Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Licenciatura em Ciências Biológicas

Nerveson Pereira dos Santos

AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM ERITRÓCITOS DE PESCADORES EXPOSTOS À CONTAMINANTES INORGÂNICOS PRESENTES NA LAGUNA MUNDAÚ (MACEIÓ-AL).

Maceió –AL
2020

Nerveson Pereira dos Santos

AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM ERITRÓCITOS DE PESCADORES EXPOSTOS À CONTAMINANTES INORGÂNICOS PRESENTES NA LAGUNA MUNDAÚ (MACEIÓ-AL).

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Coordenação da Licenciatura em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a integralização dos créditos.

Orientação:

Ana Catarina Rezende Leite

Maceió
2020

Catalogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 –1767

S237a Santos, Nerveson Pereira dos.

Avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo em eritrócitos de pescadores expostos à contaminantes inorgânicos presentes na laguna Mundaú (Maceió-AL) / Nerveson Pereira dos Santos. – Maceió, 2020.

75 f. : il. color.

Orientadora: Ana Catarina Rezende Leite.

Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas: Licenciatura) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2020.

Bibliografia: f. 40-54.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE / ICBS

COORDENAÇÃO DO CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATA DE DEFESA DE MONOGRAFIA

No dia dezenove de fevereiro de dois mil e vinte, às 14:00 hs, estiveram reunidos na sala de aula n. 17 do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, tendo como Presidente da Banca Examinadora a Professora Orientadora Profa. Dra. Ana Catarina Rezende Leite, e os Membros Titulares Prof. Dr. Lucas Anhezini de Araújo, Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos, para a defesa de monografia do discente, **NERVESON PEREIRA DOS SANTOS** , matrícula: 15111519, intitulada: **AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM ERITRÓCITOS DE PESCADORES EXPOSTOS À CONTAMINANTES INORGÂNICOS PRESENTES NA LAGUNA MUNDAÚ (MACEIÓ-AL)** Após a apresentação do aluno (a), seguiu-se a arguição da Banca examinadora, sendo esta Monografia **aprovada com nota** (8,5) Oito vírgula cinco. O aluno terá 30 dias de prazo para entregar um (01) exemplar corrigido do trabalho digitalizado em CD à Coordenação do Curso com anuência do(a) orientador(a). Nada mais havendo a tratar, eu Prof. Msc. Saulo Verçosa Nicácio, lavrei a presente Ata, que vai por mim assinada e pelos Membros da Banca Examinadora.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Ana Catarina Rezende Leite

Prof. Dr. Lucas Anhezini de Araújo

Prof. Dr.Josué Carinhanha Caldas Santos

Maceió, 19 de fevereiro de 2020

Prof. Msc. Saulo Verçosa Nicácio
Coord. do Curso de Licenciatura em Ciências Biológica

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, José Nelson dos Santos e Adeilda Antônia Pereira, e a minha tia Maria de Fátima Lima da Silva, por todo apoio e ajuda financeira nos momentos difíceis.

À minha namorada Juliana Glasherster, por passar dias me pressionando a escrever esse trabalho e não me deixar desistir dos meus sonhos.

Ao amigo e companheiro de pesquisa Reginaldo Correia da Silva Filho, pela paciência, ensinamentos e o grande exemplo de conduta como pesquisador e como pessoa.

À minha orientadora Ana Catarina Rezende Leite, pela oportunidade de trabalho e orientação.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta pra a realização desse trabalho.

RESUMO

O Complexo Estuarino Lagunar Mundaú-Manguaba em Alagoas é uma fonte de renda e alimentação para a população. Porém os impactos da atividade antropogênica resultaram em um nível elevado de degradação e desequilíbrio nesse ecossistema. Como resultado a Laguna Mundaú apresenta em sua água íons nitratos, sulfatos, fosfatos e amônio, além de metais tóxicos como Pb e Hg. Dados não publicados do nosso grupo de pesquisa demostram que o Hg apresenta níveis acima do preconizados pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) Resolução 357º de 2005). O Hg é um metal tóxico com a capacidade de se acumular em tecidos que compõe o corpo humano, o que pode agravar o risco para pessoas expostas à água da Laguna Mundaú. Dessa forma o nosso trabalho buscou avaliar se o contato constante com a água gera danos celulares para os pescadores da Laguna Mundaú. Para isso esse trabalho avaliou os efeitos do Hg e seus derivados nos eritrócitos de pescadores da Laguna Mundaú verificando alguns biomarcadores de estresse oxidativo e os impactos da exposição no sistema redox. Foi coletado sangue por punção venosa de pescadores expostos (n= 20) e controles (n=9), que foram centrifugados e os eritrócitos foram isolados. Nos eritrócitos foram avaliados biomarcadores de estresse oxidativo (malondialdeido e sufidrilas) e a atividade das principais enzimas do sistema antioxidante (superóxido dismutase, catalase e glutationa peroxidase). Os resultados apresentam redução na atividade das principais enzimas antioxidantes nos eritrócitos do grupo exposto quando comparados ao grupo controle (superóxido dismutase 37%, catalase 40%, glutationa peroxidase 26%). Os biomarcadores de estresse oxidativo mostram que os eritrócitos do grupo exposto apresentam uma peroxidação lipídica duas vezes maior quando comparamos ao controle. Já os resultados de sufidrila não diferiram significativamente entre os grupos.Com isso, se conclui que a exposição à água da Laguna Mundaú que contém metais tóxicos como Hg levou à uma redução na atividade redox do sistema antioxidante e à danos oxidativos, como a peroxidação lipídica em eritrócitos dos voluntários expostos.

Palavras Chave: Hg, Estresse oxidativo, Danos celulares.

ABSTRACT

The Laguna Mundaú-Manguaba Estuary Complex in Alagoas is a soured of income and food for the population. However, the impacts of anthropogenic activity have resulted in a high level of degradation and imbalanced in this ecosystem. As a result, Laguna Mundaú has nitrate, sulfate, phosphate and ammonium ions in its water, in addition to toxic metals such as Pb and Hg. Unpublished data from our research group show that Hg has levels above tjose recommended by the National Environment Council (CONAMA) (Resolution 357 of 2005). Hg is a toxic metal with the ability to accumulate in tissues that make up the human body, which can aggravate the risk for people exposed to the water of Laguna Mundaú. Thus, our work sought to assess whether constant contact with water generates cellular damage for fishermen of Laguna Mundaú. For this purpose, this work evaluated the effects of Hg and its derivatives in the erythrocytes of fishermen in Laguna Mundaú, verifying some biomarkers of oxidative stress and the impacts of exposure in the redox system. Blood was collected by venipuncture from exposed fishermen (n=20) and controls (n=9), who were centrifuged and the erythrocytes were isolated. In erythrocytes, biomarkers of oxidative stress (malondialdehyde and sufidrilas) and the main enzymes of the antioxidant system (superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase) were evaluated. The results show a reduction in the activity of the main antioxidant enzymes in the erythrocytes of the exposed group when compared to the control group (superoxide dismutase 37%, catalase 40%, glutathione peroxidase 26%). The oxidative stress biomarkers show that the erythrocytes of the exposed group have a lipid peroxidation twice as high when compared to the control. Sufidril results did not differ signicantly between the groups, which leads to the conclusion that exposure to water in the Laguna Mundaú that contains toxic metals such as Hg led to a reduction in the redox activity of the antioxidant system and to oxidative damage, such as lipid peroxidation in erythrocytes of exposed volunteers.

Keywords: Hg, Oxidative stress, cell damage.

LISTA DE ABREVIATURAS

AT(D)P	Adenosina tri (di) – fosfato
CAT	Catalase
CELMM	Complexo esturiano lagunar Mundaú Manguaba
EGTA	Etileno glico – bis(b-aminoetil éter)-N,N,N´,N´-ácido tetraacético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
Hb	Hemoglobina
MeHg	Metilmercúrio
MetHb	Metahemoblobina
NAD^+	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (estado oxidado)
$NADP^+$	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (estado oxidado)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (estado reduzido)
$O_2^{\bullet -}$	Radical superóxido
$OH^{\bullet}$	Radical hidroxil
SOD	Superóxido dismutase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Transição do estado T (tenso) para o estado R (relaxado) da hemoglobina

Figura 2: Representação da relação entre enzimas antioxidantes.

Figura 3: Atividade do sistema antioxidante enzimático em eritrócitos.

Figura 4: Marcadores de estresse oxidativo.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 10

2 REVISÃO DA LITERATURA 12

2.1 Poluição aquática e Caracterização do Complexo Estuarino Lagunar Mundaú-Manguaba (CELMM). 12

2.2 Contaminantes inorgânicos e os impactos causados a saúde humana. 15

2.3 Mercúrio e indução de toxidade. 18

2.4 Arsênio, Cádmio, Chumbo e indução de toxidade. 20

2.5 Eritrócitos e Hemoglobina. 24

2.6 Estresse oxidativo: produção de espécies reativas e sistema antioxidante. 27

3 OBJETIVOS 29

4 MATERIAIS E MÉTODOS. 30

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO. 32

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS. 36

REFERENCIAS 36

INTRODUÇÃO

O Complexo Estuarino Lagunar Mundaú-Manguaba (CELMM) é um importante ecossistema do Estado de Alagoas que por sua extensão e riqueza de organismos, já ofereceu grandes serviços às comunidades dos cinco municípios que o circundam fomentando à atividade pesqueira e o turismo dos estuários e manguezais. Todavia, os problemas ambientais advindos da atividade humana como crescimento populacional desordenado, ausência de saneamento básico, desmatamento, ausência de coleta seletiva do lixo, despejo de efluentes domésticos e industriais, resultaram na degradação do CELMM gerando um desequilíbrio para as vidas desse ecossistema (ARAUJO et al., 2008; FRAGOSO et al., 2009).

Essa poluição levou à alterações ambientais nas características da água dos estuários. Naturalmente todas essas mudanças provocaram a ausência de um número considerável de espécies, o que afetou a manutenção da cadeia trófica. O CELMM encontra-se com sua capacidade reduzida e com a presença de Hg (mercúrio), Pb (chumbo), íons nitratos, sulfatos, fosfato e amônio, alterando as condições da água e dificultando as condições de vida (SILVA, 2017).

Entre 2017 e 2018 foram realizadas coletas em 10 pontos do CELMM que revelaram concentrações elevadas de Pb (mínima= 114,0 µg/L e máxima= 1230,0 µg/L) e Hg (mínima= 0,012 µg/L máxima= 1,53 µg/L). No caso do Hg essa concentração máxima é 7,8 vezes maior do que o preconizado pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) Resolução 357º de 2005) (SANTOS, 2019) (Dados não publicados).

Considerados os dados citados anteriormente e a capacidade do Hg de se acumular nos tecidos humanos podendo afetar uma variedade de processos biológicos e desencadear o estresse oxidativo (VALKO, 2007). Esse trabalho buscou avaliar os impactos causados à saúde humana por exposição ao Hg presente na Laguna Mundaú (Maceió-AL), buscando

formas menos invasivas e que demonstrem os impactos celulares causado por essa exposição.

Atualmente o uso de células sanguíneas, como os eritrócitos é interessante para a avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo, uma vez que os eritrócitos são exposto a tudo que é absorvido pelo organismo e chega a corrente sanguínea. Apesar disso os eritrócitos dispõe de um eficiente sistema de defesa antioxidante enzimático que é composto por enzimas capazes de detoxificar espécies radicalares danosas à célula (KARIMI et al. 2016, YILDIZ et al. 2017).

As principais enzimas do sistema antioxidante são a Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutationa Peroxidase (GPx). A SOD dismuta o radical superóxido ($^{-}O_2$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), já a CAT é capaz de decompor o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e (O2), no caso da GPx essa selenoproteína é capaz de converte o (H_2O_2) em água (H_2O). Além disso o sistema antioxidante enzimático ainda é composto por Glutationa Redutase uma importante enzima antioxidante hidrossolúvel que colabora na manutenção do balanço da Glutationa dissulfidica (GSSG) em Glutationa reduzida (GSH), juntas com os tióis sulfidrila que funcionam como mecanismos de ação antioxidante (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

Acreditando que o contato contínuo com a água do CELMM possa promover a acumulação de Hg no corpo humano e gerar danos celulares aos pescadores da Laguna Mundaú (Maceió-AL), esse trabalho avaliou em eritrócitos de pescadores os biomarcadores de estresse oxidativo (Peroxidação lipídica e o Conteúdo de tióis totais) e a atividade das principais enzimas que compõe o sistema antioxidantes.

REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Poluição aquática e Caracterização do Complexo Estuarino Lagunar Mundaú-Manguaba (CELMM).

A hidrosfera se constitui de diversos ecossistemas aquáticos complexos, dentre os quais podemos citar os rios, lagos, lagoas, lagunas, estuários, mares e oceanos. Cada ecossistema aquático tem seu conjunto de interações específicas, sendo essas bióticas e/ou abióticas e intimamente dependentes das características físico-químicas da água (RAND et. al, 1995; NÓBREGA T. F, 2015). Desse modo, percebemos a vulnerabilidade desses sistemas aquáticos por serem abertos e dinâmicos, sendo qualquer alteração significativa, podendo afetar o equilíbrio da biodiversidade e reduzir a qualidade dos recursos hídricos, prejudicando assim a sinergia dos organismos que dependem direta ou indiretamente desses recursos (ORSOLIN DA SILVA, 2009; PELÁEZ-RODRIGUES et. al, 2000).

No Brasil, devido a sucessivos eventos históricos que propiciaram o desenvolvimento socioeconômico do país a população concentrou-se em grande número nas zonas costeiras, segundo o IBGE (2011), 26,6% da população brasileira reside em municípios da zona costeira, ou seja, aproximadamente 50,7 milhões de habitantes.

Essa ocupação desordenada ainda é agravada pela ausência de condições mínimas de saneamento básico, coleta seletiva dos resíduos ou tratamento de esgoto e limpeza urbana, essas famílias são potencialmente vistas como fontes poluidoras do meio ambiente, tornando as metrópoles litorâneas as maiores fontes de degradação ambiental (MMA, 2005).

A zona costeira brasileira pode ser entendida como a extensa faixa litorânea do país, sendo uma parte terrestre que abrange diversos municípios e outra parte marítima mais conhecida como mar territorial brasileiro com a extensão de 12 milhas a partir da costa. E essa expansão por vários municípios brasileiros, garante a variedade climática e de ecossistemas como, por exemplo, dunas, praias, lagunas, lagoas, estuários, restingas, manguezais e marismas (MMA, 2008).

Entre os ecossistemas dos ambientes costeiros brasileiros citados anteriormente, um dos que merece atenção especial são os estuários por sua alta taxa de produtividade biológica, a capacidade exportadora de biomassa para sistemas adjacentes e a oferta de abrigo para diversas espécies (CLARK, 1996; THURMAN e TRUJILLO, 1999; FERNANDES,

2001). Os estuários são corpos d'água costeiros, parcialmente fechados onde ocorre o encontro da água doce vinda do continente com a água salgada do oceano, sendo um ecossistema de transição entre o ambiente marinho e o ambiente de água doce, esses ecossistemas ainda podem ser formados por um conjunto de lagoas ou lagunas, nesse caso será chamado de complexo estuarino-lagunar (TEIXEIRA, 1969; PRITCHARD, 1967).

Para este trabalho definiremos Laguna usando a percepção de Patchineelam (2000), ou seja laguna são corpos d'água isolados parcialmente do oceano, fruto da elevação do nível do mar na era Cenozoica e da formação da restinga arenosa por meio dos processos marinhos. Sendo assim essas lagunas são alimentadas por canais de marés possuindo como características marcantes água salobra, vegetação de mangue e um fluxo de entrada e saída de água marinha (TUNDISI e MATSUMURA-TUNDISI, 2008; ESTEVES, 2011). São essas características variadas desse sistema comum nas regiões litorâneas do Brasil que proporcionam para esse ecossistema um grau de importância fundamental, tendo em vista a sua rica biodiversidade tanto da flora quanto da fauna seja ela aquática ou terrestre, aumentando seu valor econômico social e turístico (LANZER, 2005).

Em Alagoas o Complexo Estuarino Lagunar Mundaú-Manguaba (CELMM), possui uma área total de aproximadamente 55 km², sendo composto pela laguna Mundaú situada ao sul de Maceió, a capital de Alagoas, e banhando outros municípios como Coqueiro seco, Santa Luzia do Norte, Marechal Deodoro e Pilar, sendo os dois últimos municípios os únicos que são banhados pela laguna Manguaba (TAMANO, 2015). Esse rico complexo estuarino lagunar oferece serviços essenciais às comunidades circunvizinhas, seja por sua elevada produtividade biológica, motivada por suas características hidrodinâmicas, ou por reter nutrientes que favorecem a flora dos manguezais, garantindo uma sustentabilidade ecológica (FERNANDES, 2001; MIRANDA et. al, 2002).

Este berçário de diversas formas de vida, já teve seus registros taxonômicos em outras décadas, de acordo com Alagoas (1980), a vegetação dos manguezais era constituída em sua maioria de *Laguncularia racemosa* (L.) C.F. Gaertn (mangue branco), *Rhizophora mangle* L. (mangue vermelho), *Avicennia germinans* L. (mangue preto) e *Avicennia shaueriana* Stapf e Leechm. (mangue canoé). A fauna de zooplâncton também teve seus registros, foram

identificados os filos de Copepoda, Foraminifera, Polychaeta e mais de 29 espécies de moluscos dentre elas o *Mytella charruana* (Orbigny, 1842) encontrado em maior abundancia (ALAGOAS, 1980; SILVA e PEREIRA-BARROS, 1987; SILVA, 1994).

Todavia, o complexo estuarino lagunar Mundaú-Manguaba não foge à regra dos estuários brasileiros e é atingido pelo impacto ambiental causado pelas atividades antrópicas, tanto derivado da atividade industrial quanto das consequências da concentração populacional nos assentamentos urbanos (MACEDO, 2000; ARAUJO e FREIRE, 2007). Esses dois fatores são muito expressivos quando tratamos de poluição dos corpos d'água, principalmente se considerarmos que essa região sofre a influência do pólo cloroquímico e da atividade sucroalcooleira ou se dedicarmos a atenção aos aproximadamente, 260 mil habitantes que rodeiam esse complexo e aos resíduos que produzem sem saneamento básico (IMA, 2016).

A União Europeia, define poluição como qualquer forma de matéria indesejada e muitas vezes perigosas, que é introduzida nos ambientes da Terra através do homem gerando uma ameaça e/ou prejudica a saúde humana (UNION, 2010; LADRIGAN et al., 2018). Considerando rios, lagoas, lagunas e outros ecossistemas costeiros como os receptores finais das diversas formas de poluição, é possível considerar que tanto a poluição aquática que deriva de resíduos industriais quanto a poluição oriunda de dejetos domésticos já se tornou uma problema de saúde pública (MARIA et. al, 2003).

As consequências da poluição desses recursos hídricos podem ser irreversíveis principalmente quando tratamos de resíduos químicos que podem ser letais as diversas formas de vida que dependem desses ambientes costeiros, como exemplo dessa substâncias químicas inorgânicas mais resistentes e danosas estão os metais tóxicos, por possuírem características singulares, podendo formar complexos e precipitarem, garantindo assim a mobilização, transporte, biodisponibilidade e acumulação na cadeia trófica (MONTANHA et al.,2011; AL-MUSHARAFI et al., 2014).

Ao longo de décadas os impactos ambientais foram se intensificando na região desse complexo estuarino lagunar, a vegetação costeira foi sendo desmatada, resíduos domésticos e industriais foram despejados nas lagunas que o compõe e essas condições adversas, provocaram um desequilíbrio nos níveis tróficos, a diminuição e a mortandade de

muitas espécies, tanto da fauna quanto da flora (ARAUJO et al., 2008; FRAGOSO et al., 2009).

Nos últimos 10 anos encontramos uma série de trabalhos que demonstram uma preocupação com os impactos da poluição no CELMM. O trabalho de SANTOS, T.M.M., 2009, por exemplo faz uma análise química e microbiológica do *Mytella charruana*, um bivalve mais conhecido como sururu que faz parte dos pratos típicos da região.

Em 2012 o trabalho de LIMA, 2012, avaliou as condições físico-químicas da água e a presença de elementos potencialmente tóxicos em alguns moluscos. Mais preocupados com as condição socioeconômica e a caracterização da pesca artesanal os trabalhos de SANTOS, 2013 e TAMANO et al., 2015 caracterizam a pesca e as condições de vida dos pescadores que vivem no entorno do CELMM.

SILVA, 2017 avaliou a influência da matéria orgânica e a disponibilidade de metais potencialmente tóxicos em particulado suspensos. Enquanto Wanderley, 2018 extraiu e caracterizou substâncias húmicas do CELMM e a interação dessas com íons Hg (II). Apontando a contaminação por mercúrio e chumbo associado à matéria orgânica, além de outros metais tóxicos e uma alta concentração de íons nitratos, sulfato, fosfatos e amônio capaz de reduzir a oferta de oxigênio, elevar o pH da água (SILVA, 2017 E WANDERLEY, 2018).

