



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Leandro Vargas Barreto de Carvalho

**Avaliação dos níveis de estresse oxidativo induzido por exposição ao mercúrio em
população ribeirinha infantojuvenil do rio Madeira (RO)**

Rio de Janeiro

2016

Leandro Vargas Barreto de Carvalho

Avaliação dos níveis de estresse oxidativo induzido por exposição ao mercúrio em população ribeirinha infantojuvenil do rio Madeira (RO)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências, Área Saúde Pública e Meio Ambiente e subárea de concentração: Gestão de Problemas Ambientais e Promoção da Saúde

Orientadora: Sandra de Souza Hacon

Rio de Janeiro

2016

Catálogo na fonte
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica
Biblioteca de Saúde Pública

C331a Carvalho, Leandro Vargas Barreto de
Avaliação dos níveis de estresse oxidativo induzido por
exposição ao mercúrio em população ribeirinha infantojuvenil
do rio Madeira (RO). / Leandro Vargas Barreto de Carvalho. --
2015.
105 f. : il. ; tab. ; graf. ; mapas

Orientador: Sandra de Souza Hacon
Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública
Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2015.

1. Mercúrio. 2. Estresse Oxidativo. 3. Biomarcadores
Farmacológicos. 4. Saúde da Criança. 5. Saúde do Adolescente.
6. Ecossistema Amazônico. I. Título.

CDD – 22.ed. – 615.925663

Leandro Vargas Barreto de Carvalho

Avaliação dos níveis de estresse oxidativo induzido por exposição ao mercúrio em população ribeirinha infantojuvenil do rio Madeira (RO)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências, Área Saúde Pública e Meio Ambiente e subárea de concentração: Gestão de Problemas Ambientais e Promoção da Saúde

Orientadora: Sandra de Souza Hacon

Aprovada em: 25/03/2015

Banca Examinadora

Dra. Sandra de Souza Hacon – Orientadora

Dra. Rita de Cássia Oliveira da Costa Mattos – Professora do Programa

Dr. Jaime Silva de Lima – Professor Convidado

Rio de Janeiro

2016

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a duas mulheres importantes demais em minha vida.

Dedico a minha mãe, Gilca. Obrigado por fazer de tudo para que eu pudesse lutar pelo melhor. Obrigado por todo seu esforço, carinho, amor e dedicação. Você é, e sempre será minha referência. Sem você eu nada seria.

Dedico a minha esposa, Thaiza. Obrigado por todo seu amor, compreensão e paciência. Você é o equilíbrio e a felicidade que busco para minha vida.

Obrigado a vocês duas por serem meu porto seguro e meu farol. Amo vocês de uma forma que não conseguirei expressar aqui. Obrigado por tudo!

Dedico ainda este trabalho ao Prof. Moacelio (*in memoriam*), meu querido amigo e mestre Moa, que me ensinou sobre enzimas e estresse oxidativo, ciência e um pouco de tudo. Foi ele quem deu origem a ideia deste trabalho e me apresentou a Prof. Sandra. Você faz muita falta. Gostaria que você ainda estivesse por aqui. Obrigado por tudo que me ensinou!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força nos momentos difíceis. A fé é um pilar invisível que nos sustenta, pois onde termina o que a Ciência comprova, começa a nossa fé. Obrigado Deus pela família que me deu. Com nossas alegrias e loucuras seguimos em frente!

Agradeço a meus irmãos Tato e Tita, vocês sempre me apoiaram, defenderam e me entenderam. Obrigado por todo seu carinho e amor. Amo vocês demais! Cada um de vocês contribui um pouco em tudo que faço. Nossa família se torna forte com nossa união. Cada passo de um de nós é importante para os outros, e isto me deixa muito feliz. Léo e Silvana, obrigado por cuidarem dos meus irmãos, vocês fazem parte da minha família.

Agradeço a meus dois pais. Beto, nossas conversas sempre me fizeram refletir sobre o mundo que nos cerca, obrigado por todos os conselhos. Tio Paulo, obrigado por ter me criado como um filho, seu carinho e dedicação foram muito importantes para mais esta vitória.

Agradeço a Rita Mattos, minha amiga, orientadora, professora, chefe e companheira, por tudo. Você faz parte da minha história com a Fiocruz e me ajudou em cada passo que dei aqui dentro. Me ensinou a trabalhar e me incentiva em tudo que faço. Obrigado por todo apoio e carinho sempre!

Agradeço a Prof. Sandra Hacon por toda a atenção e dedicação neste trabalho. Cada ideia, sugestão, crítica e conversa foram extremamente importantes e certamente me ensinaram muito. Sua orientação me fez aprender muito sobre pesquisa científica. Este foi um período onde cresci e aprendi muito. Obrigado por tudo que me ensinou!

Na vida precisamos de bons amigos. Tive a sorte de ter uns que se tornaram mais que amigos, são irmãos: Renato, Vinicio e Anderson. Obrigado por vocês existirem na minha vida. Obrigado pelo companheirismo de sempre!

Agradeço aos amigos do CESTEh, presentes no meu dia-a-dia, e que deixam o trabalho algo tão prazeroso: Lucineide, Fernanda, Regina, Débora, Sayonara, Eline, Ana Cristina, Simone, Tati, Mário, Fábio, Thelma, Cris, Paula, Marco, Juliana Bastos e Chrisman, Francisco, Ana Luisa, Amanda Freitas, Érica, Carla, Daniel, Wilma, Carol, José, Amanda, Ione, Murata,

Carlucio, Helena, Márcia, Victor, Angélica, Sérgio e Ariane. Um agradecimento especial a Paula, que tanto me ajudou na parte estatística deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Jaime Lima pela atenção e pelas contribuições neste trabalho.

Agradeço a equipe da Prof. Sandra pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho: Gabriela, Dennys, Beatriz, Claudio, Cláudia e Eduardo. Não esquecendo do pessoal de Porto Velho: Núbia, Érisson, Jana e Cleyton.

Agradeço a toda a equipe, especialmente a Cláudia Vega, do Laboratório de Absorção Atômica da Pontífica Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-RIO), pela realização das análises de Hg em sangue e cabelo.

Agradeço a Jucilene, em especial, por toda ajuda na realização das análises de bancada. Sua dedicação a este trabalho foi muito importante.

