitelínico e área dos olhos (μm^2).



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

5.3.5. Análise estatística do *Zebrafish Embryotoxicity Test* (ZET)

Para a análise estatística dos dados obtidos foi utilizado o *software* de análise estatística *Prism 8.0 GraphPad®*. Para verificação da normalidade dos dados sem especificação de parâmetros, realizou-se análise estatística com regressão linear, seguido do teste *t* de Student.

Na regressão linear, utilizamos uma equação para modelar a relação entre uma variável dependente e uma ou mais variáveis independentes. As análises estatísticas tiveram como base o nível de significância $p \leq 0,05$. Após a normalização dos dados, estes foram submetidos à análise *ANOVA-One way*, para a comparação da média dos resultados entre os diferentes grupos tratados com o grupo controle.

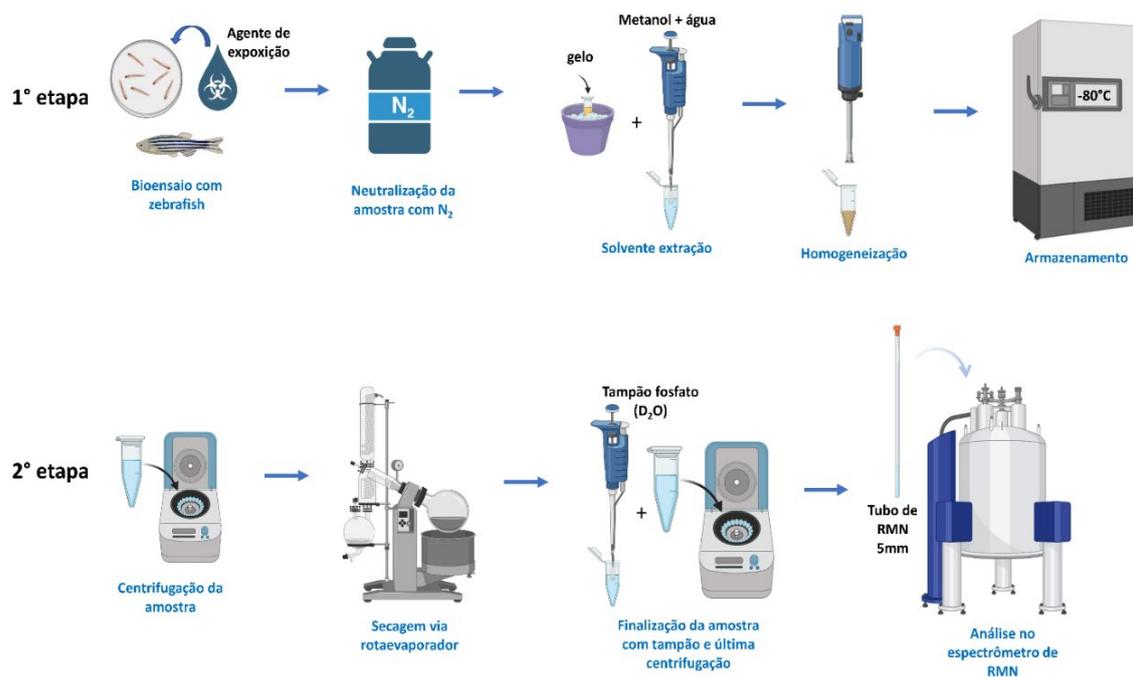
5.4. Bioensaio para estudo metabólico

5.4.1. Exposição e amostragem para espectroscopia de RMN ^1H

Para a obtenção do homogenato foram expostos 04 grupos com 150 embriões em cada (~2 horas pós fertilização) durante 96 h. Os grupos seguiram o seguinte padrão: grupo controle (meio para embrião); 03 tratamentos (MSMA 10, 30 e 60 mg L⁻¹). O experimento foi realizado com 8 replicatas. Os embriões foram expostos em placas de Petri (20 embriões em cada) com 40 mL e béqueres de vidro (50 embriões em cada) com 100 mL das soluções de exposição e controle, para cada concentração. A cada 24 horas foram realizadas as trocas dos tratamentos (exposição semi-estática), a fim de garantir a constância do grau de bioconcentração do agente químico na água de exposição, bem como retirada dos embriões coagulados/mortos.

Ao final das 96 horas as larvas foram agrupadas em pools para o mesmo tratamento e congeladas em nitrogênio líquido, a fim de interromper completamente a atividade enzimática e metabólica. Para a realização desta etapa, foi desenvolvido um protocolo de amostragem (Figura 15) adaptado de acordo com CHEN et al., (2020) e TENG et al., (2018), respeitando as devidas adaptações (Apêndice 1).

Figura 15. Esquema do protocolo de amostragem de tecidos (embriões/larvas) de *zebrafish* para análise metabólica baseada em RMN ^1H .



Fonte: A autora, 2023.

5.5. Pré-processamento dos dados e obtenção dos espectros de RMN ^1H

Os espectros de RMN foram obtidos por meio de um espectrômetro *Bruker 600 MHz Avance III (Bruker BioSpin, Alemanha)*, operando na frequência de 600,13 MHz e equipado com a sonda PA BBO 600S3 BBF-H-D-05 Z SP. As análises foram realizadas utilizando a sequência de pulso *NOESYPR1D*, com pré-saturação do sinal da água. Os parâmetros experimentais foram definidos com tamanho do FID de 65536 pontos, largura espectral com 20.0290 ppm, tempo de aquisição de 2,7 segundos, tempo de relaxação de 4 segundos, 256 scans e temperatura controlada a 298 Kelvin ou 25°C (BECKONERT et al., 2007; KIM et al., 2019).

A matriz de dados foi processada via software *TopSpin™ 4.0.8*, passando por transformada de *Fourier* para converter o FID (espectro de decaimento da energia em função do tempo) em um espectro de intensidade em função da frequência, incluindo ajuste de fase e calibração do TSP em 0.00 ppm. A correção de fase foi aplicada para maximizar a simetria de todos os sinais em todas as regiões do espectro, minimizando a distorção dos picos, especialmente os de baixa intensidade (EMWAS et al., 2018). Por fim, foram gerados 28

espectros, relativos à 7 amostras de cada grupo (7n), sendo 7 amostras para o controle e 7 amostras para cada um dos 3 grupos tratados com MSMA, totalizando 28 amostras.

5.5.1. Análise de dados espectrométricos e estudo estatístico

O tratamento e o processamento dos espectros obtidos (filtragem e *binning* – 0.001 ppm), bem como a identificação dos metabólitos foram realizados com o uso dos softwares *RStudio* e *Chenomx® Inc*, respectivamente. Para a realização da análise multivariada, as matrizes foram pré processadas a fim de gerar os dados com as integrais dos sinais metabólicos identificados.

Em seguida, foram executadas as análises de metabólitos discriminantes utilizando métodos quimiométricos de análise de componentes principais (PCA), análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) e projeções ortogonais para análise discriminante de estruturas latentes (OPLS-DA). Os dados das amostras sofreram normalização quantílica, transformação logarítmica e foram escalonados de acordo com o método de pareto (Centrados na média e divididos pela raiz quadrada do desvio padrão).

O intervalo de confiança adotado foi de 95% e comparações entre controle e cada grupo tratado foram realizadas, incluindo validação cruzada e permutação, para as análises PLS-DA e OPLS-DA. Os metabólitos discriminantes foram selecionados pela combinação baseada no VIP score da análise PLS-DA. Mapas de calor, gráficos de análises PCA, PLS-DA e OPLS-DA, bem como gráficos de análise de vias metabólicas, foram gerados por meio da plataforma on-line *MetaboAnalyst* 5.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>). As amostras de *zebrafish* expostos somente em meio para embrião (*egg-water*) foram utilizados como grupo controle qualitativo na análise estatística. Por fim, a atribuição dos metabólitos e análise das vias metabólicas foram avaliadas por meio da comparação com banco de metabólitos e vias metabólicas da biblioteca *Danio rerio* KEGG, disponível em (https://www.genome.jp/kegg-bin/show_organism?org=dre) (WISHART, 2011).

RESULTADOS & DISCUSSÃO

6. Resultados e Discussão

6.1. Avaliação ecotoxicológica

6.1.1. Determinação da CL₅₀

Com base nos resultados obtidos a partir dos experimentos laboratoriais e análise estatística, estimou-se a CL₅₀ para os grupos expostos no período de 96h em **74 mg L⁻¹** de MSMA.

De acordo com Vanitha et al., 2017, a tolerância de peixes expostos a compostos arsênicos pode variar, quando se refere ao período de 96h, sendo que a CL₅₀ pode estar entre 10.8 mg L⁻¹ e 105 mg L⁻¹, a depender do composto avaliado (US EPA, 1985). Os resultados do experimento demonstraram que concentrações abaixo 20 mg L⁻¹ de MSMA não causaram efeitos visíveis nos peixes em relação à sua morfologia e desenvolvimento. Esses resultados sugerem baixa toxicidade nessa faixa de concentração, como constatado por estudos realizados com diferentes espécies e compostos arsênicos (WU et al., 2018; DAS et al., 2012; SHAW et al., 2007).

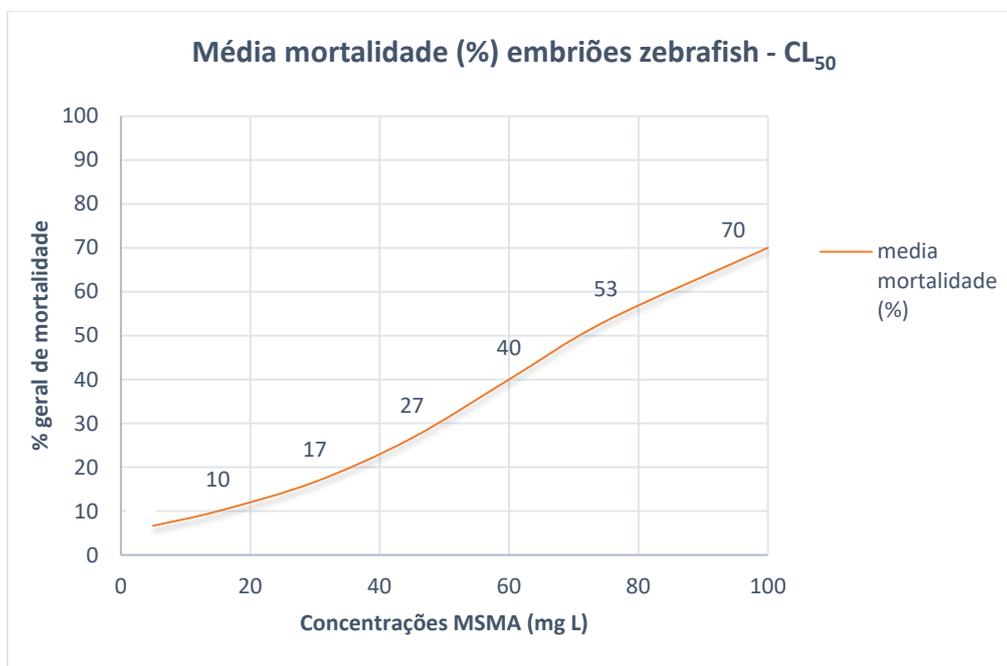
Por exemplo, a CL₅₀ do arsenito de sódio (As inorgânico) foi verificada após a exposição de um peixe teleósteo (espécie *Channa punctatus*) e os resultados verificados pelos autores indicaram uma CL₅₀ de 42 mg L⁻¹, com uma taxa de mortalidade no padrão concentração-dependente (DAS et al., 2012). Adicionalmente, Schlenk et al., 1997, avaliaram os efeitos do metilarsinato de sódio em peixes juvenis da espécie *Silurus glanis* (nome comum *catfish* ou peixe gato), obtendo uma CL₅₀ de 4,7 g L⁻¹, considerando o peso de cada animal exposto de aproximadamente 80 gramas. Nestas comparações, vale considerar as diferenças entre os compostos arsênicos (inorgânicos e orgânicos), bem como o tamanho, massa corporal total e idade do animal exposto.

Por outro lado, concentrações acima de 50 mg L⁻¹ de MSMA demonstraram efeitos subletais consideráveis na morfologia e desenvolvimento dos animais estudados. Em maiores concentrações, foram observadas alterações como redução de movimentos espontâneos, atraso na eclosão, alterações nos batimentos cardíacos, letargia, despigmentação, malformação e aumento na taxa de mortalidade, o que sugere potencial toxicidade da substância. Similarmente, Wu et al., 2018 observaram retardo no crescimento e

malformações tais como edema de pericárdio e de saco vitelínico após a exposição de embriões *zebrafish* ao arsenito, um composto arsênico inorgânico.

Ainda, Perumal et al., 2021 observaram que a exposição de larvas *zebrafish* ao As em diferentes concentrações (0 – 0,30 mg L⁻¹) por 72h causou deformidades na coluna vertebral, na cauda e na cabeça, bem como cardiotoxicidade, com presença de edema de pericárdio e alterações nos batimentos cardíacos. Os autores sugeriram que o aumento da incidência de edema pericárdico pode estar relacionado à redução significativa de *gata4* no grupo exposto ao As. O fator de transcrição *gata4* é necessário para a sobrevivência e proliferação de cardiomiócitos na cardiotoxicidade induzida por drogas e, com isto, os resultados dos autores foram reforçados pela análise de regulação gênica.

Figura 16. CL₅₀ para exposição de embriões *zebrafish* ao MSMA. Gerado via *software Excel (MS Office)*. O Gráfico apresenta a curva de efeito da taxa de mortalidade dos *zebrafish* em resposta ao aumento da concentração de metilarsinato de sódio (MSMA). O eixo y apresenta o percentual de mortalidade de 0 a 100%, enquanto o eixo x expressa as concentrações de 0 a 100 mg L⁻¹ de MSMA.



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Observa-se um aumento gradual na taxa de mortalidade a partir de 10 mg L⁻¹ de MSMA (Figura 16). No entanto, nesse nível, a mortalidade ainda se manteve dentro da faixa de tolerância de 10%, considerando que mesmo o grupo de controle pode apresentar até 10% de mortalidade sem afetar a validade dos resultados experimentais de acordo com critérios do manual de validação de bioensaios com *zebrafish* da OECD n° 157 (OECD, 2011). Assim, à medida que a concentração de MSMA aumenta, a curva da taxa de mortalidade se acentua.

Em 40 mg L⁻¹ de MSMA, a mortalidade atinge cerca de 30% e segue aumentando até que atinge o percentual na faixa de 50% próximo da concentração de 75 mg L⁻¹. A partir dessa concentração, a taxa de mortalidade aumenta significativamente, atingindo 70% no grupo exposto a 100 mg L⁻¹ de MSMA. Esses resultados indicam que o MSMA apresenta alta toxicidade, com uma relação concentração-dependente. Em outras palavras, quanto maior a concentração, maior a letalidade do composto.

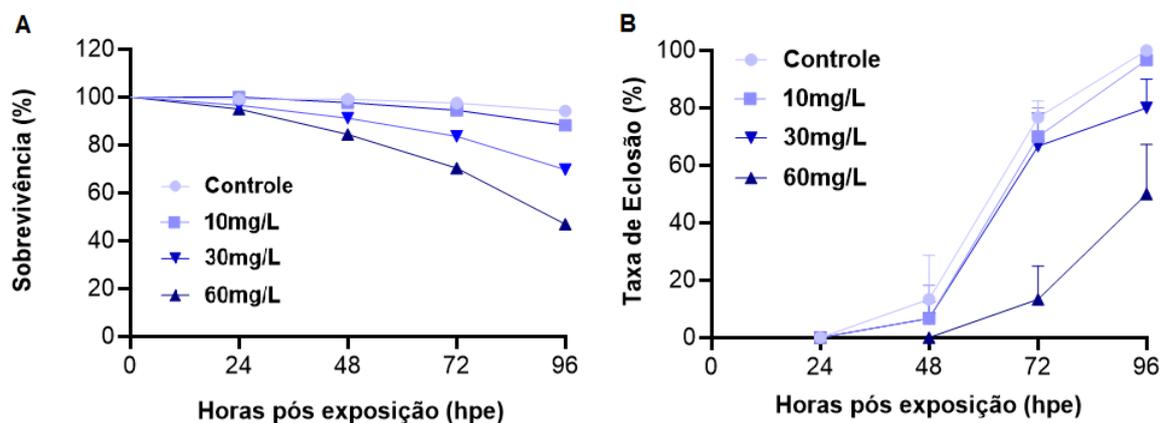
6.1.2. Embriotoxicidade

Os resultados da análise de embriotoxicidade demonstraram que a taxa de sobrevivência de embriões de *zebrafish* expostos a 30 mg L⁻¹ de MSMA foi reduzida de 100% (em 24 h) para 85% a 48 h, com redução acumulativa para 75% na análise de 96 h. Seguindo este mesmo padrão, os animais expostos ao MSMA 60 mg L⁻¹ apresentaram taxa de sobrevivência de 70% em 72 h, com redução em relação ao percentual inicial para 50% em 96 h (Figura 17A).

Além disso, observou-se redução/retardo na taxa de eclosão de embriões tratados com MSMA 60 mg L⁻¹ em comparação com os outros grupos tratados e controle (Figura 17B). Este achado fornece dados importantes sobre o impacto tóxico do MSMA já a partir de 30 mg L⁻¹ na exposição aguda (até 96 h), já que inúmeras substâncias tóxicas podem afetar o desenvolvimento embrionário e a formação adequada dos tecidos e órgãos do *zebrafish*. Isto pode levar a anormalidades no desenvolvimento e atraso na maturação necessária para a eclosão. Assim, é possível que o MSMA tenha causado disfunções na estrutura locomotora e alterações no desenvolvimento neuromuscular, impactando diretamente as atividades de eclosão e natação da larva (PEREIRA et al., 2019).

Além disso, Wang et al., 2020 verificaram severas malformações e disfunções locomotoras nos *zebrafish* expostos à um composto arsênico. Os pesquisadores realizaram exposição de larvas *zebrafish* nas concentrações de 0 a 1,3 mg L⁻¹ de arsenito por 120 h, observando ao final do experimento que os animais expostos apresentavam retardo de eclosão bem como lordose espinhal. Adicionalmente, estudos anteriores sugeriram que tais disfunções podem estar associadas à redução da expressão do hormônio do crescimento (GH/IGF) (traduzido do inglês *growth hormone*), uma vez que GH e IGF são fatores de crescimento que exercem efeitos tróficos sobre regeneração do sistema nervoso central e sistema nervoso periférico, e portanto essenciais no neurodesenvolvimento do peixe (BIANCHI et al., 2017).

Figura 17. A) Taxa de sobrevivência (%) dos embriões/larvas *zebrafish* durante exposição ao MSMA pelo período de 96 h; B) Taxa de eclosão (%) dos embriões/larvas *zebrafish*.



Fonte: A autora, 2023.

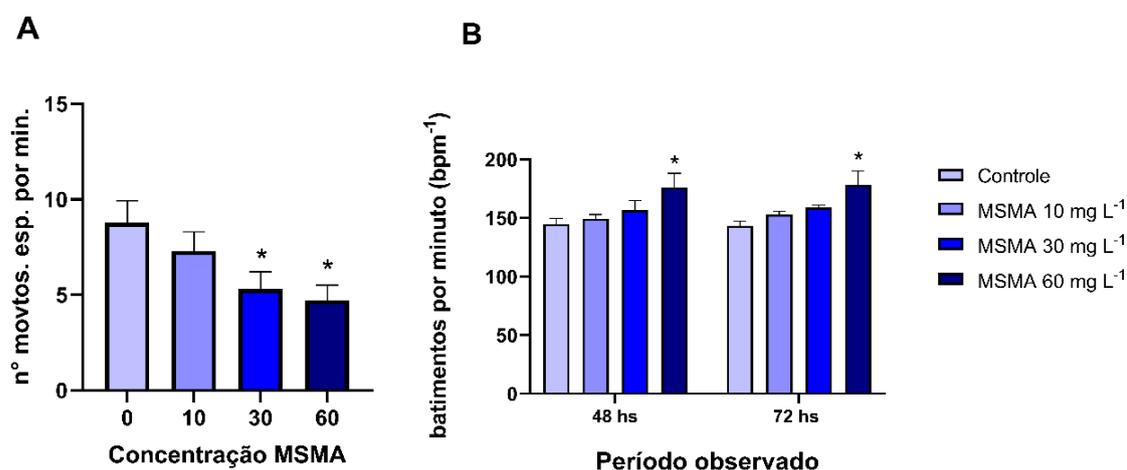
Neste sentido, associado aos resultados de taxa de eclosão, verificou-se ainda que a taxa de movimentos espontâneos, na análise de 24 h, também mostrou queda significativa de acordo com o aumento da concentração de exposição (Figura 18A). Novamente, o grupo exposto em MSMA 60 mg L⁻¹ apresentou maiores alterações, reforçando a hipótese de impacto neuromuscular no animal. Na análise estatística dos batimentos cardíacos foi observado um aumento no número de batimentos cardíacos por minuto, em especial nos grupos tratados em MSMA 30 mg L⁻¹ e 60 mg L⁻¹, comparados aos

grupos controle e tratado com MSMA 10 mg L⁻¹, indicando presença de taquicardia progressiva nos períodos avaliados (Figura 18B).

Este comportamento se acentua conforme a concentração de MSMA e o tempo de exposição aumentam (48 e 72 h), sugerindo que a cardiotoxicidade do MSMA nos embriões de *zebrafish* é do tipo concentração-dependente, bem como tempo-dependente. Assim, é possível estimar uma concentração crítica de exposição ao MSMA a partir de 30 mg L⁻¹ em 72h, com percentuais de 85% de sobrevivência (considerando queda de 15%) e de 65% de taxa de eclosão (queda de 35%).

Corroborando estes achados, a análise morfológica demonstrou que houve edema de pericárdio em embriões, analisados em 96 h, no grupo de exposição ao MSMA 60 mg L⁻¹ (Figura 18D). Ainda, a taxa elevada de edema de pericárdio sugere que a toxicidade cardíaca induzida por MSMA pode ocorrer a partir de 30 mg L⁻¹, o que é consistente com outros trabalhos que indicaram que compostos arsênicos podem causar impactos na função cardíaca, ritmo cardíaco, volume sistólico e débito cardíaco (BALAKUMAR & KAUR, 2009; PERUMAL et al., 2021).

Figura 18. A) Número de movimentos espontâneos - 24 h; B) número de batimentos cardíacos (48 e 72 h) em *zebrafish* expostos ao MSMA por 96 h.



Fonte: A autora, 2023.

Neste contexto, sugere-se que o MSMA pode estar interferindo a entrada de Ca⁺⁺ acoplado à excitação, podendo afetar o músculo cardíaco (PERUMAL et al., 2021). Experimentos anteriores, *in vitro*, utilizando cardiomiócitos

demonstraram que o arsênio está associado à toxicidade cardíaca, induzindo arritmia cardíaca e aumentando a taxa de apoptose em cardiomiócitos, como consequência da produção de espécies reativas de oxigênio, bem como a indução de sobrecarga de Ca^{++} extracelular (REBUZZINI et al., 2015). Desta forma, os resultados do presente estudo fornecem evidências importantes sobre a toxicidade cardíaca do MSMA, evidenciada pela presença de edema de pericárdio, o qual teve ocorrência a partir da concentração a partir de 30 mg L^{-1} .

6.1.3. Análise morfométrica

O grupo controle positivo (tratado com DCA 4%) apresentou 100% de mortalidade em 24 hpe. Todos os embriões do grupo controle positivo apresentaram algum dano morfológico, tais como má formação e ou ausência da cabeça, ausência de somitos e coágulos. Estes fatores são condizentes com os parâmetros de letalidade exercidos pelo composto DCA verificados na literatura (HORIE et al., 2017). A verificação de batimentos cardíacos, bem como a taxa de eclosão, ocorreram em 48 e 72 hpe.

Na análise em 24 hpe, verificou-se que o grupo tratado com MSMA 10 mg L^{-1} não apresentou alterações morfológicas significativas quando comparado ao grupo controle (Figuras 19A e B). Na análise do grupo tratado em MSMA 30 mg L^{-1} , foi verificado que algumas larvas apresentaram redução no desenvolvimento de somitos e desprendimento prematuro de cauda do saco vitelínico (Figura 19C). Estes achados demonstram o efeito acelerador metabólico do MSMA (ANDRADE et al., 2016), já que o grupo controle referência não apresentou o desprendimento da cauda na análise de 24 hpe.

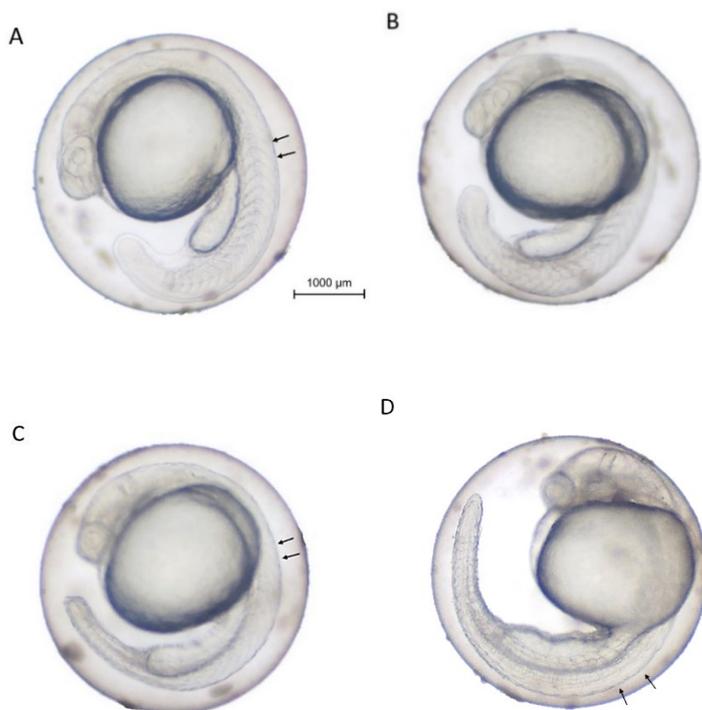
Já os embriões do grupo tratado com MSMA 60 mg L^{-1} apresentaram repostas similares ao grupo tratado em MSMA 30 mg L^{-1} , entretanto mais acentuadas, tais como a redução na formação de somitos e desprendimento prematuro da cauda (Figuras 19C e D), fato que condiz com o desenvolvimento corporal reduzido ao longo do período de exposição até 96 hpe (YANG et al., 2009; ACHENBACH et al., 2020).