Entre 2017 e 2018 foram realizadas coletas em 10 pontos do CELMM que revelaram concentrações elevadas de Pb (mínima= 114,0 µg/L e máxima= 1230,0 µg/L) e Hg (mínima= 0,012 µg/L máxima= 1,53 µg/L). No caso do Hg essa concentração máxima é 7,8 vezes maior do que o preconizado pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) Resolução 357º de 2005) (SANTOS, 2019) (Dados não publicados). Não foram encontrados trabalhos que demonstrem os impactos dessa contaminação em células humanas de pescadores exposto constantemente a água do CELMM. Por isso esse trabalho busca demonstrar essa relação entre exposição e danos celulares, afim de encontrar dados que permitam ser comparados com resultados encontrados na literatura a respeito do tema.

2.2 Contaminantes inorgânicos e os impactos causados a saúde humana.

Os ambientes costeiros brasileiros apresentam constantes modificações devido as atividades humanas, sejam elas geradas pelo desmatamento e exploração desses ecossistemas ou pelo despejo de resíduos industriais ou urbanos. Ambientes influentes na manutenção da vida, como os estuários, são afetados e isso proporciona uma quebra na sinergia do ecossistema. Esses corpos d'água de áreas costeiras costumam ser atingidos por poluição aquática de diversas formas e entre essas uma potencialmente perigosa ao ambiente e os organismos que nele vivem ou que dele depende é a poluição por metais tóxicos (RATTNER, 2009).

Os metais podem ser encontrados no solo, em formações rochosas, na constituição de proteínas e podem ser caracterizados como micronutrientes para humanos e plantas, como é o caso do manganês em plantas e do ferro em humanos. Todavia, mesmo esses metais importantes para os organismos vivos, em doses excessivas podem induzir uma possível contaminação. Dessa forma, esses elementos potencialmente tóxicos: arsênio (As), bário (Ba), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobalto (Co), cobre (Cu), crômio (Cr), estrôncio (Sr), manganês (Mn), mercúrio (Hg), molibdênio (Mo), níquel (Ni), selênio (Se), Vanádio (V) e zinco (Zn), sendo essenciais aos seres vivos ou não, podem causar danos por toxidade (CAMPOS, 2010).

Um exemplo de micronutriente essencial para a melhoria da saúde humana é o crômio (Cr) em sua forma Cr (III), que uma vez ingerido em alimentos ou água pode contribuir para a potencialização dos efeitos da insulina, estudos apontam que a ausência desse mineral essencial pode ocorrer por exemplo em pessoas com hiperglicemia em jejum, síndrome metabólica, aumento da gordura corporal e distúrbios de fertilidade (ALISSA et al.,2009; BAGCHI et al., 2002; HUMMEL et al., 2007). No entanto, nem todas as formas de crômio são seguras a vida, na verdade a forma crômio (VI) é bem perigosa e considerada carcinogênica independente das formas de exposição podendo ter ulcerações imediatas no caso de absorção pela pele, irritação das vias aéreas no caso de inalação ou ainda sintomas gastrointestinais, insuficiência renal e hepática no caso de ingestão (KEEGAN et al., 2008; QUIEVRYN et al., 2002).

Assim como o crômio o cobalto (Co) também é um micronutriente importante para a vida humana, ainda assim sua forma oxidada Co (II) é potencialmente cancerígena e promove danos aos cromossomos e alterações severas na estrutura do DNA, sendo assim a exposição a doses diárias maiores que 5 mg podem causar asma, pneumonia, alterações hormonais na tireoide, edema pulmonar periférico e atrofia do nervo ótico (KIM et al.,2008; GALANIS et al., 2009).

O cobre (Cu) é mais um dos metais que contribuem diretamente para a manutenção da vida humana, graças as suas propriedades o cobre participa como cofator de diversas proteínas importantes e está envolvido no transporte de elétrons. Em caso de ingestão do cobre na alimentação, a absorção é feita pelo intestino delgado e armazenado no fígado, desse ponto a diante o cobre pode participar de diversos processos como na composição da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, fazendo parte do Complexo citocromo C oxidase ou do sistema antioxidante compondo a estrutura da superóxido dismutase citosólica (VALKO et al., 2005; SHIM e HARRIS, 2003).

Todavia, o cobre em excesso pode trazer consequências para a vida humana, estudos apontam o excesso de cobre em pessoas com complicações do diabetes e em pacientes com aterosclerose, nas duas situações promovendo a produção de radicais livres aumentando assim o estresse oxidativo, as concentrações de cobre ainda são consideravelmente altas em doenças como o câncer de mama, cervical, ovário, pulmão, próstata, estomago e leucemia (GUPTE et al., 2009; HAIDARI; YIM et al., 2001; KANG et al.,2000).

Um outro metal essencial para a construção de metaloproteinas é o zinco (Zn). Esse elemento pode ser encontrado em diversos órgãos do corpo humano mas sempre em baixas quantidades, sendo que no corpo humano adulto temos em média 1,5 à 2,5 g de zinco. Essa pequena quantidade de zinco é responsável por gerenciar a ação da insulina e a concentração de glicose no sangue, além disso desempenha um importante papel no desenvolvimento e na manutenção do sistema imunológico (BENTERS et al., 1997; BRAY e BETTGER,1990).

A ausência de zinco por sua vez pode acarretar problemas graves na saúde humana já que o sistema imune ficará comprometido e a cicatrização será mais lenta. Pessoas

com deficiências de zinco podem apresentar dermatites e deficiência na reprodução. O zinco ainda pode funcionar como um antioxidante por sua característica de metal inerte redox, podendo proteger os grupos proteicos, em especial os grupos sulfidrilas, dos ataques dos radicais livres (PRASAD, 2009; VALKO, 2005).

2.3 Mercúrio e indução de toxidade.

O mercúrio (Hg) é um metal tóxico que apresenta forma líquida em pressão e temperatura ambiente e volatiza-se lentamente. Além disso o vapor de mercúrio pode permanecer longos períodos na atmosfera. Apesar de ser considerado um metal que oferece riscos à saúde humana, o Hg é amplamente utilizado pela indústria em células eletrolíticas destinadas a fabricação de cloro (Cl), lâmpadas fluorescentes, fungicidas, germicidas, amálgamas dentarias, termômetros, termostatos, baterias, pilhas e conservantes de vacina como o timerosal (BELZILE, 2008; KUMAR et al., 2009).

Na crosta terrestre o mercúrio pode ocorrer nas formas orgânicas e inorgânicas variando de forma e estado de acordo com seu ciclo biogeoquímico. Na forma inorgânica pode ser encontrado em três estados de oxidação que são: mercúrio elementar (Hg^0), íon mercuroso (Hg_2^{2+}) e íon mercúrico (Hg^{2+}), a forma orgânica por sua vez apresenta o íon mercúrico ligado covalentemente a um radical orgânico formando metil mercúrio (CH_3Hg^+), dimetil mercúrio ($(CH_3)_2Hg$), etil mercúrio (EtHg) e fenil mercúrio (PhHg) (SINICROPI, 2010; BERNHOFT; 2012).

O mercúrio elementar tem uma alta capacidade de se difundir através de membranas e essa alta capacidade lipofílica garante a travessia da barreira hematoencefálica. Na corrente sanguínea o mercúrio elementar pode ser oxidado a íon mercúrico se associando a diversas estruturas celulares (proteínas de membrana, enzimas, tióis proteicos e não proteicos) prejudicando o funcionamento dos diversos tipos celulares que compõem o sangue (BALLATORI,1985; CLARKSON, 2007).

A biometilação do mercúrio inorgânico feita por bactérias redutoras de sulfatos é uma importante fase para a ciclagem do mercúrio que em sua forma metil mercúrio (MeHg)

pode ser facilmente absorvido pelo trato gastrointestinal. Uma vez que o metil mercúrio chega a corrente sanguínea pode gerar danos celulares por ter um grande potencial tóxico e afinidade com grupos sufidrila (-SH), cisteínas que compõem proteínas e enzimas, glutationas (GSH), que funcionam como um mecanismo antioxidante formando conjugados de MeHg-GSH ou MeHg-Cys (COMPEAU, 1985; CLARKSON, 2006).

O mercúrio pode ainda se ligar à metalotioneínas substituindo zinco (Zn), cobre (Cu) e outros elementos que participam do metabolismo humano como o selênio afetando a atividade de metaloenzimas e colaborando para os possíveis danos em suas atividades e a desordem na homeostase redox (KEHRIG et al.,2016).

O Hg causa impactos na homeostase e na permeabilidade plasmática, formas orgânicas como metil mercúrio (MeHg) e formas inorgânicas como cloreto de mercúrio ($HgCl_2$) foram estudadas causando um aumento de cálcio em células do sistema imune, esse influxo de cálcio nas células conta com o cálcio extracelular e envolve o cálcio do retículo endoplasmático e em menor quantidade o cálcio mitocondrial, causando uma desordem em nível celular (LOITTO e MAGNUSSON, 2004; KUO et al., 2002). O Hg tem a característica de se acumular nos ambientes e nos organismos, sendo distribuídos para vários tecidos gerando distúrbios. A acumulação desse metal é relacionada a disfunções neurológicas; como déficit de memória e cognição; nefropatia, disfunção glomerular, disfunção motora, cardiopatias, hipertensão, arritmias e complicações em órgão reprodutores (DABEKA, 2004; TACON, 2013).

Todas as doenças crônicas relacionadas a mercúrio são precedidas de um evento celular específico que se chama estresse oxidativo tal evento é caracterizado como o desequilíbrio entre pró-oxidantes – antioxidantes, com um considerável aumento dos pró-oxidantes. Isso porque o mercúrio exerce uma toxidade capaz de alterar as estruturas celulares como a conformação das principais enzimas do sistema antioxidante, o que aumenta a taxa de espécies reativas de oxigênio (EROs), levando à peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e DNA (BRITO et al., 2007; CHIHUAILAF et al., 2002).

As células dispõem de um sofisticado sistema antioxidante não enzimático e um outro enzimático para compensar a superprodução de EROs, porém esse sistema antioxidante enzimático é composto principalmente por metaloenzimas que quando expostas à metais

como Hg podem sofrer alterações prejudiciais ao seu funcionamento, colaborando para o aumento de EROs (BERNTSSEN et al., 2003; ERCAL et al., 2001).

2.4 Contaminantes inorgânico e indução de toxidade.

O Arsênio é um metaloide ou semimetal presente naturalmente no solo, sedimentos, água, ar e organismos vivos. No entanto o uso de arsênio na constituição de herbicidas, pesticidas, inseticidas, fertilizantes, conservantes de madeira, e queima de combustíveis fósseis, trouxe um recrudescimento desse elemento no meio ambiente. As formas mais comuns de arsênio são arsenatos (As V) e arsenitos (As III) com números de oxidação -3, 0, +5, +3 e podendo formar compostos orgânicos e inorgânicos no ambiente ou no corpo humano (HEI E FILIPIC, 2004; FERRARIO et al, 2008).

A presença arsênio no solo está intimamente ligada ao tipo e a quantidade de elementos que o compõe, somados ao pH do solo e o seu potencial redox. O arsênio ocorre com maior frequência em espécies inorgânicas podendo no solo se ligar a matérias orgânicas, resultado da metilação feita por microorganismos. Esse é o mecanismo que em condições de oxidação transforma o As (III) em monometilarsônico (MMA), ácido dimetilarsinico (DMA) e trimetilarsina óxido (TMAsO). O arsênio pentavalente As (V) é uma espécie mais estável que o arsênio trivalente e tem a capacidade de associar-se facilmente a argila, ferro, manganês e materiais orgânicos (HUGHES et al., 2011; CHEN et al., 2012).

A água também pode ser um reservatório de arsênio, a água de solos subterrâneos por exemplo promove a interface entre arsênio e microorganismos facilitando a metilação desse semimetal. A água de ambientes marinhos também pode apresentar algumas formas orgânicas de arsênio como os sais tetrametilarsônio, arsenocolina, arsenobataína e arsina. Porém apenas uma pequena fração do arsênio total se mantem em solução na água do mar, já que a maior parte é absorvida por organismos vivos que se alimentam dos particulados em suspensão, como moluscos crustáceos e peixes (KWONG et al, 2010; SMITH E STEINMAUS, 2009).

O arsênio é um elemento que pode se acumular em tecidos vivos, por isso o contato constante com alimentos contaminados ou água contaminada pode trazer um grande risco a saúde humana. A acumulação em órgãos humanos depende de fatores como perfusão sanguínea, volume tecidual, coeficiente de difusão, características das membranas e afinidades teciduais (MANDAL E SUZUKI,2002).

A exposição crônica a arsênio já foi relacionada à problemas cardiovasculares como despolarização do miocárdio, arritmias cardíacas, espessamento dos vasos sanguíneos, hipertensão e infarto do miocárdio dentre outros (MOON et al., 2013; KUO et al., 2017).

Mas esse tipo de exposição é sistêmica e não prejudica apenas um tecido, o funcionamento do fígado e dos rins também podem ser afetados, os danos ao fígado podem trazer sintomas como cirrose, varizes esofágicas com hemorragia, colecistite, funções mitocondriais prejudicadas, insuficiência hepática primária e neoplasias. Os rins são a principal via de excreção do arsênio e apesar de apresentarem uma certa resistência ao semimetal podem sofrer necrose nos capilares, nos túbulos e nos glomérulos (LEE et al., 2003; SABATH et al., 2012).

Os danos à pele também são comuns na exposição crônica ao arsênio, existem relatos da afinidade desse elemento por tecidos queratinosos como unhas e cabelos. Os danos causado por arsênio podem se apresentar como manchas difusas na pele ou como melanose, leucomelanose, queratose, hiperqueratose, hiperpigmentação, papilomatose e tipos diferentes de carcinomas (WAALKES et al., 2004; REN et al., 2011).

Estudos como o Kibriya et al, 2017 apontam as interações gene-gene e gene-ambiente como parte importante na formação de arsenicoses e males derivados da exposição ao As, gerando instabilidade gênica e estresse oxidativo. Isso porque em nível celular o arsênio pode causar alterações metabólicas como a redução na produção de aminoácidos prejudicando a sinalização celular, a expressão gênica e as funções cerebrais e neuroendócrinas (KIBRIYA et al.; ZHOU et al., 2017).

Alguns trabalhos ainda apontam danos neurais em indivíduos expostos à arsênio inorgânico de forma crônica, os danos mais comuns são neuropatia periférica tanto sensorial

quanto motora, dormência nos pés e mãos, perda de reflexos e fraqueza muscular (TSAI et al., 2003; TOLINS et al., 2014).

Esses efeitos crônicos causados por As, tem início quando o corpo humano é exposto a doses regulares de arsênio contido na água ou em alimentos, essas espécies de arsênio sofrerão reações de oxidação-redução entre arsênio pentavalente e arsênio trivalente no plasma e reações consecutivas de metilação no fígado, onde as enzimas metiltransferase de arsênio mediarão o processo de metilação com S-adenosilmetionina, como doadora de metil e GSH como cofator essencial. Depois da metilação o composto orgânico MMA (monometilarsônico) circula no sangue até sua absorção e posterior metilação em DMA (ácido dimetilarsinico) podendo ser excretado na urina e nas fezes ou se acumular em diferentes tecidos. Essas formas orgânicas (MMA III e DMA III) são estritamente mais danosas ao corpo humano, gerando pelo menos 100 vezes mais danos que as formas inorgânicas do arsênio trivalente, além de serem as formas mais genotóxicas causando danos comprometedores ao DNA (ARNOLD et al., 2006; KIBRIYA et al., 2017).

O cádmio é um metal de cor cinza, sólido a temperatura ambiente e apresenta toxicidade mesmo em baixas concentrações, é comumente utilizado na produção baterias, plásticos, pigmentos, varetas de soldagem, fertilizantes, esmaltes, tinturas têxteis, produtos galvanizados e produto da queima de combustíveis fósseis (FAROON et al., 2012; IPCS, 2015).

O cádmio é um elemento com o potencial tóxico liberado pela atividade humana, que pode se acumular em solos, água, alimentos e organismos vivos, agravando os riscos de toxicidade. As vias de contaminação podem ser por ingestão de água ou alimentos contaminados, exposição ocupacional ou inalação da fumaça do cigarro (KOEDRITH et al., 2011; RIKANS et al., 2000).

O Cd apresenta absorção gastrointestinal, dérmica e respiratória, estudos relacionam a exposição ao cádmio à várias danos à saúde dentre esses os principais são, nefropatia, aterosclerose, hipertensão, diabetes e problemas neurológicos. Isso porque os orgãos mais afetados por Cd são: rins, pulmões, coração, ossos e sistema nervoso (HYDER et al., 2013; JARUP et al., 2009).

Independente da via de entrada, uma vez na corrente sanguínea o Cd é capaz de ligar-se aos grupos –SH de proteínas de baixo peso molecular como, albuminas e metalotioneinas ou proteínas de membranas dos eritrócitos, o que permite o transporte até outros órgãos como fígado e rins. Nos rins o complexo Cádmio-Metalotioneina por exemplo, é filtrado pelos glomérulos renais e reabsorvido nos túbulos proximais, onde pode ser acumulado. Em casos de saturação de metalotioneinas o Cádmio pode atingir o fígado causando inflamação hepática, esteatose hepática entre outras (SATO et al., 2002; OBIOHA et al., 2009).

O complexo Cádmio-metalotioneina é capaz de promover uma maior produção de Espécies reativas de oxigênio (EROs) e Espécies reativas de nitrogênio (ERNs), o que pode reduzir a atividade de enzimas antioxidantes e neutralizar alguns compostos antioxidantes, aumentando a peroxidação lipídica e causando morte celular. Esses eventos quando ocorrem no sistema cardiovascular por exemplo podem reduzir o fluxo sanguíneo coronário, inibir a cadeia transportadora de elétrons nos cardiomiócitos, causar disfunção do endotélio vascular e causar a disfunção de células da musculatura lisa vascular resultando em hipertensão e problemas cardiovasculares (FILIPIC et al., 2004; NAKMAREONG et al., 2011).

O chumbo é um metal tóxico de cor cinza-azulado, sem odor, maleável, que ocorre naturalmente no solo e é bastante usado na indústria, em gasolina, joias, brinquedos, cosméticos e tintas por suas propriedades físicas e químicas. Essas aplicações do chumbo em diversos produtos colaboram para o aumento deste metal no meio ambiente (BRANNVALL et al., 1999; LIM et al., 2012).

A possibilidade de acumulação de chumbo em solos, água e organismos vivos aumenta os risco de exposição à esse contaminante, seja esta por inalação ou ingestão de água e alimentos contaminados. Em humanos, o chumbo pode se acumular no fígado, rins, cérebro e ossos promovendo distúrbios gastrointestinais, danos ao sistema nervoso central (SNC), fígado, rins, órgãos reprodutivos, sistema imune e cardiovascular. Os efeitos de chumbo no sangue ainda incluem um impacto negativo sobre a produção de eritrócitos e hemoglobina (KATZUNG, 2003; SANDERS et al., 2009).

Apenas a menor parte do chumbo ingerido é excretado em fezes e urina, a maior parte persiste no organismo se associando aos eritrócitos e proteínas de baixo peso molecular, este mecanismo contribui para deposição no cérebro, o que resulta em deficiência cognitiva e baixo coeficiente de inteligência, sendo agravadas em crianças (NEEDLEMAN, 2004; CHANDRAMOULIN et al., 2009).

Assim como Hg, As e Cd, uma vez na corrente sanguínea o Pb afeta os componentes celulares por meio de um aumento na produção de EROs, gerando o estresse oxidativo. O chumbo também é capaz de se ligar aos grupos –SH de enzimas inativando-as, esse efeito pode colaborar para a redução dos níveis de Glutationa tornando ineficiente esse mecanismo de defesa antioxidante (PATRICK, 2006; GURER e ERCAL, 2000).

O chumbo pode ainda exercer uma influência sobre a homeostase de cálcio celular, prejudicando processos celulares no sistema nervoso central e no sistema cardiovascular. Neste último o Pb pode desempenhar um papel pró-inflamatório importante na desestabilização das placas aterosclerótica e na formação de coágulos, reduzindo a permeabilidade arterial (ROSENFELD, 2013; OBENG-GYASI et al., 2018).

A indução de estresse oxidativo causado pela exposição ao Pb é um fator de risco para problemas cardiovasculares, considerando que o aumento descontrolado de EROs propicia à oxidação de óxido nítrico presente nas células dos vasos endoteliais, resultando na formação de peroxinitrito, que por ser altamente reativo, aumentando a peroxidação lipídica e causando danos ao DNA (JOMOVA et al., 2011; HUSAIN et al., 2015).