Agradeço a minha turma do mestrado. Obrigado por dividirem comigo este período de nossas vidas. Em especial ao Daniel, Hayra e Thales, vocês tornaram este período muito mais divertido. Um agradecimento especial ao Daniel, por ter me ajudado (e ensinado) na parte estatística deste trabalho.

Agradeço a Enrico e Isabele, mais que amigos de trabalho, vocês são grandes amigos. Obrigado por estarem presentes em tantos momentos importantes e felizes. Mais um agradecimento especial a Isabele, por também ter me ajudado na execução das análises estatísticas deste trabalho.

Agradeço a toda a turma da Academia e Corrida da Fiocruz. Começar o dia com vocês torna tudo mais divertido e fácil.

Agradeço aos meus sogros, Gustavo e Sônia, e meu cunhado, Hugo. Vocês são muito importantes para mim. Obrigado por toda a ajuda e carinho.

Há quem acredite que tudo que conseguimos é mérito único e exclusivo de nosso esforço. Acho que precisamos de mais do que isso. A ajuda e apoio de alguns é muito importante em nossos

caminhos. Este trabalho e muitas outras conquistas de minha vida são um produto de meu esforço somado ao carinho e apoio de vários familiares e amigos. A todos vocês, o meu mais sincero obrigado por tudo!

“Toda doença tem duas causas, uma biológica e uma política.”

RUDOLF VIRCHOW, 1821-1902

*Avaliando nossa sociedade, me pergunto até quando o fator sociopolítico do adoecimento
será sistematicamente ignorado?*

RESUMO

A região amazônica possui hoje grandes empreendimentos na área de produção e geração de energia hidrelétrica. Em Rondônia (RO), temos o rio Madeira com duas usinas (Santo Antônio e Jirau) em construção, próximas da capital do estado, Porto Velho. Estas obras têm impactos positivos, como geração de empregos, renda e energia, mas há também impactos socioambientais que podem alterar a qualidade de vida e o perfil de morbimortalidade da população local. O mercúrio (Hg) está presente em solos amazônicos e pode ser mobilizado deste compartimento por meio do alagamento de grandes áreas para barragens. O Hg se bioacumula na cadeia trófica em sua forma orgânica, o metilmercúrio (MeHg). O MeHg tem efeitos sobre o SNC e é a forma mais tóxica para o homem, gerando problemas de saúde. Este trabalho teve como objetivo avaliar a exposição ambiental ao Hg, via ingestão de peixes, em população ribeirinha infantojuvenil no rio Madeira, e verificar sua associação com biomarcadores de estresse oxidativo, comparando com populações urbanas da cidade de Porto Velho. A população com maiores níveis de exposição ao Hg e estresse oxidativo foi a comunidade ribeirinha de Cuniã, que apresentou a maior frequência de consumo de peixes. Os biomarcadores Hg-S, Hg-C, MDA e GST foram significativamente diferentes (Testes T e Mann-Whitney, p-valor < 0,001) entre as 3 comunidades estudadas (Belmont – ribeirinha urbano, Nacional - urbana e Cuniã ribeirinha isolada), sendo mais elevados em Cuniã. O biomarcador Tiol não apresentou diferença entre as comunidades. Os níveis de Hg-S e Hg-C em Cuniã estavam acima dos valores de referência da OMS para populações não expostas ambientalmente (8 µg/L e 2 µg/g, respectivamente). Ribeirinhos com dietas ricas em peixe estão sob maior risco de exposição ao Hg e, conseqüentemente, têm maiores riscos de alterações no desenvolvimento. Este estudo mostra a importância de programas de monitoramento da exposição para a vigilância da Saúde Ambiental. Biomarcadores do estresse oxidativo podem trazer um importante panorama de alterações metabólicas precoces, relacionadas a exposições ambientais, porém este tipo de estudo sempre deve ser realizado utilizando biomarcadores específicos, a fim de aumentar a confiabilidade dos resultados.

PALAVRAS-CHAVE: Mercúrio, Estresse Oxidativo, Biomarcadores, Saúde Infantojuvenil, Amazônia

ABSTRACT

The Amazon region currently has big projects in production and generation of hydroelectric power. In Rondônia (RO), we have the Madeira river with two plants (Santo Antonio and Jirau) under construction, near the state's capital, Porto Velho. These works have positive impacts such as job creation, income and energy, but there are also social and environmental impacts that can alter the quality of life and the profile of morbidity and mortality of local people. Mercury (Hg) is present in Amazonian soils and can be mobilized from this compartment through the flooding of large areas for dams. The Hg bioaccumulates in the food chain in its organic form, methylmercury (MeHg). The MeHg has CNS effects and is the most toxic form to humans, causing health problems. This study aimed to assess environmental exposure to mercury via the intake of fish, in children and youth of riverine population on the Madeira River and its association with biomarkers of oxidative stress compared to urban populations of the city of Porto Velho. The population with the highest exposure levels of Hg and oxidative stress was the riverine community of Cuniã, with the highest frequency of fish consumption. The biomarkers Hg-B, Hg-H, MDA and GST were significantly different (Tests T and Mann-Whitney, $p < 0.001$) between the three communities studied on the Madeira river (Belmont - urban riverine, National - urban and Cuniã - isolated riverine), it is higher in Cuniã. The Thiol biomarker did not differ between communities. The levels of Hg-B and Hg-H in Cuniã were above the WHO guideline values for unexposed populations environmentally ($8 \mu\text{g/L}$ and $2 \mu\text{g/g}$, respectively). Riverines with diets rich in fish are at greater risk of exposure to Hg and, therefore, have higher risks of changes in development. This study shows the importance of monitoring programs of exposure for the surveillance of Environmental Health. Biomarkers of oxidative stress can bring an important overview of early metabolic abnormalities related to environmental exposures, but this type of test must be performed using specific biomarkers in order to increase the reliability of results.