Em relação ao grupo tratado com MSMA 60 mg L^{-1} , este apresentou alterações morfológicas mais evidentes tanto nas análises em 24 hpe como em 96 hpe. Entre elas, verificou-se presença de edema de pericárdio mais

acentuado em comparação com o grupo tratado em MSMA 30 mg L⁻¹ e retardo no desenvolvimento corporal.

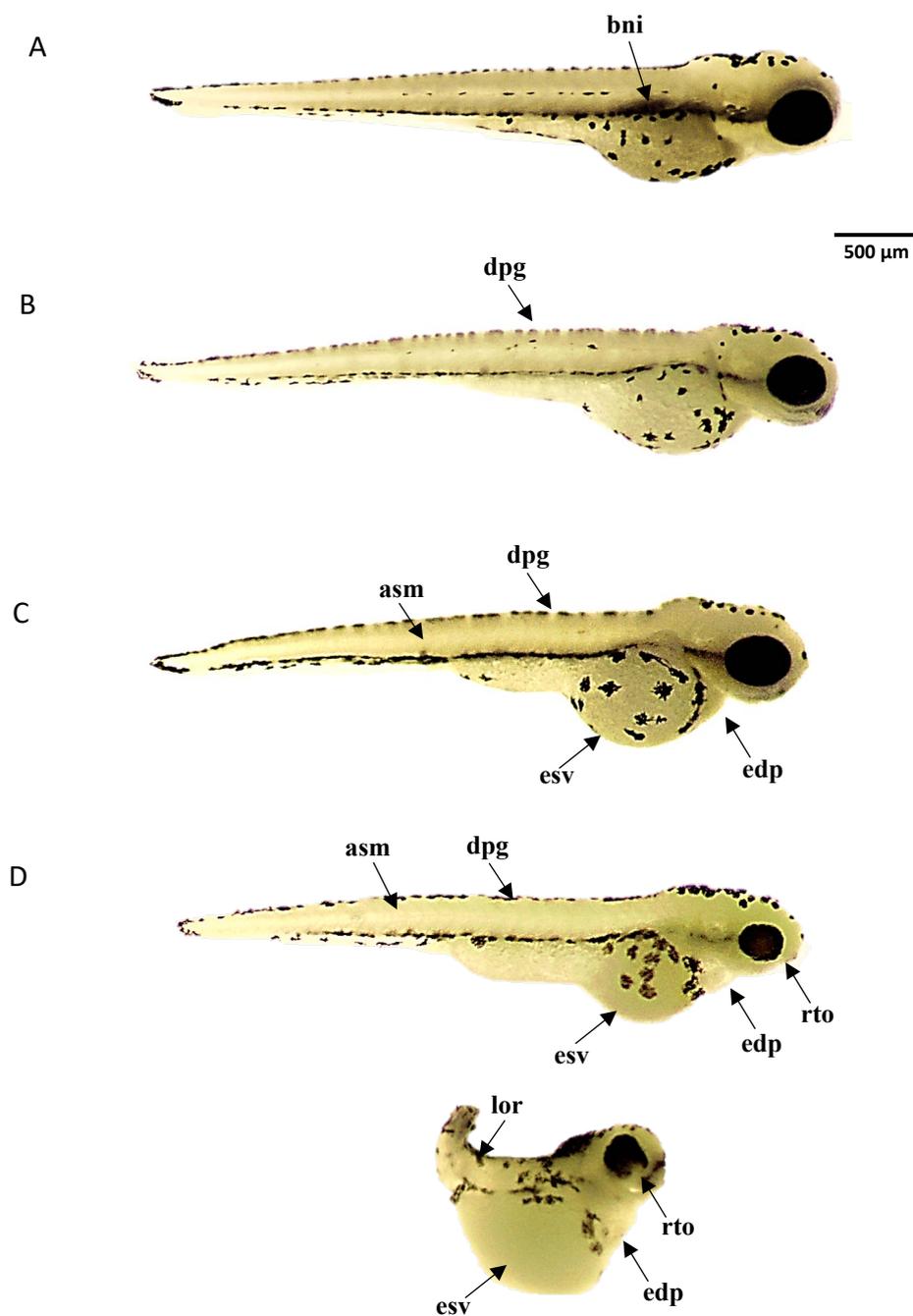
Além disso, o grupo tratado com MSMA 60 mg L⁻¹ foi o grupo com maior taxa de letalidade, apresentando uma média de aproximadamente 48% de mortalidade, valor levemente acima do apresentado no bioensaio para determinação da CL₅₀, que indicou taxa de aproximadamente 42% de mortalidade. Entretanto, essas diferenças não interferem na validade de ambos testes, considerando como um desvio padrão aceitável em muitos estudos estatísticos, especialmente quando se trabalha com amostras biológicas ou fenômenos naturais que podem apresentar variabilidade inerente (KRAMER et al., 2016).

Figura 19. Embriões *zebrafish* analisados em 24 h. A) Embrião grupo controle negativo com presença de somitos (formação normal); B) Embrião grupo tratado MSMA 10 mg L⁻¹; C) Embrião grupo tratado MSMA 30 mg L⁻¹; D) Embrião grupo tratado MSMA 60 mg L⁻¹. As setas -> indicam as regiões de formação de somitos em que, grupo controle (A) e exposto em MSMA 10 mg L⁻¹ (B) apresentam formação normal de somitos, enquanto grupos expostos em 30 mg L⁻¹ (C) e 60 mg L⁻¹ (D) apresentam deficiência ou ausência de somitos.



Fonte: A autora, 2023.

Figura 20. Larvas *zebrafish* analisadas em 96 hpe. A) Larva do grupo controle negativo com fenótipo normal; B) Larva do grupo tratado MSMA 10 mg L⁻¹; D) Larva grupo tratado MSMA 30 mg L⁻¹; E) Larva grupo tratado MSMA 60 mg L⁻¹. Legenda das setas com as principais malformações verificadas durante as análises: (bni) bexiga natatória inflada; (dpg) despigmentação; (esv) edema de saco vitelínico; (asm) ausência de somitos; (edp) edema de pericárdio; (rto) redução tamanho dos olhos e (lor) lordose espinhal.

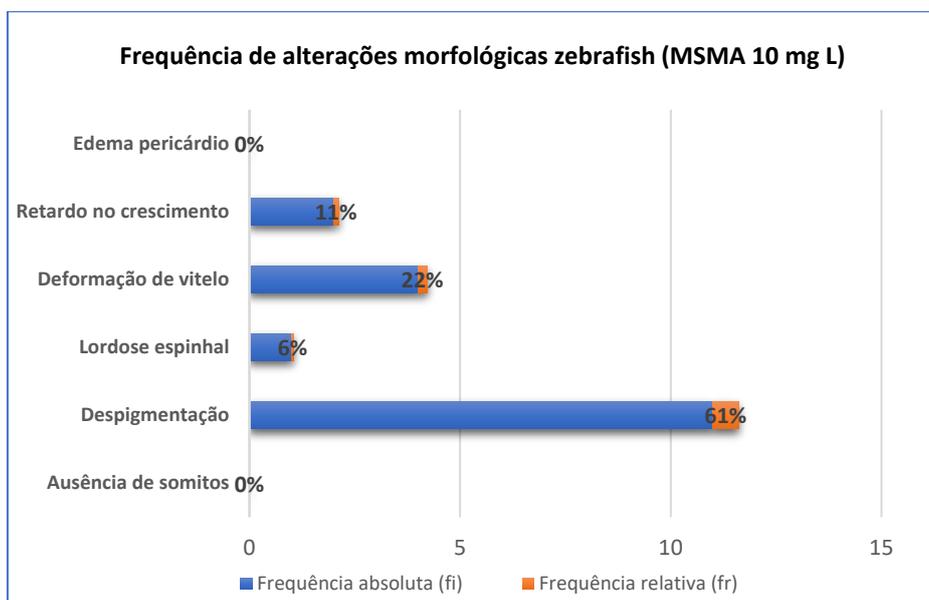


Fonte: A autora, 2023.

Durante a análise das larvas expostas em 96 horas, observou-se alterações morfológicas mais acentuadas e visíveis (Figura 20). Os animais do grupo controle apresentaram desenvolvimento normal, com taxa de eclosão e sobrevivência condizentes à outros estudos ecotoxicológicos com *zebrafish* (CHOUSIDIS et al., 2020; CHEN et al., 2020; TENG et al., 2018).

A análise do grupo exposto em 10 mg L^{-1} de MSMA apresentou alterações sutis e poucas diferenças se comparado ao grupo controle. Neste caso, a alteração mais comum neste grupo foi a despigmentação, ocorrendo em mais de 60% das larvas (Figura 21). Ainda, de acordo com o gráfico da figura 21, outras malformações incluíram retardo no crescimento, que acometeu 11% do grupo exposto, 22% apresentaram deformidades na região do vitelo e 6% apresentaram lordose espinal discreta.

Figura 21. Frequência de alterações morfológicas apresentadas no grupo de animais que apresentaram alguma alteração morfológica devido à exposição ao MSMA na concentração 10 mg L^{-1} .

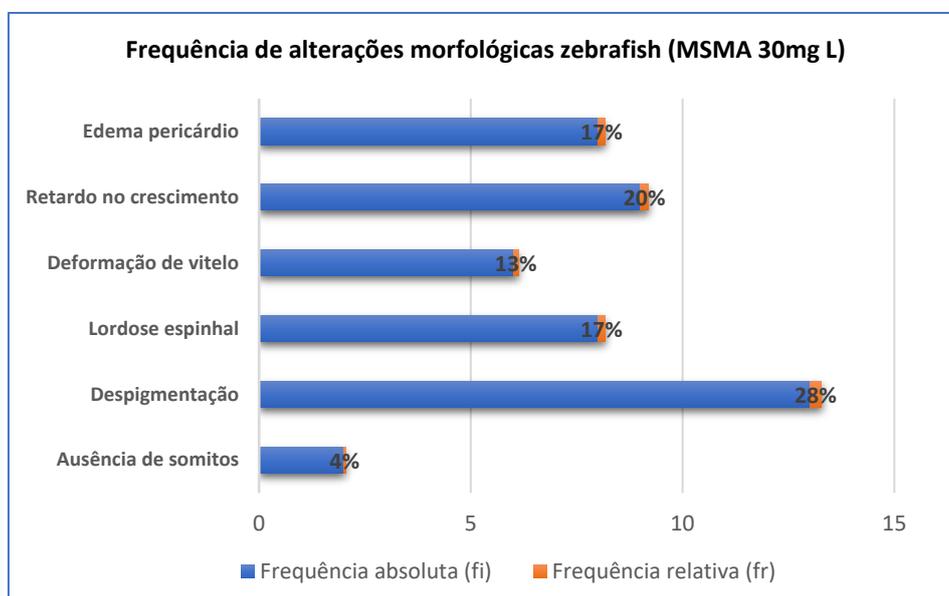


Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

A análise do grupo exposto na concentração de 30 mg L^{-1} do MSMA indicou que este grupo sofreu impactos mais visíveis em seu desenvolvimento morfológico. A figura 22 expressa a frequência das alterações morfológicas neste grupo de tratamento. Adicionalmente, a figura 20C exemplifica, com uma larva referência do grupo tratado com MSMA 30 mg L^{-1} as principais malformações

apresentadas. Novamente, a despigmentação (28%) foi a alteração mais frequente nos animais avaliados. As larvas expostas em MSMA 30 mg L⁻¹ também apresentaram edema de pericárdio discreto (17%), retardo no crescimento (20%), deformidade no vitelo (13%), lordose espinal discreta (17%) e ausência de somitos (4%). De acordo com os resultados da análise morfológica, o grupo exposto em MSMA 30 mg L⁻¹ teve maiores impactos quando comparado ao grupo exposto em MSMA 10 mg L⁻¹, o que possivelmente sugere maior toxicidade do MSMA em doses mais elevadas (> 30 mg L⁻¹).

Figura 22. Frequência de alterações morfológicas apresentadas no grupo de animais expostos ao MSMA na concentração 30 mg L⁻¹.

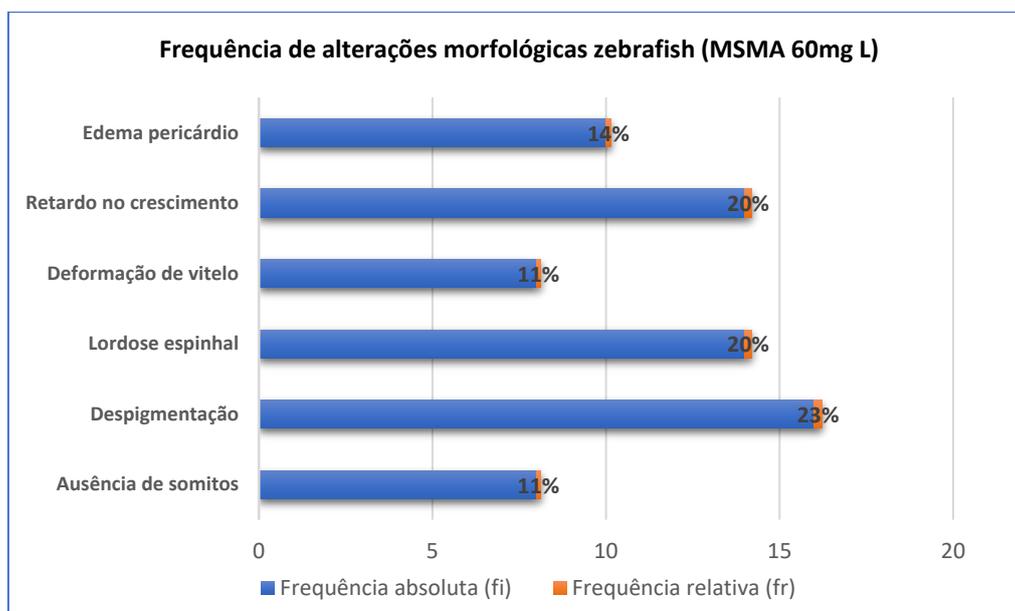


Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Em relação ao grupo tratado em MSMA 60 mg L⁻¹, observou-se que o MSMA afetou o crescimento, bem como a formação de diversas partes do corpo, incluindo a cabeça e os olhos (Figura 20D). A análise de frequência de apresentada na figura 23 expressa diferentes tipos de alterações, entre elas: edema de pericárdio (14%), retardo no crescimento (20%), deformidades e/ou edema no vitelo (11%), lordose espinal leve e acentuada (20%), despigmentação (23%) e ausência de somitos (11%). Esses resultados indicam que a exposição ao MSMA tem efeitos adversos no desenvolvimento morfológico dos animais avaliados, com uma variedade de malformações deletérias e que impactam diretamente na sobrevivência do peixe.

De maneira similar, estudos anteriores já reportaram que a exposição de peixes à compostos arsênicos, principalmente as formas inorgânicas, provoca malformações importantes tais como edema de saco vitelínico, edema de pericárdio e neurotoxicidade (WU et al., 2018; JING et al., 2012).

Figura 23. Frequência de alterações morfológicas apresentadas no grupo de animais expostos ao MSMA na concentração 60 mg L⁻¹.

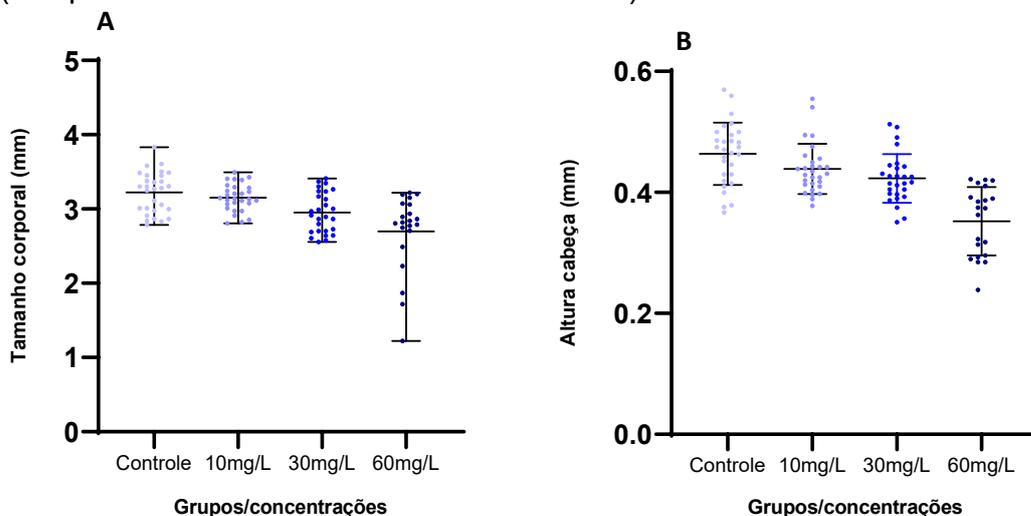


Fonte: Elaborados pela autora, 2023.

Adicionalmente, a análise de parâmetros morfométricos específicos demonstrou que houve redução corporal considerável de acordo com o aumento da concentração de exposição. Estes achados corroboram os estudos anteriores sobre a toxicidade do As, os quais indicaram que a exposição do *zebrafish* ao metal promoveu inúmeras deformidades e retardo no desenvolvimento geral do peixe (PERUMAL et al., 2021; WU et al., 2018; SCHLENK et al., 1997).

Os gráficos a seguir mostram as frequências das alterações morfológicas que impactaram o desenvolvimento dos peixes expostos ao MSMA neste estudo. Os resultados demonstraram retardo no crescimento corporal geral em 96 h, entretanto, as áreas corporais do *zebrafish* apresentaram desenvolvimento precoce na análise de 24 h, tais como o desprendimento prematuro da cauda da região do saco vitelínico, como demonstrado na Figura 20D.

Figura 24. Parâmetros morfológicos avaliados em zebrafish expostos ao MSMA por 96 h. A) Comprimento total (mm); B) Avaliação da altura da cabeça (mm). (*Dispersão - média com intervalo de classe).



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

De acordo com o gráfico de dispersão da figura 24A, observa-se a diminuição no desenvolvimento corporal das larvas tratadas com o MSMA, começando desde a concentração mais baixa (10 mg L^{-1}) até a concentração mais alta (60 mg L^{-1}), seguindo uma tendência de redução contínua. O grupo exposto na concentração mais alta apresentou heterogeneia típica que é verificada nas amostras mais distantes da média geral. Isto aponta para as larvas com tamanho corporal bastante reduzido, as quais sofreram maiores impactos em virtude da exposição.

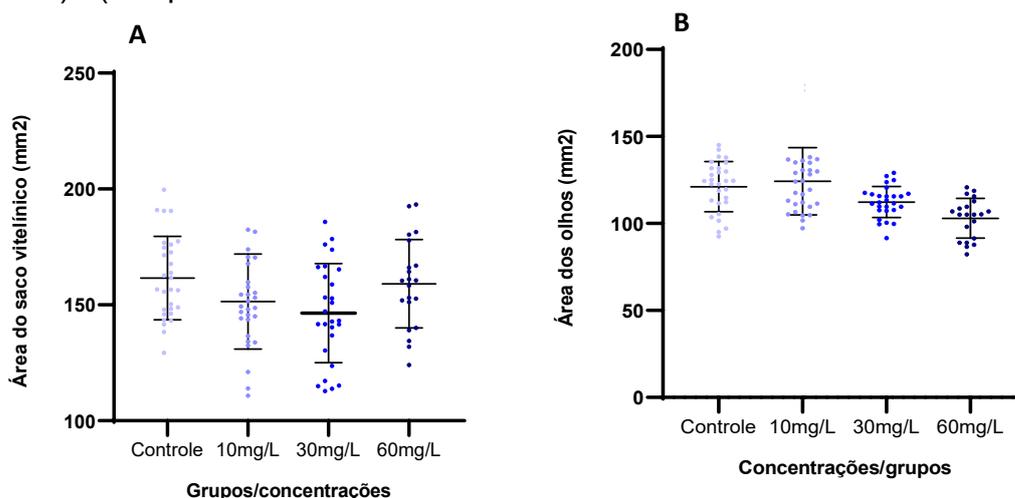
Portanto, se comparado ao grupo controle (CA), o grupo tratado com a concentração de MSMA 60 mg L^{-1} apresenta uma diferença média ($\sim 20\%$) inferior no desenvolvimento corporal das larvas. Por outro lado, os grupos tratados com as concentrações intermediárias de MSMA, 10 mg L^{-1} e 30 mg L^{-1} , não demonstraram diferenças significativas entre si. No entanto, quando estes grupos são comparados ao grupo controle, é possível observar o impacto da exposição ao MSMA no desenvolvimento geral destes animais. Esses resultados evidenciam o caráter concentração-dependente do MSMA em relação ao seu potencial tóxico. Assim, de acordo com o estudo de Das et al., 2011, a taxa de sobrevivência de peixes expostos à compostos de As cai de acordo com o aumento da concentração de exposição. Os autores utilizaram um peixe

teleósteeo como modelo e realizaram a exposição com concentrações crescentes, verificando um aumento de, além da taxa de mortalidade, hepatotoxicidade e distúrbios no metabolismo de aminoácidos.

Assim, de forma semelhante, a figura 24B também demonstra uma redução na média da altura da cabeça das larvas nos grupos tratados. Novamente, o grupo tratado com MSMA 60 mg L⁻¹ apresenta impactos significativos em relação aos outros grupos, especialmente em comparação ao grupo controle. Sugere-se então que o MSMA causou danos importantes na estrutura craniofacial, formação da cabeça e possivelmente em estruturas relacionadas ao desenvolvimento neurológico do animal.

Essa conclusão é respaldada pela redução visível do tamanho da cabeça, indicada no gráfico da figura 24B e também pela alteração na área ocular total mostrada no gráfico B da figura 25. Além disso, as alterações observadas no desenvolvimento corporal das larvas tratadas com MSMA pode estar associada a diversos impactos e danos na fisiologia embriolarval do peixe, tanto em níveis subletais quanto letais. Neste contexto, a figura 25A apresenta os impactos observados no saco vitelínico, órgão que desempenha um papel crucial no fornecimento de nutrientes durante as fases iniciais do ciclo de vida do organismo (SANT & TIMME-LARAGY, 2018).

Figura 25. A) Área do saco vitelínico (mm²); B) Área dos olhos do *zebrafish* (mm²). (*Dispersão - média com intervalo de classe - medidas em mm²);



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Considerando os resultados da análise da área do saco vitelínico nas larvas estudadas, observou-se que o grupo exposto ao MSMA concentração de

30 mg L⁻¹ apresentou os maiores impactos nesse aspecto, seguido pelo grupo exposto a 60 mg L⁻¹. Nessas larvas, foi observado um elevado índice de edema de saco vitelínico, o que pode indicar distúrbios na absorção dos nutrientes disponíveis no vitelo. Essa disfunção compromete a função de suporte nutricional e de proteção para o embrião e a larva em crescimento. Vale mencionar que o vitelo é uma fonte essencial de proteínas, lipídios, carboidratos, vitaminas e minerais necessários para o crescimento e desenvolvimento adequados dos embriões de peixe (BRUCE, 2016).

Neste sentido, a exposição à diferentes compostos químicos pode afetar a taxa de absorção desses nutrientes pelo peixe, o que tem implicações significativas na percepção do embrião sobre a disponibilidade de nutrientes e seu metabolismo. Por exemplo, um embrião exposto a substâncias tóxicas pode ter uma demanda metabólica maior, levando ao esgotamento prematuro do vitelo e resultando em uma redução drástica da energia disponível (SANT & TIMMELARAGY, 2018). Por outro lado, se os transportadores responsáveis pela absorção do vitelo forem inibidos ou insuficientes, a utilização do vitelo é prejudicada, indicando uma deficiência energética (HALBACK et al., 2020). Portanto, tanto taxas aumentadas quanto diminuídas de utilização do vitelo podem ser altamente prejudiciais para o embrião do *zebrafish*.

Coral et al., 2021 identificaram edema de saco vitelínico e de pericárdio após a exposição de embriões *zebrafish* ao As em altas concentrações. Curiosamente, os autores verificaram que após a exposição de 96 h em baixas concentrações (0.5 a 1.00 mM) ocorreu maior utilização dos nutrientes do saco vitelínico, com redução de sua extensão. Por outro lado, concentrações elevadas (> 3.30 mM) provocaram distúrbios na utilização dos nutrientes do saco vitelínico, com potencial formação de edema e desencadeando outros distúrbios no desenvolvimento morfológico do peixe.

A principal força motriz da epibolia (Figura 7), fase do desenvolvimento embrionário em que o embrião é recoberto pela ectoderme, vem das células do saco vitelínico. Durante a progressão da epibolia, 87% da membrana celular externa do vitelo é removida, provavelmente por uma região endocitose. Acredita-se que esta zona de endocitose contribui para o motor epibólico da célula vitelínica, fornecendo uma força de tração à medida que a membrana é internalizada (BRUCE, 2016; SOLNICA-KREZEL & DRIEVER, 1994). Desta

forma, sugere-se que a exposição ao As possa causar disfunções no processo de epibolia, afetando a endocitose marginal e portanto interferindo no desenvolvimento embrionário normal do *zebrafish* (BRUCE, 2016). Assim, essas descobertas destacam a importância de estudos aprofundados sobre os potenciais efeitos tóxicos do MSMA e ainda, fornecem informações relevantes para a compreensão dos riscos associados a essa substância.

6.2. Estudo metabolômico

6.2.1. Análise multivariada não supervisionada

Um total de trinta e quatro metabólitos foram detectados por meio da espectroscopia de RMN ^1H , incluindo aminoácidos, ácidos carboxílicos, carboidratos, álcoois, aminas, lipídios e nucleotídeos (Tabela 2).

Tabela 2. Divisão em classes de metabólitos identificados por meio da análise espectroscópica de RMN das amostras de *zebrafish* expostos ao MSMA.