2.5 Eritrócitos e Hemoglobina.

O sangue é composto por tipos celulares distintos e plasma, sendo o plasma formado por água, eletrólitos, metabólitos, nutrientes, proteínas e hormônios, todos concentrados em uma solução salina e a parte celular é basicamente formada por glóbulos vermelhos ou eritrócitos, glóbulos brancos e plaquetas. Alguns íons também compõem o sangue, sódio (Na^+), potássio (K^+), cálcio (Ca^{2+}), cloreto (Cl^-), bicarbonato (HCO_3^-) e fostato

(PO_4^{3-}), influenciando no equilíbrio osmótico e no pH, o que garante a preservação da hidratação celular (HOFFMANN et al., 2009; TOSTESON et al., 1960).

Os eritrócitos ou glóbulos vermelhos são as principais células sanguíneas na circulação, são células simples com o formato de disco côncavo que perdem suas organelas e possuem um tempo de vida curto de aproximadamente 120 dias, mas exercem uma função de grande importância para a manutenção da vida que é o transporte de oxigênio por meio da hemoglobina. A membrana desses eritrócitos é uma dupla camada de fosfolipídios com componentes proteicos estabilizados no folheto lipídico por ligações hidrofóbicas e ligações covalentes e o citoesqueleto dessas células é um complexo multiproteico formado por proteínas estruturais como, espectrina α e β, anquirina, e actina. Com essas características a membrana dos eritrócitos é elástica o que permite forma, flexibilidade e elasticidade mantendo a integridade estrutural mesmo depois que passam por microcirculações capilares (DE OLIVEIRA et al., 2010; MOHANDAS et al., 2008).

Os eritrócitos são descendentes de células miéloides produzidas na medula óssea, especificamente no tecido hematopoiético da medula óssea, composto por células-tronco, que são células indiferenciadas e quando estimuladas por fatores estimulantes de colônias e interleucinas promovem a manutenção funcional, proliferação e diferenciação de células progenitoras multipotentes que possuem genes miéloides e linfoides. Este processo é chamado de eritropoese e pode ser dividido entre fase de reprodução, quando ocorrem as mitoses celulares e em fase de maturação quando ocorre a hemoglobinação e a perda do núcleo (KERN, 2002; KOURY E PONKA, 2004).

A eritropoese é um processo dinâmico regulado pelo hormônio eritropoietina (EPO) e por outras substâncias essenciais para a boa formação dos eritrócitos como, ferro, folato e cobalamina a ausência de qualquer um desses pode resultar em anemia (ALLEN, 2004; HO, 2019).

Os eritrócitos não possuem mitocôndrias por isso seu substrato exclusivo é a glicose extracelular que entra na célula por difusão facilitada através do transportador

especifico GLUT-1. Dentro dos eritrócitos a glicose sofre glicólise tendo a finalidade de produzir ATP (Trifosfato de adenosina). Este ATP eritrocitário ajuda no transporte de íons e impede à hiper-hidratação celular, além de auxiliar no controle do volume e da área da superfície celular. Os eritrócitos podem produzir nicotinamida adenina nucleotídeo reduzido (NADPH), pela via das pentoses com a finalidade de atuar como cofator da enzima glutationa redutase, responsável pelo balanço glutationa oxidada e glutationa reduzida, protegendo os eritrócitos contra lesões oxidativas (BETZ et al., 2009; PARK et al., 2010; NELSON, 2014).

A hemoglobina foi uma das primeiras proteínas a ter seus aminoácidos sequenciados, esse trabalho foi feito por William Konigsberg, Guido Guidotti e Robert J. Hill em 1959. Hoje sabemos que a hemoglobina é um heterotetrâmero, com duas cadeias α e duas cadeias β de globina, tendo em cada cadeia um grupo prostético heme. O heme é composto por um anel porfirínico que contém Fe^{2+} na sua estrutura, formando um sítio de ligação para o oxigênio (O_2) (KONIGSBERG et al., 1961; WATSON E KENDREW, 1961; NELSON, 2014).

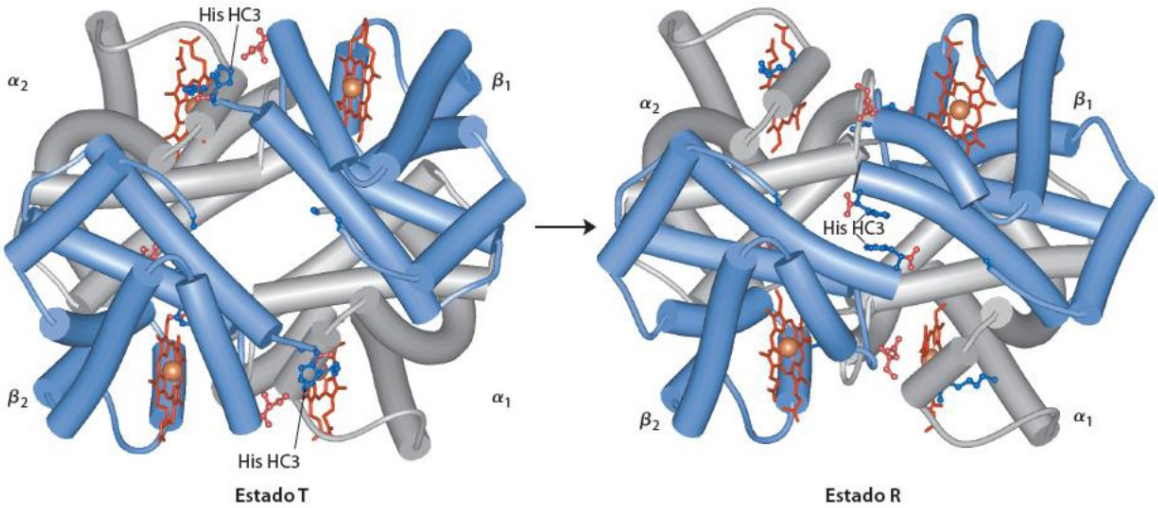

Figura 1: Transição do estado T (tenso) para o estado R (relaxado) da hemoglobina. Quando toda a proteína sofre essa transição, a estrutura das subunidades individuais se altera

pouco, mas os pares de subunidades αβ deslizam um sobre o outro e sofrem rotação, estreitando o bolsão entre as subunidades β. Fonte: Adaptado de Nelson e Cox (2014).

A capacidade da hemoglobina de se associar ao oxigênio é influenciada pela tensão do oxigênio em se ligar ao grupo heme que contém Fe^{2+}, redução do pH e a interação do 2,3-bifosfoglicerato com a hemoglobina. Isso porque mecanismos como a redução do pH pode acelerar a dissociação do oxigênio à hemoglobina, assim como o aumento no pH pode facilitar a associação. Por isso o dióxido de carbono (CO_2) é transportado no sangue na forma de bicarbonato (HCO^-_3). A anidrase carbônica é uma enzima presente nos eritrócitos capaz de catalisar a hidratação de dióxido de carbono e a desidratação de ácido carbônico liberando o CO_2 para o plasma sanguíneo e deste para os pulmões, contribuindo para a manutenção do pH sanguíneo. O 2,3-bifosfoglicerato também pode regular a associação da hemoglobina ao oxigênio, por se ligar as subunidades β da hemoglobina, causando uma mudança conformacional para o estado T, reduzindo a afinidade ao oxigênio (NELSON E COX, 2014; HOGEBACK, 2016).

Mas esses não são os únicos avanços no conhecimento sobre os eritrócitos e suas proteínas, em 1960 Max Perutz e seus colegas, determinaram a estrutura tridimensional da hemoglobina por cristalografia de raio X, e estudos mais recentes já mostram a estrutura da hemoglobina em alta resolução, além disso os genes da hemoglobina estão entre os primeiros genes a serem clonados. Estudos mais aprofundados também buscam o entendimento das interações de ligação do oxigênio ao sitio de ligação da hemoglobina e suas mutações (BUNN E FORGET, 1986; LEHMANN, 1957 RABBITTS, 1976; PARK et al., 2006; PERUTZ et al., 1960).

Os eritrócitos possuem tempo de vida limitado, por isso ao longo dos dias perdem progressivamente seus eletrólitos, provocando a desidratação celular e tornando os eritrócitos menos fluidos. A área de superfície dos eritrócitos também diminui assim como o volume, além disso suas proteínas transmenbranares se agregam na superfície da célula e esse é um dos

primeiros sinais morfológicos de morte celular, por fim essas células senescentes são recolhidas por macrófagos teciduais (GORDON-SMITH, 2007; MAIRBAURL, 2013).

2.6 Estresse oxidativo: produção de espécies reativas e sistema antioxidante.

O estresse oxidativo é um distúrbio que decorre do desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes, com um considerável aumento nos pró-oxidantes, trazendo como consequência a interrupção da sinalização e controle redox e/ou dano molecular. Os principais agentes pró-oxidantes são as espécies reativas de oxigênio (EROs) e as espécies reativas de nitrogênio (ERNs). Durante o metabolismo celular, a superprodução dessas espécies pode oxidar macromoléculas gerando um dano celular (HALLIWELL et al., 2007; SIES, 2017).

O termo espécie reativa é usado genericamente para definir espécies radicalares, que são átomos ou moléculas com existência independente contendo um ou mais elétrons não pareados nos orbitais externos. Isto determina uma atração para o campo magnético, o que pode torná-lo altamente reativo e capaz de reagir com moléculas próximas. A produção de espécies radicalares deriva das reações de oxidação-redução, podendo esses radicais doar ou receber elétrons (KOURY et al., 2003; LUSHCHAK, 2014).

A principal fonte de espécies reativas de oxigênio é a mitocôndria especificamente a cadeia transportadora de elétrons. Mas o radical superóxido (O_2^-) pode ser produzido por processos fisiológicos regulares pela enzima NADPH oxidase para ativar os mecanismos de defesa contra patógenos. Isso ocorre quando o oxigênio sofre uma redução monovalente e fica com um elétron desemparelhado em sua camada de valência. O radical superóxido sofre dismutação por meio da enzima antioxidante Superóxido dismutase (SOD) e sua catálise resulta na formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (CAMPIAN et al., 2004; LIOCHEV E FRIDOVICH, 2000).

Reação 1: $2O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$

O H_2O_2 não é uma espécie radicalar mas é considerado uma espécie reativa de oxigênio, que oferece um grande risco celular por sua capacidade de produzir radicais hidroxila ($HO\bullet$) quando em contato com metais como Fe^{+2}, Cu^{+}, Cu^{+2}, pode causar reação de Fenton, que é a reação de peróxido de hidrogênio com ferro ou cobre. O radical hidroxila é um oxidante de meia vida curta e quanto menor a meia vida de um radical mais instável será a configuração eletrônica, logo, maior será a velocidade de oxidação de moléculas como, proteínas, lipídeos e DNA, aumentando assim os danos celulares.

Reação 2: $Fe^{2+}/Cu^{+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+}/Cu^{2+} + \bullet OH + OH^{-}$

O excesso de radicais livres é combatido por antioxidantes produzidos endógenamente ou absorvidos na dieta. Os antioxidantes produzidos pelo corpo atuam enzimaticamente como: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa peroxidase (Gpx); ou ainda como susbtâncias não oxidantes como é o caso da glutationa. As substâncias antioxidantes podem fazer parte da dieta como, α-tocoferol (vitamina E), β-caroteno (pro-vitamina A) e ácido ascórbico (vitamina C) (HILLSTROM et al., 2003:GAETKE E CHOW, 2003).

A SOD é a primeira enzima de eliminação do radical superóxido fazendo a dismutação dos radicais O_2^{-} em H_2O_2. Esta metaloenzima antioxidante pode ser encontrada sob duas isoformas. A Cu/Zn-SOD1 comumente encontrada no citosol e a Mg-SOD2 que se apresenta nas mitocôndrias de células humanas. Após a dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio duas enzimas são capazes de decompor o H_2O_2 em H_2O e O_2, a Catalase e a Gpx. A catalase é uma enzima tetraédrica que contém um grupo prostético heme em cada uma de suas subunidades ligados à um íon ferro (ferriprotoporfirina IX, Por-Fe^{3+}) no sitio ativo, o que colabora para as reações catalíticas. A glutationa peroxidase ou Gpx é uma selênio-proteína capaz de decompor peróxidos de hidrogênio e muitos hidroperóxidos orgânicos, é uma proteína de aproximadamente 80 KDa, com quatro subunidades e utiliza o tripeptídeo GSH para decompor H_2O_2 (**ver Figura 3**) (CHELIKANI et al., 2004; EPP et al.,1983; PERRY et al., 2010).

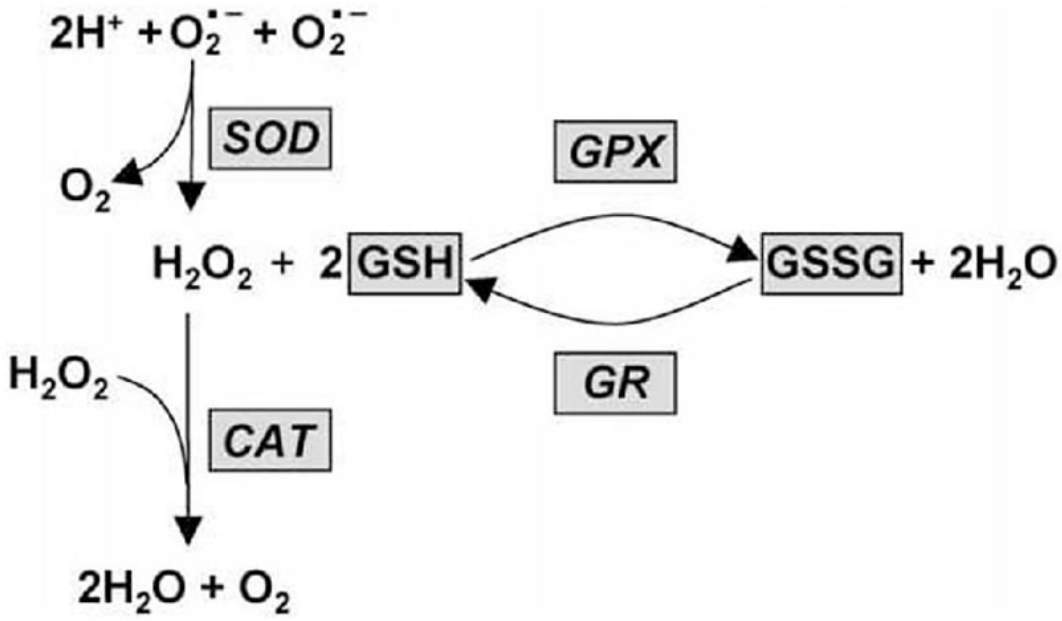

Figura 2 : Diagrama representativo: Representação da relação entre enzimas antioxidantes, Glutationa reduzida (GSH) e Glutationa oxidada (GSSG). Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutationa Peroxidase (Gpx), Glutationa Redutase (GR). Fonte: Adaptado de Borowicz et al., (2016).

A sinergia desse sistema pode ser perturbada por vários fatores, a exposição à metais tóxicos como mercúrio, cádmio e chumbo pode levar à um desequilíbrio do sistema antioxidante e uma superprodução de espécies radicalares, causando uma anormalidade no status redox, e um aumento na oxidação de macromoléculas essenciais para a atividade celular (VALKO, 2007).

A Laguna Mundaú apresenta níveis elevados de alguns metais tóxicos como, Pb e Hg. No caso do Hg a concentração máxima foi de 7,8 vezes maior do que o preconizado pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) Resolução 357º de 2005) (SANTOS, 2019) (Dados não publicados). O mercúrio é um elemento potencialmente tóxico por se acumular nos tecidos do corpo humano, gerando dano celular. Não foi encontrado na literatura trabalhos que descrevam danos celulares como o estresse oxidativo causados por exposição aos

contaminantes presentes no CELMM. Este trabalho visa caracterizar alterações no status redox dos eritrócitos de pescadores do CELMM, demostrando os possíveis danos causados pela exposição ao Hg presente na Laguna Mundaú.

OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Avaliar biomarcadores de estresse oxidativo em eritrócitos de pescadores que vivem em torno da Laguna Mundaú (Maceió - AL), comparando-os com o grupo controle.

3.2 Objetivos específicos:

- Avaliar atividades das principais enzimas do sistema antioxidante, superóxido dismutase e catalase e glutationa peroxidase em eritrócitos.
- Avaliar biomarcadores de estresse oxidativo em eritrócitos (conteúdo de tióis totais e peroxidação lipidica).

MATERIAIS E MÉTODOS.

Amostra populacional: Foi realizado um levantamento dos voluntários controles e pescadores para participação deste projeto, sendo considerados homens e mulheres acima de 18 anos. No presente estudo estimou-se um total de voluntários de 30 da população entre controles (sem contato constante com a laguna) e pescadores moradores da Laguna Mundaú (Maceió-AL). O presente projeto foi aprovado pelo comitê de ética (CAAE número 57998116.8.0000.501).

Coleta do sangue para utilização nas técnicas bioquímicas: As amostras de sangue venoso foram obtidas através de punção de veia em tubos à vácuo (BD Vacutainer) contendo anticoagulante EDTA. Para separação das células do sangue e do plasma, as amostras foram centrifugadas (Centrífuga 80-2B CENTRIBIO) à 1400 rpm por 10 min, à temperatura ambiente. Após centrifugação e separação, os eritrócitos foram congelados à -80ºC até realização dos

ensaios.

Extração de proteínas totais: Os eritrócitos obtidos foram homogeneizados em um homogenizador tipo Potter-Elvehjem em um tampão de extração composto por TRIS-HCl 50mM (pH 7,4) e EDTA 1mM. As amostras foram então centrifugadas (HEAL FORCE Neofuge 15R) à 4000 rpm durante 10 min à 4° C. O sobrenadante foi coletado para posterior quantificação de proteínas totais.

Quantificação de proteínas totais: A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de BRADFORD *et al.* (1976) em espectrofotômetro (AJX-6100PC). O princípio do método baseia-se na determinação da concentração de ligações peptídicas por meio da medida da absorbância do complexo proteína-corante. Este complexo absorve em comprimento de onda de 595 nm. A absorbância é considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada, onde uma solução de BSA (2mg/ml) foi utilizada como padrão.

Conteúdo de grupos Sulfidrilas: O conteúdo de sulfidrilas foi determinado pelo método de ELLMAN (1959) a partir da reação com o composto DTNB (5,5'-ditiobis (2 ácido nitrobenzóilo). Uma alíquota do homogenato (100 µg de proteína) foi incubada no escuro com 30 µL de DTNB 10mM e completado o volume final de 1 mL com tampão de extração. A medida da absorbância foi feita em espectrofotômetro (AJX-6100PC) à 412 nm. Os resultados foram expressos em mmol/mg de proteína.

Peroxidação lipídica (conteúdo de malondialdeído): Para a dosagem de TBARS foi utilizada a técnica colorimétrica BUEGE e AUST (1978), sendo esta uma técnica muito utilizada para avaliar a lipoperoxidação, pois o ácido tiobarbitúrico reage com os produtos da LPO, entre eles o malondialdeído e outros aldeídos (BUEGE e AUST, 1978). Foram adicionados 450 µg de proteína do homogenato de eritrócitos à 200 µl de ácido tricloroacético (TCA) a 30% e agitado por 1 min. 200 µl de TRIS-HCl 10 mM, pH 7,4, foi adicionado ao material, agitado por 1 min e então centrifugado a 1180 g durante 10 minutos, 4ºC. O sobrenadante coletado (450 µl) foi misturado ao ácido tiobarbitúrico a 0,73% (450 µl) que reage com os produtos da

lipoperoxidação formando um composto de coloração rosada. A mistura foi incubada por 15 minutos a 100ºC e em seguida resfriada. A medida da absorbância foi feita em espectrofotômetro (LIBRA S12 UV/VISIBLE) a 535nm. Os resultados foram expressos em mmol/mg de proteína. Este ensaio foi realizado pelos colaboradores do Laboratório de Bioquímica Geral, Molecular e do Exercício – LABEX do Centro acadêmico de Vitoria de Santo Antão- UFPE.

Atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD): A determinação da atividade de SOD foi feita de acordo com MISRA e FRIDOVICH (1972). O homogenato dos eritrócitos (50 µg de proteína) foi incubado no tampão carbonato de sódio (50 mM, pH 10,2 + 0,1 mM de EDTA) em banho-maria a 30 ºC. A reação teve início pela adição de epinefrina (3 mM), em ácido acético (0,05%), num volume final de 1 mL. A absorbância foi lida a 480nm em espectrofotômetro (AJX-6100PC) e a atividade determinada durante 1, 5 min. Uma unidade da SOD foi definida como a quantidade de proteína requeria para inibir a autoxidação de 1 mol de epinefrina por minuto. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

Atividade enzimática da Catalase (CAT): A atividade da CAT foi monitorada de acordo com AEBI (1984). O ensaio é baseado na determinação da constante k de decomposição de H_2O_2. Foi adicionado 25 µg de proteína em tampão fosfato 50 mM (fosfato de sódio monobásico monohidratado + fosfato de sódio dibásio), pH 7,0 à 35º C. Em seguida, a reação foi iniciada com adição de 0,3 M de H_2O_2, num volume final de 1 mL. O decaimento da absorbância foi monitorizado à 240 nm em espectrofotômetro (AJX-6100PC) durante 1 min para determinar a atividade enzimática. Uma unidade da CAT foi definida como a quantidade de proteína requerida para converter 1µmol de H_2O_2 por minuto para H_2O. A atividade da catalase foi expressa em U/mg de proteína.