KEYWORDS: Mercury, Oxidative Stress, Biomarkers, Child and Youth Health, Amazon

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1: Cinábrio, o minério de onde o Hg é extraído	7
Figura 2: A contaminação do ambiente pelo Hg	9
Figura 3: Estimativas globais de Hg	11
Figura 4: O ciclo do Hg no ambiente amazônico	15
Figura 5: Interconversão entre as formas de Hg	18
Figura 6: As fontes e a resposta celular às espécies reativas	21
Figura 7: Integração dos sistemas de defesa enzimáticos	23
Figura 8: Processo de peroxidação lipídica, onde L = lipídeo	25
Figura 9: Reação de Fenton	28
Figura 10: Reação de Haber-Weiss	28
Figura 11: Diagrama esquemático representando os tipos de biomarcadores e o processo metabólico que ocorre entre a exposição e o surgimento da doença	31
Figura 12: Campos de aplicação do monitoramento biológico	33
Figura 13: Localização geográfica do município de Porto Velho, no estado de Rondônia, Brasil	44

Figura 14: Comunidade ribeirinha urbana de Belmont, próxima a cidade de Porto Velho 45

Figura 15: Comunidade ribeirinha do lago Cuniã – comunidade remota 46

LISTA DE TABELAS

	PÁGINA
Tabela 1: Dados sociodemográficos - Rondônia x Porto Velho	43
Tabela 2: População infantojuvenil de Porto Velho em 2010	44
Tabela 3: Informações sociodemográficas da população estudada, categorizadas por comunidades	55
Tabela 4: Resultados dos biomarcadores na população estudada, categorizados por comunidades	57
Tabela 5: Resultados de média e mediana para Hg-S, em 2012, e percentual de médias acima do VR de 8 µg/L, nas 3 comunidades do estudo	61
Tabela 6: Resultados de média e mediana para Hg-C, em 2011, e percentual de médias acima do VR de 2 µg/g, nas comunidades ribeirinhas de Belmont e Cuniã	62
Tabela 7: Comparação das distribuições de médias dos biomarcadores estudados entre as comunidades	66
Tabela 8: Resultados de p-valor para comparação de médias de GST 2011 x 2012 e Hg-S 2011 x 2012	67
Tabela 9: Correlação de Spearman entre os biomarcadores estudados	67
Tabela 10: Modelo de regressão linear múltipla para os níveis sanguíneos de Hg	70

LISTA DE GRÁFICOS

	PÁGINA
Gráfico 1: Frequência de consumo de peixes entre as 3 comunidades estudadas	56
Gráfico 2: Histogramas representando a distribuição normal dos resultados dos biomarcadores MDA e GST 2011 e 2012	58
Gráfico 3: Concentrações médias de Hg-S ($\mu\text{g/L}$), em 2012, de acordo com a frequência de consumo de peixes, categorizadas por comunidades (Belmont, Cuniã e Nacional)	59
Gráfico 4: Concentrações médias de Hg-C ($\mu\text{g/g}$), em 2011, de acordo com a frequência de consumo de peixes, somente nas comunidades ribeirinhas de Belmont e Cuniã	59
Gráfico 5: Box-plot com resultados de concentrações médias de Hg-S ($\mu\text{g/L}$), em 2012, nas 3 comunidades estudadas e linha representando o VR de $8 \mu\text{g/L}$ da OMS	60
Gráfico 6: Box-plot com resultados de concentrações médias de Hg-C ($\mu\text{g/g}$), em 2011, nas comunidades ribeirinhas de Belmont e Cuniã e linha representando o VR de $2 \mu\text{g/g}$ da OMS	62
Gráfico 7: Box-plot com resultados de concentrações médias de MDA (μM), em 2012, nas 3 comunidades estudadas	63
Gráfico 8: Box-plot com resultados de concentrações médias de GST 2012 (U/L), em 2012, nas 3 comunidades estudadas	64

Gráfico 9: Box-plot com resultados de concentrações médias de Tio (mM), em 2012, nas 3 comunidades estudadas 65

Gráfico 10: Influência da frequência do consumo de peixes nos níveis de Hg-S, GST e MDA 69

LISTA DE QUADROS

	PÁGINA
Quadro 1: Biomarcadores de oxidação em DNA, lipídeos e proteínas	32
Quadro 2: Critérios importantes para um biomarcador ideal de dano oxidativo	34

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

a.C: antes de Cristo

ABS: absorvância

AIDS: síndrome da imunodeficiência adquirida

Am: amostra

Br: branco

CDNB: 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

CV AAS: espectrometria de absorção atômica com vapor frio

DNA: ácido desoxirribonucleico

DP: desvio-padrão

DTNB: ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico)

EC: Enzyme Commission

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético (sal dissódico)

GS-DNB: complexo (analito) formado da reação entre CDNB e GSH

GS-TNB: complexo (analito) formado da reação entre grupamento tiol e DTNB

hab/km²: habitantes por quilômetro quadrado

IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

ICP-MS: plasma indutivamente acoplado – espectrometria de massas

rpm: rotações por minuto

SDS: dodecil sulfato de sódio

TBA: ácido tiobarbitúrico

Tris-Cl: Tris (hidroximetil) aminometano - cloreto

UV-Vis: ultra-violeta e visível

Δ Abs/min: variação de absorvância por minuto

ϵ : coeficiente de absorvância molar (em mM⁻¹. cm⁻¹)

λ : comprimento de onda

SUMÁRIO

	PÁGINA
1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	7
2.1) Mercúrio	7
2.1.1) História e Usos	7
2.1.2) Propriedades e Distribuição	10
2.1.3) Mercúrio na Amazônia	14
2.1.4) Metilmercúrio	17
2.2) Estresse Oxidativo	20
2.2.1) Mercúrio e Estresse Oxidativo	26
2.3) Avaliação da Exposição e Biomarcadores	29
2.4) Saúde Infantil	35
3. JUSTIFICATIVA	39
4. OBJETIVOS	41
5. METODOLOGIA	42
5.1) Caracterização da Área do Estudo	42
5.2) Desenho do Estudo	47
5.3) Aplicação de Questionários	48
5.4) Coleta e Fracionamento de Amostras de Sangue e Cabelo	49
5.5) Análises Laboratoriais	50
5.6) Análise Estatística dos Dados	53

6. RESULTADOS	54
7. DISCUSSÃO	71
7.1) Mercúrio	71
7.2) Estresse Oxidativo e Mercúrio	75
7.3) Questões Sociais e Ambientais	81
8. CONCLUSÕES	85
9. REFERÊNCIAS	87
ANEXO I	101

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento tecnológico gera riscos que o homem ainda não tem total domínio de suas consequências. Por outro lado, gera expectativas sociais, econômicas e ambientais que podem melhorar a qualidade de vida da sociedade. Sabemos que não há desenvolvimento sem risco associado, porém, é importante que se conheça e se avaliem os riscos gerados, sua magnitude e suas consequências para a saúde humana (Hacon, 2003).