CLASSE	METABÓLITOS DETECTADOS
AMINOÁCIDOS	Leucina, Isoleucina, L-Valina, L-Alanina, Glutamina, N-alfa-acetil-L-lisina, L-Glutamato, L-Tirosina, Fenilalanina, Lisina, Sulfóxido de metionina, Glicina, Acetilcisteína, Tirosina, Creatina, Glutathione, L-Triptofano.
ÁCIDOS CARBOXÍLICOS	Acetato, Lactato, Fosfocreatina, Ácido oxaloacetato, Acetoacetato, Carnitina, Creatina fosfato, Betaína, Succinato.
CARBOIDRATOS	D-Glucose.
ÁLCOOIS	Colina, Glicerofosfocolina.
AMINAS	Trimetilamina, Taurina.
NUCLEOTÍDEOS	Adenosina monofosfato, Adenosina difosfato, xantina.
LIPÍDIOS	Lipídios *(vários)

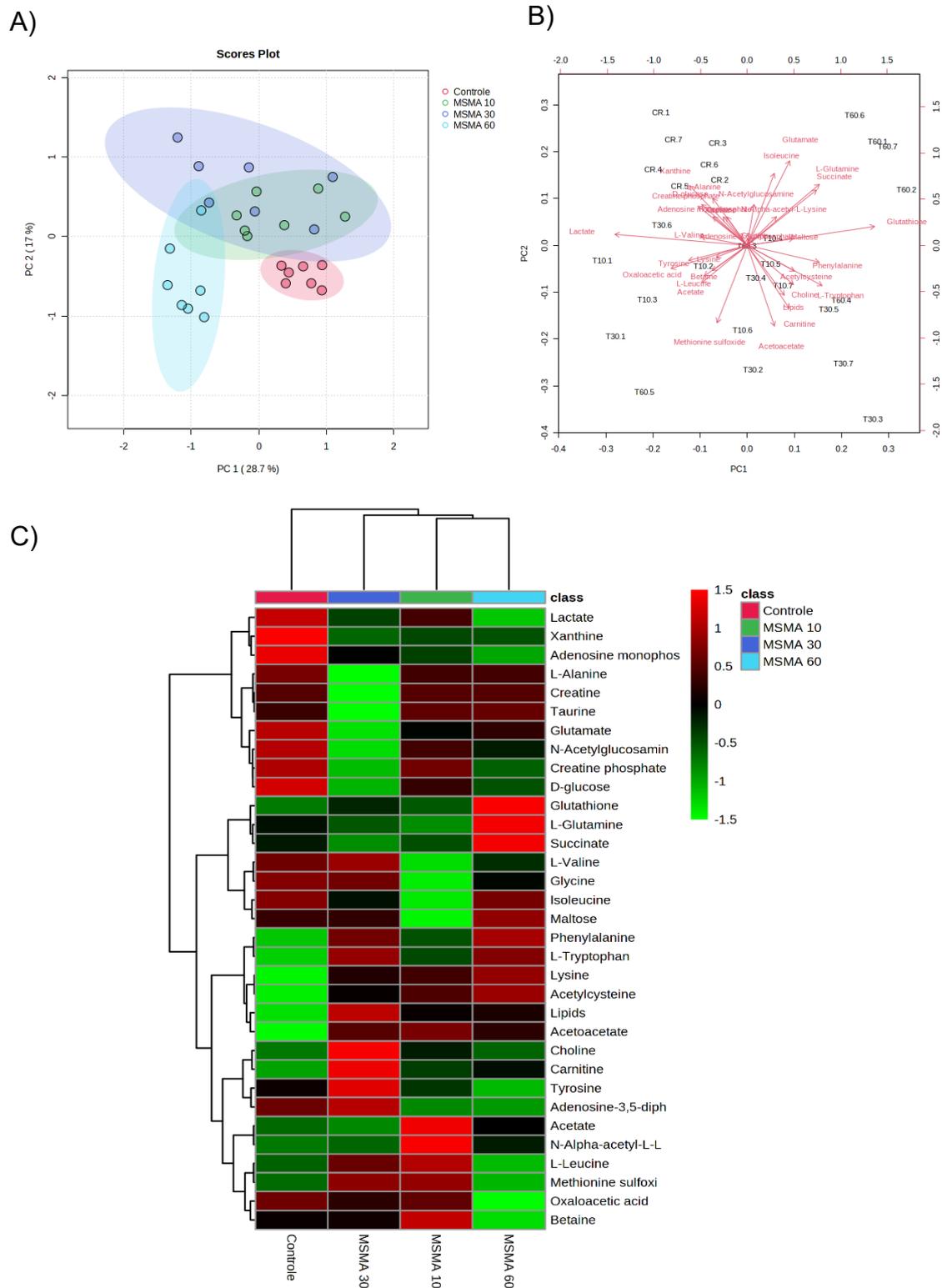
Fonte: A autora, 2023.

Os espectros obtidos a partir do *pool* de amostras de tecido de larvas *zebrafish* expostas ao MSMA (grupos tratados) e expostas em meio para

embrião (grupo controle) apresentaram relativa distinção, conforme revelado pela análise quimiométrica. Entretanto, tais amostras demonstraram baixa discriminação na análise exploratória de PCA, possivelmente devido à interferência da variação técnica causada pela presença de ruídos ou contaminantes, tais como etanol. Após a normalização, foi possível identificar uma separação evidente entre os grupos controle e o tratado em 60 mg L⁻¹, especificamente (Figura 26A).

O gráfico *biplot* apresenta a distribuição das amostras e a contribuição relativa dos metabólitos para a variação nos dados. Neste gráfico, os pontos representam as amostras e os vetores representam os metabólitos. A posição dos pontos no espaço bidimensional ou tridimensional do gráfico *biplot* é determinada pelas pontuações de cada amostra nos componentes principais. Os vetores indicam a direção e a magnitude da contribuição de cada metabólito para a variação total dos dados. Na figura 26B, o gráfico *biplot* oferece uma perspectiva interessante sobre as amostras do grupo controle e dos grupos expostos ao MSMA 60 mg L⁻¹. Embora estes grupos estejam em posições opostas, o gráfico demonstra a notável proximidade das amostras dentro de cada grupo, refletindo a consistência das respostas metabólicas entre os indivíduos de cada um desses grupos. A representação visual no gráfico *biplot* destaca ainda aspectos estatísticos importantes entre os grupos de exposição em 10 mg L⁻¹ e 30 mg L⁻¹ de MSMA. No entanto, as amostras desses grupos exibem um padrão de dispersão mais acentuado com sobreposição notável. Essa distribuição sugere uma inter-relação complexa entre as respostas metabólicas nestas concentrações. Tal fenômeno estatístico aponta para uma relativa ausência de diferença significativa entre esses dois grupos, apesar das concentrações de exposição distintas. Já em relação aos vetores que indicam os metabólitos, é possível observar a correlação positiva entre metabólitos tais como xantina, isoleucina, glutamato e succinato, já que estes apontam para a mesma direção. A xantina, isoleucina, glutamato e succinato, estão na mesma direção em relação a PC2. Entretanto, em relação a PC1 estão em direções opostas e, da mesma forma, lactato e glutatona, são positivamente correlacionados em relação a PC2, e negativamente correlacionados em relação a PC1. Estes dados são importantes para o entendimento da estrutura e a relação entre as amostras e os metabólitos.

Figura 26. Análise multivariada não supervisionada mostrando resultados da exposição ao MSMA, incluindo (A) Gráfico PCA *score plot*; (B) Gráfico *biplot*; (C) Mapa de calor evidenciando os agrupamentos das amostras e os níveis de metabólitos (coloração vermelha indica níveis elevados; coloração escura indica níveis neutros e coloração esverdeada indica níveis reduzidos).



Fonte: A autora, 2023.

No mapa de calor apresentado na figura 26C, a representação visual das variações dos metabólitos entre os grupos oferece insights valiosos sobre as respostas bioquímicas diante da exposição ao MSMA 60 mg L⁻¹. Notavelmente, a diferenciação entre o grupo controle e os grupos expostos é claramente visível através das cores indicativas. Por exemplo, os metabólitos lactato e glicose, essenciais no metabolismo energético das células, exibiram um padrão de regulação positiva no grupo controle; já nos grupos expostos, observou-se a regulação negativa desses compostos. Esse resultado sugere que a presença do MSMA pode, possivelmente, estar impactando a eficiência energética das células (WYSS et al., 2011).

Além disso, observa-se a regulação negativa entre os metabólitos associados ao metabolismo de purinas, tais como xantina e adenosina monofosfato. A regulação negativa de seus níveis indica uma potencial interrupção nas vias metabólicas relacionadas às purinas, o que pode trazer implicações significativas para a síntese de DNA, RNA e outros processos bioquímicos vitais (MARTORELL et al., 2021).

Já os metabólitos glutathiona (relacionada à defesa antioxidante) e a glutamina (envolvida no metabolismo energético e regulação da resposta imunológica) apresentaram regulação positiva (TOWNSEND et al., 2003). Desta forma, a análise multivariada não supervisionada desempenhou um papel fundamental neste estudo, fornecendo dados para a identificação dos padrões intrínsecos das amostras estudadas e contribuindo para a análise metabolômica global, sem que uma hipótese do perfil metabólico fosse estabelecida previamente (CARLSON et al., 2018). Além disso, esse modelo revelou-se útil na identificação de metabólitos associados a grupos específicos de amostras.

Ao comparar diferentes grupos, é possível identificar metabólitos que são específicos ou diferencialmente expressos em cada grupo. Esses metabólitos podem ser considerados como candidatos a marcadores metabólicos, fornecendo informações importantes sobre as diferenças metabólicas entre os grupos. Por exemplo, os metabólitos evidenciados tanto no gráfico biplot quanto no mapa de calor (glutathiona, L-glutamina, succinato, glutamato e isoleucina) estão envolvidos em vias metabólicas como a síntese de glutathiona, o sistema celular antioxidante e de desintoxicação, o metabolismo de nitrogênio e a integridade intestinal, a oxidação de ácidos graxos, os processos de sinapse e

neurotransmissão, o metabolismo energético e a síntese de proteínas (FLOHÉ, 2018). Estes metabólitos apresentaram níveis altos no grupo exposto em MSMA 60 mg L⁻¹, entretanto, nos grupos expostos em MSMA 10 e 30 mg L⁻¹, observou-se níveis baixos. Este resultado conduz para a hipótese da existência de um sistema intrincado de tolerância e ou adaptação à exposição aguda de xenobióticos, presente no organismo do *zebrafish* (RAWLS et al., 2004). Além disso, esses dados corroboraram os resultados encontrados no estudo ecotoxicológico, proporcionando maior clareza na análise e consistência da hipótese.

6.2.2. Análise multivariada supervisionada

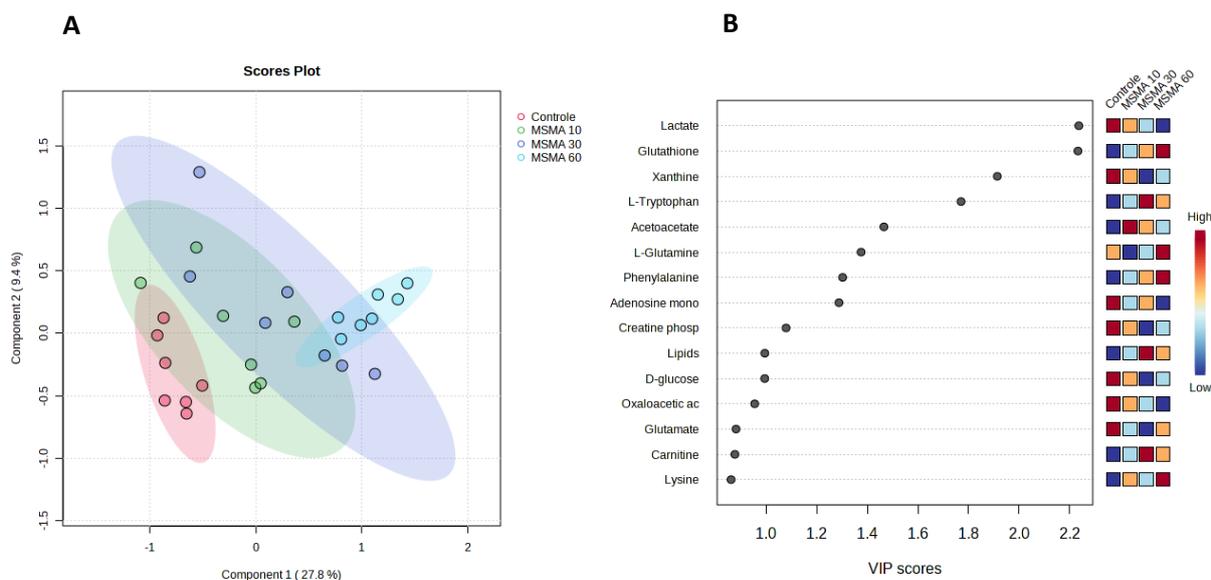
No intuito de se identificar distinções, bem como gerenciando o modelo e previsão de dados com maior nível de acurácia, empregou-se a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). Neste sentido, a PLS-DA permitiu a classificação de amostras em diferentes grupos ou classes com base em seu perfil metabolômico. Esta função é útil para identificar marcadores metabólicos associados a condições específicas ou para distinguir diferentes grupos de amostras com base em sua composição metabólica (ZHANG et al., 2016).

Além disso, a PLS-DA fornece medidas de importância relativa para cada variável (ou metabólito) em relação à separação das classes. Isso contribui para a identificação de metabólitos relevantes responsáveis pelas diferenças entre as classes em estudo (SZYMAŃSKA et al., 2012). Assim, de acordo com o gráfico *score plot* da PLS-DA (Figura 27A), o grupo controle apresentou uma maior distinção em relação aos grupos tratados, sendo possível observar uma separação mais clara entre as amostras em comparação com a análise multivariada não supervisionada (Figura 26A). Isso ocorre porque a análise não supervisionada e a análise supervisionada são abordagens distintas na análise multivariada de dados metabolômicos (GROMSKI et al., 2014).

Ainda, de acordo com o gráfico *score plot* da análise PLS-DA, o grupo controle apresentou alguma similaridade com o grupo exposto à concentração mais baixa (MSMA 10 mg L⁻¹); isto pode ser explicado pela baixa dosagem e mecanismo de tolerância do *zebrafish* ao composto arsênico. Adicionalmente, é

possível observar que existe maior relação entre os grupos tratados intermediários (10 e 30 mg L⁻¹). Estes dois grupos parecem não apresentaram diferenças significantes em suas respostas metabólicas, de acordo com o gráfico *score plot*.

Figura 27. Análise multivariada supervisionada mostrando resultados da exposição ao MSMA; (A) Gráfico PLS-DA *score plot* e (B) Gráfico VIP *score* (escala indica os níveis de regulação positiva, representados pela cor vermelha, níveis neutros, representados pela cor amarela e regulação negativa, representados pela cor azul).



Fonte: A autora, 2023.

Contudo, o estudo ecotoxicológico indicou que o grupo tratado em MSMA 30 mg L⁻¹ sofreu maiores impactos em sua morfologia do que o grupo exposto em 10 mg L⁻¹. Além disso, verifica-se que o grupo exposto em 30 mg L⁻¹ parece ser o grupo que apresenta amostras mais dispersas ou mais heterogêneas, em comparação aos outros grupos, apesar de apresentar alguma relação com o grupo exposto em 10 mg L⁻¹. Já o grupo exposto em MSMA 60 mg L⁻¹, observado na PC1, apresenta maior homogeneidade. A elipse do círculo ou espaço em que se encontram as amostras, apresenta ângulos mais fechados, fato que indica amostras mais similares entre si (Figura 27A).

O gráfico VIP *score* da PLS-DA expressa os metabólitos positivamente correlacionados que demonstraram maior importância estatística, a saber: lactato, glutathiona, xantina, *L*-triptofano, acetoacetato, *L*-glutamato, fenilalanina, adenosina monofosfato, creatina fosfato, lipídios, *D*-glucose e oxaloacetato

(Figura 27B). A escala de pontuação VIP é uma medida sobre a contribuição de cada variável explicada pelos componentes PLS-DA (MEHMOOD et al., 2012). As variáveis com escore VIP maior que 1,0 são aceitas como variáveis significativas. Assim, uma maior pontuação VIP indica maior influência das variáveis na separação dos clusters. Por exemplo, o nível de concentração do metabólito xantina exibiu regulação negativa ($p < 0,05$), de acordo com a escala VIP, para os embriões expostos a 30 e 60 mg L⁻¹ de MSMA. Curiosamente, o grupo tratado em 30 mg L⁻¹, apresentou níveis inferiores aos níveis observados no grupo exposto em 60 mg L⁻¹. A xantina é uma molécula intermediária nas vias metabólicas de purina e é conhecida por seu papel na produção de ácido úrico, um importante antioxidante no corpo humano e em outras espécies. O ácido úrico é crucial para neutralizar os radicais livres e proteger as células contra danos oxidativos (MASTALLOUDIS et al., 2001). Neste sentido, com base no conceito de VIP score e na regulação negativa da xantina, é possível inferir que a exposição ao MSMA pode estar perturbando o equilíbrio metabólico e redox nas células dos embriões de zebrafish.

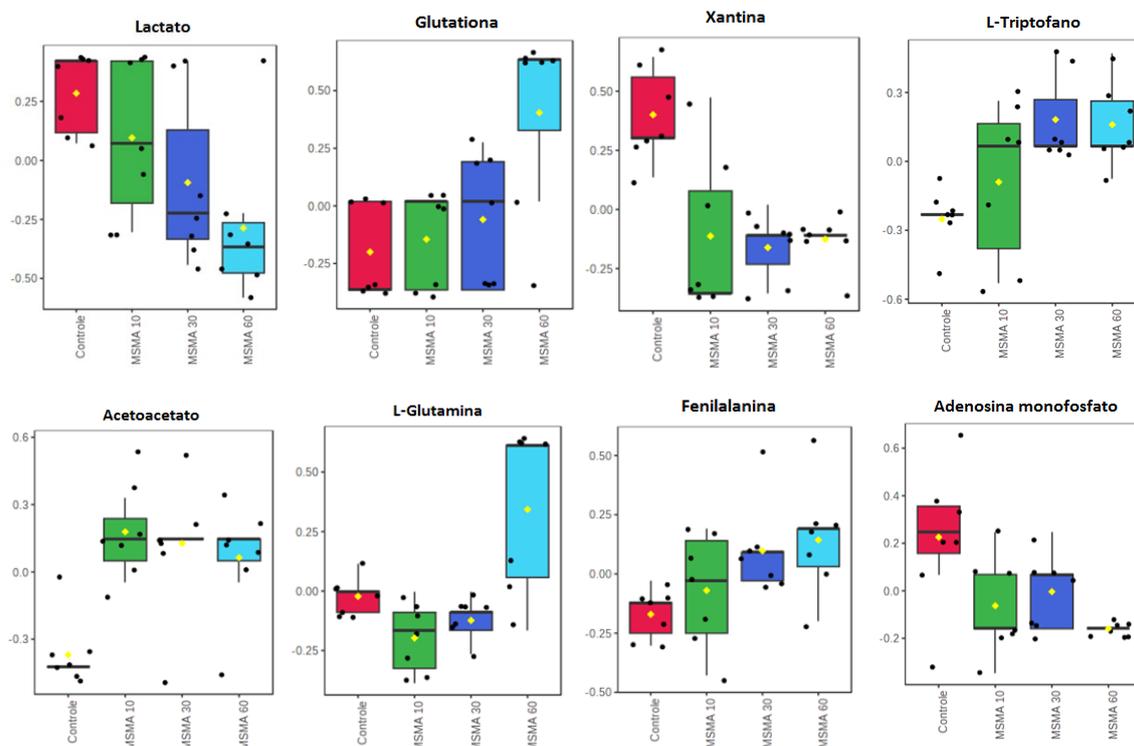
De acordo com os gráficos *box plot* apresentados na figura 28, os níveis de lactato, glutatona, *L*-triptofano, *L*-glutamina, entre outros metabólitos, também foram significativamente alterados ($p < 0,05$) em embriões expostos a 30 mg L⁻¹ de MSMA, em relação ao grupo controle. Essas alterações incluem tanto regulações positivas quanto negativas, de acordo com a função bioquímica do composto na via metabólica. Estes dados sugerem que os impactos causados pela exposição do *zebrafish* ao MSMA ocorrem a nível molecular, especialmente nas faixas de concentrações de exposição entre 30 e 60 mg L⁻¹. Além disso, esses achados demonstram coerência com os resultados apresentados pelo estudo ecotoxicológico, onde são visíveis impactos morfológicos marcantes nos dois últimos grupos expostos ao composto de arsênio (30 e 60 mg L⁻¹).

No contexto desse estudo, foi possível identificar a ocorrência frequente de edema de pericárdio (conforme figuras 20C e D) dentro da população de larvas expostas às concentrações de MSMA de 30 e 60 mg L⁻¹. Adicionalmente, foi observada uma notável redução no desenvolvimento corporal e na região cefálica de acordo com a análise apresentada nas figuras 24A e B, bem como a presença de edema no saco vitelínico e uma diminuição na área dos olhos (Figuras 25A e B), sendo que tais fenômenos foram detectados em uma

significativa proporção dos animais estudados. Esta concordância entre os resultados fortalece significativamente a hipótese sobre a potencial toxicidade e riscos da exposição ao MSMA.

Os gráficos *box plot* exibidos na Figura 28 proporcionam dados interessantes acerca dos metabólitos associados ao metabolismo energético, de purinas e à regulação da resposta imunológica. De maneira congruente com as observações identificadas no mapa de calor resultante da análise não supervisionada (Figura 26C), notou-se que glutatona e glutamina manifestaram variações específicas no grupo exposto à concentração de MSMA de 60 mg L⁻¹.

Figura 29. Gráficos *box plot* (VIP PLS-DA) das áreas de pico normalizadas mostrando os metabólitos discriminantes e seus níveis. Barras de erro representam o desvio padrão; o ponto amarelo representa a média.



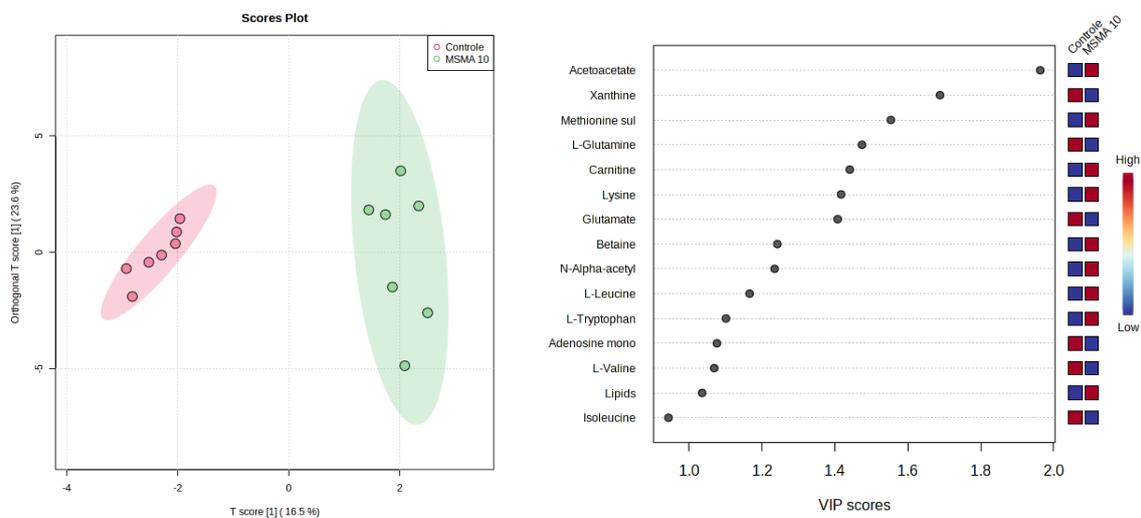
Fonte: A autora, 2023.

Em contrapartida, tanto xantina quanto acetoacetato revelaram modificações em todos os grupos submetidos ao tratamento, quando comparados ao grupo controle. Essas constatações sugerem que tanto o metabolismo dos aminoácidos quanto o das purinas, juntamente com o processo metabólico energético, podem ter sido impactados pela exposição ao MSMA. Similarmente, Garai et al., 2021, verificaram impactos no desenvolvimento

corporal (implicações no metabolismo energético), expressão gênica (metabolismo de purinas) e no sistema de proteção antioxidante e resposta imune em peixes de diferentes espécies expostos ao As.

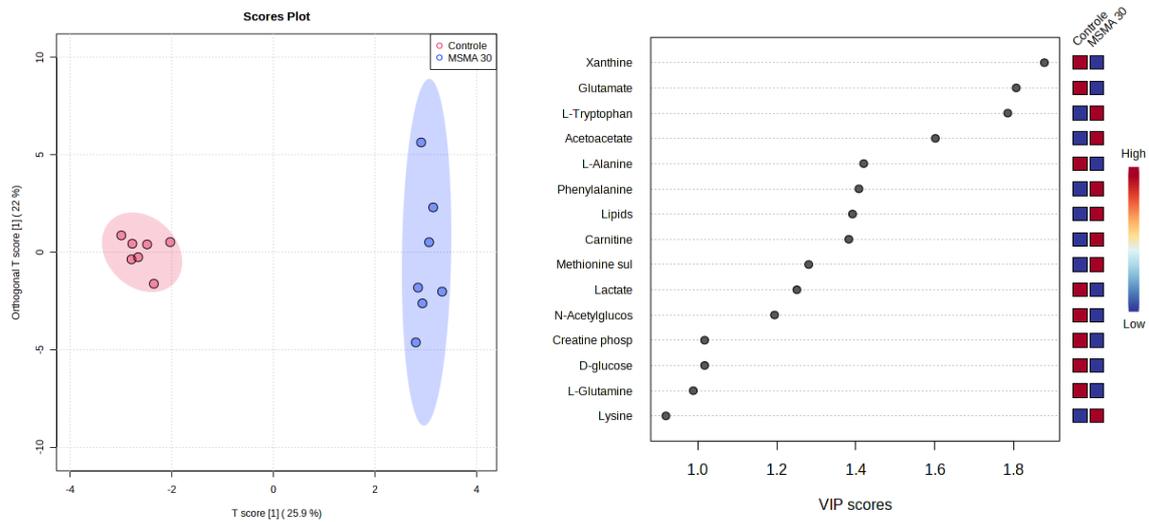
Neste contexto, no intuito de identificar de forma mais clara as diferenças entre os grupos, em especial os grupos que até agora apresentaram suposta similaridade (grupos tratados nas concentrações de MSMA 10 e 30 mg L⁻¹), utilizou-se a variante ortogonal do formalismo PLS-DA, portanto, projeções ortogonais para análise discriminante de estruturas latentes ou simplesmente, OPLS-DA. A principal função do OPLS-DA é maximizar a variação entre os grupos de interesse, enquanto minimiza a variação dentro dos grupos, sendo ainda útil para identificar as características metabólicas mais importantes relacionadas às diferenças biológicas ou fisiológicas entre os grupos estudados (ROCCHETTI & O'CALLAGHAN, 2021; YANG et al., 2022).