Avaliação da atividade enzimática da Glutationa Peroxidase (GPx): A atividade da enzima glutationa peroxidase foi monitorada pela diminuição de absorbância do NADPH à 340 nm em espectrofotômetro (AJX-6100PC) e determinada durante 1,5 min, a 25 ºC, em um meio contendo: 40µg de proteínas, tampão fosfato 0,05M (pH 7,0) e EDTA 0,005 M, NADPH 84 µM,

Azida sódica 1,1 mM, GSH 1,5 mM, Glutationa redutase (GR) 0,1 U e peróxido de hidrogênio 90 μM, num volume final de 1 mL (PAGLIA, 1967). Uma unidade da GPx foi definida como a quantidade de proteína requerida para converter 1 μmol de NADPH por min.

Análise estatística: Os resultados foram expressos como média ± DPM (desvio padrão da média). A análise estatística foi realizada através do teste "t" de Student não pareado utilizando o software GranphPad Prism 6.01. O nível de significância foi considerado quando $p \leq 0,05$ para todas as análises.

RESULTADOS E DISCUSSÃO.

A principal motivação da elaboração do projeto inerente ao presente trabalho decorre de dados não publicados do nosso grupo de pesquisa que revelam concentrações elevadas de Hg em 10 pontos do CELMM, essas coletas foram realizadas entre 2017 e 2018. Os dados apresentam uma concentração máxima de mercúrio 7,8 vezes maior do que o preconizado pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) Resolução 357º de 2005) (SANTOS, 2019) (Dados não publicados).

Pensando nos impactos que o contato constante com o Hg presente na água do CELMM pode gerar a saúde das pessoas expostas. Foram usados dois grupos de voluntários para que pudéssemos fazer um comparativo entre pessoas com contato constante com a água do CELMM (Grupo exposto) e um outro grupo com pouco contato, ou quase nenhum contato com a água do CELMM e seus derivados (Grupo controle).

As análises foram feitas em eritrócitos dos voluntários garantindo um método menos invasivo e a possibilidade de analisarmos os efeitos de metais tóxicos como Hg em eritrócitos, especificamente no sistema antioxidante desses eritrócitos, considerando que esse e outros metais possam exercer fortes efeitos negativos para a manutenção da homeostase celular (KANTER, 2009; CACIARI et al, 2013).

Para caracterizar o possível estresse oxidativo avaliamos a produção de malodialdeido (MDA), que é um produto secundário da peroxidação lipídica e atesta o dano celular, além disso avaliamos os níveis de tióis totais (-SH) que funcionam como defesa

antioxidante contra os efeitos tóxicos de metais e a produção de radicais livres como no caso do GSH ou fazendo parte das proteínas que constituem a célula (VALKO et al, 2007; PATRICK, 2006).

Para avaliar os impactos no sistema antioxidante dos voluntários exposto à água do CELMM, analisamos as principais enzimas que compõem o sistema antioxidante, a SOD eritrocitária que é uma metaloenzima capaz de catalisar a dismutação do ânion superóxido O_2^- em H_2O_2, a Catalase e a Glutationa peroxidase eritrocitárias capazes de converter o H_2O_2 em água (H_2O) e oxigênio. Nos eritrócitos o radical superóxido (O_2^-) pode ser gerado na auto oxidação da hemoglobina oxigenada, quando o grupamento heme está ligado ao oxigênio. É nesse processo que o Fe^{2+} da hemoglobina é oxidado a Fe^{3+} + O_2^-. Uma série de reações em cascata ocorrem resultando na dismutação desse radical. Depois da dismutação do O_2^- em H_2O_2 pela SOD é que Catalase e GPx iniciam a detoxificação de H_2O_2 para transforma-lo em H_2O + O_2 (HALLIWELL et al., 2007; RIFKIND et al., 2003; VERCESI et al., 2018).

A **Figura 3**, resume os resultados da atividade das principais enzimas antioxidante SOD, CAT, GPx comparando o grupo controle e o grupo exposto. Esses resultados demonstram uma redução significativa na atividade das enzimas antioxidantes dos voluntários expostos (Controle: 0,416 ± 0,019; n= 9 *vs* Exposto: 0,304 ± 0,024; n= 20), (Controle: 0, 614 ± 0,142; n=10 *vs* Exposto: 0,366 ± 0,029; n= 20), (Controle: 0,045 ± 0,002; n= 10 *vs* Exposto: 0,033 ± 0,001; n=20).

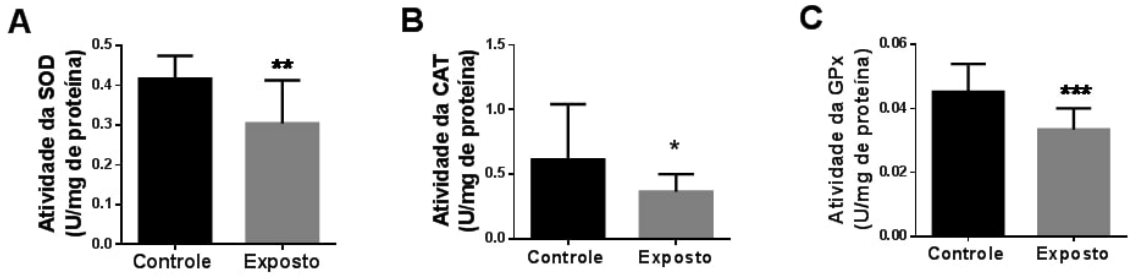

Figura 3: Atividade do sistema antioxidante enzimático em eritrócitos. (**A**) Atividade da SOD; (**B**) Atividade da catalase; (**C**) Atividade da glutationa peroxidase. A atividade de cada enzima foi iniciada com adição de seus respectivos substratos. Os dados mostram média ±

S.D. de ambos os grupos (Controle, n=9 *vs* Exposto, n=20). Análise estatística: Teste t de student foi aplicado. **p=0,05 *p=0,021; ***p=0,0006.

A **Figura 3A** apresenta a redução da atividade da SOD dos voluntários exposto quando comparamos ao grupo controle. Como pode ser observado essa redução é de aproximadamente 37% da atividade normal dessa enzima. A SOD é a enzima responsável pela dismutação do radical superóxido (O_2^-), este radical tem como característica uma facilidade de reagir com macromoléculas. Esse déficit na atividade enzimática colabora para uma maior oxidação de moléculas como proteínas lipídeos dos eritrócitos (PATIL et, al., 2006; GROVER et. al., 2010).

A **Figura 3B** e **C** apresenta as atividades enzimáticas de CAT e GPx, ambas com um déficit de 40% para CAT e 26% para Gpx. Isso nos proporciona um aumento de H_2O_2, que quando exposto à metais pode produzir radicais hidroxila (HO•) por meio da reação de Fenton e oxigênio singlete ($^1O_2$) quando exposto ao radical superóxido.

A redução brusca na atividade enzimática da catalase pode estar envolvida com a capacidade do mercúrio de se associar a compostos enzimáticos modificando e neutralizando sua atividade. O aumento de radical superóxido (O_2^-) também é um fator que contribui para a redução na atividade da Catalase, já que o O_2^- pode oxidar enzimas e interferir em seu funcionamento.

A redução da Gpx pode ser modulada pela redução do substrato GSH, o que pode ser uma consequência da exposição ao Hg ou pelo impacto causado na competição entre selênio e mercúrio, causando disfunções enzimáticas (MEYER et al., 2005).

Hasan et al, (2013) constataram uma redução significativa da atividade de SOD e GPx eritrocitárias e um aumento considerável na peroxidação lipídica em trabalhadores expostos à Hg, e uma possível melhora nas duas avaliações quando são adicionados à dieta vitamina C e vitamina E, demonstrando assim o esgotamento das defesas antioxidantes e os danos que a exposição ao Hg pode causar (HASAN et al.,2013). Isso acontece porque o ácido ascórbico (vitamina C) e o α-tocoferol (vitamina E) são compostos antioxidantes que podem ser ingeridos na dieta colaborando para a redução de radicais livres.

O mercúrio é metal tóxico conhecido por sua capacidade de causar malefícios a saúde humana, como por exemplo carcinogenicidade, nefrotoxidade, neurotoxidade e cardiotoxidade, todavia em todas essas situações os efeitos patológicos são multifatoriais e os primeiros sinais de alterações celulares são mensurados pelo estresse oxidativo, já que a exposição seja ela crônica ou aguda afeta diretamente as defesas antioxidantes como os radicais hidroxila (-OH) e as enzimas antioxidantes como SOD, CAT e GPx (TEIXEIRA et al., 2014; GALAN et al., 2001; BOFFETA et al., 2001; SALLONEN et al., 2000).

Os resultados da comparação entre marcadores de estresse oxidativo do grupo exposto e do grupo controle estão resumidos na **Figura 4**, que traz resultados do conteúdo de tióis totais, importante na manutenção do estado redox celular, e os resultados do conteúdo de MDA. O malodialdeido é o principal produto da oxidação de ácidos graxos poli-insaturados que sofrem oxidação, sendo assim um indicador de peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica é um mecanismo químico capaz de perturbar a estrutura e a função de sistemas biológicos, com o ataque de radicais livres em lipídios que compõe a membrana celular (PARK, 2007).

O conteúdo de MDA se mostrou quase duas vezes maior no grupo exposto, quando comparado ao grupo controle (Controle: 7,77 ± 0,83; n =9 *vs* Exposto: 16,4 ± 1,3; n= 20, $p < 0,05$). Esse resultado pode ter a influência do mercúrio, já que esse metal tóxico tem a capacidade de induzir aumento na produção de EROs, responsáveis por causar desequilíbrios celulares como, peroxidação lipídica e degradação de proteínas (GUZZI E LAPORTA, 2008).

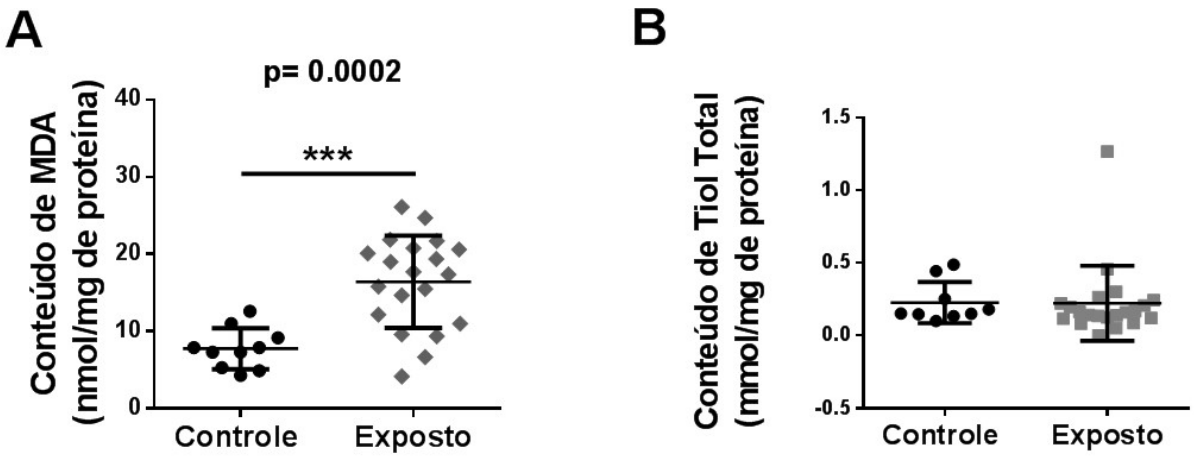

Figura 4: Marcadores de estresse oxidativo em eritrócitos. (A) Conteúdo de MDA; (B) Conteúdo de tiol total. Os dados mostram média ± D.P.M. de ambos os grupos (Controle, n=9 *vs* Exposto, n=20). Análise estatística: Teste t de student foi aplicado. ***p≤0,0002.

O resultado do conteúdo de MDA corrobora com os resultados da **Figura 4**, isso porque uma vez que a célula apresenta uma debilidade no seu sistema antioxidante enzimático, ocorrerá um aumento na produção de EROs e estas vão colaborar para a peroxidação lipídica. A redução da atividade das principais enzimas antioxidantes SOD, CAT e Gpx, revelam um aumento na produção de EROs, o que além de induzir peroxidação lipídica também induz a produção de radicais livres como o radical hidroxila (HO•) e o oxigênio singlete ($^1O_2$), capazes de afetarem o funcionamento da hemoglobina e promoverem a oxidação do DNA e outras macromoléculas (THOMAS, 2003; PROUSEK, 2007).

O conteúdo de tióis totais também foi avaliado e apesar do resultado não significativo, os dados demonstram o funcionamento das defesas antioxidantes, equilibrando o efeito da produção de espécies reativas demonstrada na peroxidação lipídica. (Controle: 0,228 ± 0,047; n =10 *vs* Exposto: 0,221 ± 0,056; n= 20).

A avaliação de dados como esses é de suma importância, já que os metais tóxicos como o Hg se atraem facilmente à grupos sufidrila (-SH) de proteínas como a hemoglobina dos eritrócitos e a supressão dessas defesas antioxidantes registrariam um aumento de radicais livres. Em eritrócitos os grupos sufidrila que compõem a hemoglobina representam uma grande fração proteica e apresentam uma afinidade considerável por MeHg, o que propicia um maior dano celular nos eritrócitos, induzindo morte celular (HAREL et al., 1988; SHI ET AL., 1993; GO, 2011).

Estudos como o de RUSH et al. (2012), apontam danos neurais causados por toxicidade do MeHg relacionada a redução de GSH e tióis totais, considerando um esgotamento nas defesas antioxidantes, o que propicia o estresse oxidativo e facilita a constituição de danos celulares. No Brasil, Grotto e colaborades (2010) sugeriram em um estudo realizado na Amazônia, que as concentrações de Hg se relacionavam diretamente com a redução de tióis totais, concluindo que a oxidação dos grupos sufidrila foi induzida por Hg (RUSH et al., 2012; GROTTO et al., 2010).

Os resultados alertam para os efeitos tóxicos do Hg contido na água do CELMM, e o aumento da peroxidação lipídica, que pode ser uma das consequências da interação entre MeHg e as diversas enzimas do corpo humano, incluindo as principais enzimas do sistema antioxidante. O aumento da peroxidação lipídica em indivíduos expostos às diversas formas de Hg é um efeito comum em indivíduos que sofrem danos neurais como, déficit de memória e cognição sempre que expostos a mercúrio. (VALKO, 2005; TEIXEIRA et al. 2014).

O dano mais comum aos eritrócitos causados pela exposição a Hg, acontece na membrana plasmática que perde a permeabilidade seletiva. Este dano pode ser causado pelo excesso de EROs produzidas na interação do MeHg (Metil mercúrio) com as principais enzimas antioxidantes e pela peroxidação lipídica já que o excesso de radicais livres que atacam a membrana plasmática dos eritrócitos pode danificar a constituição do citoesqueleto celular, induzindo hipóxia tecidual (MAHESHWARI et al., 2017; RIFKIND et al., 2003).

O alto nível de MDA ainda está relacionado com problemas de saúde graves como, nefropatia, disfunção glomerular, disfunção, cardiopatias, hipertensão, diabetes, doenças coronariana e arritmias, podendo essas doenças crônicas serem agravadas por exposição à mercúrio (DROGE, 2002; NOVELLI, 2000; STADLER et al., 2004; FLORES et al., 2004; ABADIN, 2007).

CONSIDERAÇÕES FINAIS.

Os resultados demonstram que a exposição ao Hg contido na água do CELMM afetou a atividade das principais enzimas do sistema antioxidante (superóxido dismutase 37%, catalase 40%, glutationa peroxidase 26%) e aumentou o nível de peroxidação lipídica em eritrócitos de pescadores do CELMM. O trabalho também mostrou que o uso de amostras sanguíneas são de grande valor na avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo e que a exposição ao mercúrio presente na Laguna Mundaú pode trazer complicações graves para a saúde dos indivíduos expostos. Porém, os estudos de toxicidade por metais tóxicos como Hg são de alta complexidade por isso necessitam de estudos mais amplos.

REFERENCIAS

ABADIN, H., ET AL., 2007. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2005. **Toxicological Profile for Lead, Atlanta.** U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, pp. 43-59.

AEBI H. (1974) Catalase. In: Bergmeyer HU (ed) Methods of enzymatic analysis, 2. Werlag Chemie, Weinheim, pp 673–678.

ALAGOAS (1980) - **Projeto de levantamento ecológico cultural da região das Lagoas Mundaú/Manguaba**, 2. ed., vol II, 605p., Secretaria de Planejamento de Alagoas, Coordenação de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Maceió, AL, Brasil.

ALISSA, E.M., BAHJRI, S.M., AHMED, W.H., AL-AMA, N., FERNS, G.A.A., 2009. Chromium status and glucose tolerance in Saudi men with and without coronary artery disease. Biol. **Trace Elem. Res**. 131, 215–228.

ALLEN, H. R. Anemias Megaloblásticas. In: Cecil, R. L. Tratado de Medicina Interna. 21 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004, 958-963p.

Al-MUSHARAFI, S. K., MAHMOUD, I. Y., & Al-BAHRY, S. N. (2014). Environmental Hazards and Pollution from Liquid Waste Lagoons. **5th International Conference on Environmental Science and Technology**, 69, 1-5.

ARAUJO, M. S. L. C.; CALADO, T. C. S.. Bioecologia do caranguejo-uça *cides cordatus* (Linnaeus) no Complexo Lagunar Mundaú/Manguaba (CELMM), Alagoas, Brasil. **Revista de Gestão Costeira Integrada**, v.8, n.2 p. 169-181, 2008.

ARAUJO, P.M.; COSTA, T. L. F.; CARREIRA, S. R. Esteróis como indicadores do acúmulo de esgotos domésticos. **Quim. Nova**, vol. 34, No. 1, P. 64-70, 2011.

ARAUJO, M. V.; FREIRE, G. S. S. Utilização de Geotecnologias: Diagnóstico Ambiental do Estuário do Rio Acaraú, Ceará, Como Estudo de Caso. **Revista Pesquisas em Geociências**, 34 (2): 33-44, 2007.

ARNOLD, L.L.,ELDAN, M., NYSKA, A., VAN GEMERT, M. CIHEN, S.M., 2006. Dimethyarsinic acid: results of chronic toxicity/ oncogenicity studies in F344 rats in B6C3F1 mice. **Toxicology** 223,82-100.

BAIRD, C. **Química Ambiental**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

BAGCHI, D., STOHS, S.J., DOWNS, B.W., BAGCHI, M., PREUSS, H.G., 2002. Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. **Toxicology** 180, 5–22.

BALLATORI, N.; CLARKSON, T.W. Biliary secretion of glutathione and of glutathione-metal complexes. **Fundam. Appl. Toxicol**. **1985**, 5, 816–831.

BELZILE, N., LANG, C.-Y.; CHEN, Y. W. ; WANG, M.; *Sci. Total Environ.* **2008**, 405,226.

BENTERS, J., FLOGEL, U., SCHAFER, T., LEIBFRITZ, D., HECHTENBERG, S., BEYERSMANN, D., 1997. Study of the interactions of cadmium and zinc ions with cellular calcium homoeostasis using F-19-NMR spectroscopy**. Biochem**. J. 322, 793–799.

BERNTSSEN, M.H.G.; AATHAND, A.; HANDY, R.D. (2003). Chronic dietary mercury exposure causes oxidative stress, brain lesions, and altered behaviour in Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. **Aquatic Toxicology**, 65:55-72.

BERNHOFT, R.A. Mercury toxicity and treatment: A review of the literature. J. Environ. Public Health **2012**.

BETZ, T., LENZ, M., JOANNY, J. F., SYKES, C. ATP-dependent mechanics of red blood cells. **Proc Natl Acad Sci 2009; 106: 15320-15325.**

BRADFORD, M. M. Arapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle-dye binding. **Anal biochem,** v. 72, p. 248-54, May 7 1976.

BRANNVALL, M. L., BINDLER, R., RENBERG, I., EMTERYD, O., BARTNICKI, J., BILLSTROM, K., 1999. The Medieval metal industry was the cradle of modern large scale atmospheric lead pollution in northern Europe. **Environ. Sci. Technol.** 33,4391-4395.

BRASIL. Agência Nacional de Águas (ANA). **Plano de Ações e Gestão Integrada do Complexo Estuarino Lagunar Mundaú/ Manguaba–CELMM**. Brasília: Agência Nacional de Águas. 2006. Disponível em: Acesso em: 28 fev. 2018.