O processo de degradação da Amazônia legal, associado também a grandes projetos de desenvolvimento, tem preocupado a comunidade científica nacional e internacional, assim como, as organizações não governamentais, órgãos ligados à saúde pública, educação, planejamento, meio ambiente e a sociedade civil (Fearnside, 2003).

A crise ambiental mundial nos coloca diante de um dilema fundamental do modelo econômico capitalista: sua necessidade de produção em escala crescente, para sustentar a acumulação de riquezas dos grupos econômicos hegemônicos, e a finitude dos recursos naturais, necessários à sustentação deste modelo. Esta crise, apresenta-se em um cenário sem precedente na história da humanidade no que diz respeito a consumo de energia, urbanização, geração e disposição de resíduos, contaminação do solo, poluição do ar e água, queimadas, desmatamento, mudanças climáticas e suas consequências sobre a saúde humana. O impacto desta poluição atinge mais significativamente os povos dos chamados países pobres. A contaminação química do solo, principalmente por fertilizantes artificiais, agrotóxicos e metais, fez com que a área atual degradada pela ação humana seja da ordem de dois bilhões de hectares (Miranda, Castro e Augusto, 2009).

Os melhores momentos de expansão econômica no Brasil têm sido caracterizados pela concentração de renda, desmatamento e contaminação do ambiente. Empresas privadas concentram lucros, mas perdas são socializadas. Grandes projetos de desenvolvimento em âmbito nacional são executados sem que riscos ao Ambiente e à Saúde da população sejam devidamente avaliados. A linha de pensamento imposta pelo modelo econômico é que nada deve impedir o progresso. Nos momentos de crise, a concentração de poder e riqueza e a degradação ambiental são apresentados como mal necessário. Assim, problemas ambientais podem ser encarados como consequência do desenvolvimento econômico ou ausência do mesmo. A coexistência de diversos tipos de problemas ambientais e sociais deve ser examinada como resultado do desenvolvimento dentro de um quadro de pobreza, gerando uma interação negativa entre diversos e complicados fatores (Barcellos, 2009).

Na região amazônica, as populações tradicionais ribeirinhas caracterizam-se por viver a base de atividades de subsistência, tais como como extrativismo, agricultura familiar e atividade pesqueira. Mudanças em seus hábitos de vida vêm acontecendo em virtude de recentes projetos, particularmente na área de infraestrutura. Em relação às comunidades localizadas às margens do rio Madeira, destacam-se as obras de construção das barragens das hidrelétricas de Santo Antônio e Jirau, que estão localizadas próximas à cidade de Porto Velho, em Rondônia, Brasil. Os impactos socioambientais negativos oriundos desses empreendimentos sobre o estilo de vida podem ser suficientemente importantes a ponto de alterar a qualidade de vida e o perfil de morbimortalidade da população ribeirinha (Oliveira *et al.*, 2013).

A construção de usinas hidrelétricas é uma das atividades mais controversas no que tange o desenvolvimento da Amazônia brasileira. A lista completa de barragens planejadas na região, aproximadamente 80 unidades, independentemente da data prevista de construção, inundaria aproximadamente 3% da floresta. Decisões sobre projetos hidrelétricos futuros provocam uma cadeia de eventos, com impactos socioambientais negativos de alcance muito além da vizinhança imediata das barragens e reservatórios (Fearnside, 2005).

A usina hidrelétrica Santo Antônio, construída no rio Madeira, em meio à floresta amazônica e a 7 km da cidade de Porto Velho, no estado de Rondônia (RO), começou a ser construída em setembro de 2008 e a funcionar em março de 2012. Atualmente 32 turbinas estão em operação, gerando aproximadamente 2.286 megawatts (MW) de energia. A previsão é de que em novembro de 2016 a usina estará totalmente concluída, operando com as 50 turbinas instaladas, com potência total de 3.568 MW, energia suficiente para atender o consumo de mais de 45 milhões de pessoas. A hidrelétrica Santo Antônio será uma das cinco maiores geradoras do Brasil e uma das 15 maiores do mundo. A sua principal característica é o aproveitamento da alta vazão do rio Madeira para gerar energia com reservatório reduzido e pequena queda d'água, utilizando turbinas bulbo. Este modelo de operação da usina é uma nova tecnologia denominada *fio d'água* (que não faz estoque de água), e permite que o reservatório ocupe 421,56 km², do qual 142 km² correspondem à calha natural do rio. O empreendimento é considerado uma obra estratégica para o desenvolvimento da região Norte do país, particularmente para o Estado de Rondônia, e faz parte do Programa de Aceleração do Crescimento (PAC), do governo federal brasileiro, juntamente com a Usina Hidrelétrica Jirau (Grupo Santo Antônio Energia, 2014).

A hidrelétrica está sendo construída na cachoeira de Santo Antônio, que é a última cachoeira antes da cidade de Porto Velho, e marca o início do trecho navegável do rio Madeira até o oceano Atlântico (Hacon *et al.*, 2014).

Em setembro de 2013 a Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEEL) autorizou o início da operação comercial da hidrelétrica Jirau, em Rondônia, também instalada no rio Madeira, a cerca de 120 quilômetros rio acima de Porto Velho. Jirau terá capacidade instalada de 3.750 MW e potencial para gerar energia para cerca de 10 milhões de domicílios brasileiros. A área do reservatório terá 362 km², em seu nível d'água máximo normal, com área inundada variando ao longo do ano entre 31 e 108 km². Juntamente com a hidrelétrica Santo Antônio, Jirau compõe o Complexo do Rio Madeira (Grupo Energia Sustentável do Brasil, 2013; Portal EBC de notícias, 2013).

De acordo com Tolmasquim *et al.*, 2001, são propostos como custos socioambientais em projetos de geração de energia os custos de controle, mitigação, compensação, monitoramento, institucionais e degradação, sendo estes considerados os resultados negativos destes empreendimentos, e que não são custeados por concessionárias de geração de energia, mas sim, transferidos para terceiros. Quando um projeto de uma hidrelétrica é pensado, em geral, são calculados alguns custos associados a externalidades do projeto, tais como inundação de áreas remotas e deslocamento de populações humanas (indígenas e ribeirinhos) e animais. Populações humanas indígenas e ribeirinhos têm um vínculo histórico e social com a sua terra, e isto não é resolvido com novas terras e indenizações.