Figura 30. À esquerda, gráfico OPLS-DA *score plot* grupo tratado MSMA 10 mg L⁻¹ x grupo controle. À direita, gráfico *VIP score* do OPLS-DA.



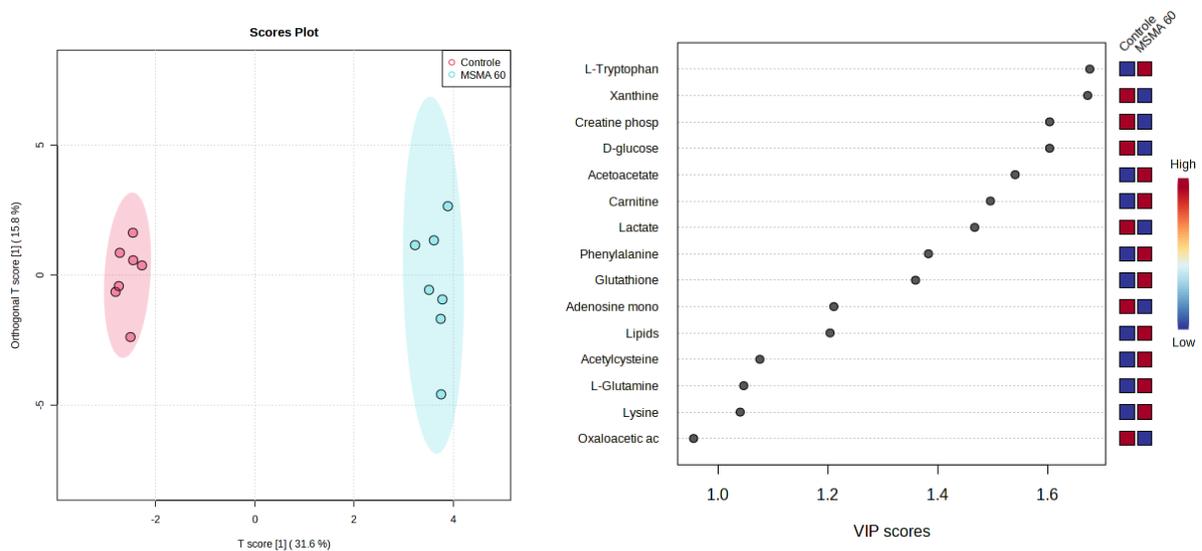
Fonte: A autora, 2023.

Figura 31. À esquerda, gráfico OPLS-DA *score plot* grupo tratado MSMA 30 mg L⁻¹ x grupo controle. À direita, gráfico VIP *score* do OPLS-DA.



Fonte: A autora, 2023.

Figura 32. À esquerda, gráfico OPLS-DA *score plot* grupo tratado MSMA 60 mg L⁻¹ x grupo controle. À direita, gráfico VIP *score* do OPLS-DA.



Fonte: A autora, 2023.

De acordo com o gráfico *Score plot* expresso na figura 30, o grupo controle se mostrou distinto e categoricamente separado do grupo exposto na concentração 10 mg L⁻¹. Entretanto, a elipse da área em que se encontram as amostras do grupo exposto revela alguma dispersão entre as amostras deste grupo, o que sugere certa heterogeneidade amostral. Isto pode ser explicado

pelo fato de que nem todas as larvas tratadas nesta concentração sofrem o impacto a nível molecular (SCHLENK et al., 1997).

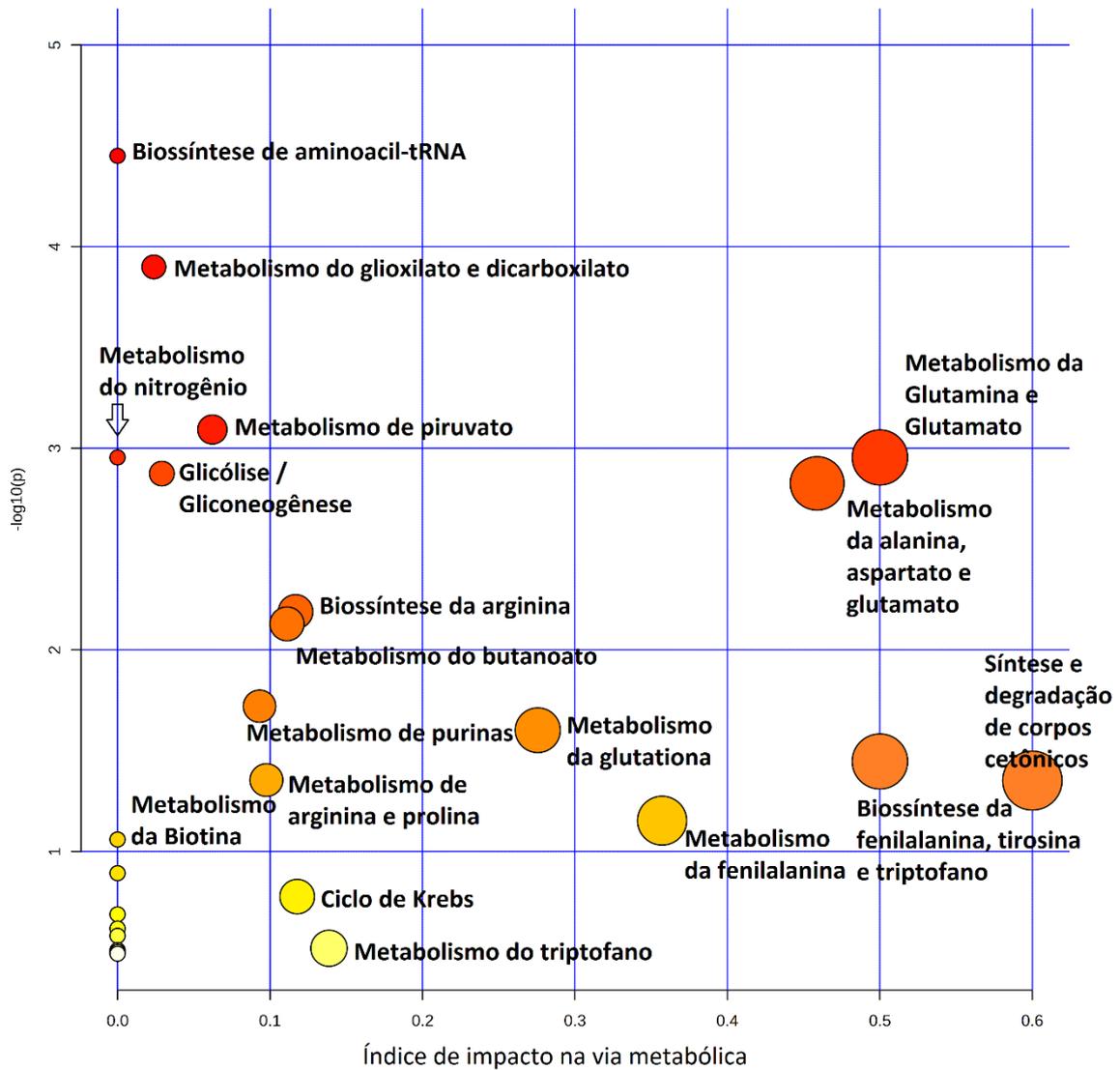
Adicionalmente, os metabólitos discriminantes revelados no gráfico VIP scores da OPLS-DA expressam de forma bastante similar os metabólitos apresentados na análise PLS-DA. Por exemplo, os níveis de acetoacetato surgem aumentados para o grupo exposto, assim como mostrou a análise PLS-DA. Este metabólito cetogênico está relacionado com condições de cetose, bem como a liberação de corpos cetônicos, em condições de baixos níveis de glicose circulante (DENOON et al., 2020). Além disso, conforme mostrou o estudo ecotoxicológico, os impactos morfológicos neste grupo foram relativamente sutis (Figura 17 A e B), quando comparado aos grupos expostos nas maiores concentrações. Neste caso, sugere-se que a toxicidade do MSMA é relativamente tolerada no organismo do *zebrafish*, quando em doses mais baixas (SODHI et al., 2019).

As figuras 31 e 32 exemplificam a efetividade da análise OPLS-DA na separação dos grupos estudados. No gráfico *Score plot*, verifica-se que os grupos tratados nas concentrações 30 e 60 mg L⁻¹ apresentam boa separação em relação ao grupo controle. A dispersão das amostras, neste caso, é reduzida, especialmente quando comparado ao resultado mostrado no gráfico do grupo exposto em MSMA 10 mg L⁻¹. Isto sugere que os grupos são bastante distintos entre si e reforça a hipótese de que o grupo tratado sofreu impactos suficientes para alterar suas características naturais, de acordo com a comparação com o grupo controle.

Adicionalmente, os gráficos VIP score nestas análises, expressam alterações em metabólitos já mencionados na análise PLS-DA. Ainda, a legitimação das análises obtida através da validação cruzada e permutações ($p < 0,01$) (Apêndice 5) reforça a robustez do estudo e confirma hipóteses que corroboram o estudo ecotoxicológico. Portanto, as alterações dos metabólitos como xantina, L-triptofano, D-glucose, acetoacetato, lactato, glutatona e demais discriminantes se relacionam com vias metabólicas cruciais do metabolismo de purinas (VARADIAH et al., 2022), metabolismo de aminoácidos (PANFILI et al., 2020), metabolismo energético bem como processos de gliconeogênese e funções celulares de proteção antioxidante (GLEESON, 1996).

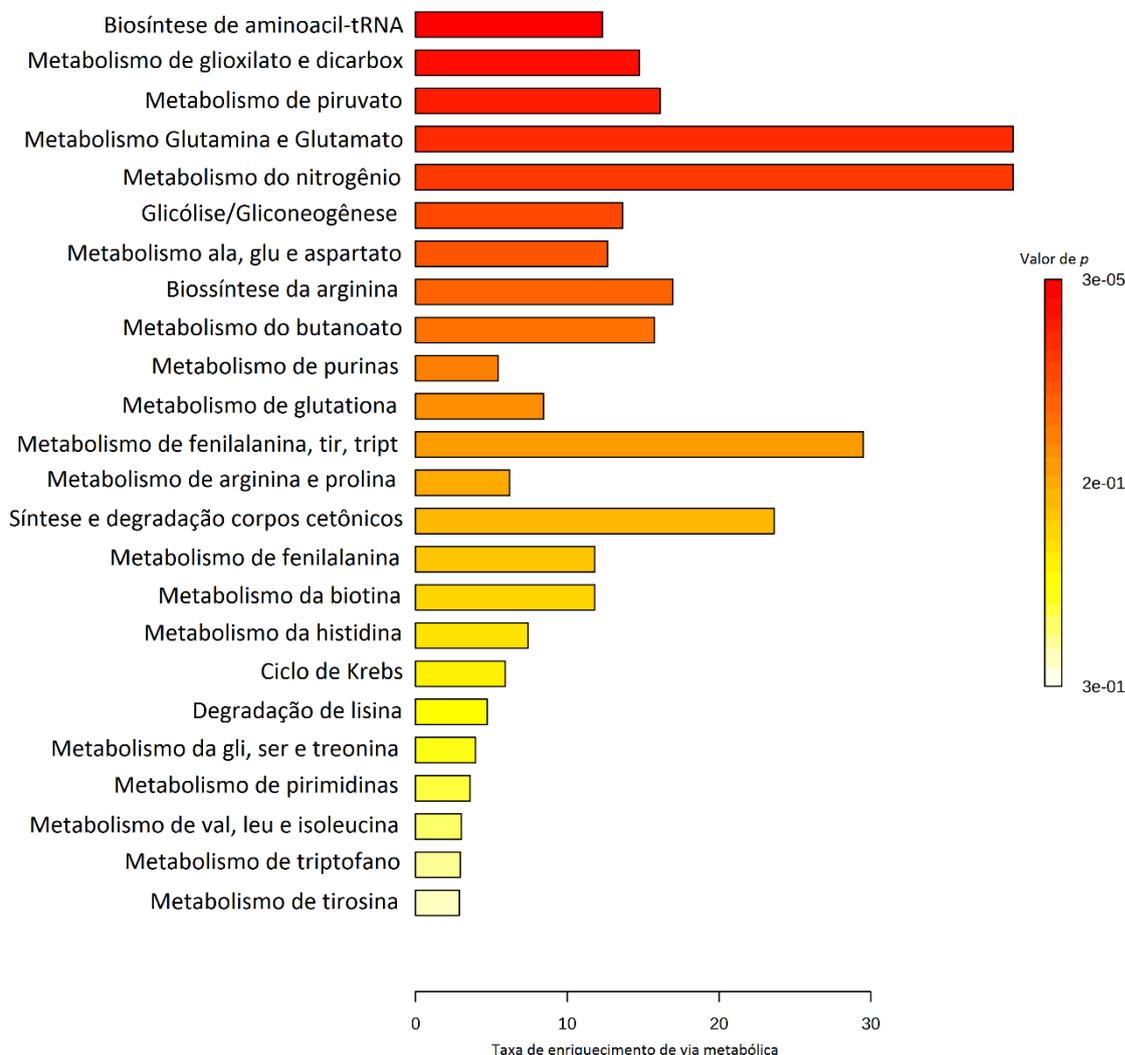
Figura 33. A) Representação esquemática das vias metabólicas significativamente impactadas após exposição do *zebrafish* ao MSMA. Legenda – intensidade da cor vermelha: indica um alto valor de $-\log(p)$, que corresponde à um valor de p baixo, conferindo maior significância do metabólito da via afetada; tamanho da esfera - representa o índice de alterações metabólicas em relação ao número total de metabólitos da via em questão. B) Análise de enriquecimento-vias metabólicas afetadas.

A)



B)

Visão geral do conjunto de vias e metabólitos



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

As figuras 33A e B fornecem uma visão geral das vias metabólicas impactadas, ilustrada pelo gráfico do índice de impacto de via obtido via plataforma *on-line MetaboAnalyst 5.0*. De acordo com a figura 33A, um alto valor de $-\log(p)$ corresponde à significância das alterações ocorridas na via metabólica. “*Pathway impact*” corresponde ao impacto nas vias metabólicas de forma geral.

Desta forma, foi observado na análise de vias metabólicas que as perturbações metabólicas são indicativas de disfunções em vias primárias e secundárias envolvendo metabólitos tais como xantina, lactato, *L*-triptofano, *L*-

glutamina, glutatona, fenilalanina, entre outros. Estes impactos podem afetar o metabolismo de aminoácidos e purinas, síntese de proteínas, metabolismo energético, bem como o sistema celular de proteção antioxidante (BARTIKOSKI et al., 2022). Desta forma, tais impactos podem resultar em alterações no fornecimento de energia para as células, desequilíbrio nos níveis de aminoácidos essenciais, comprometimento na produção de proteínas e redução na capacidade de defesa contra o estresse oxidativo. Essas disfunções metabólicas podem afetar o funcionamento adequado de diversos sistemas do organismo, como as funções cardíacas, neuromusculares e até mesmo a resposta imunológica (KELLY & PEARCE, 2020).

Tais disfunções foram observadas no estudo ecotoxicológico e portanto, reforçam a hipótese de toxicidade do MSMA no organismo do *zebrafish*. Deste modo, sugere-se que os impactos das funções cardíacas e neuromusculares no *zebrafish* podem estar relacionados com a disfunção nessas vias metabólicas. Esses achados destacam a importância da integração do estudo toxicológico com a análise metabolômica como apoio para alegações sobre a potencial toxicidade de certos compostos, como o As e demais metais, assim como a regulamentação de seu uso.

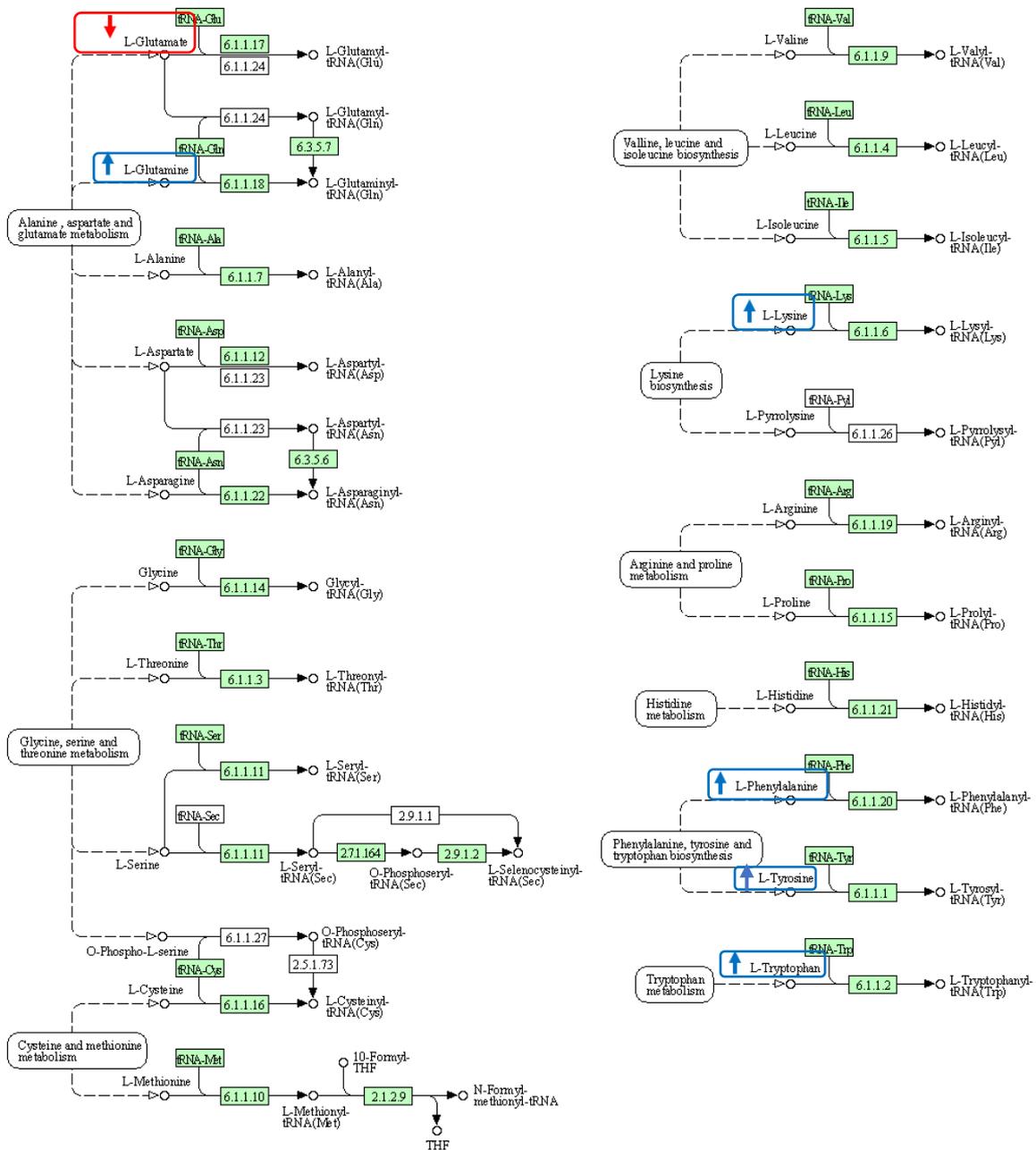
6.2.3. Metabolismo de aminoácidos: impactos na via metabólica da biossíntese de aminoacil-tRNA

No presente estudo, os níveis de fenilalanina, tirosina e lisina em embriões expostos a 60 mg L⁻¹ de MSMA tiveram regulação positiva em comparação ao grupo controle. Os grupos expostos às demais concentrações (10 e 30 mg L⁻¹) apresentaram elevação de nível gradativa, com exceção do triptofano, que apresentou regulação positiva no grupo tratado com 30 mg L⁻¹ comparado ao grupo tratado com 60 mg L⁻¹ de MSMA, que apresentou níveis neutros. Esses metabólitos estão envolvidos em uma das principais vias afetadas neste estudo, conforme indicado pelo gráfico de enriquecimento (Figura 33 B), a via metabólica de biossíntese de aminoacil-tRNA (Figura 34).

A via de biossíntese do aminoacil-tRNA envolve a captação e ativação dos aminoácidos intracelulares, seguida pela ligação específica dos aminoácidos aos seus tRNAs correspondentes. Essa via é fundamental para a correta incorporação dos aminoácidos na sequência de proteínas durante a síntese protéica (BRÖER & BRÖER, 2017). Assim, a disponibilidade adequada de aminoacil-tRNAs é essencial para a síntese de proteínas com sequência correta, estrutura tridimensional adequada e, conseqüentemente, funções biológicas apropriadas (FOSTER & LILJERUHM, 2014). Perturbações nessa via metabólica, como a elevação dos níveis de metabólitos como glutamina, lisina, fenilalanina e triptofano, podem alterar funções vitais do organismo, incluindo a síntese de proteínas, gerando disfunções metabólicas em vários níveis e impactando o desenvolvimento e crescimento adequados do organismo (HOSEINI et al., 2019).

Neste sentido, as alterações no desenvolvimento geral dos animais, observado no estudo ecotoxicológico, sugere que a deficiência no desenvolvimento das larvas expostas às concentrações mais altas de MSMA pode estar relacionada às disfunções verificadas na via metabólica de aminoacil-tRNA. Entretanto, é importante ressaltar que as perturbações na via metabólica de biossíntese de aminoacil-tRNA podem variar dependendo da extensão e da duração da exposição, bem como das características específicas dos metabólitos afetados pela toxicidade do composto em estudo.

Figura 34. Representação esquemática da via metabólica da biosíntese de aminoacil-tRNA. Setas azuis indicam regulação positiva dos metabólitos específicos; A seta vermelha indica regulação negativa; caixas verdes representam as enzimas ativas nos processos metabólicos.



Fonte: Adaptado de base de dados *KEGG Pathway (Danio rerio)*. Disponível em: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?dre00970 Acesso em Jun/2023.

6.2.4. Metabolismo de aminoácidos: estresse oxidativo

O estresse oxidativo envolve a perturbação no equilíbrio dinâmico das reações bioquímicas que ocorrem especialmente na mitocôndria, o que leva ao surgimento de um maior nível de espécies reativas de oxigênio, bem como danos aos constituintes celulares (LUSHCHAK, 2011; BYEON et al., 2021). Neste sentido, os resultados do presente estudo sugerem que os embriões dos grupos expostos ao MSMA sofreram estresse oxidativo, que é demonstrado, por exemplo, pela regulação positiva dos níveis de fenilalanina (Figura 29). O aumento dos níveis de aminoácidos pode ser o resultado do aumento do catabolismo para geração de energia, um processo no qual a proteína é quebrada para liberar aminoácidos livres durante períodos de estresse (QAID & AL-GARADI, 2021).

Compostos arsênicos foram previamente testados na indução de estresse oxidativo em espécies aquáticas como *Daphnia magna* e *Danio rerio* (BYEON et al., 2021). Aminoácidos de cadeia ramificada BCAA's e AAA's são precursores essenciais para a síntese de proteínas e produção de energia. Além disso, BCAA's como fenilalanina e tirosina em regulação positiva foram observados nas células tumorais e podem ser indicadores importantes do risco potencial de lesão em tecidos (GUO et al., 2021).

O triptofano, um aminoácido essencial e precursor para a síntese do neuromodulador serotonina (5HT), bem como do hormônio melatonina e quinurenina. Devido a isto, o triptofano possui um papel fundamental na regulação de processos que vão desde o neuroendócrino até o sistema imune, em vertebrados (HOSEINI et al., 2019). Contudo, como mencionado anteriormente, os resultados do presente trabalho demonstraram que os grupos expostos ao MSMA 30 mg L⁻¹ expressaram regulação positiva desse aminoácido. Assim, os impactos gerados por essas alterações incluem distúrbios generalizados na capacidade e força muscular e de desenvolvimento geral, fato que explica o efeito de enfraquecimento muscular e desenvolvimento reduzido das larvas do grupo exposto em MSMA 60 mg L⁻¹, que apresentaram letargia e redução no tamanho corporal, bem como malformações.

O glutamato, um aminoácido não-essencial, é um neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central (DA SILVA LEMOS et al., 2022). A

regulação negativa do glutamato em embriões de *zebrafish* expostos ao MSMA no presente estudo pode estar relacionada à alteração no sistema de ácido gama-aminobutírico (GABA), que também reflete o dano no desenvolvimento do cérebro (DA SILVA LEMOS et al., 2022). Isto é consistente com estudos anteriores que mostram que a atividade da colinesterase (ChE) pode ser significativamente alterada em *zebrafish* expostos à compostos arsênicos (ROSALES-PÉREZ et al., 2022) e que os peixes expostos podem exibir alterações na expressão gênica no cérebro, bem como apoptose em células neuronais (KUMAY et al., 2015). Isto pode explicar as malformações craniofaciais apresentadas nos grupos tratados em 30 e 60 mg L⁻¹ de MSMA.