BRAY, T.M., BETTGER, W.J., 1990. The physiological-role of zinc as an antioxidant. Free Radic. **Biol. Med**. 8, 281–291.

BRITO, V. B. et al. Long-term sucrose and glucose consumption decreases the δ-aminolevulinate dehydratase activity in mice. **Nutrition,** v. 23, p.818-826, 2007.

BOFFETA P, SALLSTEN G, GARCIA-GOMEZ M, POMPE-KIRN V, ZARIDZE D, BULBULYAN M, CABALLERO JD, CECCARELLI F, KOBAL AB, and MERLER E (2001). Mortality from cardiovascular dieases and exposure to inorganic mercury. Occup Environ me 58: 461-466.

BOROWICZ, H.; KUBIAK, K., NIKOLOVSKI, G.; NIEDZWIEDZ, A. Impact of recurrent airway obstruction (RAO) on selected antioxidants in horses. **Mac Vet Rev.** 2016; 39:165-761.

BUNN, H. F., FORGET, B. G. 1986. Hemoglobin: Molecular, genetic and clinical aspects. W. B. Saunders Philadelphia.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol,** v. 52, p. 302-10,1978.

CACIARI T., CASALE T., CIARROCCA M., CAPOZZELLA A., GIOFFRE P.A., CORBOSIERO P., TOMEI G., SCALA B., ANDREOZZI G., NARDONE N., TOMEI F., ROSATI M.V. (2013) Correlation between total blood lead values and peripheral
blood counts in workers occupationally exposed to urban stressors. **J Environ Sci Health ATox Hazard Subst Environ Eng** 48:1457–1469

CHANDRAMOULI, K., STEER, C. D., ELLIS, M., EMOND, A.M. Effects of early childhood lead exposure on academic performance and behavior of school age children. Arch Dis Child. 2009;94:844-848

CAMPOS, M. L. A. M. **Introdução a Biogeoquímica de Ambientes Aquáticos**. São Paulo, Editora Átomo, 2010.

CAMPIAN, J.L.,QIAN, M., GAP, X., EATON, J.W. 2004. Oxygen tolerance and coupling of mitochondrial electron transport. **J. Biol. Chem.** 279, 46580-46587.

CHELIKANI, P.; FITA, I.; LOEWEN, P.C. Diversity of structures and properties among catalases. **Cellular and Molecuçar life Sciences** 61,192-208,2004.

CHEN, J. W., WANG, S. L., WANG Y. H., ET AL. Arsenic methylation, GSTO1 polymorphisms, and metabolic syndrome in an arseniasis endemic area of southwestern Taiwan. *Chemosphere* 2012; 88;432-8.

CHIHUAILAF, R. H.; CONTRERAS, P.A.; WITTWER, F. G. Patogénesis del estrés oxidative: Consecuencias y evaluación en salud animal Pathogenesis of oxidative stress:Consequences and evaluantion in animal health. **Vet. Méx.** V. 33 p. 265, 2002.

CLARK, J. (1996). Coastal zone management handbook. **New York**: Lewis Pubisher/CRC Press.

CLARKSON, T.W.; Vyas, J.B.; Ballatori, N. Mechanisms of mercury disposition in the body. **Am. J. Ind. Med**. **2007**, 50, 757–764.

CLARKSON, T.W.; MAGOS, L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. **Crit. Rev. Toxicol**. **2006**, 36, 609–662.

CONDINI, P. **Subsídio para educação ambiental na bacia hidrográfica do**

Guarapiranga: a qualidade das águas. São Paulo: Secretaria de Estado do Meio Ambiente/ Coordenadoria de Educação Ambiental (SMA/CEAM). 1998.

COMPEAU, G.C.; BARTHA, R. Sulfate-reducing bacteria: Principal methylators of mercury in anoxic estuarine sediment**. Appl. Environ. Microbiol**. **1985**, 50, 498–502.

DABEKA, R.; MCKENZIE, A.D.; FORSYTH, D.S.; CONACHER, H.B. Survey of total mercury in some edible fish and shellfish species collected in Canada in 2002. Food Addit. Contam. **2004**, 21, 434–440.

DAS, A.K., SAHU, R., DUA, T.K., BAG, S., GANGOPADHYAY, M., SINHA, M.K., DEWANJEE,S.,2010. Arsenic-induced myocardial injury: protective role of Corchorus olitorius leaves**. Food Chem. Toxicol**. 48, 1210–1217.

DE OLIVEIRA, S., SALDANHA, C. Na overview about erythrocyte membrane. **Clin Hemorheol Micro** 2010; 44:63-74.

DROGE, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev**. 82, 47–95.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch Biochem Bioprhys,** v. 82, n. 1,p. 70-7, May 1959.

EPAGRI - **Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A. Manuais de Maricultura** – Cultivo de mexilhões. Florianópolis 2003.

EPP, O. LADENSTEIN, R., WENDEL, A. 1983. The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution. **Eur. J. Biochem.** 133,51-69.

ERCAL, N., GURER-ORHAN, H., AYKIN-BURNS, N., 2001. Toxic metals and oxidative stress. Part 1. Mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. Curr. **Top. Med. Chem**. 1, 529–539.

ESTEVES, F. A. **Fundamentos de Limnologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2011.

FAROON, O. et al., In toxicological Profle for Cadmium (Agency for Toxic SUbstances and Disease Registry (US), 2012).

FERNANDES, L.D.F. Transporte de Poluentes em Estuários por Arsenio. Trabalho Final de Curso de Engenharia do Ambiente. Universidade Técnica de Lisboa, 2001.

FERRARIO, D., CROERA, C., BRUSTIO, R., COLLOTTA, A., BOWE, G., VAHTER, M., GRIBALDO, L., 2008.Toxicity of inorganic arsenic and its metabolites on haematopoietic progenitors “in vitro”: comparison between species and sexes. **Toxicology**, 249, 102–108.

FILIPIC M., HEI T.K. 2004. Mutagenicity of cadmium in mammalian cells: Implication of oxidative DNA damage. **Mutat** Res 546:81–91.

FLORA, S.J.S., MITTAL, M., MEHTA, A., 2008. Heavy metal induced oxidative stress and its possible reversal by chelation therapy. **Indian J. Med. Res**. 128, 501–523.

FLORES, L., RODELA, S., ABIAN, J., CLARIA, J., ESMATJES, E., 2004. F2 isoprostane is already increased at the onset of type 1diabetes mellitus: effect of glycemic control. **Metabolism** 53, 1118-1120.

FRAGOSO JR., C. R. **Modelagem tridimensional da estrutura trófica em ecossistemas aquáticos continentais rasos**. 2009. 309f. Tese de Doutorado (Doutorado em Recursos Hídricos e Saneamento). Instituto de Pesquisas Hidráulicas, Rio Grande do Sul, 2009.

GAETKE, L.M., CHOW, C.K., 2003. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. **Toxicology 189,147-163.**

GALAN A, GARCIA-BERMEJO L, TROYANO A, VILABOA N. E, FERNANDEZ C, DE BLAS E, ALLER P, 2001. The role of intracellular oxidation in deth induction (apoptosis and necrosis) in human promonocytic cells treated with strees inducers (cadmium, heat, X-rays). EUR. J. Cell Biol. 80, 312-320.

GALANIS, A., KARAPETSAS, A., SANDALTZPOULOS, R., 2009. Metal-induced carcinogenesis, oxidative stress and hypoxia signalling. Mutat. Res.: Genet. Toxicol. Environ. **Mutagen**. 674, 31–35.

GALVÃO, P.M.A. et al. Bioacumulação de metais em moluscos bivalves: aspectos evolutivos e ecológicos a serem considerados para a biomonitoração de ambientes marinhos. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology,** v.13, n.2, p.59-66, 2009. Disponível em: <http://www6.univali.br/seer/index.php/bjast/
article/view/1359/1518>. Acesso em: 24 abr. 2011.

GROTTO, D. et al. Mercury exposure and oxidative stress in communities of the Brazilian Amazon. **Sci Total Environ,** v. 408, n. 4, p. 806-11, Jan 15 2010.

GROVER P., REKHADEVI P.V., DANADEVI K., VUYYURI S.B., MAHBOOB M., RAHMAN M.F. (2010) Genotoxicity evaluation in workers occupationally exposed to lead. **Int J Hyg Environ Health** 213:99–106.

GO, Y.M., AND JONES, D.P. (2011). Cysteine/cystine redox signaling in cardiovascular disease. Free Radical Biology & Medicine 50, 495–509.

GORDON-SMITH, T. 2007. Red blood cells. **Surgery**, 25 (2), 57-60. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.mpsur.2006.12.004.

GURER, H., ERCAL, N., 2000. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? Free Radic. Biol. Med. 29, 927-945.

GUPTE, A., MUMPER, R.J., 2009. Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. **Cancer Treat**. Rev. 35, 32–46.

HAIDARI, M., JAVADI, E., KADKHODAEE, M., SANATI, A., 2001. Enhanced susceptibility to oxidation and diminished vitamin E content of LDL from patients with stable coronary artery disease. **Clin. Chem**. 47, 1234–1240.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J. M. **Free radicals in biology and medicine.** New York: Oxford University Press, 2007.

HASAN F., AL AZZAWIE, AKRAM UMRAM and NADHEM H. HYADER., 2013. Oxidative stress, Antioxidante status and DNA damage in a Mercury Exposure workers. British Journal of Pharmacology and toxicology 4(3): 80-88, 2013.

HEI, T. K., FILIPC, M., 2004. Role of oxidative damage in the genetoxicity of arsenic. Free Radic. Biol. Med. 37.574-581.

HIGINO, P. A. S. *.,* Variação sazonal de mercúrio total em Sururus (*Mytella charruana, Orbigini, 1842)* de uma laguna tropical, NE, Brasil. **Ver. Virtual, Quim.** V. 4 nº. 4, P.393-404, 2012.

HILLSTROM, R.J., YACAPIN-AMMONS, A.K., LYNCH, S.M., 2003. Vitamin C inhibits lipid oxidation in human HDL. **J. Nutri.** 133, 3047-3051.

HO, Y. et al., Remodeling of boné marrow hematopoietic stem cell niches promotes myeloid cell expansion during premature or physiologic aging. **Cell Stem Cell** 25, 1-12 (2019).

HOFFMANN, E. K., LAMBERT, I. H., PEDERSEN, S. F. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. **Physiol Rev.** 2009;89 (1):193-277.

HOGEBACK, J. et al. Investigating the adduct formation of organic mercury species with carbonic anhydrase and hemoglobin from human red blood cell hemolysate by means of LC/ESI-TOF-MS ans Lc/ICP-MS. **Metallomics,** v. 8, n.1, p. 101-7, Jan 2016.

HUGHES, M. F., BECK B. D., CHEN, Y. Arsenic exposure and toxicology: a historial perspective. Toxicol Sci. 2011; 123;305-32.

HUMMEL, M., STANDL, E., SCHNELL, O., 2007. Chromium in metabolic and cardiovascular disease. **Horm. Metab. Res**. 39, 743–751.

HUSAIN, K., HERNANDEZ, W., ANSARI, R. A. et al., Inflammation, oxidative stress and renin angiotensin system in atherosclerosis. World J Biol Cham 2015; 6:209-17.

HYDER, O. et al. Cadmium exposure and liver disease among US adults. **J Gastrointest Surg** 17, 1265-1273. 2013.

IBGE. **Atlas geográfico das zonas costeiras e oceânicas do Brasil**. 2011. ISBN = 9788524042195.

IMA (Instituto do Meio Ambiente) 2016- disponível em: http://www.ima.al.gov.br, acessado em janeiro de 2018.

IPCS, International Programme on Chemical Safety. Cadmium, disponível em: www. Who.int/ipc/assessment/public_health/cadmium , 2015.

JARUP, L. E ÂKESSON, A. Current status of cádmium as na environmental health problem. **Toxicol Appl Pharmacol** 238, 201-208, 2009.

JOMOVA, K., VONDRAKOVA, D., LAWSON, M., VALKO, M., 2010. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. Mol. Cell. Biochem. 345, 91–104.

JONES, G. B.; MERCURIO, P. & OLIVIER, F., 2000. Zinc in fish, crabs, oysters, and mangrove flora and fauna from Cleveland Bay. **Marine Pollution Bulletin**, 41:345-352.

KARIMI, R.; VACCHI-SUZZI, C.; MELIKER, J.R. Mercury exposure and a shift toward oxidative stress in avid seafood consumers. Environ Res, v. 146, p. 100-7, Apr 2016.
KANTER M, AKSU B, AKPOLAT M, TARLADACALISIR YT, AKTAS C, UYSAL H. 2009. Vitamin E protects against oxidative damage caused by cadmium in the blood of rats. **Eur J Gen Med** 6:154–160.

KANG, Y.J., WU, H., SAARI, J.T., 2000. Alterations in hypertrophic gene expression by dietary copper restriction in mouse heart. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med**. 223, 282–287.

KATZUNG, B. G. Farmacologia básica e clínica. 8 ed. Rio de Janeioro: Guanabara Koogan, 2003. P. 876-870.

KEEGAN, G.M., LEARMONTH, I.D., CASE, C.P., 2008.Asystematic comparison of the actual, potential, and theoretical health effects of cobalt and chromium exposures from industry and surgical implants. **Crit. Rev. Toxicol**. 38, 645–674.

KENNISH, M. J. **Practical Handbook of Estuarine and Marine Pollution**. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 544 p. 1996.

KERN, W. **PDQ HEMATOLOGY**. 2002. ISBN 1-55009-176-x.

KEHRIG, H.A., HAUSER-DAVIS, R. A., SEIXAS, T.G. et al. Mercury species, selenium, metalloproteins and glutathione in two dolphins from the southeastem Brazilian coast: mercury detoxification and physiological differences in diving capacity. **Environ Pollut. 2016;213:7850792.**

KIM, J., GHERASIM, C., BANERJEE, R., 2008. Decyanation of vitamin B12 by a trafficking chaperone. **Proc. Natl. Acad. Sci**. U.S.A. 105, 14551–14554.

KIBRIYA, M. G., JASMINE, F., PARVEZ, F. et al. Association between genomewide copy number variation and arsenic-induced skin lesions: a prospective study. **Enciron Health** 2017;16.

KOEDRITH, P., SEO, Y. R. Advances in carcinogenic metal toxicity and potential molecular markers. **Int. J. Mol Sci. 2011;12:9576-954.**

KONIGSBERG, W., GUIDOTTI, G. HILL, R. J. 1961 The amino acid sequence of the a chain of human hemoglobin. **J. Biol. Chem.** 236: PC55-PC56.

KOURY, M. J., PONKA, P. 2004. New insiugth into erythropoiesis: the roles of folate, vitamin B12, and iron. **Annu Rev Nutr** 24, 105-131.

KOURY, J. C., DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidative e atividade fisica. **Ver Nutr.** 2003; 16(4): 433-41. DOI: 10.1590/*S1415-52732003000400007.

KUMAR, A., CLARK, C.S., 2009. **Lead loadings in household dust in Delhi, India**. Indoor Air 19, 414–420.

KUO, C. C. et al. The association of Arsenic metabolismo with Cancer, Cardiovascular disease, and Diabets: A systematic Review of the Epidemiological Evidence. **Enciron Health Perspect,** v. 125, n. 8, p. 087001, Aug. 1, 2017.

KWONG, R. C. et al. Arsenic exposure predicts bladder cancer survival in a US population. *World J Uro*l, v. 28, n. 4 p. 487-92, Aug. 2010

LANZER, R. M. Lagoas Costeiras: patrimônio ambiental do Rio Grande do Sul. Pelotas, **Cadernos do LEPAARQ**, v. 2, n. 3, jan./jul. p. 103-110, 2005.

LEE, J. C., CHEN M. J., CHANG, C. H. et al. Plasm amino acid levels in patients with colorectal cancers and liver cirrhosis with hepatocellular carcinoma. **Hepato-gastroenterol** 2003; 50;1269-73.

LEHMANN, H. 1957. HAEMOGLOBIN AND ITS ABNORMATILIES. Practitioner 178:198-214.

LIMA, Elysson David de Satana. “Avaliação das concentrações de elementos inorgânicos potencialmente tóxicos presntes em águas e moluscos do complex estuarino lagunar Mundaú/Manguaba: possivel fonte de contaminação à saúde humana. 2012.

LIM, S. S., VOS, T., FLAXMAN, A.D. et al., A comparative risk assesssment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk fator clusters in 21 regions, 19990-2010: a systematic analysis for the global Burden of Disease study 2010. Lancet**.** 2012;380:2224-2260.

LIOCHEV, S.I., FRIDOVICH, I., 2000. Copper-and zinc-containing superoxide dismutase can act as a superoxide reductase and a superoxide oxidase. **J. Biol. Chem.** 275,38482-38485.

LUSHCHAK, V.I. Free radicals, reactve oxygen species, oxidative stress and its classification, **Chemico-Biological Internations** 2014, 224C 164-175.

MACÊDO, S. J. de; MONTES, M. de J.F.; LINS, I. C. Caracteristicas abióticas da área. In: BARROS, Henrique Monteiro de et al. (Ed). **Gerenciamento participativo de estuários e manguezais.** Recife: Ed. Universitária da UFPE, 2000, p. 7-25.

MAHESHWARI, N.;KHAN, F.; MAHMOOD,R. Sodium meta-arsenite induced reactive oxygen species in human red blood cells: impared antioxidant and membrane redox systems, haemoglobin oxidation, and morphological changes. Free Radic Res, v. 51, n. 5, p. 483-497, May 2017.

MAIRBAURL, H. 2013. Red blood cells in sports: effects of exercise and training on oxygen supply by red blood cells. **Front Physiol** 4, 332. DOI: 10.3389/fphys.201 300332.

MANDAL, B.K., SUZUKI, K.T., 2002. Arsenic round the world: a review. **Talanta** 58, 201–235.

MARIA, V. L.; CORREIA A. C.; SANTOS M. A. Genotoxic and hepatic biotransformation responses induced by the overflow of pulp mill and secondary treated effluents on *Anguila anguila L.* **Ecotoxicology and Enviromental Safety,** v.55, p.126-137, 2003.

MEYER, A. J.; HELL, R. Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups. **Phostosynth Res,** v. 86, n. 3, p. 435-57, Dec 2005.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Macrodiagnóstico da Zona Costeira e Marinha do Brasil**. Brasília: MMA, 2008. 242 p.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Plano de Ação e Gestão Integrado do Complexo Estuarino Lagunar Mundaú Manguaba (CLMM)**. 2005. Disponível em: www.ana.gov.br. Acessado em janeiro de 2017.

MIRANDA LB, CASTRO BM & KJERFVE B. 2002. **Princípios de oceanografia física de estuários**. EDUSP, São Paulo, 414 p.

MISRA, H.P., FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem**., 247, 3170-3175 (1972).

MOHANDAS, N., GALLAGHER, P. G. Red cell membrane: past, present, and future. Blood 2008; 112:3939-3948.

MONTANHA, F. P., ASTRAUSKAS, J. P., KIRNEW, M. D., NAGASHIMA, J. C., & PIMPÃO, C. T. (2011). Degradação de ambientes aquáticos por exposição a compostos químicos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, 10(17), 1-12.

MOON K. A., GUALLAR, E., UMANS, J. G., DEVEREUX, R. B., BEST, L. G., FRANCESCONI, K. A., et al. 2013. Association netween exposure to low to moderate arsenic levels and incident cardiovascular disease: a prospective cohort study. *.* 159 (10):649-659.

NAKMAREONG, S., KUKONFVIRIYAPAN, U., PAKDEECHOTE, P., DONPUNHA, W., KUKONGVIRIYAPAN, V., KONGYINGYOES, B., SOMPAMIT, K., PHISALAPHONGH, C. Antioxidante and vascular protective effects of curcumin and tetrahydrocurcumin in rats with L-NAME- induced hypertension. Naunyn Schmiedebergs Arch. **Pharmacol**. 2011, 383,519-529.

NAVAS-ACIEN, A. et al. Metals in urine and periphenal arterial disease. Environ Health Perspect, v. 113, n 2,p.164-9, Feb 2005.

NEEDLEMAN, H. Lead poisoning. Annu Rev Med 2004;55:209-22.

NELSON, D. L. C., M. M. Lehninger Principles of Biochemistry. 6ª. Freeman, W. H. & Company, 2014. 1328 ISBN 8428216037.

NÓBREGA T. F. Análise Ecotoxicológica dos estuários do Rio Jundiaí-Potengi e Piranhas-Açu, Rio Grande do Norte. 2015. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Departamento de Oceanografia e Limnologia. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

NOVELLI, E.L.B., MARQUES, S.F.G., ALMEIDA, J.A., DINIZ, Y.S., FAINE, L.A., RIBAS, B.O., 2000.Mechanism of cadmium exposure on cardiac tissue. **Toxic Subst. Mech**. 19, 207–217.