A região Amazônica é um importante local no cenário brasileiro de produção de energia hidrelétrica, sendo um grande propulsor de projetos de desenvolvimento nacional (MME, 2007), porém esta mesma região que vai gerar energia para o país, apoiando nosso crescimento, ainda carece de serviços básicos, como saneamento, educação e saúde.

Usinas hidrelétricas são consideradas fontes de energia renovável e limpa, porém, a possibilidade de contaminação das águas de seus reservatórios, pela mobilização de mercúrio (Hg) dos solos locais, e seus desdobramentos sobre a saúde humana e ambiental é uma questão que deve ser considerada durante o planejamento de grandes empreendimentos como estes. Diversos estudos apresentam este debate sobre a contaminação de águas de reservatórios na região amazônica e no mundo, em diferentes hidrelétricas construídas ao longo dos anos (Schetagne, Doyon e Fournier, 2000; Fearnside, 2001; Fearnside, 2005; Hylander *et al.*, 2006; Mailman *et al.*, 2006; He *et al.*, 2008; Kehrig *et al.*, 2009; Huguet *et al.*, 2010; Marques *et al.*, 2010).

O Hg é um contaminante global, pois é um elemento natural de distribuição ubíqua em todos os compartimentos do planeta (geosfera, hidrosfera e biosfera), ocorrendo em

concentrações variadas, e é de grande preocupação para o ambiente, seres humanos e animais (IPCS, 1989; IPCS, 1990; ATSDR, 1999).

Estima-se que 400-1400 toneladas de Hg são mobilizadas globalmente em barragens e outros represamentos feitos pelo homem. Isto tem levado a um aumento significativo nos níveis de Hg e metilmercúrio (MeHg) na água, e de MeHg em peixes e outras espécies aquáticas. Em alguns casos, os níveis elevados de Hg, também foram observados a jusante de lagos artificiais e reservatórios (UNEP, 2013).

Solos amazônicos têm elevadas concentrações de Hg de origem natural, sendo o bioma amazônico rico neste metal (Hacon *et al.*, 1995; Roulet e Lucote, 1995; Roulet *et al.*, 1996). O desflorestamento da Amazônia para diferentes usos do solo que vem ocorrendo desde o início da década de 70 também é apontado como uma das causas da mobilização do Hg e a sua reemissão dos solos para a atmosfera, mantendo elevados níveis de Hg no ecossistema amazônico (Grotto *et al.*, 2010; Hacon *et al.*, 2009; Wasserman *et al.*, 2001). Outro fator que também favorece a mobilização do Hg e possivelmente a produção de MeHg na Amazônia é a formação de grandes lagos para geração de energia hidrelétrica (IPCS, 1990; Hacon *et al.*, 2009).

As concentrações de Hg em águas de reservatórios de hidrelétricas se elevam porque a metilação de Hg inorgânico aquoso é mediada por microrganismos, que, por sua vez, são estimulados pela carbono presente na matéria orgânica, encontrada em solos terrestres, sedimentos, vegetação e zonas úmidas. A inundação provoca a decomposição do carbono orgânico e promove condições anóxicas, onde a metilação de Hg inorgânico por microrganismos é favorecida. A elevação dos níveis de MeHg em águas de reservatórios de hidrelétricas pode durar anos, e a rápida transferência de MeHg através da cadeia alimentar pode aumentar as concentrações deste composto em peixes do reservatório e do rio, o que pode persistir por até 30 anos após a inundação (Mailman *et al.*, 2006).

O risco de exposição a agentes químicos se inicia na fase intra-uterina. As vias de biotransformação (metabolismo) não estão completamente desenvolvidas durante os primeiros meses de vida, portanto, em recém-nascidos, a capacidade de metabolizar, detoxificar e excretar difere do adulto. Crianças constituem um grupo dentro da população que tem exposições únicas e vulnerabilidades especiais a substâncias tóxicas presentes no ambiente, devido ao seu metabolismo diferenciado. Compreende-se que as crianças necessitam de uma abordagem de avaliação de risco que considere as suas características particulares (Landrigan e Garg, 2002; Mello-da-Silva e Fruchtengarten, 2005; Guimarães e Asmus, 2010).

Crianças podem ser expostas ao Hg pela ingestão de peixe contaminado com MeHg. Quando o MeHg é consumido por mulheres grávidas em elevadas concentrações, pode levar a problemas de desenvolvimento neurológico no feto. A exposição transplacentária é a mais perigosa. Os sintomas neurológicos incluem retardo mental, convulsões, perda de visão e audição, atraso no desenvolvimento, distúrbios de linguagem e perda de memória (WHO, 2007).

Assim, populações que dependem de dieta ricas em peixes, oriundos de áreas contaminadas, podem ser expostas a níveis elevados de Hg, aumentando os riscos à saúde. Os ribeirinhos, assim como indígenas e quilombolas, comunidades tradicionais da região amazônica, apresentam esta característica e dependem do pescado local como principal item alimentar (Boischio e Barbosa, 1993).

As populações ribeirinhas que habitam a floresta amazônica foram submetidas a mudanças, devido ao desenvolvimento econômico da região nos últimos 40 anos. Mineração, construção de estradas, desmatamento para projetos agrícolas e inundação de grandes áreas para reservatórios de hidrelétricas resultaram em alterações dos tradicionais estilo de vida e subsistência, devido à reocupação rural e imigração (Marques *et al.*, 2010). Estas mudanças podem trazer sérios impactos sociais e riscos à saúde destas populações.

As informações apresentadas desenham a seguinte situação: a região amazônica tem grandes usinas hidrelétricas sendo construídas em seus territórios. Solos desta região são ricos em Hg, um metal tóxico, que pode ser mobilizado para as águas de reservatórios, devido a condições ambientais favoráveis. Este Hg será transformado em sua forma orgânica mais tóxica, o MeHg, que é biomagnificado na cadeia trófica, contaminando os peixes. Crianças são mais sensíveis a exposições a substâncias químicas, o que pode afetar seriamente seu desenvolvimento. Populações ribeirinhas consomem muitos pescados, e se estes estiverem contaminados, podem trazer sérios riscos à saúde desta população. Portanto, crianças ribeirinhas têm um risco elevado à saúde quando expostas ao Hg, oriundo de dietas ricas em peixes.