Entretanto, alguns dados permanecem incertos em relação a disparidade dos níveis metabólicos dos grupos tratados. Os grupos intermediários (tratados com MSMA 10 e 30 mg L⁻¹) demonstraram maior impacto metabólico, porém taxas inferiores de alterações morfológicas em comparação ao grupo exposto em MSMA 60 mg L⁻¹. Estudos mais aprofundados e análises de enzimas e genes podem ser eficazes para fornecer dados mais aprofundados sobre estas diferenças.

6.2.5. Metabolismo energético: perturbações nas vias metabólicas da glicólise e gliconeogênese

O metabolismo energético apresenta uma diversidade de vias metabólicas e metabólitos, os quais estão envolvidos em inúmeras funções responsáveis pela manutenção da energia disponível e das funções homeostáticas do organismo. Portanto, vários metabólitos desempenham papéis cruciais na produção e armazenamento de energia (HE et al., 2020). Neste estudo, a análise multivariada revelou impactos em metabólitos envolvidos em vias primárias e secundárias do metabolismo energético, tais como lactato, ácido oxaloacético e acetato (Figura 29). O estudo metabolômico indicou que, através dos resultados da análise multivariada supervisionada PLS-DA (Figuras 27A e B), grupos expostos às diferentes concentrações de MSMA apresentaram regulação negativa nos níveis dos metabólitos lactato, *D*-glicose, ácido oxaloacético e acetato, em comparação com o grupo controle.

A redução nos níveis desse metabólitos exerce impactos variados no metabolismo energético. Por exemplo, o lactato é um produto da glicólise

anaeróbica e pode ser convertido de volta em piruvato, fornecendo energia para a síntese de ATP. A redução nos níveis de lactato indica uma diminuição na atividade da glicólise anaeróbica, que é importante durante períodos de baixa disponibilidade de oxigênio. Isso afeta a produção de energia em tecidos que dependem fortemente da glicólise anaeróbica, como o tecido muscular em demanda intensa. Além disso, a redução do lactato afeta ainda a regeneração de NAD⁺ necessário para a continuação da glicólise (KANE, 2014).

A *D*-glicose é uma fonte primária de energia para muitos tecidos e é metabolizada principalmente através da glicólise. A redução nos níveis de glicose pode levar a uma diminuição na disponibilidade de glicose como substrato energético, promovendo a redução da produção de ATP. Isto afeta negativamente a função celular e o metabolismo energético de forma ampla (CUNNANE et al., 2020).

Em relação ao ácido oxaloacético, trata-se de um intermediário chave no ciclo de Krebs (ou ciclo do ácido cítrico), que ocorre na mitocôndria. A redução nos níveis de ácido oxaloacético interfere negativamente na capacidade de produção de energia do ciclo de Krebs, comprometendo a oxidação completa de ácidos graxos e a síntese de ATP. Como resultado, ocorre a diminuição na disponibilidade de ATP para as células, afetando a função celular e o metabolismo energético de forma generalizada (VOSS et al., 2020).

Adicionalmente, a redução nos níveis de acetato limita a disponibilidade de acetil-CoA, afetando negativamente a produção de ATP. O acetato pode ser convertido em acetil-CoA, que é um intermediário central no metabolismo energético. Além disso, o acetato também pode ser utilizado como substrato para a síntese de lipídios. Portanto, a redução nos níveis de acetato afeta tanto o metabolismo energético quanto o metabolismo lipídico (LIU et al., 2019).

Neste sentido, foi observado que os animais de todos os grupos expostos ao MSMA apresentaram alterações em um ou mais metabólitos envolvidos no metabolismo energético. Curiosamente, o grupo exposto ao MSMA 10 mg L⁻¹, apresentou regulação positiva nos níveis de acetoacetato, enquanto os grupos expostos às concentrações 30 e 60 mg L⁻¹ apresentaram queda gradativa neste metabólito. Por outro lado, o ácido oxaloacético apresentou regulação negativa gradativa em todos os grupos expostos. Similarmente, os níveis de *D*-glicose sofreram regulação negativa em todos os grupos expostos ao MSMA.

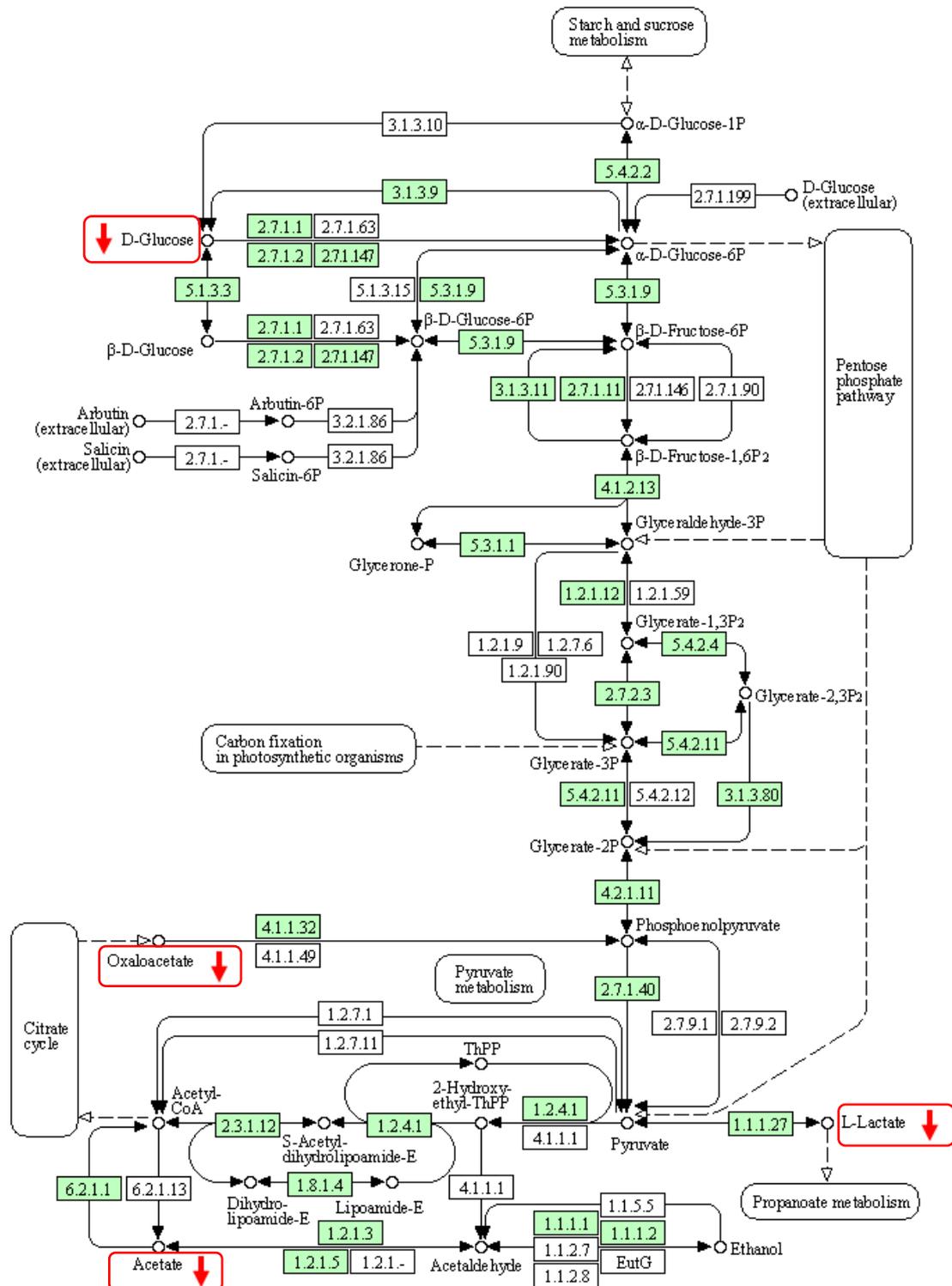
Estes achados sugerem que a demanda por energia pode ter sido aumentada no embrião e posteriormente na larva tanto devido à fatores fisiológicos do metabolismo do animal, quanto ao metabolismo de xenobióticos, o qual demanda alta energia. Quando um xenobiótico é adsorvido no organismo do peixe, ele é geralmente processado no fígado e em outros tecidos especializados (XU et al., 2021).

O metabolismo dessas substâncias é realizado por enzimas desintoxicantes, como as do sistema do citocromo P450 (CYP), que são responsáveis pela biotransformação dos xenobióticos. A primeira etapa do metabolismo de xenobióticos é a fase I, na qual as enzimas do CYP modificam a estrutura química dos compostos, geralmente adicionando grupos funcionais reativos. Isso torna os xenobióticos mais solúveis em água e mais suscetíveis à eliminação. A fase II do metabolismo envolve a conjugação dos xenobióticos transformados com moléculas endógenas, como ácido glucurônico, sulfato ou glutatona. Essas reações de conjugação aumentam ainda mais a solubilidade dos xenobióticos e facilitam sua excreção do organismo (KUROGI et al., 2013).

Deste modo, infere-se que ambas as fases do metabolismo de xenobióticos demandam bastante energia. A atividade das enzimas do CYP e as reações de conjugação requerem energia para a sua execução. Além disso, a metabolização de xenobióticos pode competir com outros processos metabólicos, interfere no equilíbrio energético do organismo (NADAL et al., 2017).

Neste sentido, a redução da energia disponível no organismo do peixe pode levar à perturbações em vários órgãos e tecidos do organismo. Neste caso, no estudo ecotoxicológico, foi verificada redução na taxa de eclosão dos animais (Figura 17 B), especialmente no grupo exposto em MSMA 60 mg L⁻¹, de acordo com o aumento da concentração de exposição. Este fato sugere que a redução da energia disponível teve impactos diretos no desenvolvimento neuromuscular, refletido na visível perda de tônus e força muscular do animal para o rompimento da membrana do ovo.

Figura 35. Representação esquemática da via metabólica da glicólise e gliconeogênese. Setas vermelhas indicas regulação negativa; caixas verdes representam enzimas ativas.



Fonte: Adaptado de base de dados *KEGG Pathway (Danio rerio)*. Disponível em: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?dre00010 Acesso em Jun/2023.

6.2.6. Metabolismo da glutathiona: impactos no sistema celular de proteção antioxidante

O metabolismo da glutathiona é dividido em duas principais vias: a via de síntese e a via de regeneração. Na via de síntese, a cisteína é o aminoácido limitante, e sua disponibilidade pode afetar a taxa de produção de glutathiona. A cisteína é obtida tanto da dieta como por meio da degradação de proteínas (HELLWIG, 2020). Uma vez sintetizada, a glutathiona desempenha papéis essenciais no metabolismo animal. Ela atua como um importante antioxidante intracelular, ajudando a neutralizar os radicais livres e protegendo as células contra danos oxidativos. A glutathiona também está envolvida na desintoxicação de compostos tóxicos e xenobióticos, como produtos químicos e medicamentos. Ela se liga a esses compostos para formar conjugados solúveis em água, facilitando sua excreção do organismo (PAULSON, 2020).

Além disso, a glutathiona está envolvida em processos de reparo celular, regulação da resposta imune, metabolismo de aminoácidos, síntese de proteínas e transporte de aminoácidos. Também desempenha um papel importante na função do sistema nervoso central (ISKUSNYKH et al., 2022) e na saúde dos pulmões e do sistema respiratório (SILVAGNO et al., 2020). Níveis elevados de glutathiona podem ser benéficos em certas condições, como proteção contra o estresse oxidativo e redução do risco de doenças associadas a danos celulares e procesos neurodegenerativos (PIZZORNO, 2014). No entanto, em certas situações, níveis altos de glutathiona podem estar associados a distúrbios metabólicos (STOJILJKOVIĆ et al., 2012).

Neste contexto, a regulação positiva de glutathiona observada por meio do gráfico *VIP score* da análise PLS-DA (Figura 27 B) nos grupos expostos à 30 e 60 mg L⁻¹ de MSMA sugere que o organismo dos animais expostos, em resposta à exposição ao composto arsênico, induziu o aumento na produção deste metabólito como uma estratégia de defesa contra o estresse oxidativo provocado pelo MSMA. Desta maneira, níveis elevados de glutathiona em peixes expostos a compostos arsenicais podem indicar a ativação das vias de proteção antioxidante como uma resposta adaptativa ao estresse oxidativo causado pelo xenobiótico (SILVESTRE, 2020). No entanto, é importante destacar que a exposição crônica ou prolongada ao As pode levar a uma sobrecarga do sistema

de proteção antioxidante, resultando em desequilíbrios no metabolismo da glutathione e em possíveis disfunções nas vias de proteção antioxidante. Isso compromete a capacidade das células de neutralizar efetivamente os radicais livres, gerando danos oxidativos mais extensos e, portanto, afetando negativamente o organismo dos peixes expostos ao arsênio (LI et al, 2016).

6.3. Potenciais biomarcadores de toxicidade

Os biomarcadores desempenham um papel fundamental na área da pesquisa e avaliação de riscos, especialmente quando se trata de toxicologia e estudos ambientais. Eles são características mensuráveis, como moléculas, genes, proteínas ou alterações fisiológicas, que fornecem informações objetivas sobre o estado de um organismo em relação à exposição a uma substância química ou estresse ambiental (PORTO et al., 2023). A importância dos biomarcadores reside em sua capacidade de indicar a presença, a extensão e a natureza dos efeitos biológicos induzidos por um agente químico. Eles são valiosos porque fornecem uma maneira direta de medir e monitorar as respostas biológicas às exposições ambientais, permitindo a detecção precoce de efeitos adversos, identificação de populações suscetíveis e avaliação de riscos (FOSSI et al., 2020).

O presente estudo possibilitou a identificação de potenciais biomarcadores, fornecendo subsídios para estudos aprofundados sobre os mecanismos de toxicidade de compostos à base de arsênio orgânico. Desta forma, os resultados identificados por meio do estudo ecotoxicológico junto à análise metabolômica, foram eficientes para o fornecimento de dados para a determinação de potenciais biomarcadores de toxicidade do As em embriões *zebrafish*. Neste contexto, Bakar et al., 2022 investigaram a toxicidade de um composto arsênico por meio da combinação do estudo ecotoxicológico e a análise metabolômica. Os resultados indicaram malformações como lordose espinhal, alterações do saco vitelínico e malformações na cabeça e olhos. Os autores verificaram alterações no metabolismo de proteínas e na síntese de lipídios, impactando direta e indiretamente demais vias metabólicas envolvidas em processos vitais do peixe. Adicionalmente, estes achados possibilitaram aos autores a eleição de biomarcadores de neurotoxicidade e dsitúrbio

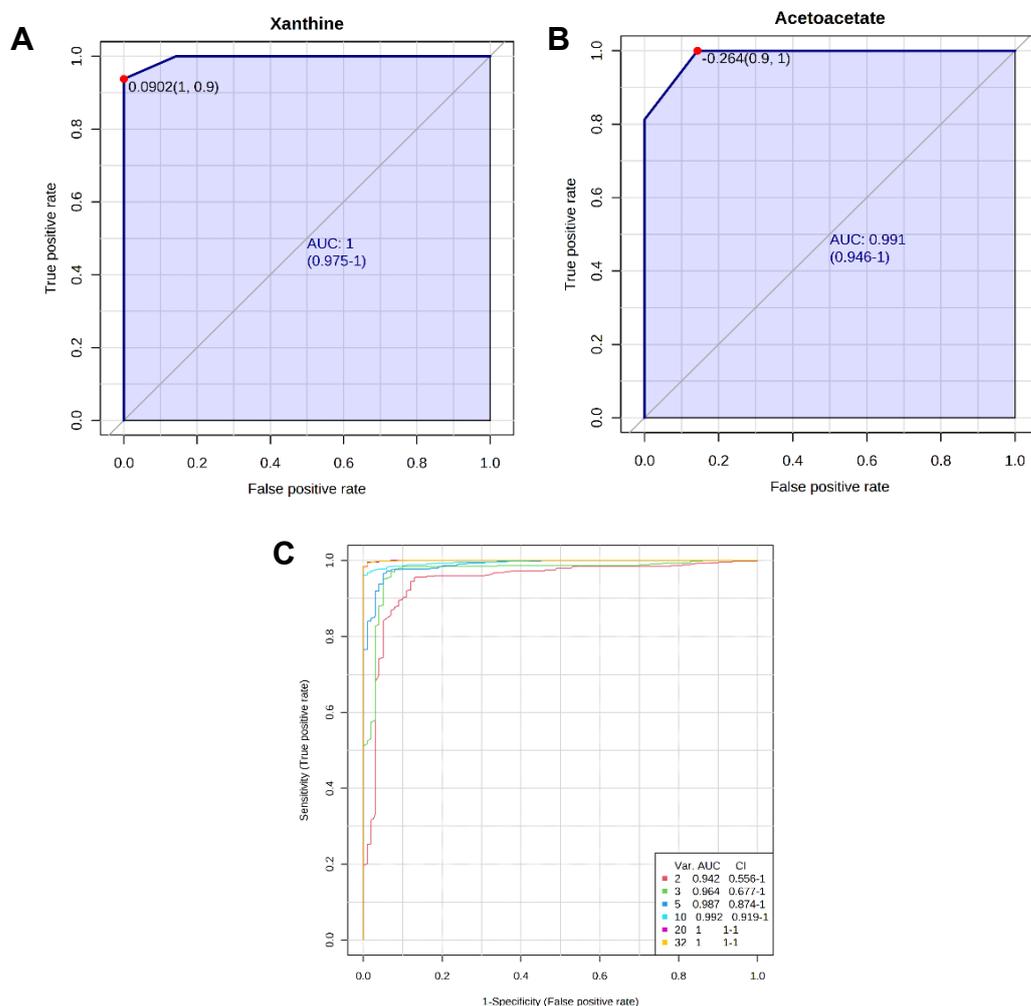
comportamental, associados às alterações de ácidos graxos como ácido araquidônico e ácido palmítico no *zebrafish*.

Como mencionado anteriormente, o presente estudo ecotoxicológico demonstrou que a exposição causou perturbações fisiológicas severas nos animais expostos, tais como edema cardíaco e disfunções no desenvolvimento geral do animal acompanhado de malformações perceptíveis em estruturas da cabeça, como olhos e boca. Adicionalmente, o estudo metabolômico identificou padrões de variabilidade importantes entre os grupos estudados, demonstrando que os grupos expostos apresentaram impactos em vias essenciais para o desenvolvimento normal do embrião. Metabólitos discriminados como acetoacetato e xantina são relacionados com funções da via metabólica energética e metabolismo de purinas, respectivamente (MARTORELL et al., 2021; DENOON et al., 2020). Neste estudo, estes metabólitos surgem como importantes biomarcadores de toxicidade de exposição do MSMA.

A desregulação dos níveis de xantina tem várias implicações fisiológicas no organismo, especialmente em relação às vias metabólicas de síntese de aminoácidos e purinas. As purinas estão envolvidas em processos de sinalização celular, incluindo a modulação da resposta imunológica. A redução no metabólito xantina vai interferir na capacidade das células imunológicas de responder adequadamente a estímulos externos, tais como a exposição à metais potencialmente tóxicos (MARTORELL et al., 2021).

Como as purinas são essenciais para muitos processos celulares, qualquer disfunção nessas vias metabólicas impactará no crescimento e desenvolvimento normais do organismo, especialmente em tecidos que têm uma alta taxa de regeneração celular, como a medula óssea e o epitélio intestinal (FURUHASHI, 2020). Similarmente, a desregulação dos níveis de acetoacetato pode estar relacionada ao distúrbio na sinalização celular, já que este metabólito exerce funções sobre processos de sinalização celular, os quais estão envolvidos na adaptação metabólica, bem como a resposta à diferentes condições ambientais (GARCÍA-RODRÍGUEZ & GIMÉNEZ-CASSINA, 2021).

Figura 36. Análise curva ROC representando os grupos discriminantes, com destaque para os metabólitos xantina (A) e acetoacetato (B). Gráfico de especificidade incluindo os metabólitos discriminantes (C).



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Neste sentido, a fim de comprovar e validar a eficácia dos biomarcadores propostos neste estudo, utilizou-se o gráfico de curva ROC, que permitiu avaliar a capacidade discriminatória dos biomarcadores propostos, distinguindo os grupos de amostras expostos e grupo controle (Figura 36). Ainda, de acordo com a figura 36, a área abaixo da curva (AUC), reflete a maior exatidão obtida pelo estudo. Os biomarcadores propostos apresentam discriminação clara em relação ao grupo controle qualitativo, reforçando a hipótese de que estes biomarcadores estão relacionados de forma ampla com os impactos observados nestes estudo.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

7. Conclusão e Perspectivas

Os resultados do presente estudo demonstram que a metabolômica baseada em RMN ^1H pode fornecer informações importantes sobre os impactos a nível molecular que a exposição de contaminantes químicos exerce no desenvolvimento de embriões de *zebrafish*. A abordagem metabolômica global permitiu a quantificação de metabólitos associados à vias bioquímicas essenciais, sendo útil ainda para a compreensão de vários distúrbios observados no estudo ecotoxicológico. No total, trinta e quatro metabólitos foram detectados nos embriões de *zebrafish* estudados. Os metabólitos identificados incluíram ácidos carboxílicos, carboidratos, ácidos graxos, aminoácidos, nucleotídeos e lipídios. Os resultados indicam que a exposição a concentrações subletais de MSMA na faixa de 10 a 60 mg L⁻¹ causou perturbações em vários metabólitos e vias metabólicas. Os principais metabólitos alterados em embriões expostos ao MSMA incluíram lactato, glutatona, xantina, triptofano, acetoacetato, glutamina, fenilalanina, creatina, ácido oxaloacético e *D*-glicose.

Os dados obtidos neste trabalho sugerem disfunções em várias vias, com implicações potenciais para o metabolismo energético, metabolismo de aminoácidos, bem como para as funções de proteção antioxidativa e imunológica. Os resultados indicaram ainda que o MSMA induziu toxicidade cardíaca a partir da concentração 30 mg L⁻¹, conforme demonstrado pela taxa elevada de edema cardíaco e outras malformações nos embriões expostos, particularmente a partir da concentração de 60 mg L⁻¹. Além disso, a análise metabolômica revelou biomarcadores específicos, abrindo novas perspectivas para o desenvolvimento de estratégias de intervenção e diagnóstico. Assim, os resultados apresentados evidenciam a vulnerabilidade do *zebrafish* ao MSMA, destacando a importância de estudos aprofundados sobre os impactos dos compostos arsênicos em organismos vivos, bem como no solo e na água. A correlação entre a concentração de exposição e os danos observados reforça a necessidade de regulamentações rigorosas a fim de reduzir a exposição ao arsênio e seus derivados, como o MSMA, em diferentes setores industriais. Por fim, a melhor compreensão dos mecanismos de toxicidade deve ainda permitir a identificação de alvos terapêuticos, auxiliando o desenvolvimento de estratégias para a minimização de efeitos adversos da exposição à contaminantes, beneficiando a saúde de animais e seres humanos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. Referências bibliográficas

- ABAS, A. A systematic review on biomonitoring using lichen as the biological indicator: A decade of practices, progress and challenges. **Ecological Indicators**, v. 121, p. 107197, 2021.
- ACHENBACH, J. C., LEGGIADRO, C., SPERKER, S. A., WOODLAND, C., & ELLIS, L. D. Comparison of the zebrafish embryo toxicity assay and the general and behavioral embryo toxicity assay as new approach methods for chemical screening. **Toxics**, 8(4), 126, 2020.
- AKHTAR, M.T., MUSHTAQ, M.Y., VERPOORTE, R., RICHARDSON, M.K., CHOI, Y.H. Metabolic effects of cannabinoids in *zebrafish* (*Danio rerio*) embryos determined by ¹H NMR metabolomics. **Metabolomics**. 12, 1-11; 2016
- ANDRADE, G., MARCHIORI M., SILVA, C., GIRIO T., CARVALHO, F., NETO, C. D. Eficácia da formulação de *Phenodral*® (Metilarsinato de sódio + citrato de ferro amoniacal + Adrenalina) em bovinos. **Ars Veterinaria**, 32(1), 09-15, 2016.
- ANTONELLI R., SHAO K., THOMAS D.J., SAMS R. II, COWDEN J. AS3MT, GSTO, and PNP polymorphisms: impact on arsenic methylation and implications for disease susceptibility. **Environm. Res.** 132:156–67, 2014.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Nota técnica: Reavaliação Toxicológica do Ingrediente Ativo MSMA**, 2002.
- ARAÚJO, A.M., CARVALHO, F., GUEDES DE PINHO, P., CARVALHO, M. Toxicometabolomics: Small Molecules to Answer Big Toxicological Questions. **Metabolites**. v11, p.692, 2021.
- BAKAR, ABU, N., WAN IBRAHIM, W. N., CHE ABDULLAH, C. A., RAMLAN, N. F., SHAARI, K., SHOHAIMI, S., MEDIANI, A., NASRUDDIN, N.S., KIM, CHEOL-HEE & MOHD FAUDZI, S. M. Embryonic arsenic exposure triggers long-term behavioral impairment with metabolite alterations in *zebrafish*. **Toxics**, 10(9), 493, 2022.
- BALAKUMAR, P. & KAUR, J. Arsenic exposure and cardiovascular disorders: an overview. **Cardiovascular toxicology**, v. 9, p. 169-176, 2009.
- BAMBINO, K., CHU, J. *Zebrafish* in toxicology and environmental health. **Current topics in developmental biology**. 124, 331-367, 2017.
- BARTLETT, Andrew; LEWIS, Jamie; WILLIAMS, Matthew L. Generations of interdisciplinarity in bioinformatics. **New Genetics and Society**, v. 35, n. 2, p. 186-209, 2016.
- BARTIKOSKI, B. J., DE OLIVEIRA, M. S., DO ESPÍRITO SANTO, R. C., DOS SANTOS, L. P., DOS SANTOS, N. G., & XAVIER, R. M. A Review of metabolomic profiling in rheumatoid arthritis: bringing new insights in disease pathogenesis, treatment and comorbidities. **Metabolites**, 12(5), 394, 2022.
- BHATT, P., GANGOLA, S., BHANDARI, G., ZHANG, W., MAITHANI, D., MISHRA, S., & CHEN, S. New insights into the degradation of synthetic pollutants in contaminated environments. **Chemosphere**, 268, 128827, 2021.