OBIOHA, U. E., SURU, S.M., OLA-MUDATHIR, K.F., FAREMI, T. Y. Hepatoprotective potentials of onion and garlic extracts on cádmium-induced oxidative damage in rats. Biol. **Trace Elem. Res.** 2009, 129,143-4156.

OBENG-GYASI, E., ARMIJOS, R. X., WEIGEL, M. M., FILIPPELLI G. M., SAYEGH M. A. Cardiovascular-related outcomes in US adults exposed to lead. Int j Environ Res Public Health 2018; 15:759.

ORSOLIN DA SILVA, D. R., AVILA, L. A., AGOSTINETTO, D., DAL MAGRO T., OLIVEIRA, E., ZANELLA. R., NOLDIN, J. A. Monitoramento de agrotóxicos em águas superficiais de regiões orizícolas no sul do Brasil. **Cienc. Rural** vol.39 no.9 Santa Maria Dec. 2009.

PAGLIA, D. E. A. V., W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. V. 70, n. 1, p.158-169,03/21/1967 1967.

PARK, S., YOKOYAMA, T., SHIBAYAMA, N., SHIRO, Y., TAME, J. R. 2006.1.25 A resolutions crystal structures of human haemoglobin in the oxy, deoxy and carbomonoxy forms. **J MOL BIOL** 360: 690-701.

PARK, Y. BEST, C. A., AUTH, T., et al. Metabolic remodeling of the human red blood cell membrane. Proc Natl Acad Sci 2010; 107: 1289-1294.

PATIL A.J., BHAGWAT V.R., PATIL J.A., DONGRE N.N., AMBEKAR J.G., DAS K.K. (2006) Biochemical aspects of lead exposure in silver jewellery workers of Western Maharashtra (India**). J Basic Clin Physiol Pharmacol** 17:213–229.

PATRICK, L., 2006. Lead toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. **Altern. Med. Rev**. 11, 114–127.

PEDROSA LFC, COZZOLINO SMF. Composição centesimal e de minerais de mariscos crus e cozidos da cidade de Natal/RN. **Ciênc. Tecnol. Aliment**. 2001; 21(2): 154-157.

PELÁEZ-RODRIGUES, M.; PERET, A.M.; TUNDISI, T.M.; ROCHA, O. Análise da Qualidade da Água e Aplicação do Índice de proteção da Vida Aquática (IVA) em Duas Sub-Bacias da bacia hidrográfica do Rio Jacaré-Guaçú. In: ESPÍNDOLA, E.L.G.; PASCHOAL, C.M.R.; ROCHA, O.; BOHRER, M.B.C.; OLIVEIRA-NETO, A.L. (Org.).**ECOTOXICOLOGIA Perspectivas Para o século XXI**. 1 ed. São Carlos: RiMa, 2000, v. 1, p. 95-114.

PERUTZ, M. 1960. Structure of hemoglobina. **Brookhaven Symp Biol** 13: 165-183.

PERRY, J.J.P. et al., The structural biochemistry of the superoxide dismutases. **Review. Biochimica et Biophysica Acta** 1804. 245-262.2010.

PINTO, J. I. A. **Estudo dos níveis de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em *nodipecten nodosus* (Coquilles Saint Jacques) de fazendas marinhas da Baía de Ilha Grande, RJ.** 2008. 100 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ciências na área de Saúde Pública, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

PRASAD, A.S., 2009. Zinc: role in immunity, oxidative stress and chronic inflammation. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab**. Care 12, 646–652.

PRITCHARD, D. W. What is an estuary?. Physical viewpoint, 1967. In: McLUSKY, D. S. **The estuarine ecosystem**. London, Blackie, 1989.

PROUSEK, J., 2007. Fenton chemistry in biology and medicine. **Pure Appl. Chem.** 79, 2325-2338.

PATCHINEELAM, S. 2000. **Sedimentação Estuarina**. Publicação Eletrônica. Disponível em: htto//www.usu.br/icba/oceano2. Acesso em: 12 de outubro de 2018.

QUIEVRYN, G., MESSER, J., ZHITKOVICH, A., 2002. Carcinogenic chromium(VI) induces cross-linking of vitamin C to DNA in vitro and in human lung A549 cells. **Biochemistry** 41, 3156–3167.

RAND, G. M., WELLS, P. G., MCCARTY, L. S. **Fundamentals of Aquatic Toxicology**: Effects,Environmental Fate, and Risk Assessment; Rand, G. M., ed.; 2nd ed., Taylor & Francis: Washington, cap. 1, 1995.

RATTNER, H. **Meio ambiente, saúde e desenvolvimento sustentável**. Ciência & Saúde Coletiva, v.14, n.6, p.1965-1971, 2009.

RIFKIND, J.M. et al. Hemoglobin redox reactions and oxidative stress. **Redox Rep.** v. 8, n. 5, p. 234-7, 2003.

RIKANS, L. E., YAMANO, T. Mechanisms of cádmium mediated acute hepatotoxicity. **J biochem Mol Toxicol.** 2000;14:110-7.

ROSENFELD, M.E. Inflammation and atherosclerosis: direct versus indirect mechanisms. Curr Opin Pharmacol 2013;13:154-60.

RUSH, T. LIU, X., NOWAKOWKI, A.B., et al. Glutathione-mediated neuroprotection against methylmercury neurotoxicity in cortical culture is dependent on MRP1. **Neutoxicology. 2012;33:476-481.**

SABATH, E., ROBLES-OSORIO, M. L. Renal health and the environment: “heavy nephrotoxicity. ” **Nefrologia,** vol. 32, n. 3, p. 279-286,2012.

SALLONEN J.T., SEPPANEN K., LAKKA T.A., et al. Mercury accumulation and accelerated progression of carotid atherosclerosis: a populationbased prospective 4-year follow-up study in men in eastern Finland. **Atherosclerosis**. 2000;148:265–273.

SANDERS T., Y. LIU, V. BUCHNER, P.B. TCHOUNWOU, Neurotoxic effects and biomarkers of lead exposure, **Rev. Environ. Health** 24 (January-March (1)) (2009) 15–45.

SANTOS, T. M.M. Análise química e microbiológica do sururu “Mytella faltaca” com e sem leite de coco. 2009. 103 Dissertação (Master). FACULDADE DE NUTRIÇÃO, UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS, Maceió.

SANTOS, Everson Cardoso dos; SAMPAIO, Cláudio Luis Santos. A pesca artesanal na comunidade de Fernão Velho, Maceió (Alagoas, Brasil): de tradicional a marginal. **Revista de Gestão Costeira Integrada**, v. 13, n. 4, p. 413-424, 2013.

SATO, M., KONDOH, M. Recent studies on metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals. **Tohoku J Exp Med.** 2002; 196:9-22.

SCHECHTER, A.N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. **Blood**, v. 112, n. 10, p. 3927-38, Nov 15 2008.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D.P. Oxidative stress. **Annu Rev Biochem,** v. 86, p. 715-748, Jun 20 2017.

SILVA, E. A., Influência da matéria orgânica extraída do material particulado em suspensão na disponibilidade de metais potencialmente tóxicos na Laguna Mundaú, Alagoas. 2017. **Dissertação de mestreado em química e biotecnologia, universidade federal de alagoas.**

SILVA, C.S. (1994) – Distribuição e abundância da fauna macrobentônica do Complexo Estuarino Mundaú/Manguaba (Alagoas – Brasil**). *Boletim de Estudos de Ciências do Mar*,** 8:45-64, Maceió, AL, Brasil.

SILVA, C.S. & PEREIRA-BARROS, J.B. (1987) – Inventário da malacofauna do Complexo Lagunar Mundaú/ Manguaba, Alagoas**. *Boletim de Estudos de Ciências do Mar*,** 6:65-74, Maceió, AL, Brasil.

SINICROPI, M.S., AMANTEA, D., CARUSO, A., SATURNINO, C., 2010. Chemical and biological properties of toxic metals and use of chelating agents for the pharmacological treatment of metal poisoning. **Arch. Toxicol**. 84, 501–520.

SMITH A. H., STEINMAUS, C. M.M health effects of arsenic and chromium in drinking water: recent human findings. Annual review of public health. *Palo Alto: Annual Reviews*, 2009: 107-22.

STADLER, N., LINDNER, R.A., DAVIES, M. J., 2004. Direct detection ans quantification of transition metal ions in human atherosclerotic plaques: evidence for the presence of elevated levels of iron and copper. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 24, 949-954.

TACON, A.G.J.; METIAN, M. Fish matters: Importance of aquatic foods in human nutrition and global food supply. **Rev. Fish. Sci**. **2013**, 21, 22–38.

TAMANO, L.T.O.; ARAUJO, D.M.; LIMA, B.B.C.; SILVA, F.N.F.; SILVA, J.. Socioeconomia e saúde dos pescadores de Mytella falcata da Lagoa Mundaú, Maceió-AL. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. **Ciências Humanas**, v. 10, n. 3, p. 699-710, set./dez. 2015. DOI: http://dx.doi.org/10.1590/1981-81222015000300011.

TEIXEIRA, C., 1969. **Estudo sobre algumas características do fitoplâncton da região de Cananéia e o seu potencial fotossintético**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, 82p.

TEIXEIRA, F. B., FERNANDES, R. M., FARIAS-JUNIOR, P. M., COSTA, N. M., FERNANDES, L. M., SANTANA, L. N., et al. (2014). Evaluation of the effects of chronic intoxication with inorganic mercury on memory and motor control in rats.
Int. Environ. **J. Res. Public Health** 11, 9171–9185. doi: 10.3390/ijerph11090
9171.

THOMAS, J. A. Estresse oxidativo e defesa contra oxidantes. In: SHILS, M. E.; OLSON, J. A.; SHIKE, M.; ROOS, A. C. Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença. 9. Ed. São Paulo: Manole, 2003 cap. 46, p.801-811.

THURMAN, H. V. e TRUJILLO, A. P. **Essentials of oceanography**. New Jersey: Prentice Hall, 1999. P.527.

TOLINS, M. RUCHIRAWAT, M. LANDRIGAN, P.2014. The developmental neutotoxicity of arsenic: congnitive and behavioral consequences of early life exposure. **Ann Glob Health** 80(4): 303-314.

TOSTESON, D. C., HOFFMAN, J. F. Regulation ofcell volume by active cation transport in high and low potassium sheep red cells. **J Gen Physiol.** 1960: 44:169-194.

TSAI, S. Y., CHOU, H. Y., THE, H. W., CHEN, C. M., CHEN, C.J. The effects of chronic arsenic exposure from drinking water on the neurobehavioral development in adolescence. **Neurotoxicology.** 2003;24(4-5):747-53.

TUNDISI, J. G.; MATSUMURA-TUNDISI, T. Limnologia. São Paulo: Oficina de textos, 2008.

VALKO, M.,MORRIS, H., CRONIN, M.T.D., 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. **Curr. Med. Chem**. 12, 1161–1208.

VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M.T.D., MAZUR, M., TELSER, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int. J. Biochem. **Cell Biol**. 39, 44–84.

VAZQUEZ, F. J. (2005) **Las tesinas de Belgrano: toxicidad comparada de zinc, plombo y mercúrio para zoea I de *Chasmagnatus granulata* (Brachyura)**. Faculdad de Ciências exactas e Naturales. Carrera de Licenciatura e Ciências Biológicas, 110p.

VERCESI, A.E. et al. Mitochondrial calcium transport and redox nature of the calcium-induced membrane permeability transition. **Free Radic Biol Med,** v. 129, p. 1-24, Dec 2018.

WAALKES, M.P., LIU, J., WARD, J.M., DIWAN, L.A., 2004. Mechanisms underlying arsenic carcinogenesis: hypersensitivity of mice exposed to inorganic arsenic during gestation. **Toxicology** 198, 31–38.

WANDERLEY, A. D. P. Extração e carcterização de substâncias húmicas aquáticas do complexo estuarino lagunar Mundaú/Manguaba e interação com íons Hg (II). 2018.

WATSON, H.C., KENDREW, J. C. 1961. The amino-acid sequence of sperm whale myoglobin. Comparison between the amino-acid sequences of sperm whale myoglobin and human hemoglobin. **Nature** 190: 670-672.

YILDIZ, M. et al. Lipid peroxidation and DNA oxidation caused by dental filling materials. J Dent Sci, v. 12, n. 3, p. 233-240, Sep 2017.

YIM, M.B., YIM, H.S., LEE, C., KANG, S.O., CHOCK, P.B., 2001. Protein glycation: creation of catalytic sites for free radical generation. Ann. N.Y. **Acad. Sci**. 928, 48–53.

7. ANEXO I

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da exposição a contaminantes inorgânicos (Hg, As, Se, Cd e Pb) no ambiente e parâmetros bioquímicos associados ao estresse oxidativo da população circunvizinha ao Complexo Lagunar Mundaú-Manguaba (Maceió-AL): correlação entre contaminação ambiental e qualidade da saúde humana.

Pesquisador: Josué Carinhanha Caldas Santos

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 57998116.8.0000.5013

Instituição Proponente: Universidade Federal de Alagoas

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE ALAGOAS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.684.743

Apresentação do Projeto:

Os proponentes descrevem o projeto da seguinte forma:

"Este projeto pretende avaliar a concentração total de contaminantes inorgânicos Hg, As, Se, Cd e Pb em amostras de água e sururu do Complexo Estuarino Lagunar Mundaú-Manguaba (CELMM) referente ao município de Maceió-AL visando estabelecer o perfil de contaminação ambiental deste sistema de grande importância econômica, turística e social. Uma vez realizado este mapeamento ambiental pretende-se quantificar os níveis destes elementos e biomarcadores do estresse oxidativo (espécies reativas de oxigênio, GSH e GSSG, enzimas antioxidantes, ALA-D e 8-isoprostano) em amostras de sangue e urina de voluntários que residam no entorno do CELMM (Maceió-AL) com preferência para pescadores e habitantes em condição vulnerável. Desta forma, podemos estabelecer um paralelo entre a contaminação ambiental e o efeito na saúde da população, uma vez, que a contaminação pelos elementos citados pode levar a condição de estresse oxidativo, e desta forma se relacionar com um grande número de doenças e agravos da saúde. Salienta-se que ainda não foram realizados estudos desta natureza na região do CELMM ou até mesmo no estado de Alagoas. Neste sentido, estes dados podem nortear o SUS para o entendimento de possíveis causas de doenças relacionado ao perfil da população. Para contextualizar, tem-se que pelos dados mais recentes divulgados pela Secretaria de Estado da Saúde a frequência de internações da 1ª região (a qual está contida Maceió) por doenças associados ao estresse oxidativo (como diabetes mellitus, por exemplo), corresponderam a 33,7% do total e, estas foram responsáveis por cerca de 46% dos óbitos referente ao período de 2007-2013. Contudo, se os homicídios e acidentes de trânsito forem omitidos deste do número total de óbitos e levando-se em conta somente as mortes relacionadas a doenças, este valor passa para quase 68% no total de mortes associadas a doenças com relação direta ao estresse oxidativo. Logo, fica evidente a necessidade de se identificar as principais causas, e como a exposição ambiental se relaciona com estes indicadores da saúde e ao estresse oxidativo da população. Assim, podese reduzir o impacto no SUS quanto a estas doenças em virtude da melhoria da qualidade de atenção à saúde através da identificação das principais doenças associadas a exposição ambiental.Por fim, os resultados obtidos podem conduzir a ações que forneçam subsídios para o planejamento e desenvolvimento de mecanismos de gestão capazes de garantir transformações sociais para implementação/manutenção de padrões de qualidade ambiental e saúde da população, além, de contribuir para o aprimoramento e consolidação do SUS e desenvolvimento científico de Alagoas."

Objetivo da Pesquisa:

Os objetivos apresentados foram:

"Objetivo Primário:

Avaliação das concentrações totais de Hg, As, Se, Cd e Pb e biomarcadores do estresse oxidativo (produção de espécies reativas de oxigênio, glutationa reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), superóxido dismutase (SOD), catalase, glutationa peroxidase (GSPx), dehidratase gamaaminolevulinato (ALA-D) e 8- isoprostano) em amostras de sangue, plasma e urina de voluntários que residam no entorno do CELMM relativo ao município de Maceió (AL) e avaliar se existem correção entre a exposição ambiental a estes elementos e doenças relacionadas ao estresse oxidativo para população que vive no entorno doo Complexo Estuarino Lagunar Mundaú-Manguaba (Maceió - AL)"

"Objetivo Secundário:

Levantamento e mapeamento do atual estágio de poluição do CELMM (água e sururu) quanto a concentração de Hg, As, Se, Cd e Pb e o possível impacto a população através da identificação dos principais problemas de saúde da população do CELMM avaliada e o impacto da exposição humana ao ambiente."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios com relação aos participantes são:

"Riscos:

Possivelmente durante a coleta das amostras de sangue pode ocorrer dor, hematomas, acidente com perfurocortantes, punção acidental de uma artéria e lesão nervosa. Contudo, este procedimento serão realizados por profissional da saúde com experiência e segundo as boas práticas individuais que seguem tal procedimento visando eliminar os riscos inerentes ao procedimento."

"Benefícios:

Os principais benéficos seriam obter informações inéditas e traçar um perfil da relação dos biomarcadores do estresse oxidativo com contaminantes inorgânicos (Hg, As, Se, Cd e Pb) no ambiente e nas amostras biológicas (sangue, plasma e urina) com os principais problemas de saúde da população do CELMM (Maceió-AL). Assim, com mapeamento da região quanto aos contaminantes inorgânicos, pretende-se

diminuir o impacto da população a possíveis contaminações agudas, e a incorporação destes resultados em políticas públicas deve nortear a melhoria dos parâmetros ambientais e da saúde visando reduzir impactos ao SUS e município. Além disto, os resultados obtidos neste projeto fornecerão subsídios para o gerenciamento dos riscos, buscando a implantação de medidas para manutenção ou redução da exposição para níveis que atendam aos limites estabelecidos pela legislação (quando houver), não causando danos aos trabalhadores (pescadores) e população local de forma geral."

-Como os procedimentos de coleta das amostras serão realizados por profissionais da área da saúde, os riscos podem ser considerados mínimos e os benefícios com relação aos indivíduos e ao meio ambiente parecem plausíveis.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

-Pesquisa relevante, principalmente para os habitantes da região da coleta de amostras;

-Pode vir a ser um embasamento para políticas de saúde pública da população presente no entorno da lagoa Mundaú;

-A metodologia está clara;

-O projeto enfatiza a formação de recursos humanos e fortalecimento dos grupos de pesquisa envolvidos;

-Propõe "realização de oficinas e cursos informativas para população circunvizinha do CELMM (Maceió-AL)";

-O TCLE está de acordo com as normas do CEP;

-O projeto foi submetido ao Edital FAPEAL 06/2016 – PPSUS.

De acordo com a resolução 466/2012.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

18 arquivos foram submetidos devido ao projeto ter sido submetido à FAPEAL: PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_756386.pdf;

Questionario_epidemiologico.pdf;

Declaracao_de_cumprimento_Raphael.pdf;

Declaracao_de_cumprimento_Mariana.pdf;

Declaracao_de_cumprimento_Wander.pdf;

Declaracao_de_cumprimento_Ana_Catarina.pdf;

Declaracao_de_cumprimento_Josue_e_Paulo.pdf;

Declaracao_Publicizacao_Coordenador.pdf;

CL_Raphael_Pinto.pd;

CL_Mariana_Pinheiro.pdf;

CL_Wander_Botero.pdf;

CL_Ana_Catarina_Leite.pdf;

CL_Paulo_Roldan.pdf;

CL_Josue_Carinhanha.pdf;

TCLE_modelo_sugerido.pdf;

Projeto_de_Pesquisa.pdf;

Concordancia_Institucional.pdf

;

Folha_de_rosto_completa.pdf.

Os documentos que necessitam de assinatura estão devidamente assinados.

De acordo com a resolução 466/2012.