Os grandes empreendimentos em desenvolvimento na região amazônica, a exposição ambiental de populações ribeirinhas e a vulnerabilidade de crianças são uma realidade que deve ser estudada. Avaliações de impacto a Saúde destes empreendimentos devem ser desenvolvidas neste cenário. Este tipo de avaliação é complexa, porém imprescindível para monitorar os impactos positivos e negativos destes empreendimentos na população.

Uma abordagem possível na avaliação da saúde de crianças expostas ao Hg é a avaliação dos biomarcadores de exposição Mercúrio em Sangue (Hg-S) e Mercúrio em Cabelo (Hg-C) e sua relação com o estresse oxidativo. Este é um fenômeno decorrente de um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante (Barbosa *et al.*, 2010), que tem como desfecho o dano celular. Este dano pode estar ligado a patogênese de diversas doenças, o que depende de investigação científica para estabelecer a relação causa-efeito.

Os estudos de avaliação da exposição fazem uso de biomarcadores, e de acordo com o conceito da Organização Mundial de Saúde (OMS, ou *WHO*, na sigla em inglês) estes avaliam a intensidade da exposição e o risco à saúde (WHO, 1996).

Estudos sugerem que o estresse oxidativo está relacionado à toxicodinâmica do Hg, porém poucos trabalhos analisaram possíveis eventos biológicos subjacentes. A exposição ao Hg pode causar estresse oxidativo em sistemas biológicos, levando a processos patológicos. Porém, deve-se estudar melhor a associação entre a exposição ao Hg e estresse oxidativo em populações expostas através do consumo de peixes (Clarkson, 1975; Farina *et al.*, 2003; Grotto *et al.*, 2010).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a exposição humana ao Hg, via ingestão de peixes contaminados, em populações ribeirinha e urbana infantojuvenil, no rio Madeira (RO), e verificar sua associação com biomarcadores de estresse oxidativo.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1) Mercúrio

2.1.1) História e Usos

Para executar seus desenhos sobre as paredes das cavernas em que habitava, ou em objetos de argila e pinturas faciais, o homem pré-histórico certamente se serviu de uma pedra vermelha, o cinábrio (Figura 1), principal minério do Hg, quimicamente conhecida como sulfeto de mercúrio II (HgS). Isto demonstra que a relação entre o homem e o Hg é bastante antiga, e permanece sendo objeto de interesse da ciência. Admite-se que o cinábrio e o Hg começaram a ser extraídos de minas há mais de 2.300 anos. O símbolo do mercúrio vem do seu nome em latim *Hidrargyrum*, e o metal também é conhecido como prata líquida, devido ao seu aspecto e cor (Azevedo e Chasin, 2003).

Figura 1: Cinábrio, o minério de onde o Hg é extraído (UNEP, 2013)



O Hg já era conhecido na Antiguidade pelos chineses e indianos. O metal também foi encontrado em túmulos egípcios que datam de até 2000 a.C. Teofrasto (300 a.C.) descreveu o método que se utilizava para obter o Hg a partir do cinábrio, por meio da interação deste com o cobre e com o vinagre. Sua utilização foi relatada também nos escritos de Aristóteles (384-322 a.C.), e tanto na antiga Roma como na China o cinábrio foi muito utilizado como corante natural, bem como por suas supostas propriedades "mágicas" (Minamata Disease, 1968).

O Hg é um metal que por conta de suas características ímpares e seus usos, tem fascinado a humanidade por milênios. Infelizmente, tal fascínio implicou num aprendizado, pela prática, bastante cruel quanto à sua toxicidade. É interminável a literatura científica a respeito, tanto do aspecto da saúde humana quanto no da saúde ambiental. Hoje, depois de toda a evidência científica e dos fatos reais acontecidos, como bem prova a história deste metal, é evidente a natureza dos riscos toxicológicos e ecotoxicológicos decorrentes de usos do Hg. Todas as formas do Hg, a depender da forma química e da via de exposição, são tóxicas para o ser humano, podendo levar a graves consequências (Hacon e Azevedo, 2006).

O uso do Hg e seus riscos deve ser sempre avaliado, para evitar danos para o ambiente e o ser humano. Embora quantidades de Hg decorrentes da atividade humana possam ser muito pequenas em relação às emissões globais, a liberação antropogênica de Hg metálico elementar em áreas confinadas foi a fonte de surtos de intoxicação na Bacia de Minamata (Minamata) e no rio Agano (Niigata), ambos no Japão (WHO, 1976, IPCS 1990, IPCS 1991).

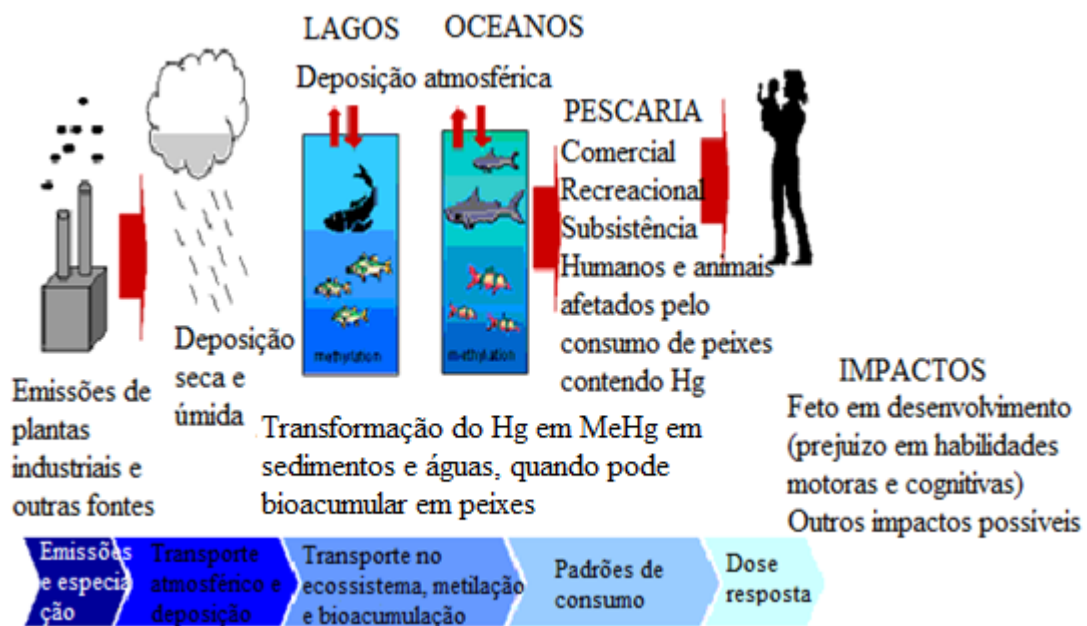
O primeiro e mais conhecido desastre ambiental, de repercussão mundial, que expôs ao mundo os riscos do uso do Hg ocorreu por volta de 1953 na Baía de Minamata, sudoeste do Japão. Uma planta química da empresa Chisso Corporation utilizava sulfato de mercúrio como catalisador para a produção de ácido acético e seus derivados, e cloreto de mercúrio como catalisador na produção de cloreto de vinila, sendo que o MeHg era um subproduto na síntese do acetaldeído. O MeHg é biomagnificado ao longo da cadeia trófica, sendo um grande risco para a saúde ambiental e humana. O MeHg, que era despejado como efluente industrial, contaminou a biota marinha e as águas da Baía de Minamata, chegando até a população através da ingestão de frutos do mar, item constante na dieta da população local. A “Doença de Minamata” foi oficialmente descoberta em 1956, quando uma criança foi hospitalizada com mãos e pés paralisados, sendo então vários casos similares encontrados, atingindo níveis epidêmicos. Durante este período, houve também relatos de efeitos diretos do Hg sobre a vida selvagem da área. Outros acidentes no Irã, Paquistão e Guatemala, causados pelo uso de MeHg como fungicida para tratamento de sementes de grãos, permitem confirmar o problema do uso intensivo do Hg, principalmente na forma de compostos organomercuriais (IPCS 1989; Lacerda, 1997; Micaroni, Bueno e Jardim, 2000).