- BEALE, D.J., PINU, F.R., KOUREMENOS, K.A., POOJARY, M.M., NARAYANA, V.K., BOUGHTON, B.A., KANOJIA, K., DAYALAN, S., JONES, O.A.H., DIAS, D.A. Review of recent developments in GC–MS approaches to metabolomics-based research. **Metabolomics**. 14, 1-31, 2018.
- BECKONERT, O., KEUN, H. C., EBBELS, T. M., BUNDY, J., HOLMES, E., LINDON, J. C., & NICHOLSON, J. K. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. **Nature protocols**, 2(11), 2692, 2007.
- BEDNAR, A. J., GARBARINO, J. R., RANVILLE, J. F., & WILDEMAN, T. R. Presence of organoarsenicals used in cotton production in agricultural water and soil of the southern United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50(25), 7340-7344, 2002.
- BIANCHI, V. E., LOCATELLI, V., & RIZZI, L. Neurotrophic and neuroregenerative effects of GH/IGF1. **International journal of molecular sciences**, 18(11), 2441, 2017.
- BINGOL, K. Recent advances in targeted and untargeted metabolomics by NMR and MS/NMR methods. **High-throughput**. p.7, 9, 2018.
- BISPO, D.S., JESUS, C.S., MARQUES, I., ROMEK, K.M., OLIVEIRA, M.B., MANO, J.F., GIL, A.M. Metabolomic applications in stem cell research: A review. **Stem Cell Reviews and Reports**. 17, 2003-2024, 2021.
- BJERRUM, J.T., WANG, Y.L., SEIDELIN, J.B., NIELSEN, O.H. IBD metabonomics predicts phenotype, disease course, and treatment response. **E. Bio Medicine**. 71, 103551, 2021.
- BOCCARD, Julien; RUTLEDGE, Douglas N. A consensus orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) strategy for multiblock Omics data fusion. **Analytica chimica acta**, v. 769, p. 30-39, 2013.
- BOWMAN, Teresa V.; ZON, Leonard I. Swimming into the future of drug discovery: in vivo chemical screens in *zebrafish*. **ACS chemical biology**, v. 5, n. 2, p. 159-161, 2010.
- BRÖER, Stefan; BRÖER, Angelika. Amino acid homeostasis and signalling in mammalian cells and organisms. **Biochemical Journal**, v. 474, n. 12, p. 1935-1963, 2017.
- BRUCE, ASHLEY EE. Zebrafish epiboly: spreading thin over the yolk. **Developmental Dynamics**, v. 245, n. 3, p. 244-258, 2016.
- BUGEL, S.M., TANGUAY, R.L., PLANCHART, A. *Zebrafish*: a marvel of high-throughput biology for 21st-century toxicology. **Current environmental health reports**. 1, 341-352, 2014.
- BYEON, E., KANG, H. M., YOON, C., & LEE, J. S. Toxicity mechanisms of arsenic compounds in aquatic organisms. **Aquatic Toxicology**, 237, 105901, 2021.
- CAMPBELL, K. M., & NORDSTROM, D. K. Arsenic speciation and sorption in natural environments. **Reviews in Mineralogy and Geochemistry**, 79(1), 185-216, 2014.

- CANEDO, A., DE JESUS, L.W.O., BAILÃO, E.F.L.C., ROCHA, T.L. Micronucleus test and nuclear abnormality assay in *zebrafish* (*Danio rerio*): Past, present, and future trends. **Environmental Pollution**. v 290, 118019, 2021.
- CAPPELLO, T., PEREIRA, P., MAISANO, M., MAUCERI, A., PACHECO, M., FASULO, S. Advances in understanding the mechanisms of mercury toxicity in wild golden grey mullet (*Liza aurata*) by ¹H NMR-based metabolomics. **Environmental pollution**. 219, 139-148, 2016.
- CARLSON, A. K., RAWLE, R. A., ADAMS, E., GREENWOOD, M. C., BOTHNER, B., & JUNE, R. K. Application of global metabolomic profiling of synovial fluid for osteoarthritis biomarkers. **Biochemical and biophysical research communications**, 499(2), 182-188, 2018.
- CASTELHANO GEBARA, R., DE OLIVEIRA GONÇALVES ALHO, L., BRUNO DE ABREU, C., DA SILVA MANSANO, A., MOREIRA, R. A., SWERTS ROCHA, G., & GAMA MELAO, M. D. G. Toxicity and Risk Assessment of Zinc and Aluminum Mixtures to *Ceriodaphnia silvestrii* (Crustacea: Cladocera). **Environmental Toxicology and Chemistry**, 40(10), 2912-2922, 2021.
- CHAGAS, T.Q., DA SILVA ALVAREZ, T.G., MONTALVÃO, M.F., MESAK, C., ROCHA, T.L., DA COSTA ARAÚJO, A.P., MALAFAIA, G. Behavioral toxicity of tannery effluent in *zebrafish* (*Danio rerio*) used as model system. **Science of the Total Environment**. 685, 923-933; 2019.
- CHAKRABORTI D., DAS B., RAHMAN M.M., CHOWDHURY U.K., BISWAS B., et al. Status of groundwater arsenic contamination in the state of West Bengal, India: a 20-year study report. **Mol. Nutr. Food Res**. 53(5):542–51, 2009.
- CHATZIMITAKOS, T.G., PLIATSIKA, C., CHOUSIDIS, I., D. LEONARDOS, I., STALIKAS, C.D. Metabolomic Profiling Unveils the Impact of Non-Doped and Heteroatom-Doped Carbon Nanodots on *Zebrafish* (*Danio rerio*) Embryos. **Nanomaterials**, 11, 483, 2021.
- CHEN Q.Y., DESMARAIS T., COSTA, M. Metals and mechanisms of carcinogenesis. **Annual Rev. Pharmacology and Toxicology** 59:537–54, 2019.
- CHEN, X., TENG, M., ZHANG, J., QIAN, L., DUAN, M., CHENG, Y., ZHAO, F., ZHENG, J., WANG, C. Tralopyril induces developmental toxicity in *zebrafish* embryos (*Danio rerio*) by disrupting the thyroid system and metabolism. **Science of the Total Environment**. 746. 141860, 2020.
- CHEN, X., ZHENG, J., TENG, M., ZHANG, J., QIAN, L., DUAN, M., ZHAO, F., WANG, Z., & WANG, C. Bioaccumulation, Metabolism and the Toxic Effects of Chlorfenapyr in *Zebrafish* (*Danio rerio*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 69, 8110-8119; 2021.

CHENG A, TYNE R, KWOK YT, REES L, CRAIG L, et al. Investigating arsenic contents in surface and drinking water by voltammetry and the method of standard additions. **J. Chem. Educ.** 93(11):1945–50., 2016.

CHOUSIDIS, I., CHATZIMITAKOS, T., LEONARDOS, D., FILIOU, M.D., STALIKAS, C.D., LEONARDOS, I.D. Cannabinol is the spotlight: Toxicometabolomic study and behavioral analysis of *zebrafish* embryos exposed to the unknown cannabinoid. **Chemosphere**, 252, 126417, 2020.

CIUCCI, S., GE, Y., DURÁN, C., PALLADINI, A., JIMÉNEZ-JIMÉNEZ, V., MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, L. M., WANG, Y., SALES, S., SHEVCHENKO, A., POSER, S.W., HERBIG, M., OTTO, O., ANDROUTSELLIS-THEOTOKIS, A., GUCK, J., GERL, M.J. & CANNISTRACI, C. V. Enlightening discriminative network functional modules behind Principal Component Analysis separation in differential-omic science studies. **Scientific reports**, 7(1), 43946, 2017.

CUNNANE, S. C., TRUSHINA, E., MORLAND, C., PRIGIONE, A., CASADESUS, G., ANDREWS, Z. B., ... & MILLAN, M. J. Brain energy rescue: an emerging therapeutic concept for neurodegenerative disorders of ageing. **Nature Reviews Drug Discovery**, 19(9), 609-633, 2020.

DA SILVA LEMOS, I., WESSLER, L. B., DUARTE, M. B., DA SILVA, G. L., BERNARDO, H. T., CANDIOTTO, G., ... & STRECK, E. L. Exposure to leucine alters glutamate levels and leads to memory and social impairment in *zebrafish*. **Metabolic Brain Disease**, 1-11., 2022.

DALZOCHIO, T., SIMÕES, L.A. et al. Water quality parameters, biomarkers and metal bioaccumulation in native fish captured in the Ilha River, Southern Brazil. **Chemosphere**, v.189, p.609-618, 2017.

DAS, S., UNNI, B., BHATTACHARJEE, M., WANN, S. B., & RAO, P. G. Toxicological effects of arsenic exposure in a freshwater teleost fish, *Channa punctatus*. **African Journal of Biotechnology**, 11(19), 4447-4454, 2012.

DE SOUZA, M. B., DE SOUZA SANTOS, L. R., BORGES, R. E., NUNES, H. F., VIEIRA, T. B., PACHECO, S. M., & DE MELO E SILVA, D. Current status of ecotoxicological studies of bats in Brazil. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, 104, 393-399, 2020.

DEN BROEDER, M.J., KOPYLOVA, V.A., KAMMINGA, L.M., LEGLER, J. *Zebrafish* as a model to study the role of peroxisome proliferating-activated receptors in adipogenesis and obesity. **PPAR research**. 2015.

DENOON, Trudi; SUNILKUMAR, Siddharth; FORD, Sue M. Acetoacetate enhances oxidative metabolism and response to toxicants of cultured kidney cells. **Toxicology Letters**, v. 323, p. 19-24, 2020.

DILEO, M. V., STRAHAN, G. D., DEN BAKKER, M., & HOEKENGA, O. A. Weighted correlation network analysis (WGCNA) applied to the tomato fruit metabolome. **PloS one**, 6(10), e26683, 2011.

DONG, G., WEI, D., WANG, J., GUO, P., LI, M., YANG, M., & KONG, L. Study of the cardiotoxicity of Venenum Bufonis in rats using an ¹H NMR-based metabolomics approach. **Plos one**, 10(3), e0119515, 2015.

DONG, H. L., ZHANG, S. X., TAO, H., CHEN, Z. H., LI, X., QIU, J. F., CUI, W.Z., SIMA, Y-H., CUI, W-Z. & XU, S. Q. Metabolomics differences between silkworms (*Bombyx mori*) reared on fresh mulberry (*Morus*) leaves or artificial diets. **Scientific reports**, 7(1), 1-16, 2017.

DRIEVER W., SOLNICA-KREZEL, L., SCHIER, A.F., NEUHAUSS, S.C., MALICKI, J., STEMPLE, D.L., STAINIER, D.Y., ZWARTKRUIS, F., ABDELILAH, S., RANGINI, Z., BELAK, J., BOGGS, C. A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in *zebrafish*. **Development** 123:37–46, 1996.

EGLER, S. G., ROLDÃO, T. M., SANTOS, G. O., HEIDELMANN, G. P., GIESE, E. C., CORREIA, F. V., & SAGGIORO, E. M. Acute toxicity of single and combined rare earth element exposures towards *Daphnia similis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 251, 114538, 2023.

EMWAS, A. H., SACCENTI, E., GAO, X., MCKAY, R. T., DOS SANTOS, V. A., ROY, R., & WISHART, D. S. Recommended strategies for spectral processing and post-processing of 1D ¹H-NMR data of biofluids with a particular focus on urine. **Metabolomics**, v14(3), 1-23; 2018.

EMWAS, A.H., ROY, R., MCKAY, R.T., TENORI, L., SACCENTI, E., GOWDA, G.A., WISHART, D.S. NMR spectroscopy for metabolomics research. **Metabolites**. 9, 123, 2019.

EPA (Environmental Protection Agency). **Drinking water standard for arsenic. EPA Fact Sheet 815-F-00-015**, EPA, Washington, DC., 2001.

<https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPdf.cgi?Dockey=20001XXC.txt> Acesso: 28/12/2022

FEITSMA H, CUPPEN E. *Zebrafish* as a cancer model. **Mol Cancer Res** 6:685–694, 2008.

FIEHN, O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. **Comparative and functional genomics**. 2, 155-168, 2001.

FLOHÉ, Leopold (Ed.). Glutathione. **CRC Press**, 2018.

FORSTER, Anthony C.; LILJERUHM, Josefine; GULLBERG, Erik. Synthetic biology: A lab manual. **World Scientific**, 2014.

FOSSI, M. Cristina; LEONZIO, Claudio; PEAKALL, David B. The use of nondestructive biomarkers in the hazard assessments of vertebrate populations. In: Nondestructive biomarkers in vertebrates. **CRC Press**, 2020.

- FURUHASHI, Masato. New insights into purine metabolism in metabolic diseases: role of xanthine oxidoreductase activity. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, 2020.
- GADIAN, D. G. & RADDIA, G. K. NMR Studies of Tissue Metabolism. **Annu. Rev. Biochem.** Ed 50, p.69–83, 1981.
- GANESAN, R., KIM, S., YOON, D., YOON, C., KIM, S. ¹H NMR based metabolomics studies of the toxicity of titanium dioxide nanoparticles in *zebrafish* (*Danio rerio*). **Bulletin of the Korean Chemical Society**. 39, 33-39, 2018.
- GARAI, P., BANERJEE, P., MONDAL, P., & SAHA, N. C. Effect of heavy metals on fishes: Toxicity and bioaccumulation. **J Clin Toxicol.** S, 18, 2021.
- GARCIA-PEREZ, I., POSMA, J.M., SERRANO-CONTRERAS, J.I., BOULANGÉ, C.L., CHAN, Q., FROST, G., STAMLER, J., ELLIOT, P., LINDON, J.C., HOLMES, E., NICHOLSON, J.K. Identifying unknown metabolites using NMR-based metabolic profiling techniques. **Nature Protocols**, v15, p.2538-2567, 2020.
- GARCÍA-RODRÍGUEZ, Darío; GIMÉNEZ-CASSINA, Alfredo. Ketone bodies in the brain beyond fuel metabolism: From excitability to gene expression and cell signaling. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 14, p. 732120, 2021.
- GENCHI, G., LAURIA, G., CATALANO, A., CAROCCI, A., & SINICROPI, M. S. Arsenic: a review on a great health issue worldwide. **Applied Sciences**, 12(12), 6184., 2022.
- GILLIS, T. E.; BALLANTYNE, J. S. The effects of starvation on plasma free amino acid and glucose concentrations in lake sturgeon. **Journal of fish biology**, v. 49, n. 6, p. 1306-1316, 1996.
- GLEESON, Todd T. Post-exercise lactate metabolism: a comparative review of sites, pathways, and regulation. **Annual Review of Physiology**, v. 58, n. 1, p. 565-581, 1996.
- GONÇALVES, Í.F.S., SOUZA, T.M., VIEIRA, L.R., MARCHI, F.C., NASCIMENTO, A.P., FARIAS, D.F. Toxicity testing of pesticides in *zebrafish*:- a systematic review on chemicals and associated toxicological endpoints. **Environmental Science and Pollution Research**. 27, 10185-10204, 2020.
- GHOSH, T., ZHANG, W., GHOSH, D., & KECHRIS, K. Predictive modeling for metabolomics data. In *Computational Methods and Data Analysis for Metabolomics* (pp. 313-336). Humana, New York, NY; 2020.
- GROMSKI, P. S., XU, Y., KOTZE, H. L., CORREA, E., ELLIS, D. I., ARMITAGE, E. G., TURNER, M.L. & GOODACRE, R. Influence of missing values substitutes on multivariate analysis of metabolomics data. **Metabolites**, 4(2), 433-452, 2014.

GUIJAS C., MONTENEGRO-BURKE JR, WARTH B., SPILKER ME, SIUZDAK G. Metabolomics activity screening for identifying metabolites that modulate phenotype. **Nature Biotechnology**. Apr 5;36(4):316-320, 2018.

GUO, Y., LV, B., LIU, R., DAI, Z., ZHANG, F., LIANG, Y., YU, B., ZENG, D., XIAO-BIN, L., ZHANG, Z. Role of LncRNAs in regulating cancer amino acid metabolism. **Cancer Cell International**, 21(1), 1-10., 2021.

GUPTA, T., MARQUART, G. D., HORSTICK, E. J., TABOR, K. M., PAJEVIC, S., & BURGESS, H. A. Morphometric analysis and neuroanatomical mapping of the zebrafish brain. **Methods**, 150, 49-62, 2018.

HAAS, R., ZELEZNIAK, A., IACOVACCI, J., KAMRAD, S., TOWNSEND, S., & RALSER, M. Designing and interpreting 'multi-omic' experiments that may change our understanding of biology. **Current Opinion in Systems Biology**, v 6, 37-45, 2017.

HALBACH, K., ULRICH, N., GOSS, K. U., SEIWERT, B., WAGNER, S., SCHOLZ, S., LUCKENBACH, T., BAUER, C., SCHWEIGER, N. & REEMTSMA, T. Yolk sac of zebrafish embryos as backpack for chemicals? **Environmental Science & Technology**, 54(16), 10159-10169, 2020.

HALLAUER, J., GENG, X., YANG, H. C., SHEN, J., TSAI, K. J., & LIU, Z. The effect of chronic arsenic exposure in *zebrafish*. **Zebrafish**, 13(5), 405-412, 2016.

HASANUZZAMAN, M., NAHAR, K., & FUJITA, M. Arsenic toxicity in plants and possible remediation. **Soil remediation and plants: Prospects and challenges**, 433-501, 2015.

HAZRA, D. K., & PURKAIT, A. Role of pesticide formulations for sustainable crop protection and environment management: A review. **J. Pharmacogn. and Phytochemistry**, 8, 686-693, 2019.

HE, J., ZHANG, P., SHEN, L., NIU, L., TAN, Y., CHEN, L., & ZHU, L. Short-chain fatty acids and their association with signalling pathways in inflammation, glucose and lipid metabolism. **International journal of molecular sciences**, 21(17), 6356, 2020.

HELLWIG, Michael. Analysis of protein oxidation in food and feed products. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 68, n. 46, p. 12870-12885, 2020.

HONG, J.H., LEE, W.C., HSU, Y.M., LIANG, H.J., WAN, C.H., CHIEN, C.L., LIN, C.Y. Characterization of the biochemical effects of naphthalene on the mouse respiratory system using NMR-based metabolomics. **Journal of Applied Toxicology**. 34, 1379-1388; 2014.

HONG, X., & ZHA, J. Fish behavior: A promising model for aquatic toxicology research. **Science of the total environment**, 686, 311-321, 2019.

HOSEINI, S. M., PÉREZ-JIMÉNEZ, A., COSTAS, B., AZEREDO, R., & GESTO, M. Physiological roles of tryptophan in teleosts: current knowledge and perspectives for future studies. **Reviews in Aquaculture**, 11(1), 3-24., 2019.

HORIE, Y., YAMAGISHI, T., KOSHIO, M., IGUCHI, T., & TATARAZAKO, N. Lethal and sublethal effects of aniline and chlorinated anilines on *zebrafish* embryos and larvae. **Journal of Applied Toxicology**, 37(7), 836-841, 2017.

IARC (Int. Agency Res. Cancer). Arsenic, Metals, Fibers and Dusts, Vol. 100 C: A Review of Human Carcinogens. **Geneva: WHO Press**. 2012.

IBAMA – INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Portaria Normativa IBAMA n.84, de 15 de outubro de 1996.

ISKUSNYKH, Igor Y.; ZAKHAROVA, Anastasia A.; PATHAK, Dhruva. Glutathione in brain disorders and aging. **Molecules**, v. 27, n. 1, p. 324, 2022.

ISO (1996) INTERNATIONAL STANDARDS. **Water quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]**. ISO 7346-3: Flow-through method. Disponível em: [<http://www.iso.org>] Acesso em 12/08/2023.

JANG, Z.H., CHUNG, H.C., AHN, Y.G., KWON, Y.K., KIM, J.S., RYU, J.H., RYU, D.H., KIM, C-H., HWANG, G. S., 2012. Metabolic profiling of an alcoholic fatty liver in *zebrafish* (*Danio rerio*). **Molecular biosystems**. v8, p.2001-2009, 2012.

JARQUE, S., RUBIO-BROTOS, M., IBARRA, J., ORDOÑEZ, V., DYBALLA, S., MIÑANA, R., & TERRIENTE, J. Morphometric analysis of developing *zebrafish* embryos allows predicting teratogenicity modes of action in higher vertebrates. **Reproductive toxicology**, 96, 337-348, 2020.

JÄRUP, Lars. Hazards of heavy metal contamination. **British medical bulletin**, v. 68, n. 1, p. 167-182, 2003.

JIA, M., WANG, Y., TENG, M., WANG, D., YAN, J., MIAO, J., ZHOU, Z., ZHU, W. Toxicity and metabolomics study of isocarbophos in adult *zebrafish* (*Danio rerio*). **Ecotoxicology and environmental safety**. 163, 1-6; 2018.

JING, J., ZHENG, G., LIU, M., SHEN, X., ZHAO, F., WANG, J., ZHANG, J., HUANG, G., DAI, P., CHEN, Y., CHEN, J. & LUO, W. Changes in the synaptic structure of hippocampal neurons and impairment of spatial memory in a rat model caused by chronic arsenite exposure. **Neurotoxicology**, 33(5), 1230-1238, 2012.

JU-WOOKLEE, HOONCHOI, UN-K. et al. Toxic effects of lead exposure on bioaccumulation, oxidative stress, neurotoxicity, and immune responses in fish: A review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.68, 101-108, 2019.

- KA J., JIN S.W. *Zebrafish* as an Emerging Model for Dyslipidemia and Associated Diseases. **J Lipid Atherosclerosis**. 2021 Jan;10(1):42-56, 2021.
- KAGUE, E., GALLAGHER, M., BURKE, S., PARSONS, M., FRANZ-ODENDAAL, T. & FISHER, S. Skeletogenic fate of *zebrafish* cranial and trunk neural crest. **PloS one**, v. 7, n. 11, p. e47394, 2012.
- KANE, Daniel A. Lactate oxidation at the mitochondria: a lactate-malate-aspartate shuttle at work. **Frontiers in neuroscience**, v. 8, p. 366, 2014.
- KAR, M., NAZLIOGLU, Ş., AGIR, H. Financial Development and Economic Growth Nexus in the MENA countries: Bootstrap Panel Granger Causality Analysis, **Economic Modelling** 28, p. 685-693, 2011.
- KELLY, Beth; PEARCE, Erika L. Amino assets: how amino acids support immunity. **Cell metabolism**, v. 32, n. 2, p. 154-175, 2020.
- KHAN, K. M., CHAKRABORTY, R., BUNDSCHUH, J., BHATTACHARYA, P., & PARVEZ, F. Health effects of arsenic exposure in Latin America: An overview of the past eight years of research. **Science of the total environment**, 710, 136071, 2020.
- KIM, H.K., CHOI, Y.H., VERPOORTE, R. NMR-based metabolomic analysis of plants. **Nature protocols**. 5, 536-549, 2010.
- KIM, E. R., KWON, H. N., NAM, H., KIM, J. J., PARK, S., & KIM, Y. H. Urine-NMR metabolomics for screening of advanced colorectal adenoma and early-stage colorectal cancer. **Scientific Reports**, 9(1), 1-10, 2019.
- KIMMEL, C. B., BALLARD, W. W., KIMMEL, S. R., ULLMANN, B. & SCHILLING, T. F. Stages of Embryonic Development of the *Zebrafish*. **Developmental Dynamics**, 203, 255-310, 1995.
- KNÖBEL, M., BUSSER, F. J., RICO-RICO, A., KRAMER, N. I., HERMENS, J. L., HAFNER, C., TANNEBERGER, K., SCHIRMER, K. & SCHOLZ, S. Predicting adult fish acute lethality with the *zebrafish* embryo: relevance of test duration, endpoints, compound properties, and exposure concentration analysis. **Environmental Science & Technology**, 46(17), 9690-9700, 2012.
- KOBAYASHI, Y. & AGUSA, T. Arsenic metabolism and toxicity in humans and animals: racial and species differences. In: Arsenic Contamination in Asia. **Springer**, Singapore, 2019. p. 13-28.
- KRAMER, C., DAHL, G., TYRCHAN, C., & ULANDER, J. A comprehensive company database analysis of biological assay variability. **Drug discovery today**, 21(8), 1213-1221, 2016.
- KUMAI, Y., HARRIS, J., AL-REWASHDY, H., R. W. M. KWONG, & S. F. PERRY, Nitrogenous Waste Handling by Larval *Zebrafish Danio rerio* in

Alkaline Water. **Physiological and Biochemical Zoology**, vol. 88, no. 2, pp. 137–145, 2015.

KUROGI, K., LIU, T. A., SAKAKIBARA, Y., SUIKO, M., & LIU, M. C. The use of *zebrafish* as a model system for investigating the role of the SULTs in the metabolism of endogenous compounds and xenobiotics. **Drug metabolism reviews**, 45(4), 431-440, 2013.

LANKADURAI, B.P., NAGATO, E.G., SIMPSON, M.J. Environmental metabolomics: an emerging approach to study organism responses to environmental stressors. **Environmental Reviews**, 21, 180-205; 2013.

LAPWORTH, D. J., BARAN, N., STUART, M. E., & WARD, R. S. Emerging organic contaminants in groundwater: a review of sources, fate and occurrence. **Environmental pollution**, v 163, p. 287-303, 2012.

LEE, S., OH, S., KIM, S., LEE, W., CHOI, J., LEE, H., CHOI, J., LEE, H., LEE, Y., KIM, S. NMR-based Metabolomic Responses of *Zebrafish* (*Danio Rerio*) by Fipronil Exposure. **Journal of the Korean Magnetic Resonance Society**. 24, 104-116; 2020.

LI, C., LI, P., TAN, Y. M., LAM, S. H., CHAN, E. C., & GONG, Z. Metabolomic characterizations of liver injury caused by acute arsenic toxicity in *zebrafish*. **PLoS One**, 11(3), e0151225, 2016.

LIESCHKE, Graham J.; CURRIE, Peter D. Animal models of human disease: *zebrafish* swim into view. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 5, p. 353-367, 2007.

LIU, W., SUN, Z., CHEN, J., & JING, C. Raman spectroscopy in colorectal cancer diagnostics: Comparison of PCA-LDA and PLS-DA models. **Journal of Spectroscopy**, 2016.