Recomendações:

O TCLE precisa ser apropriado para a linguagem dos participantes da pesquisa, sem desconsiderar os itens obrigatórios exigidos na resolução.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pesquisa relevante e de acordo com a resolução 466/2012.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_756386.pdf	14/07/2016 12:26:31		Aceito
Outros	Questionario_epidemiologico.pdf	14/07/2016 12:25:02	Josué Carinhanha Caldas Santos	Aceito

Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_cumprimento_Raphael.pdf	14/07/2016 12:22:27	Josué Carinhanha Caldas Santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_cumprimento_Mariana.pdf	14/07/2016 12:22:08	Josué Carinhanha Caldas Santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_cumprimento_Wander.pdf	14/07/2016 12:21:57	Josué Carinhanha Caldas Santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_cumprimento_Ana_Catarina.pdf	14/07/2016 12:21:47	Josué Carinhanha Caldas Santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_cumprimento_Josue_e_Paulo.pdf	14/07/2016 12:20:01	Josué Carinhanha Caldas Santos	Aceito
Outros	Declaracao_Publicizacao_Coordenador.pdf	14/07/2016 12:19:42	Josué Carinhanha Caldas Santos	Aceito
Outros	CL_Raphael_Pinto.pdf	14/07/2016 11:59:53	Josué Carinhanha Caldas Santos	Aceito
Outros	CL_Mariana_Pinheiro.pdf	14/07/2016 11:59:25	Josué Carinhanha Caldas Santos	Aceito
Outros	CL_Wander_Botero.pdf	14/07/2016 11:59:01	Josué Carinhanha Caldas Santos	Aceito
Outros	CL_Ana_Catarina_Leite.pdf	14/07/2016 11:58:31	Josué Carinhanha Caldas Santos	Aceito
Outros	CL_Paulo_Roldan.pdf	14/07/2016 11:56:18	Josué Carinhanha Caldas Santos	Aceito
Outros	CL_Josue_Carinhanha.pdf	14/07/2016 11:54:12	Josué Carinhanha Caldas Santos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_modelo_sugerido.pdf	14/07/2016 11:47:56	Josué Carinhanha Caldas Santos	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_Pesquisa.pdf	14/07/2016 11:46:58	Josué Carinhanha Caldas Santos	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Concordancia_Institucional.pdf	14/07/2016 11:45:02	Josué Carinhanha Caldas Santos	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_completa.pdf	14/07/2016 11:39:54	Josué Carinhanha Caldas Santos	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MACEIO, 18 de Agosto de 2016

Assinado por:

Wagnner José Nascimento Porto
(Coordenador)

8. ANEXO II

Informações Gerais

Projeto a ser submetido no âmbito do Edital FAPEAL 06/2016 – PPSUS, Programa Pesquisa para o SUS: gestão compartilhada em Saúde.
Eixo 3: Saúde, ambiente, trabalho e biossegurança
Subeixo: Saúde ambiental e biossegurança
Linha de pesquisa: Avaliação e monitoramento de parâmetros da qualidade do ambiente (químicos, físicos, biológicos e/ou psicossociais) relacionados à saúde.

Título

Avaliação da exposição a contaminantes inorgânicos (Hg, As, Se, Cd e Pb) no ambiente e parâmetros bioquímicos associados ao estresse oxidativo da população circunvizinha ao Complexo Lagunar Mundaú-Manguaba (Maceió-AL): correlação entre contaminação ambiental e qualidade da saúde humana.

Coordenador (Proponente)

Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos
Instituto de Química e Biotecnologia,
Universidade Federal de Alagoas, Campus A.C. Simões, Maceió, Alagoas, Brasil.

Instituição de execução

Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas
LINQA - Laboratório de Instrumentação e Desenvolvimento em Química Analítica
LAMP – Laboratório de Metabolismo e Proteômica

Instituições de Coexecutoras

Curso de graduação em Biomedicina, Centro de Estudos Superiores de Maceió - CESMAC
Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Período de desenvolvimento do projeto

Outubro/2016 a outubro/2018

VI.1 Folha de rosto: título do projeto, nome, número da carteira de identidade, CPF, telefone e endereço para correspondência do pesquisador responsável e do patrocinador, nome e assinaturas dos dirigentes da instituição e/ou organização

Em anexo à submissão do projeto pelo formulário eletrônico.

VI.2 Descrição da pesquisa, compreendendo os seguintes itens:

a) descrição dos propósitos e das hipóteses a serem testadas

A hipótese a ser testada no projeto é: a contaminação ambiental relativa a água e alimento (sururu) do Complexo Estuarino Lagunar Mundaú-Manguaba (Maceió - AL) quanto aos elementos Hg, As, Se, Cd e Pb pode induzir ao estresse oxidativo da população pela alteração de biomarcadores e, desta forma, levar ao desenvolvimento ou agravamento de doenças.

b) antecedentes científicos e dados que justifiquem a pesquisa

A região do Complexo Estuarino Lagunar Mundaú-Manguaba (CELMM) em Alagoas abrange cerca de 300 mil habitantes que vivem no seu entorno. Este apresenta intensa atividade antrópica, elevada ocupação populacional, influência do pólo cloroquímico e atividade sucro-alcooleira, crescimento desordenado da área urbana sem saneamento básico levando a população e o ambiente a uma condição de vulnerabilidade [1-3]. Contaminantes inorgânicos (CI) tem especial atenção pela toxicidade e, sobretudo neste projeto, pela ausência de estudos sistemáticos no CELMM.

Nosso grupo de pesquisa, foi pioneiro e avaliou o teor de Pb na água e sururu em diferentes pontos do complexo [4, 5], sendo que em alguns locais a concentração foi 5 vezes superior ao estabelecido pela legislação para água [6], e no sururu (*Mytella falcata*) chegou a 4,1 ug/g, contudo no Brasil não existe para este alimento limite legal. Contudo, que se tenha registro até o momento não houveram outros estudos no CELMM quanto a CI e o impacto para a ambiente ou saúde humana. Intoxicações por espécies inorgânicas alteram as estruturas celulares, inativam enzimas, oxidam DNA, entre outros aspectos [7]. De acordo com os órgãos de saúde, 90% da ingestão de metais e outros contaminantes ocorrem através do consumo de água e alimentos [8].

Assim, a exposição humana a contaminantes como Hg, As, Se, Cd e Pb pode levar ao estresse oxidativo que acarreta em disfunções neurológicas [9], câncer [10], doenças cardiovasculares [11], diabetes, processos de inflamação, doenças neurodegenerativas [12], dentre outras doenças ou problemas de saúde.

Os efeitos tóxicos destes CI são geralmente associados ao aumento da geração de espécies reativas de oxigênio, alteração da atividade de enzimas antioxidantes e depleção do sistema antioxidante [13]. Estudos recentes têm demonstrado relação direta da exposição a CI como Hg, As, Se, Cd e Pb no ambiente (água e alimentos) com suas concentrações em amostras biológicas (sangue, plasma, urina e cabelo, por exemplo) e biomarcadores do estresse oxidativo (níveis de GSH e GSSG, catalase, GluPx, ALA-D, entre outros) [14-17]. Além disto, para o monitoramento de citotoxicidade por espécies metálicas, os linfócitos circulantes são excelentes marcadores devido a sua acessibilidade, método de obtenção menos invasivo e potencialidade para responder a diversos questionamentos sobre efeitos de toxidade. Os elementos e espécies derivadas que apresentam efeitos tóxicos são responsáveis pela diminuição da circulação dos principais componentes do sistema imune, os anticorpos, que são produzidos pelos linfócitos.

Estudos como os realizados por Grotto e cols [13] mostraram associação entre a exposição ambiental a Hg e estresse oxidativo em linfócitos de moradores de comunidades das regiões ribeirinhas do rio Amazonas. Tal trabalho mostrou que tanto o efeito da contaminação com Hg e derivados nos peixes consumidos pela população

tinha relação direta com os teores deste elemento no cabelo, plasma e o sangue de tal população. Além disto, influenciou diretamente os níveis de glutationa reduzida, a atividade das enzimas catalase, glutationa peroxidase e dehidratase δ-aminolevulinato. Outro estudo, visando ilustrar a importância do tema foi realizado por Nascimento e cols [9] que fizeram uma relação à exposição ambiental a múltiplos elementos (Pb, As, Cr, Mn, Fe) de centro urbanos e rural com crianças da região Sul do Brasil. Foi concluído que os indivíduos de regiões rurais eram mais expostos a toxicidade dos elementos, o que levou à um déficit de cognição e diminuição da atividade da enzima dehidratase δ-aminolevulinato.

Neste contexto, a ausência de dados ambientais relativos a concentração de CI no CELMM e da população que vive em seu entorno são preocupantes. Assim, este projeto busca realizar uma avaliação sistemática da concentração total de Hg, As, Se, Cd e Pb em diferentes pontos do CELMM quanto à qualidade da água e do sururu consumido pela população. Além de monitorar estes CI e biomarcadores do estresse oxidativo em amostras biológicas de voluntários que residam no entorno do complexo. Por fim, os resultados obtidos podem conduzir a ações que forneçam subsídios para o planejamento e desenvolvimento de mecanismos de gestão capazes de garantir a manutenção de padrões adequados de qualidade ambiental e saúde da população.

O CELMM abrange um dos sistemas estuarinos mais importantes do país e vem sofrendo um processo acelerado de degradação ambiental, afetando seus habitantes que tem como base alimentar o sururu. O sururu é um organismo filtrante e bioacumulador a contaminação da água, sendo abundante no CELMM e consumido/comercializado pela população local, representando sua maior fonte de renda. Desta forma, a exposição ambiental a água e sururu pode levar a contaminação direta da população que depende de ambos. Com base nos nossos dados preliminares quanto a elevada concentração de Pb é necessário um levantamento dos níveis de CI nas amostras ambientais e biológicas, avaliando se os biomarcadores estão sendo alterados e por consequência, se esta exposição se relaciona com doenças associadas ao estresse oxidativo. Além da real necessidade do levantamento destes dados, não existem estudos anteriores que se propuseram a avaliar tais parâmetros, os quais tem impacto direto no SUS.

Segundo o último relatório da análise da situação da saúde de 2014 realizado pela Secretaria de Estado da Saúde [29] a frequência de internações da 1ª região (a qual está contida Maceió) por doenças cerebrovasculares (13,5%), insuficiência cardíaca (12,5%) e diabetes (7,7%) corresponderam a 33,7% do total. Sendo que todas estas doenças têm relação direta com estresse oxidativo. De forma geral, as doenças citadas aumentaram sua incidência de internações no período de 2007-2013. Particularmente merece mencionar a variação para diabetes mellitus que para o munícipio de Maceió observou-se aumento de cerca de 20% nas internações. Para corroborar estes dados tem-se que as 5 principais causas de óbitos na primeira região são devido a homicídios (26,7%), seguido por doenças cerebrovasculares (16,3%), diabetes mellitus (12,2%), infarto agudo do miocárdio (8,9%) e doenças hipertensivas (8,6%). Nota-se que exceto para os homicídios as outras quatro causas são todas relacionadas a doenças com relação direta ao estresse oxidativo, perfazendo 45,9% do total de óbitos. Se não considerarmos o efeito dos homicídios e acidentes de trânsito neste percentual e, levando em conta somente as mortes relacionadas a doenças, este percentual passa para 67,8% no total de óbitos de acordo com relatório da Secretaria de Estado da Saúde [29].

Estes dados têm impacto direto no SUS, e os mesmos podem ser mais críticos em populações expostas a CI no ambiente. Neste contexto, existe necessidade imediata na realização de estudos com os habitantes que vivem no entorno do CELMM, principalmente pescadores e população em condição vulnerável para avaliar se a exposição ambiental da água e alimento (sururu) quanto aos CI tem relação com biomarcadores do estresse oxidativo e, por consequência, as principais doenças desta população. Os resultados deste projeto irão fornecer subsídios para tomada de decisões públicas visando a melhoria da qualidade da saúde humana e ambiental, assim como trazer um menor impacto ao SUS.

c) descrição detalhada e ordenada do projeto de pesquisa

1. material e métodos

A descrição da metodologia contida no formulário eletrônico foi a mesma do projeto a ser submetido para FAPEAL. Por questões de restrições quanto ao número de caracteres a mesma foi objetiva. Assim, abaixo segue uma versão estendida da metodologia com mais detalhes.

Água e sururu

Serão selecionados no mínimo dez pontos distintos no CELMM (Maceió-AL) para coleta das amostras de água e sururu (*Mytella falcata*) com uma periodicidade entre 4-6 meses a depender das condições ambientais. Os locais serão identificados a partir de coordenadas por GPS. Amostragem, condicionamento e tratamento da amostra de água seguirá protocolos já descritos na literatura [4, 5]. Os procedimentos de preparo, armazenamento e digestão das amostras de sururu seguirá trabalho anterior do grupo [4]. A quantificação dos teores totais de Hg, Se e As nas amostras ambientais serão realizados por vapor frio e/ou sistema de geração de hidretos por espectrometria de fluorescência atômica (CV/HG AFS) [18, 19], enquanto Cd e Pb por cronopotenciometria de redissolução anódica (SCP) [20].

Sangue, plasma e urina:

Inicialmente será realizado um levantamento dos voluntários (preferencialmente pescadores e população em condições vulnerável) para participação deste projeto, sendo considerados homens e mulheres com idade igual ou acima de 18 anos. Os questionários epidemiológicos serão aplicados e as amostras de sangue e urina recolhidas. No presente estudo estima-se um total de voluntários entre 100-130.

Coleta das amostras

A urina dos participantes será coletada em tubos específicos e mantidos congelados em freezer específico (-80ºC) até a realização dos testes desejados.

As amostras de sangue venoso serão obtidas através de punção de veia em dois tubos com vácuo (BD Vacutainer) contendo anticoagulante EDTA ou Heparina. Para a separação do sangue e do plasma, as amostras de sangue serão centrifugadas à 1000x*g* por 6 min. Após centrifugação e separação, tais amostras serão mantidas congelados em freezer específico (-80ºC) até a realização dos testes desejados. O sangue obtido na presença do EDTA será transferido para tubo falcon de 15 ml contendo 2 ml de Ficoll-Hypaque (d = 1,076g/ml) para a obtenção das células linfomonucleares.

Isolamento de células linfomononucleares a partir de sangue

Após a separação das células linfomononucleares pelo Ficoll, a transferência de tais células será realizada com o auxílio de pipeta Pasteur, para evitar a mistura do sangue com o ficoll, de modo a formar duas fases. Em seguida, as amostras serão centrifugadas a 2000 rpm por 20 minutos. Após centrifugação, o anel de célula formado na interface das soluções será retirado com pipeta Pasteur e transferido para outro tudo falcon de 15 ml, completando o volume com PBS para 10 ml e em seguida será centrifugado á 1500 rpm por 20 minutos. O sobrenadante será descartado e a fração celular será ressuspensa em 5 ml de tampão de lise, ficando por 15 min em temperatura ambiente. Após esse período, será acrescentado 5ml de PBS e centrifugado a 1500 rpm por 15 minutos. O sobrenadante será novamente descartado e será feita outra lavagem com PBS. A fração celular será ressuspensa em PBS e submetida à coloração por Azul de Tripan para a contagem das células. O procedimento descrito seguirá protocolo de Malaguti et al. [21].

Parâmetros inorgânicos e bioquímicos

Para quantificação do CI as amostras de plasma e urina serão digeridas por procedimentos já bem estabelecidos na literatura [14, 22] e em seguida, Hg, Se e As serão quantificados por CV/HG AFS, enquanto Cd e Pb por SCP.

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) nas células será monitorada por espectrofluorimetria usando o corante permeável à membrana H_2DCF-DA (diacetato de diclorodihidrofluoresceína). O sinal de fluorescência será monitorado usando espectrofluorímetro RF5300 (Shimadzu) operando com comprimento de onda de excitação e emissão de 488 e 525 nm, respectivamente, com largura da fenda de 2,5 nm, sob constante agitação. Nas células isoladas (linfócitos circulantes 10^5 células/ml) a oxidação do marcador fluorescente H_2DCF-DA (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA) será realizada utilizando meio HBSS tamponado a 37°C. A calibração será feita pela adição de concentrações conhecidas de diclorofluoresceína (DCF), o produto da oxidação do H_2-DCFDA [23].

A produção de ânion superóxido de origem mitocondrial será medida usando MitoSOX™ Red (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA). As incubações serão realizadas a 37°C e o sinal de fluorescência emitido pelo MitoSOX™ Red oxidado será monitorado por espectrofluorimetria usando o espectrofluorímetro RF5300 (Shimadzu). MitoSOX™ Red será adicionado as células isoladas e lavadas (linfócitos circulantes 10^5 células/ml), na concentração final de 5 µM em meio e monitorado sob agitação constante à 37°C por 10 min. A intensidade de fluorescência será monitorada com comprimento de onda de excitação e emissão de 510 nm e 580 nm, respectivamente [24].

A dosagem de 8-isoprostanos que é um produto de peroxidação lipídica, será realizada através de um kit Elisa específico (Cayman) seguindo as especificações do fabricante. As medidas em amostras de plasma e urina, bem como a curva de calibração serão realizadas por leitor de Elisa (Flex Station, Molecular Devices).

A concentração de proteína total nas células será determinada pelo método de Bradford (1976) usando um espectrofotômetro de varredura com feixe duplo Shimadzu (modelo TCC-240A, Japão) equipado com cubetas de vidro de 1,0 cm de caminho óptico. Uma curva de calibração com concentrações conhecidas de BSA a 2 mg/mL será utilizada como padrão [25].

A atividade da enzima superóxiodo dismutase (SOD) será avaliada através do método de auto-oxidação do pirogalol, o qual compete com a SOD podendo ser medido em por espectrofotômetria a 420 nm. Em uma cubeta de quartzo de 1 mL, será adicionado tampão fosfato 50 mM, amostra, catalase e pirogalol. Após a adição de cada um dos reagentes será realizada homogenização. A absorbância será registrada por um período de 3 min. Os resultados serão expressos em unidade por miligrama de proteína, sendo uma unidade da SOD definida como a quantidade de proteína requerida para inibir a auto oxidação de 1 µmol de pirogalol por min [26].

A atividade da enzima catalase é baseada na determinação da constante *k* de decomposição de H_2O_2. Nas condições experimentais empregadas (20°C de temperatura, pH 7,0 e 50 mM de tampão fosfato), a constante *k* será definida como $4{,}6x10^7$. A atividade enzimática da catalase será medida através das mudanças na absorbância em 240 nm por min, durante 2 min. Os resultados serão expressos em unidade por miligrama de proteína. Uma unidade de catalase é definida como sendo a concentração de proteína requerida para converter 1 µmol de H_2O_2 por minuto a H_2O [27].

Para medida da atividade da glutationa peroxidase (GPx) serão misturados tampão fosfato 50 mM (pH 7,0) contendo 5 mM de EDTA, NADPH 8,4 mM, glutationa redutase (100µL/mg proteína/ml), NaN_3 1,125 M, glutationa reduzida 0,15 M e a amostra. A reação enzimática inicia-se pela adição de H_2O_2 2,2 mM. A conversão do NADPH em NADP será medida pela absorbância a 340 nm por 4 min após o inicio da reação. A unidade enzimática é definida como oxidação de 1 µmol de NADPH por min por miligrama de proteína e serão calculado com base na absortividade molar do NADPH a 340 nm [28].

Os níveis de glutationa reduzida e oxidada serão medidos separadamente de acordo com método do *o*-ftalaldeído (OPA) por espectrofluorimetria. Esse método é baseado no princípio que o OPA reage com o GSH e GSSG, em pH 8,0 e pH 12, respectivamente, originando um produto altamente fluorescente que pode ser monitorado em 420 nm, após excitação em 350 nm. Os níveis de GSSG serão determinados nas amostras tratadas com N-etilmaleimida (NED) para remover completamente o GSH. As concentrações de GSH e GSSG nas amostras serão calculadas de acordo com uma curva padrão que será preparada com GSH e GSSG, respectivamente [29].

A atividade da dehidratase δ-aminolevulinato (ALA-D) no sangue será realizada pela velocidade de formação do porfobilinogenio, em presença e ausência do agente redutor ditiotreitol a concentração final de 2 mM. A reação será iniciada após 10 min de pré-incubação, pela adição de ácido δ-aminolevulênico em 4 mM de tampão fosfato a pH 6.8 por 1 h a 37ºC, sendo o produto da reação monitorado a 555 nm [14]. O tratamento estatístico e quimiométrico dos resultados será realizado, conforme descritivo no projeto submetido no formulário eletrônico.

Parâmetros químicos e bioquímicos adicionais aos descritos acima podem ser efetuados para maiores esclarecimentos sobre a hipótese do projeto, desde que, não seja necessário uma nova coleta de amostra.

2. casuística

De acordo com os antecedentes científicos e justificativa apresentados anteriormente neste projeto, a ausência de dados ambientais e da população do CELMM (Maceió-AL) quanto aos parâmetros contaminantes inorgânicos e biomarcadores do estresse oxidativo suportam e legitimam a necessidade da realização do projeto proposto.

3. resultados esperados

Os principais resultados que se esperam com a implementação deste projeto são:

1. Levantamento e mapeamento do atual estágio de poluição do CELMM (água e sururu) quanto aos CI selecionados e o possível impacto a população;

2. Identificar os problemas de saúde que dependem de conhecimento científico para a sua resolução através da avaliação do impacto da exposição humana ao ambiente e a influência dos CI nos biomarcadores (estresse oxidativo);

3. Avaliação e monitoramento de parâmetros de qualidade do ambiente relacionados à saúde pela correlação entre os parâmetros relativos aos CI no ambiente e em humanos e a relação com os biomarcadores do estresse oxidativo da população do CELMM (Maceió-AL);

4. Melhoria da qualidade de atenção à saúde através da identificação das principais doenças e seu impacto ao SUS em função da exposição a CI e estresse oxidativo da população que vive no entorno do CELMM (Maceió-AL);

5. Formação de recursos humanos e fortalecimento dos grupos de pesquisa envolvidos neste projeto envolvendo diferentes IES, assim como, os respectivos programas de pós-graduação no qual estão inseridos visando futuramente a implementação de uma rede de monitoramento do impacto do ambiente na saúde humana;

6. Instituir conceitos de preservação ambiental e o impacto à saúde através da realização de oficinas e cursos informativas para população circunvizinha do CELMM (Maceió-AL), divulgando as principais informações obtidas;

7. Divulgação dos resultados na forma de relatórios técnicos, resumos (mínimos de 10 trabalhos) e artigos científicos (mínimo de 4 artigos em revista indexadas), para a sociedade e órgãos de interesse visando contribuir para a superação das desigualdades e melhoria dos indicadores de saúde local.