MeHg foi utilizado também como pesticida no tratamento de sementes de grãos no Iraque. Esse uso deu origem a graves incidentes de envenenamento antes de 1960 e, novamente, no início dos anos 1970. O surto de intoxicação em massa ocorreu no inverno de 1971-1972. Sementes e grãos tratados com um fungicida derivado de Hg foram usadas para preparar pão

caseiro em comunidades rurais em todo o país. Mais de 400 mortes atribuídas a intoxicação foram registradas. Ambos os sexos e todas as idades foram afetados (IPCS 1990, UNEP, 2002)

A Figura 2 ilustra a contaminação do ambiente pelo Hg, a transformação do metal na forma orgânica MeHg e, no final da cadeia de eventos, o impacto na saúde do ser humano. A forma MeHg se torna mais perigosa para o humano pois se bioacumula ao longo da cadeia trófica e chega ao humano em maiores concentrações que as presentes no ambiente.

Figura 2: A contaminação do ambiente pelo Hg (USEPA, 2013)



Os acidentes relatados acima apresentam quadros de exposição ambiental, mas é importante considerar também o Hg no ambiente de trabalho e seu impacto no campo da Saúde Ocupacional, pois a exposição ao Hg por ambas as fontes, ambiental e ocupacional, representam um risco a saúde humana.

Os níveis de exposição ambiental, em geral, são mais baixos do que aqueles normalmente detectados no ambiente de trabalho. Os trabalhadores estão expostos ao vapor de Hg por inalação, principalmente ao Hg metálico, mas também a formas inorgânicas e orgânicas (IARC, 1997).

2.1.2) Propriedades e Distribuição

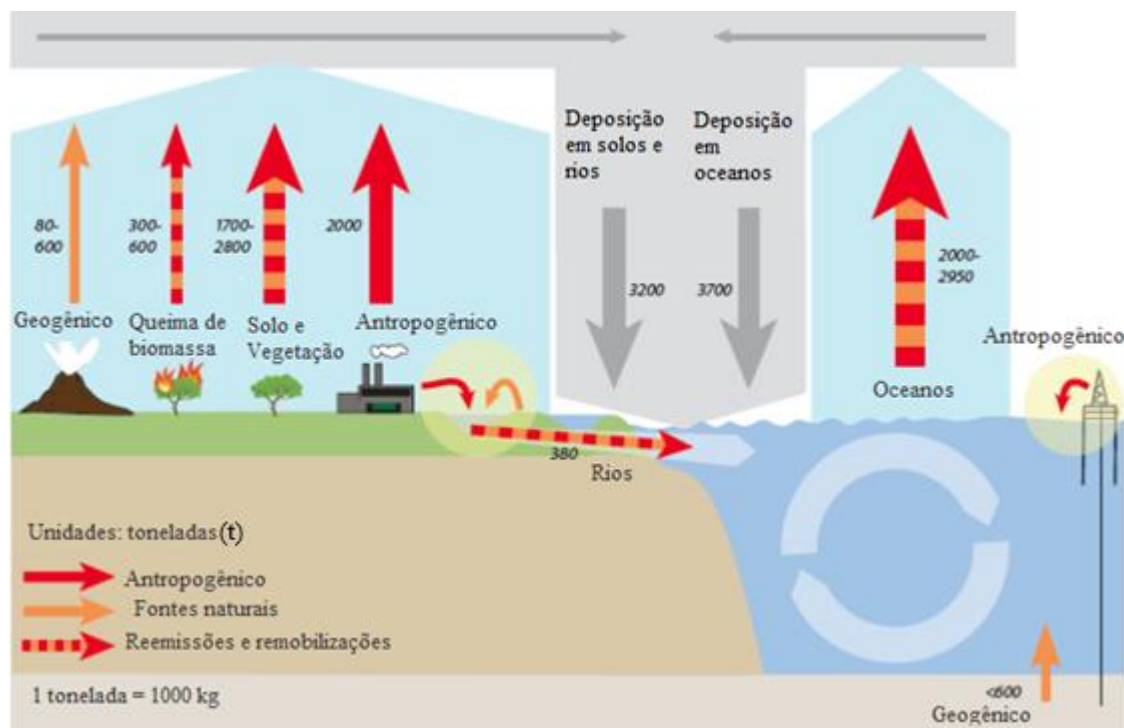
O Hg encontra-se associado em pelo menos 25 minerais, mas a única forma economicamente explorada é o cinábrio, que ocorre em depósitos em áreas com atividade vulcânica recente, em veios e fraturas minerais, e próximo a fontes de águas termais. Importantes depósitos deste mineral se localizam na Espanha, Quirguistão, Argélia, China, Estados Unidos e México (Biester, Gosar e Muller, 1999).