LIU, Lei; FU, Chunyan; LI, Fuchang. Acetate affects the process of lipid metabolism in rabbit liver, skeletal muscle and adipose tissue. **Animals**, v. 9, n. 10, p. 799, 2019.

LOTTERING, R. T., GOVENDER, M., PEERBHAY, K., & LOTTERING, S. Comparing partial least squares (PLS) discriminant analysis and sparse PLS discriminant analysis in detecting and mapping *Solanum mauritianum* in commercial forest plantations using image texture. **ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing**, 159, 271-280.

LU, Y., ZHANG, Y., DENG, Y., JIANG, W., ZHAO, Y., GENG, J., DING, L., REN, H. Uptake and accumulation of polystyrene microplastics in *zebrafish* (*Danio rerio*) and toxic effects in liver. **Environmental science & technology**, 50(7), 4054-4060, 2016.

LUSHCHAK, Volodymyr I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic toxicology**, v. 101, n. 1, p. 13-30, 2011.

LUSHCHAK, Volodymyr I. Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. **Fish physiology and biochemistry**, v. 42, p. 711-747, 2016.

MacRAE, C., PETERSON, R. *Zebrafish* as tools for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery** 14, 721–731, 2015.

MARKLEY, J.L., BRÜSCHWEILER, R., EDISON, A.S., EGHBALNIA, H.R., POWERS, R., RAFTERY, D., WISHART, D.S. The future of NMR-based metabolomics. **Current opinion in biotechnology**. 43, 34-40, 2017.

MARTI, G., ERB, M., BOCCARD, J., GLAUSER, G., DOYEN, G. R., VILLARD, N., WOLFENDER, J.L. Metabolomics reveals herbivore-induced metabolites of resistance and susceptibility in maize leaves and roots. **Plant, Cell & Environment**. 36, 621-639; 2013.

MARTORELL, M., LUCAS, X., ALARCÓN-ZAPATA, P., CAPÓ, X., QUETGLAS-LLABRÉS, M. M., TEJADA, S., & SUREDA, A. Targeting xanthine oxidase by natural products as a therapeutic approach for mental disorders. **Current Pharmaceutical Design**, 27(3), 367-382, 2021.

MASTALOUDIS, Angela; LEONARD, Scott W.; TRABER, Maret G. Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 7, p. 911-922, 2001.

MATTESON, A.R., GANNON, T.W., JEFFRIES, M.D., HAINES, S., LEWIS, D.F., POLIZZOTTO, M.L. Arsenic Retention in Foliage and Soil after Monosodium Methyl Arsenate (MSMA) Application to Turfgrass. **Journal of Environmental Qual.** 2014.

MEHMOOD, T., LILAND, K. H., SNIPEN, L., & SÆBØ, S. A review of variable selection methods in partial least squares regression. **Chemometrics and intelligent laboratory systems**, 118, 62-69, 2012.

MENG, Z., CUI, J., LIU, L., YANG, C., BAO, X., WANG, J., CHEN, X. Toxicity effects of chlorantraniliprole in *zebrafish* (*Danio rerio*) involving in liver function and metabolic phenotype. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 187, 105194; 2022.

MOCO, Sofia. Studying metabolism by NMR-based metabolomics. **Frontiers in Molecular Biosciences**, p. 372, 2022.

NADAL, A., QUESADA, I., TUDURI, E., NOGUEIRAS, R., & ALONSO-MAGDALENA, P. Endocrine-disrupting chemicals and the regulation of energy balance. **Nature Reviews Endocrinology**, 13(9), 536-546, 2017.

NASIR, M. J., WAHAB, A., AYZAZ, T., KHAN, S., KHAN, A. Z., & LEI, M. Assessment of heavy metal pollution using contamination factor, pollution load index, and geoaccumulation index in Kalpani River sediments, Pakistan. **Arabian Journal of Geosciences**, 16, 143, 2023.

NAUJOKAS, M. F., ANDERSON, B., AHSAN, H., APOSHIAN, H. V., GRAZIANO, J. H., THOMPSON, C., & SUK, W. A. The broad scope of health effects from chronic arsenic exposure: update on a worldwide public health problem. **Environmental health perspectives**, 121(3), 295-302, 2013.

NICHOLSON, J.K., LINDON, J.C., HOLMES, E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. **Xenobiotica**. 29, 1181-1189, 1999.

NOBRE, R.C.M. & NOBRE, M.M.M., Groundwater and health implications of biofuels production. **Environmental impact of biofuels**. InTech, Alagoas, 2011.

NOVELLI, A., VIEIRA, B. H., CORDEIRO, D., CAPPELINI, L. T. D., VIEIRA, E. M., & ESPÍNDOLA, E. L. G. Lethal effects of abamectin on the aquatic organisms *Daphnia similis*, *Chironomus xanthus* and *Danio rerio*. **Chemosphere**, 86(1), 36-40, 2012.

NUGNES, R., RUSSO, C., LAVORGNA, M., ORLO, E., KUNDI, M., & ISIDORI, M. Polystyrene microplastic particles in combination with pesticides and antiviral drugs: Toxicity and genotoxicity in *Ceriodaphnia dubia*. **Environmental Pollution**, 313, 120088, 2022.

NURCHI, V. M., BUHA DJORDJEVIC, A., CRISPONI, G., ALEXANDER, J., BJØRKLUND, G., & AASETH, J. Arsenic toxicity: molecular targets and therapeutic agents. **Biomolecules**, v.10(2), 235, 2020.

OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Validation Report (Phase 1) for the *Zebrafish* Embryo Toxicity Test: Part I and Part II. **Series on Testing and Assessment n° 157**, Paris, 2011.

OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Guidance document n° 236 on the conduct and design of fish embryo toxicity test (FET), **OECD Publishing, 2013**.

OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Guidance document n° 116 on the conduct and design of chronic toxicity and carcinogenicity studies, supporting test guidelines 451, 452 and 453. **OECD Publishing, 2014**.

OMS (**Organização Mundial da Saúde**) – (WHO-World Health Organization). Guidelines for drinking-water quality. Third edition: incorporating the first and second addenda, Volume 1, recommendations. Guid., WHO, Geneva., 2008. http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/fulltext.pdf Acesso: 28/12/2022.

OMAR, S., MUHAMAD, M. S., TE CHUAN, L., HADIBARATA, T., & TEH, Z. C. A review on lead sources, occurrences, health effects, and treatment using

hydroxyapatite (HAp) adsorbent made from fish waste. **Water, Air, & Soil Pollution**, 230, 1-21, 2019.

OZTURK, M., METIN, M., ALTAY, V., BHAT, R. A., EJAZ, M., GUL, A., ... & KAWANO, T. Arsenic and human health: Genotoxicity, epigenomic effects, and cancer signaling. **Biological trace element research**, 1-14, 2021.

PAL, A., GIN, K. Y. H., LIN, A. Y. C., & REINHARD, M. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: review of recent occurrences, sources, fate and effects. **Science of the total environment**, 408(24), p. 6062-6069, 2010.

PAULSON, K. Eric. Xenobiotic regulation of glutathione S-transferase Ya gene expression. **Induced Effects of Genotoxic Agents in Eukaryotic Cells**, p. 1-20, 2020.

PANFILI, E., GERLI, R., GROHMANN, U., & PALLOTTA, M. T. Amino acid metabolism in rheumatoid arthritis: friend or foe? **Biomolecules**, 10(9), 1280, 2020.

PARNG, Chuenlei. In vivo *zebrafish* assays for toxicity testing. **Current opinion in drug discovery & development**, v. 8, n. 1, p. 100-106, 2005.

PEDLAR, R. M.; KLAVERKAMP, J. F. Accumulation and distribution of dietary arsenic in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). **Aquatic Toxicology**, v. 57, n. 3, p. 153-166, 2002.

PEREIRA, A. C., GOMES, T., MACHADO, M. R. F., & ROCHA, T. L. The zebrafish embryotoxicity test (ZET) for nanotoxicity assessment: from morphological to molecular approach. **Environmental pollution**, 252, 1841-1853, 2019.

PERUMAL, E., ESWARAN, S., PARVIN, R & BALASUBRAMANIAN, S. Mitigation of arsenic induced developmental cardiotoxicity by ferulic acid in *zebrafish*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 244, p. 109021, 2021.

PIZZORNO, Joseph. Glutathione!. **Integrative Medicine: A Clinician's Journal**, v. 13, n. 1, p. 8, 2014.

PORTO, V. A., ROCHA JÚNIOR, E. R., URSULINO, J. S., PORTO, R. S., SILVA, M., DE JESUS, L. W. O., OLIVEIRA, J.M., CRISPIM, A. C., CARINHANHA, J.C.S. & DE AQUINO, T. M. NMR-based metabolomics applied to ecotoxicology with zebrafish (*Danio rerio*) as a prominent model for metabolic profiling and biomarker discovery: Overviewing the most recent approaches. **Science of The Total Environment**, 868, 161737, 2023.

PROKIĆ, M. D., RADOVANOVIĆ, T. B., GAVRIĆ, J. P., & FAGGIO, C. Ecotoxicological effects of microplastics: Examination of biomarkers, current

state and future perspectives. **TrAC Trends in analytical chemistry**, 111, 37-46, 2019.

QAID, Mohammed M.; AL-GARADI, Maged A. Protein and amino acid metabolism in poultry during and after heat stress: a review. **Animals**, v. 11, n. 4, p. 1167, 2021.

QIAO, R., SHENG, C., LU, Y., ZHANG, Y., REN, H., LEMOS, B. Microplastics induce intestinal inflammation, oxidative stress, and disorders of metabolome and microbiome in *zebrafish*. **Science of the Total Environment**. V 662, p. 246-253, 2019.

RÅDJURSÖGA, M., LINDQVIST, H.M., PEDERSEN, A., KARLSSON, G.B., MALMODIN, D., BRUNIUS, C., ELLEGÅRD, L., WINKVIST, A. The ¹H NMR serum metabolomics response to a two-meal challenge: a cross-over dietary intervention study in healthy human volunteers. **Nutrition journal**. 18, 1-12, 2019.

RAHMAN, M. S., NORTON, G. W., & RASHID, M. H. A. Economic impacts of integrated pest management on vegetables production in Bangladesh. **Crop Protection**, 113, 6-14, 2018.

RAMIREZ T, DANESHIAN M, KAMP H, et al. Metabolomics in toxicology and preclinical research. **ALTEX**. 30(2):209-225, 2013.

RASHED, M. N. Cadmium and lead levels in fish (*Tilapia nilotica*) tissues as biological indicator for lake water pollution. **Environmental monitoring and assessment**, v. 68, p. 75-89, 2001.

RAVENSCROFT P, BRAMMER H, RICHARDS K. Arsenic Pollution: A Global Synthesis. **Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.**, 2011.

RAWLS, John F.; SAMUEL, Buck S.; GORDON, Jeffrey I. Gnotobiotic *zebrafish* reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 13, p. 4596-4601, 2004.

REBUZZINI, P., CEBRAL, E., FASSINA, L., ALBERTO REDI, C., ZUCOTTI, M. & GARAGNA, S. Arsenic trioxide alters the differentiation of mouse embryonic stem cell into cardiomyocytes. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 14993, 2015.

REHMAN, M. U., KHAN, R., KHAN, A., QAMAR, W., ARAFAH, A., AHMAD, A., AHMAD, A., AKHTER, R., RINKLEBE, J. & AHMAD, P. Fate of arsenic in living systems: Implications for sustainable and safe food chains. **Journal of Hazardous Materials**, v 417, 126050, 2021.

REID, MICHAEL S., HOY, KAREN S., SCHOFIELD, JORDAN R.M., UPPAL, JAGDEESH S., LIN, YANWEN, LU, XIUFEN, PENG, HANYONG, LE, X. CHRIS. Arsenic speciation analysis: A review with an emphasis on chromatographic separations. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 123, p. 115770, 2020.

- REN, J.L., ZHANG, A.H., KONG, L., WANG, X.J. Advances in mass spectrometry-based metabolomics for investigation of metabolites. **RSC advances**, 8, p.22335-22350, 2018.
- ROCCHETTI, G., & O'CALLAGHAN, T. F. Application of metabolomics to assess milk quality and traceability. **Current Opinion in Food Science**, 40, 168-178, 2021.
- ROSA, J.G.S., LIMA, C., LOPES-FERREIRA, M. Zebrafish larvae behavior models as a tool for drug screenings and pre-clinical trials: a review. **International Journal of Molecular Sciences**. v23, 6647, 2022.
- ROSALES-PÉREZ, K. E., ELIZALDE-VELÁZQUEZ, G. A., GÓMEZ-OLIVÁN, L. M., OROZCO-HERNÁNDEZ, J. M., CARDOSO-VERA, J. D., HEREDIA-GARCÍA, G., ... & GALAR-MARTÍNEZ, M. Brain damage induced by contaminants released in a hospital from Mexico: Evaluation of swimming behavior, oxidative stress, and acetylcholinesterase in zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, 294, 133791, 2022.
- ROSATO, A., TENORI, L., CASCANTE, M., DE ATAURI CARULLA, P.R., MARTINS DOS SANTOS, V.A., SACCENTI, E. From correlation to causation: analysis of metabolomics data using systems biology approaches. *Metabolomics*. 14, 1-20; 2018.
- SAMUELSSON, L.M. & LARSSON, D.J. Contributions from metabolomics to fish research. **Molecular BioSystems**, 4 (10): 974-979, 2008.
- SANT, K. E., & TIMME-LARAGY, A. R. Zebrafish as a model for toxicological perturbation of yolk and nutrition in the early embryo. **Current environmental health reports**, 5, 125-133, 2018.
- SHAIKHIEV, I. G., KRAYSMAN, N. V., SVERGUZOVA, S. V., SPESIVTSEVA, S. E., & YAROTHCKINA, A. N. Fish scales as a biosorbent of pollutants from wastewaters and natural waters (a literature review). **Biointerface Research in Applied Chemistry**, 10(6), 6893-6905, 2020.
- SHANKAR S., SHANKER U., SHIKHA. Arsenic contamination of groundwater: a review of sources, prevalence, health risks, and strategies for mitigation. **Sci.World J.** 2014:304524., 2014.
- SHAW, J. R., GLAHOLT, S. P., GREENBERG, N. S., SIERRA-ALVAREZ, R., & FOLT, C. L. Acute toxicity of arsenic to *Daphnia pulex*: influence of organic functional groups and oxidation state. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, 26(7), 1532-1537, 2007.
- SHI, X., WAHLANG, B., WEI, X., YIN, X., FALKNER, K. C., PROUGH, R. A., KIM, S.H., MUELLER, E.G., MCCLAIN, C.J., CAVE, M., ZHANG, X. Metabolomic analysis of the effects of polychlorinated biphenyls in nonalcoholic fatty liver disease. **Journal of proteome research**. 11, 3805-3815; 2012.

SHULMAN, R. G., BROWN, T. R., UGURBIL, K., OGAWA, S., COHEN, S. M., AND DEN HOLLANDER, J. A. Cellular Applications of ^{31}P and ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance. **Science** ed 205, p.160–166, 1979.

SILVAGNO, Francesca; VERNONE, Annamaria; PESCARMONA, Gian Piero. The role of glutathione in protecting against the severe inflammatory response triggered by COVID-19. **Antioxidants**, v. 9, n. 7, p. 624, 2020.

SINHA D, PRASAD P. Health effects inflicted by chronic low-level arsenic contamination in groundwater: a global public health challenge. **Journal of Applied Toxicology**. 40(1):87–131, 2020.

SODHI, K. K., KUMAR, M., AGRAWAL, P. K., & SINGH, D. K. Perspectives on arsenic toxicity, carcinogenicity and its systemic remediation strategies. **Environmental Technology & Innovation**, v 16, 100462, 2019.

SOLNICA-KREZEL, L., & DRIEVER, W. Microtubule arrays of the *zebrafish* yolk cell: organization and function during epiboly. **Development**, 120(9), 2443-2455, 1994.

SONG, B., ZHOU, Y., ZHAN, R., ZHU, L., CHEN, H., MA, Z., CHEN, X., LU, Y. Effects of Different Pesticides on the Brewing of Wine Investigated by GC-MS-Based Metabolomics. **Metabolites**. 12, 485; 2022.

SOZA-RIED, C., BUSTAMANTE, E., CAGLEVIC, C., ROLFO, C., SIRERA, R., & MARSIGLIA, H. Oncogenic role of arsenic exposure in lung cancer: A forgotten risk factor. **Critical reviews in oncology/hematology**, 139, 128-133, 2019.

SPIEWAK R. Pesticides as a cause of occupational skin diseases in farmers. **Annals of Agricultural Environmental Medicine**, v8 (1):1-5. PMID: 11426918, 2001.

STICKNEY, H. L., BARRESI, M. J., & DEVOTO, S. H. Somite development in *zebrafish*. **Developmental Dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists**, 219(3), 287-303, 2000.

STOJILJKOVIĆ, V., PEJIĆ, S., KASAPOVIĆ, J., GAVRILOVIĆ, L., STOJILJKOVIĆ, S., NIKOLIĆ, D., & PAJOVIĆ, S. B. Glutathione redox cycle in small intestinal mucosa and peripheral blood of pediatric celiac disease patients. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 84, 175-184, 2012.

STREISINGER G., WALKER C., DOWER N., KNAUBER D., SINGER F. Production of clones of homozygous diploid *zebrafish* (*Brachydanio rerio*). **Nature** 291:293–296, 1981.

SZYMAŃSKA, E., SACCENTI, E., SMILDE, A. K., & WESTERHUIS, J. A. Double-check: validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. **Metabolomics**, 8, 3-16, 2012.

TENG, M., ZHU, W., WANG, D., YAN, J., QI, S., SONG, M., WANG, C. Acute exposure of *zebrafish* embryo (*Danio rerio*) to flutolanil reveals its developmental mechanism of toxicity via disrupting the thyroid system and metabolism. **Environmental Pollution**. 242, 1157-1165, 2018.

TENG, M., ZHU, W., WANG, D., QI, S., WANG, Y., YAN, J., DONG, K., ZHENG, M., WANG, C. Metabolomics and transcriptomics reveal the toxicity of difenoconazole to the early life stages of *zebrafish* (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**. 194, 112-120, 2018b.

TENG, M., ZHAO, W., CHEN, X., WANG, C., ZHOU, L., WANG, C., XU, Y. Parental exposure to propiconazole at environmentally relevant concentrations induces thyroid and metabolism disruption in *zebrafish* (*Danio rerio*) offspring: An in vivo, in silico and in vitro study. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v242, 113865; 2022.

TIAN, S., YAN, S., MENG, Z., HUANG, S., SUN, W., JIA, M., TENG, M., ZHOU, Z., ZHU, W. New insights into bisphenols induced obesity in *zebrafish* (*Danio rerio*): Activation of cannabinoid receptor CB1. **Journal of hazardous materials**. 418, 126100, 2021.

TOWNSEND, D. M., TEW, K. D., & TAPIERO, H. The importance of glutathione in human disease. **Biomedicine & pharmacotherapy**, 57(3-4), 145-155, 2003.

TRANFO, G., MARCHETTI, E., PIGINI, D., MICCHELI, A., SPAGNOLI, M., SCIUBBA, F., CONTA, G., TOMASSINI, A., FATTORINI, L. Targeted and untargeted metabolomics applied to occupational exposure to hyperbaric atmosphere. **Toxicology Letters**. 328, 28-34; 2020.

TRIGUEIRO, N.S.D.S., CANEDO, A., BRAGA, D.L.D.S., LUCHIARI, A.C., ROCHA, T.L. *Zebrafish* as an emerging model system in the global south: two decades of research in Brazil. **Zebrafish**. v17, 412-425, 2020.

TUDI, M., DANIEL RUAN, H., WANG, L., LYU, J., SADLER, R., CONNELL, D., CHU, C., PHUNG, D.T. Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment. **International journal of environmental research and public health**. 18, 1112; 2021.

TULLO, Emanuela; FINZI, Alberto; GUARINO, Marcella. Environmental impact of livestock farming and Precision Livestock Farming as a mitigation strategy. **Science of the total environment**, v. 650, p. 2751-2760, 2019.

TWADDLE, N. C., BELAND, F. A., & DOERGE, D. R. Metabolism and disposition of arsenic species from controlled dosing with sodium arsenite in adult and neonatal rhesus monkeys. VI. Toxicokinetic studies following oral administration. **Food and Chemical Toxicology**, v 133, 110760, 2019.

US EPA. (**U.S. Environmental Protection Agency**). Guidelines for Deriving Numerical National Water Quality Criteria for the Protection of Aquatic Organisms and Their Uses. EPAPB 85-227049, 1985.

US EPA. (**U.S. Environmental Protection Agency**). Pesticides: Reregistration, 2013.

VANITHA, S., AMSATH, A., & SUGUMARAN, J. Effect of arsenic (As_2O_3) on haemetological parameters of freshwater air breathing fish, *Channa*. (**Bloch**), 2017.

VARADAI AH, Y. G. C., SIVANESAN, S., NAYAK, S. B., & THIRUMALARAO, K. R. Purine metabolites can indicate diabetes progression. **Archives of physiology and biochemistry**, 128(1), 87-91, 2022.

VASSEUR, PAULE; MASFARAUD, JEAN-FRANÇOIS; BLAISE, CHRISTIAN. Ecotoxicology, revisiting its pioneers. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 3852-3857, 2021.

VIGNOLI, A., GHINI, V., MEONI, G., LICARI, C., TAKIS, P. G., TENORI, L., TURANO, P., LUCHINAT, C. High-Throughput Metabolomics by 1D NMR. **Angewandte Chemie Int. Ed.** 58, p.968–994, 2019.

VINAIXA, M., SAMINO, S., SAEZ, I., DURAN, J., GUINOVART, J. J., YANES, O. A guideline to univariate statistical analysis for LC/MS-based untargeted metabolomics-derived data. **Metabolites**. 2, 775-795, 2012.

VOSS, C. M., ANDERSEN, J. V., JAKOBSEN, E., SIAMKA, O., KARACA, M., MAECHLER, P., & WAAGEPETERSEN, H. S. AMP-activated protein kinase (AMPK) regulates astrocyte oxidative metabolism by balancing TCA cycle dynamics. **Glia**, 68(9), 1824-1839, 2020.

XU, Z., CAO, J., QIN, X., QIU, W., MEI, J., & XIE, J. Toxic effects on bioaccumulation, hematological parameters, oxidative stress, immune responses and tissue structure in fish exposed to ammonia nitrogen: a review. **Animals**, 11(11), 3304, 2021.

YANG, L., HO, N. Y., ALSHUT, R., LEGRADI, J., WEISS, C., REISCHL, M., MIKUT, R., LIEBEL, U., MULLER, F. & STRÄHLE, U. Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. **Reproductive Toxicology**, 28(2), 245-253, 2009.

YANG, T., HUI, R., NOUWS, J., SAULER, M., ZENG, T., & WU, Q. Untargeted metabolomics analysis of esophageal squamous cell cancer progression. **Journal of Translational Medicine**, 20(1), 127, 2022.

YOON, D., KIM, S., LEE, M., YOON, C., KIM, S. 1H -NMR-based metabolomic study on toxicity of methomyl and methidathion in fish. **Journal of Environmental science and health**. Part B, 51, 824-831; 2016.

YOON, C., YOON, D., CHO, J., KIM, S., LEE, H., CHOI, H., KIM, S. 1H -NMR-based metabolomic studies of bisphenol A in *zebrafish* (*Danio rerio*). **Journal of Environmental Science and Health**. Part B, 52, 282-289, 2017b.

WAINWRIGHT, Mark. Methylene blue derivatives-suitable photoantimicrobials for blood product disinfection? **International journal of antimicrobial agents**, v. 16, n. 4, p. 381-394, 2000.

WANG, Y., TENG, M., WANG, D., YAN, J., MIAO, J., ZHOU, Z., ZHU, W. Enantioselective bioaccumulation following exposure of adult zebrafish (*Danio rerio*) to epoxiconazole and its effects on metabolomic profile as well as genes expression. **Environmental Pollution**. 229, 264-271, 2017.

WANG, L., YAN, R., YANG, Q., LI, H., ZHANG, J., SHIMODA, Y., KATO, K., YAMANAKA, K. & AN, Y. Role of GH/IGF axis in arsenite-induced developmental toxicity in zebrafish embryos. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 201, 110820, 2020.

WANG, H. T., LIANG, Z. Z., DING, J., XUE, X. M., LI, G., FU, S. L., & ZHU, D. Arsenic bioaccumulation in the soil fauna alters its gut microbiome and microbial arsenic biotransformation capacity. **Journal of Hazardous Materials**, v 417, 126018, 2021.

WANG, H., CUI, S., MA, L., WANG, Z., & WANG, H. Variations of arsenic forms and the role of arsenate reductase in three hydrophytes exposed to different arsenic species. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 221, 112415, 2021.

WISHART, D.S. Advances in metabolite identification. **Bioanalysis**. 3, 1769-1782, 2011.

WISHART, D.S. Metabolomics for investigating physiological and pathophysiological processes. **Physiological reviews**. 99, 1819-1875, 2019.

WOOD, S. L.; WESTBROOK, J. A.; BROWN, J. E. Omic-profiling in breast cancer metastasis to bone: implications for mechanisms, biomarkers and treatment. **Cancer Treat Rev**, v. 40, n. 1, p. 139-52, 2014.

WORLEY, B., POWERS, R. PCA as a practical indicator of OPLS-DA model reliability. **Current Metabolomics**. 4, 97-103; 2016.

WU, S.-Y., PHAN, N.-N., HO, S.-H., LAI, Y.-H., TSAI, C.-H., YANG, C.-H., YU, H.-G., WANG, J.-C., HUANG, P.-L., LIN, Y.-C. Metabolomic assessment of arsenite toxicity and novel biomarker discovery in early development of zebrafish embryos. **Toxicology Letters**, 290, 116–122; 2018.

WYSS, M. T., JOLIVET, R., BUCK, A., MAGISTRETTI, P. J., & WEBER, B. In vivo evidence for lactate as a neuronal energy source. **Journal of Neuroscience**, 31(20), 7477-7485, 2011.