4. bibliografia

[1] IMA (Instituto do Meio Ambiente) - disponível em: http://www.ima.al.gov.br, acessado em junho de 2016.
[2] ANA (Agência Nacional de Águas) - disponível em: http://www2.ana.gov.br, acessado em junho de 2016.
[3] MMA-Ministério do Meio Ambiente. Plano de Ação e Gestão Integrado do Complexo Estuarino Lagunar Mundaú Manguaba (CLMM). 2005. Disponível em: www.ana.gov.br. Acessado em junho de 2016.
[4] Lima, E.D.S.; Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia (PPGQB – UFAL); Avaliação das concentrações de elementos inorgânicos potencialmente tóxicos presentes em águas e moluscos do Complexo Estuarino Lagunar Mundaú/Manguaba: possível fonte de contaminação à saúde humana, Maceió, 2012.
[5] Jacundino, J.S. et al. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 3, 708-715, 2015.
[6] CONAMA-Conselho Nacional do Meio Ambiente, Resolução, Nº 357, de 17 de março, 2005.
[7] Conti, M.C.; Finoia, M.G.; *Journal of Hazardous Materials* 181, 388–392, 2010.
[8] Astorga, M.S.E.; Rodríguez, E.M.; Romero, C.D.; *Journal of Food Composition and Analysis, 20, 273–279, 2007.*
[9] do Nascimento S.N. et al. *Environmetal Research* 136, 387-395, 2015.
[10] Hughes, D.J. et al., *The American Journal of Clinical Nutrition*, pii: ajcn131672, 2016.
[11] Fillion M. et al. *Environmental Health*, 5:29, 2006.
[12] Flora, S.J.S; Mittal, M.; Mehta, A. *Indian J Med Res* 128, 501-523, 2008.
[13] Crotto, D. et al. *Science of the Total Environment* 408, 806-811, 2010.
[14] Dobrakowski, M. et al. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 45, 235-240, 2016.
[15] Al-Saleh, I. et al.; *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 218, 66-90, 2015.
[16] Colacino, J.A. *Environmental Research* 131, 6–12, 2014.
[17] Lu, M. et al. *Toxicology and Applied Pharmacology* 302, 52-61, 2016.
[18] Sanchez-Rodas, D. et al. *J. Anal. At. Spectrom*. 25, 933-946, 2010.
[19] Cai, Y. Atomic Fluorescence in Environmental Analysis, *Encyclopedia of Analytical Chemistry,* John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2270-2292, 2000.
[20] Monteiro, A.S.C et al. *Talanta* 152, 112-118, 2016.
[21] Malaguti C. et al. *Free Radic Res*. 48(12),1494-1504, 2014.
[22] Gomes, J.M.M. et al. *Microchemical Journal* 124, 629-636, 2016.
[23] Garcia-Ruiz C. et al. *J Biol Chem*, 272, 11369-11377, 1997.
[24] Mitchell T. et al. *J. Pharmacol Exp Ther.* 336(3), 682-692, 2011.
[25] Bradford M.M. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254, 1976.
[26] Marklund, S. *Handbook of Methods for Oxygen radical Research*. CRC Press, 243-247, 1985.
[27] Aebi H. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology* 105, 121–126, 1984.
[28] Paglia D.E.; Valentine W.N. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 70, 158-69, 1967.
[29] Secretaria de Estado da Saúde - disponível http://www.saude.al.gov.br/indicadores/. Acessado em junho de 2016.

d) análise crítica de riscos e benefícios

Estes itens constam no formulário eletrônico.

e) duração total da pesquisa, a partir da aprovação

Conforme cronograma do Edital FAPEAL 06/2016 – PPSUS, Programa Pesquisa para o SUS: gestão compartilhada em Saúde os projetos uma vez aprovados devem a contratação das propostas em outubro de 2016. Assim, tomamos como referência este início, para propor o cronograma. Logo a pesquisa teria duração de dois anos, sendo outubro/2016 a outubro/2018.

f) explicitação das responsabilidades do pesquisador, da instituição, do promotor e do patrocinador

As responsabilidades do coordenado são associadas a supervisão e garantia de qualidade e práticas adequadas em todas as etapas previstas no projeto. Os demais pesquisadores terão responsabilidades especificas as quais serão descritas neste projeto no tocante a equipe do mesmo. A instituição executora é responsável pela infraestrutura e disponibilidade de equipamentos para execução das atividades experimentas necessárias ao desenvolvimento do referido projeto como consta em Carta de Concordância Institucional anexada a este projeto durante o processo de submissão por via eletrônica. As responsabilidades do promotor/patrocinador são relativas ao financiamento (descritivo no formulário eletrônico) conforme o que preconiza o Edital FAPEAL 06/2016 - PPSUS, Programa Pesquisa para o SUS: gestão compartilhada em Saúde.

g) explicitação de critérios para suspender ou encerrar a pesquisa

A suspensão ou encerramento da estará associada aos seguintes fatores:
1) ausência de recursos financeiros ou repasses pela agência de fomento, caso o projeto seja aprovado;
2) ausência de voluntários apitos a participar do processo de amostragem em relação ao sangue e urina. Esta possibilidade possivelmente só levaria a suspensão temporária do projeto, até um novo redimensionamento das atividades;
3) Quebra dos equipamentos necessários para realização das medições. Esta possibilidade só levaria a suspensão temporária do projeto até conserto ou realização de colaborações para atender as necessidades previstas.

h) local da pesquisa: detalhar as instalações dos serviços, centros, comunidades e instituições nas quais se processarão as várias etapas da pesquisa

As análises das amostras ambientais e biológicas serão realizadas no LINQA (Laboratório de Instrumentação e Desenvolvimento em Química Analítica), LAMP (Laboratório de Metabolismo e Proteômica) e Central Analítica presentes no Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL e, Laboratório de Bioquímica e Bioquímica do Exercício da Universidade Federal de Pernambuco (Centro Acadêmico de Vitória). Os laboratórios citados apresentam infraestrutura adequada para realização das análises propostas. Com aprovação do projeto, os reagentes e consumíveis que ainda não estão disponíveis serão adquiridos.

As amostras de água e sururu serão recolhidas em pelo menos dez pontos distintos no CELMM somente do município de Maceió-AL, sendo os locais selecionados de acordo com relatórios de balneabilidade do IMA, pontos de lançamento de esgoto ou proximidade de residências, ou presença de indústria, lixões ou atividade humana efetiva. Também serão selecionados pontos com características contrarias as incaicas, a fim de estabelecer se a presença/ausência de determinados contaminantes é devido a atividade antropogênica ou de origem endêmica.

Inicialmente será realizado um levantamento dos voluntários (preferencialmente pescadores e população em condições vulnerável) após a realização das oficinas na comunidade local. Será feito contato com a associação

de pescadores e moradores da região visando a facilitação no contato com os habitantes. Os questionários epidemiológicos serão aplicados e as amostras de sangue e urina recolhidas dos participantes voluntários. Os locais de trabalho ou moradia dos voluntários não deve ter uma distância superior a 2 km dar margens do CELMM (Maceió-AL).

i) demonstrativo da existência de infraestrutura necessária ao desenvolvimento da pesquisa e para atender eventuais problemas dela resultantes, com a concordância documentada da instituição

Declaração consta como anexo no formulário eletrônico.

j) orçamento financeiro detalhado da pesquisa: recursos, fontes e destinação, bem como a forma e o valor da remuneração do pesquisador

Este item foi preenchido no formulário eletrônico.

l) explicitação de acordo preexistente quanto à propriedade das informações geradas, demonstrando a inexistência de qualquer cláusula restritiva quanto à divulgação pública dos resultados, a menos que se trate de caso de obtenção de patenteamento; neste caso, os resultados devem se tornar públicos, tão logo se encerre a etapa de patenteamento

Cartas dos pesquisadores e estudantes envolvidos no projeto constam em anexo ao formulário eletrônico indicando que todos os resultados serão divulgados publicamente conforme cumprimento das normas da Resolução 466/12, de publicização dos resultados e sobre o uso e destinação do material/dados coletados. Adicionalmente foi anexada uma carta do coordenador se comprometendo antecipadamente a explicitar que todas as informações geradas serão divulgadas publicamente e que, as mesmas podem ser solicitadas, a qualquer momento por vias formais durante a execução do projeto.

m) declaração de que os resultados da pesquisa serão tornados públicos, sejam eles favoráveis ou não

Cartas dos pesquisadores e estudantes envolvidos no projeto constam em anexo ao formulário eletrônico indicando que todos os resultados serão divulgados publicamente conforme cumprimento das normas da Resolução 466/12, de publicização dos resultados e sobre o uso e destinação do material/dados coletados.

n) declaração sobre o uso e destinação do material e/ou dados coletados

Idem item anterior.

VI.3 Informações relativas ao sujeito da pesquisa:

a) descrever as características da população a estudar: tamanho, faixa etária, sexo, cor (classificação do IBGE), estado geral de saúde, classes e grupos sociais. Expor as razões para a utilização de grupos vulneráveis;

O tamanho da população avaliada será de no mínimo 100 e máximo 130 voluntários, entre homens e mulheres. A faixa etária será de pessoas com idade variando entre 18 a 65 anos, sendo considerando os valores limites. Não será feita distinção quanto a cor, estado de saúde, classe ou grupo social. Todos estariam apitos a participar da pesquisa. Pessoas em condição de vulnerabilidade são do interesse da pesquisa, desde que residam ou trabalhe no entorno do CELMM (Maceió-AL), assim, pode-se avaliar como a exposição ambiental podem ter influência na concentração de contaminantes inorgânicos, biomarcadores do estresse oxidativo e a incidência de doenças ou problemas de saúde.

b) descrever os métodos que afetem diretamente os sujeitos da pesquisa

O único método que poderiam afetar os sujeitos da pesquisa seria durante a coleta das amostras de sangue. Contudo, este procedimento será realizado por profissionais qualificados seguidos as práticas recomendadas.

c) identificar as fontes de material de pesquisa, tais como espécimes, registros e dados a serem obtidos de seres humanos. Indicar se esse material será obtido especificamente para os propósitos da pesquisa ou se será usado para outros fins;

A pesquisa será realizada com seres humanos, sendo as amostras de sangue, urina e as informações contidas no questionário epidemiológicos de cada indivíduo utilizada somente com proposito cientifico para realização da pesquisa referente a este projeto.

d) descrever os planos para o recrutamento de indivíduos e os procedimentos a serem seguidos. Fornecer critérios de inclusão e exclusão.

O recrutamento dos indivíduos será realizado após oficinas informativas realizadas nas comunidades (locais próximos ao CELMM, município de Maceió) e através de visitação com representantes da associação de moradores e de pescadores da região. Os critérios de inclusão e exclusão foram descritos no formulário eletrônico.

g) descrever as medidas para proteção ou minimização de qualquer risco eventual. Quando apropriado, descrever as medidas para assegurar os necessários cuidados à saúde, no caso de danos aos indivíduos. Descrever também os procedimentos para monitoramento da coleta de dados para prover a segurança dos indivíduos, incluindo as medidas de proteção à confidencialidade.

O único risco eventual seria durante a retirada das amostras de sangue. Para evita-los este procedimento será realizado por profissionais qualificados e com experiência comprovada, seguindo as práticas recomendas para tais procedimento. Os dados coletados quanto ao questionário epidemiológico serão realizados por pesquisadores da equipe na presença de representante da comunidade ou outras testemunhas que forem autorizadas pelo indivíduo. O mesmo não é obrigado a responder todas as perguntas, podendo interromper parcialmente ou completamente o procedimento quando desejar. Uma vez os questionários sendo preenchidos os dados serão digitalizados, codificados, e organizados em planilhas protegidos por senha, com acesso somente aos pesquisadores do projeto. A identidade de nenhum individuo será publicizada em nenhuma etapa do projeto. Os registros físicos serão arquivados durante o período máximo de 1 ano após o encerramento do projeto, sendo incinerados após este intervalo. Os mesmos podem ser requisitados a qualquer momento pelo respetivo indivíduo. Para garantir a qualidade das amostras biológicas serão passadas as principais as instruções quanto amostragem de urina e sangue, uma vez fazendo as recomendações necessárias, serão agendados horários para o recolhimento das

mesmas. Uma vez de possa das amostras biológicas as mesmas serão acondicionadas em câmara frigorífera móvel, e em seguida, levadas ao laboratório para serem estocadas a -80ºC até o momento das análises necessárias. As amostras biológicas serão codificadas em função do questionário epidemiológico. Quando necessário, as amostras serão separadas em lotes, em função do tipo de análise a ser realizada.

e) apresentar o formulário ou termo de consentimento, específico para a pesquisa, para a apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa, incluindo informações sobre as circunstâncias sob as quais o consentimento será obtido, quem irá tratar de obtê-lo e a natureza da informação a ser fornecida aos sujeitos da pesquisa

Um modelo de termo de consentimento contendo as principais informações do projeto foi anexado ao formulário eletrônico.

f) descrever qualquer risco, avaliando sua possibilidade e gravidade;

Este item foi preenchido no formulário eletrônico.

h) apresentar previsão de ressarcimento de gastos aos sujeitos da pesquisa. A importância referente não poderá ser de tal monta que possa interferir na autonomia da decisão do indivíduo ou responsável de participar ou não da pesquisa.

Os sujeitos da pesquisa não terão nenhum gasto. Todo o material necessário para os procedimentos de amostragem, instruções escritas, termo de consentimento escrito, entre outros, foram contemplados no orçamento do referido projeto, como consta no formulário eletrônico e serão fornecidos pela equipe do projeto durante as atividades.

VI.4 Qualificação dos pesquisadores: "*Curriculum Lattes*" do pesquisador responsável e dos demais participantes

Este item foi anexado no formulário eletrônico somente em relação aos pesquisadores.

Equipe técnica do projeto e atribuições

PESQUISADORES (6)

Instituição de vínculo: Universidade Federal de Alagoas - Instituto de Química e Biotecnologia
Nome integrante: Josué Carinhanha Caldas Santos
Titulação: Doutor
Função no projeto: Coordenador. Gerenciamento e responsabilidade por todas as atividades previstas no presente projeto. Especificamente avaliará a quantificação de Hg, As, Se, Cd e Pb em amostras ambientais e biológicas (plasma e urina) e biomarcadores do estresse oxidativo nas amostras biológicas.

Instituição de vínculo: Universidade Federal de Alagoas - Instituto de Química e Biotecnologia
Nome integrante: Ana Catarina Rezende Leite

Titulação: Doutora
Função no projeto: Avaliação e quantificação dos biomarcadores do estresse oxidativo nas amostras biológicas. Auxilio na aplicação do questionário epidemiológico e obtenção das amostras de sangue.

Instituição de vínculo: Universidade Federal de Alagoas - Instituto de Química e Biotecnologia
Nome integrante: Paulo dos Santos Roldan
Titulação: Doutor
Função no projeto: Avaliação e quantificação de Hg, As, Se, Cd e Pb em amostras ambientais e biológicas (plasma e urina). Auxilio na aplicação do questionário epidemiológico.

Instituição de vínculo: Universidade Federal de Alagoas - Campus Arapiraca
Nome integrante: Wander Gustavo Botero
Titulação: Doutor
Função no projeto: Avaliação e quantificação de Hg, As, Se, Cd e Pb em amostras ambientais e biológicas (plasma e urina). Auxilio na aplicação do questionário epidemiológico.

Instituição de vínculo: Universidade Federal de Pernambuco – Centro Acadêmico de Vitória
Nome integrante: Mariana Pinheiro Fernandes
Titulação: Doutor
Função no projeto: Avaliação e quantificação dos biomarcadores do estresse oxidativo (enzimas) nas amostras biológicas.

Instituição de vínculo: Centro Universitário CESMAC
Nome integrante: Raphael de Souza Pinto
Titulação: Doutor
Função no projeto: Avaliação e quantificação dos biomarcadores do estresse oxidativo nas amostras biológicas. Auxilio na aplicação do questionário epidemiológico e obtenção das amostras de sangue.

ESTUDANTES (13, entre doutorandos, mestrandos e iniciação cientifica)

Instituição de vínculo: Universidade Federal de Alagoas - Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia.
Nome integrante: Marina de Magalhães Silva
Titulação: Mestre. Doutorando em Química Analítica.
Função no projeto: Avaliação e quantificação dos biomarcadores do estresse oxidativo nas amostras biológicas.

Instituição de vínculo: Universidade Federal de Alagoas - Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia.
Nome integrante: Shenia de Oliveira Souza
Titulação: Mestre. Doutoranda em Química Analítica.
Função no projeto: Avaliação e quantificação de Hg, As e Se por fluorescência atômica em amostras ambientais e biológicas (plasma e urina).

Instituição de vínculo: Universidade Federal de Alagoas - Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia.
Nome integrante: Maria Dayanne de Araújo Dantas
Titulação: Mestre. Doutoranda em Química Analítica.

Função no projeto: Avaliação e quantificação dos biomarcadores do estresse oxidativo nas amostras biológicas.

Instituição de vínculo: Universidade Federal de Alagoas - Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia.
Nome integrante: Elysson David de Santana Lima
Titulação: Mestre. Doutoranda em Química Analítica.
Função no projeto: Avaliação e quantificação de Hg, As e Se por fluorescência atômica em amostras ambientais.

Instituição de vínculo: Centro Universitário CESMAC
Nome integrante: Chiara Rachel Maciel Marinho
Titulação: Mestre
Função no projeto: Avaliação e quantificação dos biomarcadores do estresse oxidativo nas amostras biológicas. Auxilio na aplicação do questionário epidemiológico e obtenção das amostras de sangue.

Instituição de vínculo: Universidade Federal de Alagoas - Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia.
Nome integrante: João César Nascimento Santos
Titulação: Mestrando em Química Analítica. Bacharel em Química.
Função no projeto: Avaliação e quantificação de Hg, As e Se por fluorescência atômica em amostras ambientais.

Instituição de vínculo: Universidade Federal de Alagoas - Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia.
Nome integrante: Erismarck Ananias da Silva
Titulação: Mestrando em Química Analítica. Licenciado em Química.
Função no projeto: Avaliação e quantificação de Cd e Pb por cronopotenciometria de redissolução anódica em amostras ambientais e biológicas (plasma e urina).

Instituição de vínculo: Universidade Federal de Alagoas - Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia.
Nome integrante: Maria Célia Tavares
Titulação: Mestranda em Química Analítica. Licenciada em Química.
Função no projeto: Avaliação e quantificação de Cd e Pb por cronopotenciometria de redissolução anódica em amostras ambientais e biológicas (plasma e urina).

Instituição de vínculo: Universidade Federal de Alagoas - Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia.
Nome integrante: Alinne Diana Pinho Wanderley
Titulação: Mestranda em Química Analítica. Licenciada em Química.
Função no projeto: Avaliação e quantificação de Cd e Pb por cronopotenciometria de redissolução anódica em amostras ambientais e biológicas (plasma e urina).

Instituição de vínculo: Universidade Federal de Alagoas - Mestrado em Ciências Farmacêuticas, da Escola de Enfermagem e Farmácia.
Nome integrante: Abner Magalhães Nunes
Titulação: Mestrando em Ciências Farmacêuticas, Farmacêutico.
Função no projeto: Análises da produção de espécies reativas de oxigênio através dos métodos DCF e MitoSox nos linfócitos e análises da produção de 8-isoprostanos no plasma e urina.

Instituição de vínculo: Universidade Federal de Pernambuco – Programa de Pós-graduação em Nutrição.
Nome integrante: Talitta Ricarlly Lopes de Arruda Lima
Titulação: Mestranda em Nutrição
Função no projeto: Função no projeto: Avaliação e quantificação dos biomarcadores do estresse oxidativo (enzimas) nas amostras biológicas.

Instituição de vínculo: Universidade Federal de Alagoas - Instituto de Química e Biotecnologia
Nome integrante: João Arthur da Silva Santos
Titulação: Graduando em Química Licenciatura
Função no projeto: Análises da produção de espécies reativas de oxigênio através dos métodos DCF e MitoSox nos linfócitos.

Instituição de vínculo: Universidade Federal de Alagoas - Instituto de Química e Biotecnologia
Nome integrante: Eric José Braga Ferreira
Titulação: Graduando em Química Tecnológica
Função no projeto: Análises da produção de 8-isoprostanos no plasma e urina.