ZACHARIAS, H.U., ALTENBUCHINGER, M., GRONWALD, W. Statistical analysis of NMR metabolic fingerprints: established methods and recent advances. **Metabolites**, 8, 47, 2018.

ZHANG, A., SUN, H., YAN, G., WANG, P., & WANG, X. Mass spectrometry-based metabolomics: applications to biomarker and metabolic pathway research. **Biomedical Chromatography**, 30(1), 7-12, 2016.

ZAKARIA, F., AKHTAR, M.T., WAN IBRAHIM, W.N., ABU BAKAR, N., MUHAMAD, A., SHOHAIMI, S., MAULIDIANI, M., AHMAD, H., ISMAIL, I.S., SHAARI, K. Perturbations in Amino Acid Metabolism in Reserpine-Treated *Zebrafish* Brain Detected by ¹H Nuclear Magnetic resonance-based Metabolomics. **Zebrafish**. 18, 42-54; 2021.

APÊNDICES

Apêndices

1. Protocolo para extração de metabólitos de organismo inteiro (*zebrafish*) amostragem para espectroscopia de RMN ¹H

1° etapa - Materiais e equipamentos:

- 1) Prepare uma caixa pequena de isopor com gelo seco ou gelo raspado;
- 2) Separe tubos de *ependorf* (para 03 etapas de centrifugação);
- 3) Separe o solvente de extração (metanol e água na proporção 4:1, respectivamente);
- 4) Providencie um almofariz e mantenha-o em baixa temperatura (caixinha de isopor com gelo);
- 5) Prepare o nitrogênio líquido;
- 6) Configure a centrífuga em 4°C; a amostra deverá ser colocada em 12.000 rpm, por 10 minutos.

2° etapa - Preparo do solvente para extração de metabólitos:

- 1) Exemplo: 40 ml de metanol + 10 ml de água destilada (a proporção tem que respeitar o cálculo 4 (metanol): 1 (água destilada) – colocar em tubo de 50 mL e manter resfriado (mínimo –20°C);
- 2) Mantenha este solvente resfriando por 1 hora no –80°C antes do uso; ou por 2 horas no –20°C;
- 3) Para transporte das amostras, utilize a caixa de isopor com o gelo (evitar a variação de temperatura durante o processo de amostragem).

3° etapa - Preparo das amostras:

- 1) Retire o excesso de líquido de exposição das amostras (larvas) nas placas de petri, lave com o meio para embrião por 2 a 3 vezes e então transfira as larvas para um tubo de *ependorf* 2,0 mL e leve ao freezer –20°C por 5 a 10 minutos;
- 2) Após isto, as larvas estarão todas ao fundo do tubo e então o líquido deve ser retirado totalmente. Este procedimento deve ser realizado com os tubos dentro da caixa de isopor com gelo;
- 3) Após retirar o líquido, transfira as larvas para um almofariz e congele-as com nitrogênio líquido. Mantenha seus materiais em baixa temperatura na caixa de isopor. Após congelar as larvas, macere o conteúdo no almofariz;
- 4) Após obter um “pó”, transfira este material para outro tubo de *ependorf*;

- 5) Faça a pesagem de um tubo eppendorf vazio e depois com as amostras em uma balança analítica, antes de adicionar o solvente de extração;
- 6) Adicione a este pó obtido, 0,2ml da solução de extração para cada 5mg de amostra (ex.: se a amostra pesar 15mg, deverá adicionar 0,6ml da solução); tenha o cuidado de manter esta amostra em baixa temperatura, sempre na caixinha de isopor com gelo;
- 7) Após ter realizado as etapas em todas as amostras, mantenha-as na caixa de isopor no gelo enquanto realiza a homogeneização de cada amostra por 1 a 2 minutos no vórtex;
- 8) Então encaminhe as amostras para centrifugação (a centrífuga deverá estar preparada em 4°C) e centrifugue todas as amostras tratadas + amostra controle com 0,2 ml da solução de extração num tubo eppendorf extra. Realize a centrifugação de todas as amostras + o controle (apenas com 0,2 ml solvente de extração) em 12.000 rpm, a 4°C por 10 minutos;
- 9) Após a primeira centrifugação, colete o conteúdo sobrenadante com uma pipeta automática e transfira para novos tubos eppendorf. Realize esta ação para todas as amostras; mantenha as amostras sempre na caixa de isopor com gelo;
- 10) Realize nova centrifugação, como especificado no item 8 e, então repita o item 9. Repita as centrifugações de 2 a 3 vezes, conforme necessário;
- 11) Após as etapas acima, sua amostra poderá ser acondicionada em um freezer -80°C ou -20°C, até que seja levada para o processo de secagem. A secagem pode ser realizada num rotaevaporador, em temperatura ambiente;
- 12) Após secagem completa, adicione a solução tampão (conforme composição mencionada no item 6.2);
- 13) Centrifugue as amostras pela última vez e colete o líquido sobrenadante, cuidando para não coletar as partículas que ficam no fundo do tubo. Após isto, as amostras estão prontas para ir para o tubo de RMN.

2. Tabelas de frequência da análise ecotoxicológica

Tabela 1. Tabela exibindo as frequências de malformações apresentadas no grupo exposto em MSMA 10 mg L⁻¹.

<i>Alterações morfológicas</i>	<i>F. absoluta (fi)</i>	<i>F. relativa (fr)</i>	<i>Porcentagem (%)</i>
<i>Ausência de somitos</i>	0	0.00	0%
<i>Despigmentação</i>	11	0.61	61%
<i>Lordose espinhal</i>	1	0.06	6%
<i>Deformação de vitelo</i>	4	0.22	22%
<i>Retardo no crescimento</i>	2	0.11	11%
<i>Edema pericárdio</i>	0	0.00	0%
TOTAL	18	1.00	100%

Tabela 2. Tabela exibindo as frequências de malformações apresentadas no grupo exposto em MSMA 30 mg L⁻¹.

<i>Alterações morfológicas</i>	<i>F. absoluta (fi)</i>	<i>F. relativa (fr)</i>	<i>Porcentagem (%)</i>
<i>Ausência de somitos</i>	2	0.04	4%
<i>Despigmentação</i>	13	0.28	28%
<i>Lordose espinhal</i>	8	0.17	17%
<i>Deformação de vitelo</i>	6	0.13	13%
<i>Retardo no crescimento</i>	9	0.20	20%
<i>Edema pericárdio</i>	8	0.17	17%
TOTAL	46	1.00	100%

Tabela 3. Tabela exibindo as frequências de malformações apresentadas no grupo exposto em MSMA 60 mg L⁻¹.

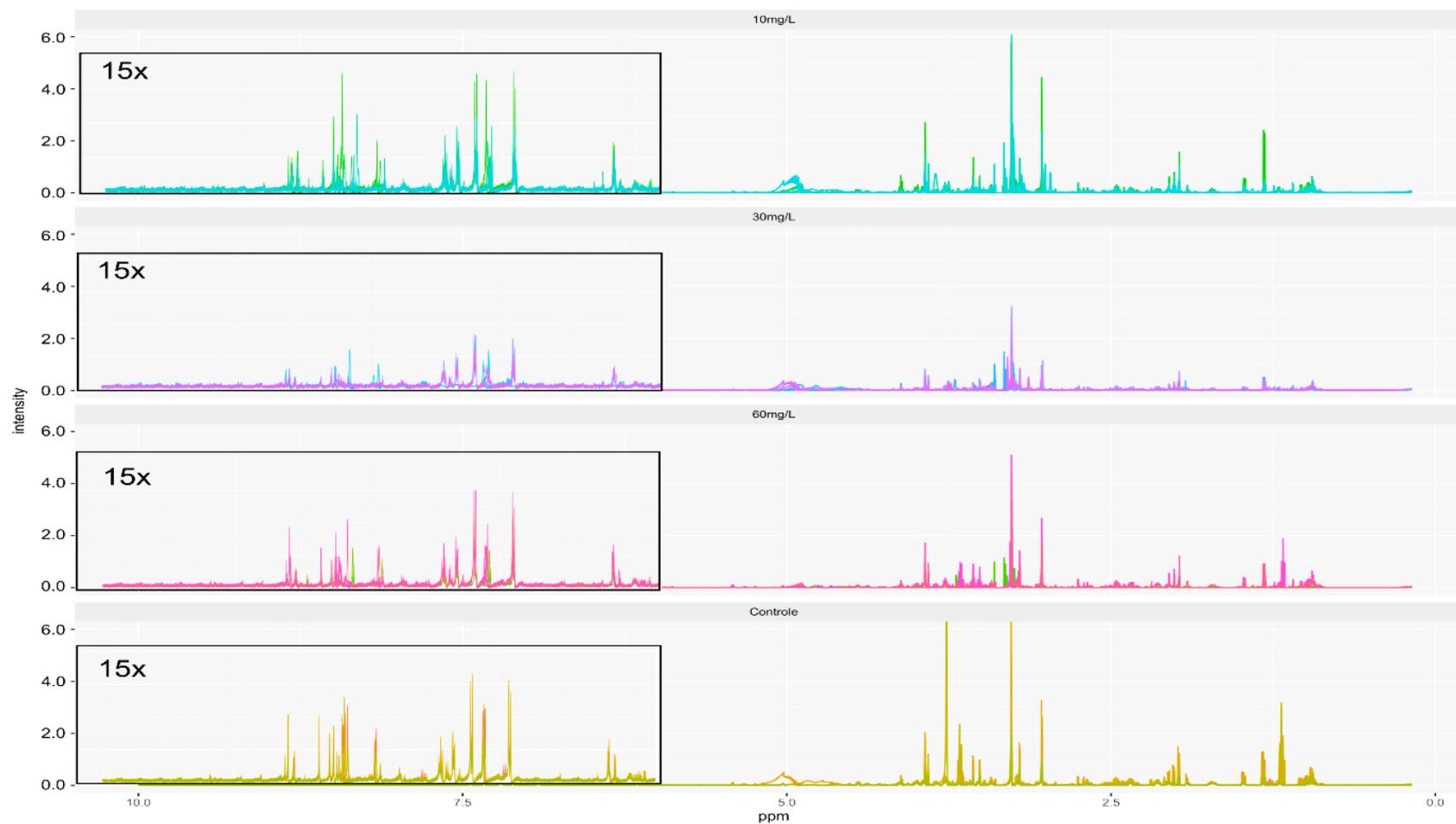
<i>Alterações morfológicas</i>	<i>F. absoluta (fi)</i>	<i>F. relativa (fr)</i>	<i>Porcentagem (%)</i>
<i>Ausência de somitos</i>	8	0.11	11%
<i>Despigmentação</i>	16	0.24	24%
<i>Lordose espinhal</i>	14	0.22	22%
<i>Deformação de vitelo</i>	8	0.11	11%
<i>Retardo no crescimento</i>	14	0.19	19%
<i>Edema pericárdio</i>	10	0.14	14%
TOTAL	74	1.00	100%

Tabela 4. Tabela exibindo as frequências de malformações apresentadas no grupo exposto em MSMA 60 mg L⁻¹.

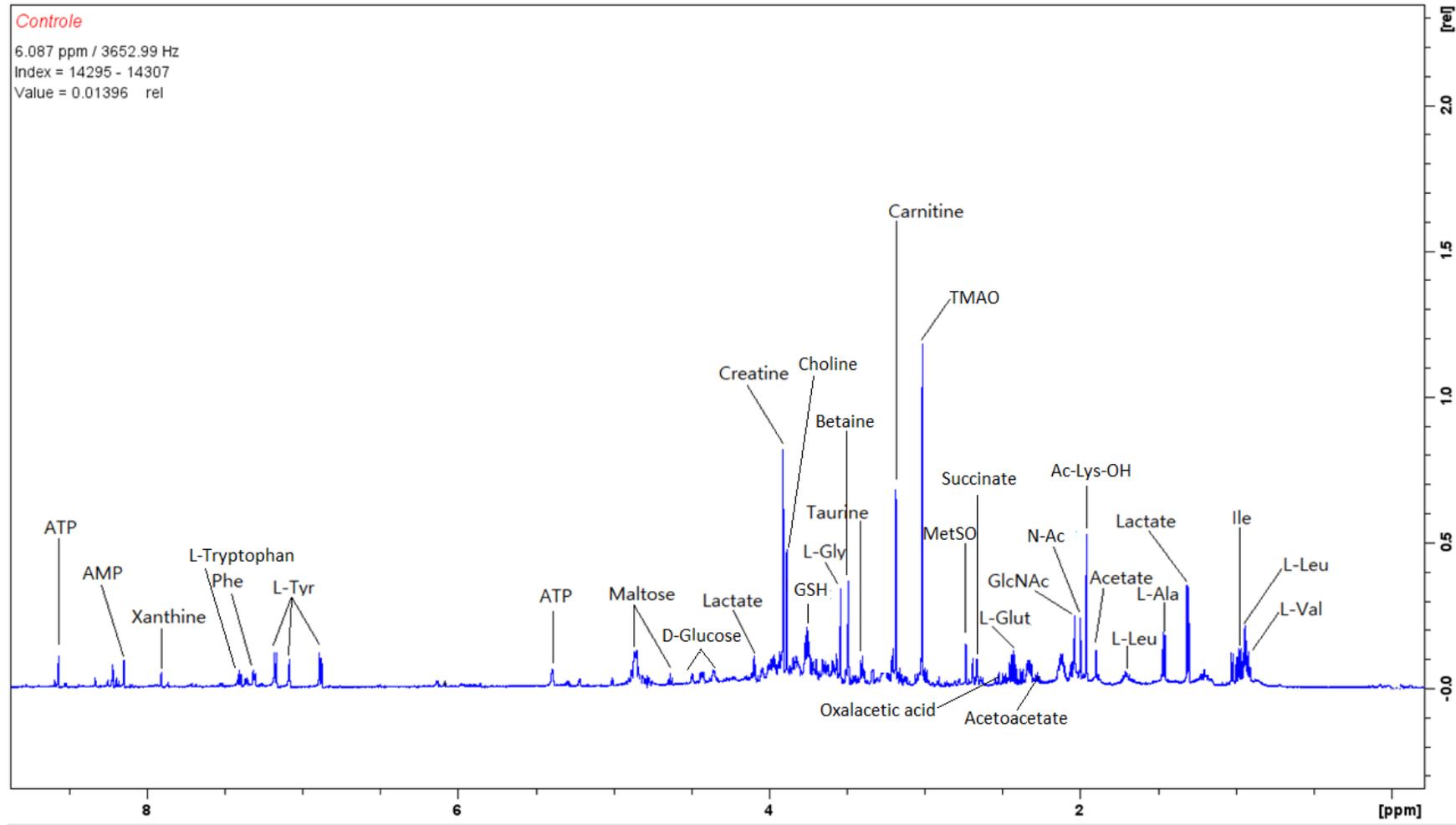
<i>Alterações morfológicas</i>	<i>F. absoluta (fi)</i>	<i>F. relativa (fr)</i>	<i>Porcentagem (%)</i>
<i>Ausência de somitos</i>	8	0.11	11%
<i>Despigmentação</i>	16	0.24	24%
<i>Lordose espinhal</i>	14	0.22	22%
<i>Deformação de vitelo</i>	8	0.11	11%
<i>Retardo no crescimento</i>	14	0.19	19%
<i>Edema pericárdio</i>	10	0.14	14%
TOTAL	74	1.00	100%

3. Espectros das amostras

Anexo 1. Espectros RMN ^1H (600 MHz, D_2O) para amostras em exposição às concentrações MSMA 10mg L^{-1} , 30mg L^{-1} , 60mg L^{-1} e grupo controle. Região de compostos aromáticos (6 – 8 ppm) aumento 15x.

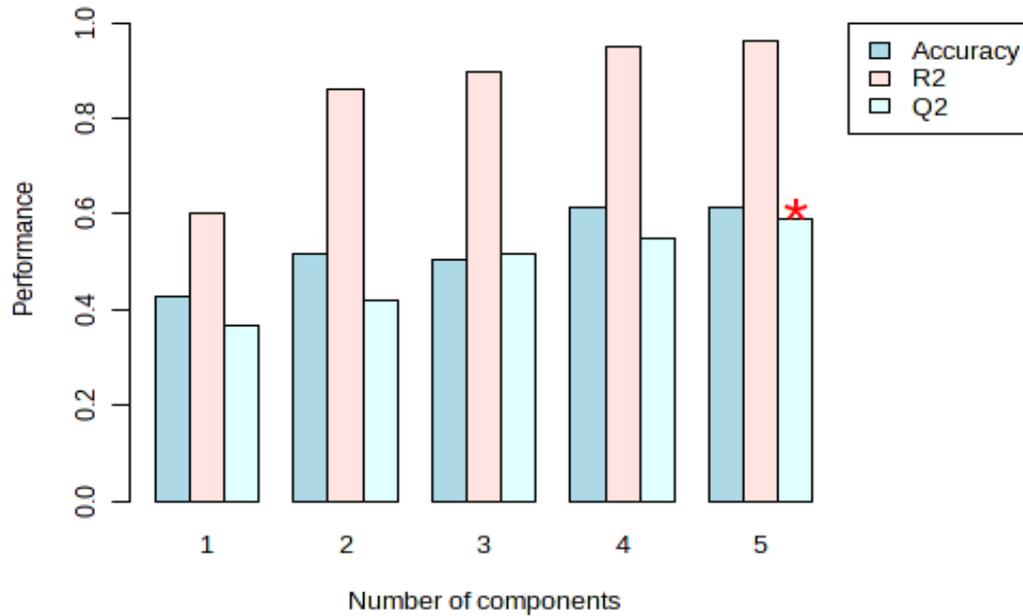


4. Espectro com identificação de metabólitos



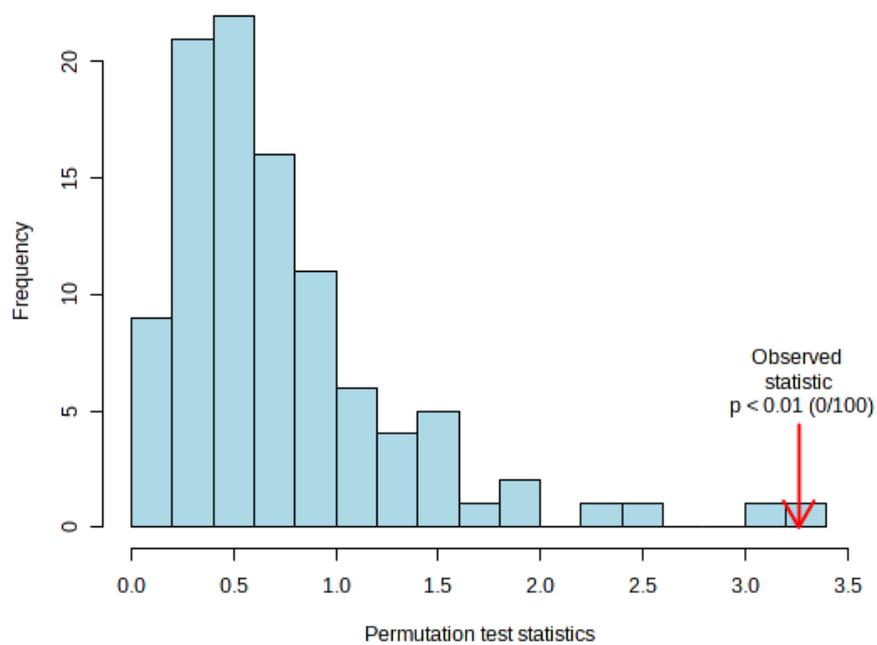
5. Gráficos de validação cruzada e permutação da análise multivariada supervisionada (PLS-DA e OPLS-DA).

A) Validação cruzada PLS-DA

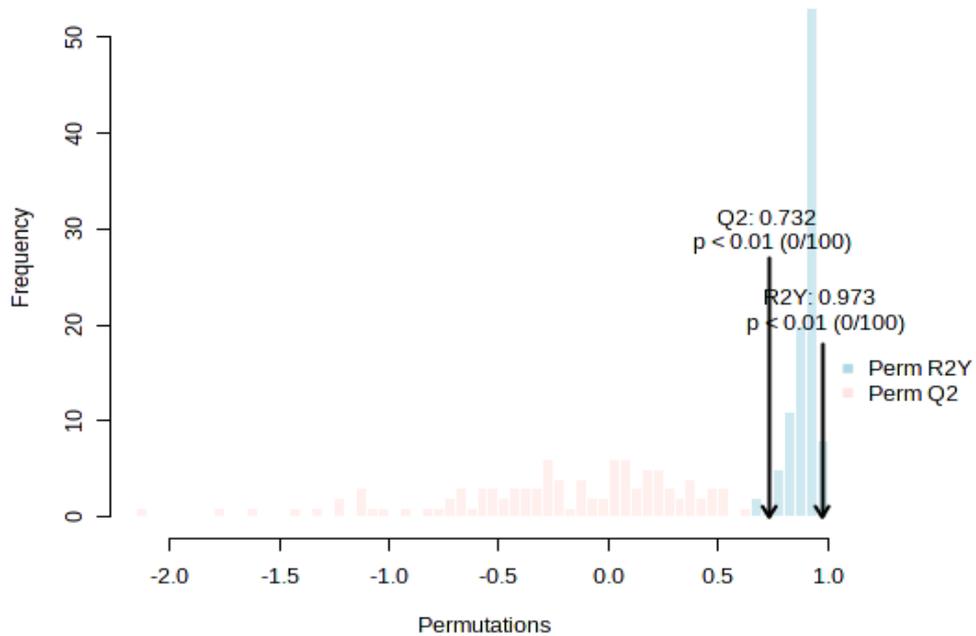


Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

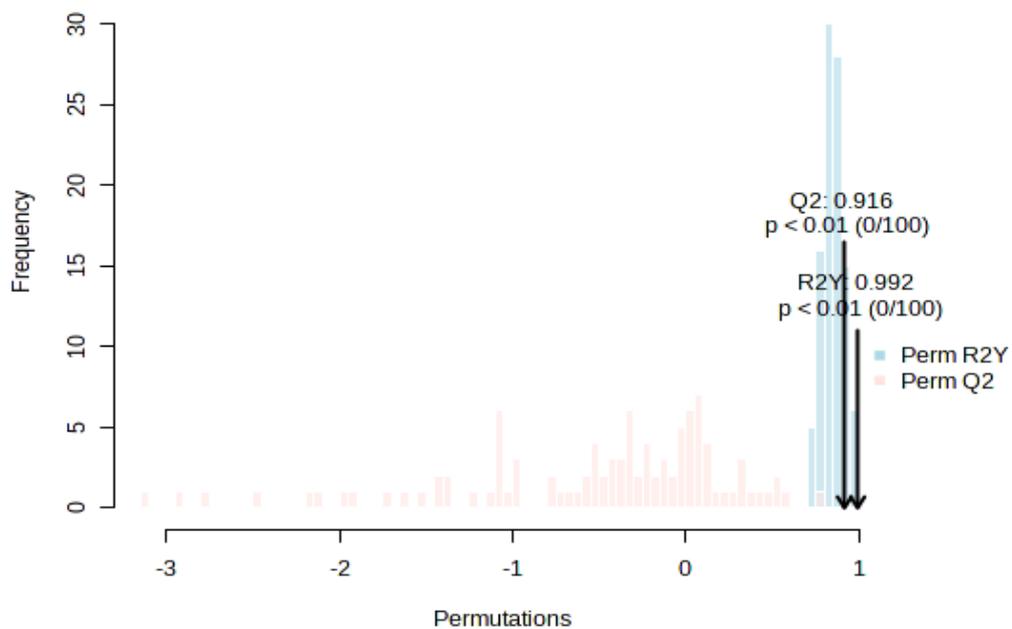
B) Permutação PLS-DA



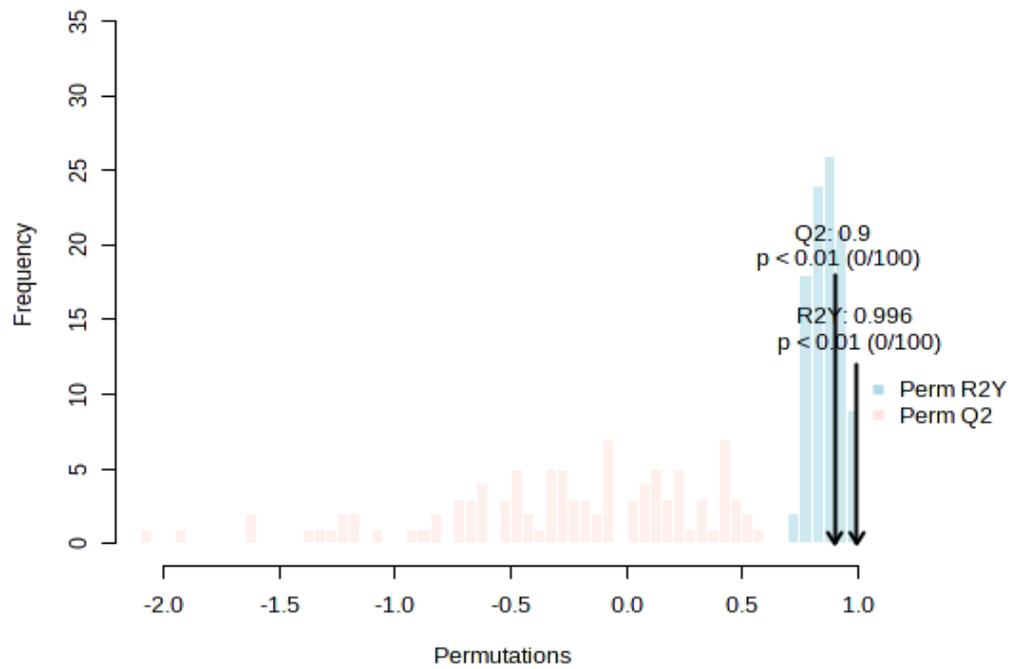
Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

C) Permutação OPLS-DA (Controle x MSMA 10mg L⁻¹)

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

D) Permutação OPLS-DA (Controle x MSMA 30mg L⁻¹)

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

E) Permutação OPLS-DA (Controle x MSMA 60mg L⁻¹)

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.