A abundância do Hg é de aproximadamente 0,05 mg/kg na crosta terrestre, com variações locais significativas. Minérios de Hg em geral contêm cerca de 1% do metal, embora os extratos de minas na Espanha podem conter até 12-14%. Hg também está presente em níveis muito baixos por toda a biosfera, e sua absorção pelas plantas pode contribuir na presença da composição de combustíveis fósseis como o carvão, petróleo e gás, uma vez que estes combustíveis são formados a partir de transformação geológica de resíduos orgânicos (UNEP, 2002).

As fontes naturais mais significativas de Hg são a degaseificação da crosta terrestre, as emissões de vulcões e a evaporação de corpos aquáticos (IPCS, 1991). A crosta terrestre é uma importante fonte para a contaminação de corpos aquáticos. Uma parcela do Hg encontrado na água é de origem natural, embora possa parcialmente ser de origem atmosférica e ter sido gerado também por atividade antropogênica. Portanto, é difícil avaliar, quantitativamente, as contribuições relativas à atividade antropogênica e à natural em relação aos compostos mercuriais que sofrem lixiviação do solo para a água (Azevedo e Chasin, 2003).

O Hg é liberado para o ambiente a partir de fontes e processos naturais e como resultado de atividades humanas. Uma vez que tenha entrado nos compartimentos ambientais, ocorrem ciclos do metal entre ar, terra e água até que seja removido do sistema e depositado em sedimentos do oceano ou lacustres, ou mesmo, “aprisionado” em compostos minerais estáveis. A Figura 3 demonstra as estimativas globais de Hg, em toneladas, ilustrando os principais compartimentos ambientais, os caminhos que são de importância no ciclo global do metal, e as maneiras pelas quais versões naturais e antropogênicas movem-se entre os compartimentos terra, ar e água (UNEP, 2013).

Figura 3: Estimativas globais de Hg (UNEP, 2013)



Os sedimentos de rios, lagos e oceanos poluídos com Hg são perigosos porque o Hg depositado pode permanecer ativo como substrato para a metilação por cerca de 100 anos, mesmo quando a fonte é eliminada. A distribuição do Hg nos sedimentos está relacionada com o conteúdo de carbono orgânico, argila, ferro, fósforo, potencial redox e enxofre, dentre outros. Os agentes orgânicos complexantes solúveis em água, tais como humatos e fulvatos, podem quelar as espécies solúveis e insolúveis na água; os últimos precipitam-se diretamente da solução para o sedimento. O pH ácido favorece a absorção do Hg pelo húmus. No entanto, em pH básico, o solo, ar e água têm maior afinidade pela fração mineral, desfavorecendo a formação do MeHg (Stein *et al.*, 1996; Pak e Bartha, 1998, Wasserman *et al.*, 2002; Bisinoti e Jardim, 2004).

Independentemente dos processos que regulam estes ciclos do Hg no ambiente, o Hg que chega nos diferentes compartimentos ambientais pode apresentar-se como inorgânico ou orgânico. Na forma inorgânica pode ser encontrado sob três diferentes estados de oxidação: o Hg elementar (Hg^0), o qual se encontra principalmente na forma de gás, o íon mercuroso (Hg_2^{2+}), forma pouco estável em sistemas naturais, e o íon mercúrico (Hg^{2+}). Na forma orgânica, o íon mercúrico apresenta-se ligado covalentemente a um radical orgânico, sendo o MeHg e o dimetilmercúrio os mais comuns, ou ainda com ligantes orgânicos naturais. No ciclo biogeoquímico do Hg, o MeHg e os compostos de Hg^{2+} , dimetilmercúrio e Hg^0 são

interconvertidos nos sistemas atmosféricos, aquáticos e terrestres (Micaroni, Bueno e Jardim, 2000).

Fontes antropogênicas de emissões de Hg representam cerca de 30% da quantidade total de Hg na atmosfera a cada ano. O aporte antrópico ocorre através de indústrias que queimam combustíveis fósseis, produção eletrolítica de cloro-soda, produção de acetaldeído, incineradores de lixo, polpa de papel, tintas, pesticidas, fungicidas, lâmpadas de vapor de Hg, baterias, amalgamação de mercúrio em extração de ouro, entre outros. Nessas atividades o Hg é emitido pois está presente como uma impureza nos combustíveis e matérias-primas. Hg ainda é utilizado numa vasta gama de produtos, incluindo as baterias, tintas, *switches* elétricos, dispositivos eletroeletrônicos, termômetros, aparelhos para medir pressão arterial, lâmpadas fluorescentes, pesticidas, fungicidas, medicamentos e cosméticos, e amálgama dentária (Clarkson, 1992; UNEP, 2013).

O Hg é um metal mundial e onipresente, ocorre naturalmente, tem amplos usos no cotidiano e é liberado para a atmosfera, solo e água a partir de uma variedade de fontes. Isto faz com que fontes antropogênicas de Hg sejam um fator chave no controle dos riscos associados a este metal. Diante disso, em fevereiro de 2009, uma decisão do Programa da Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA) considerou ser necessário realizar estudos sobre o Hg e listou uma série de atividades importantes neste contexto, tais como, estudo das várias fontes e emissões de Hg, e atividades para reduzir os riscos à saúde humana e ao meio ambiente. Como resultado, em janeiro de 2013, foi acordado por 140 países o texto da Convenção de Minamata, que é um tratado global para proteger a saúde humana e o ambiente dos efeitos adversos do Hg, reconhecendo o Hg como uma substância química de interesse ambiental global (Fundacentro, 2013; MMA, 2014; Minamata Convention on Mercury, 2014).

Os principais destaques da Convenção de Minamata incluem a proibição de novas minas, a eliminação progressiva das já existentes, as medidas de controle sobre as emissões atmosféricas, e a regulamentação internacional do setor informal para mineração artesanal e de ouro em pequena escala (Minamata Convention on Mercury, 2014).

No Brasil, em março de 2011, a Comissão Nacional de Segurança Química (CONASQ) instituiu o Grupo de Trabalho sobre Mercúrio (GT-Mercúrio), com o objetivo de discutir e propor estratégias, diretrizes, programas, planos e ações sobre o Instrumento Global sobre o Mercúrio e encaminhar sugestões para a participação brasileira nas negociações do instrumento jurídico mundial sobre o Hg (MMA, 2014).

O Brasil não é um país produtor de Hg, importando toda a quantidade consumida. Entretanto, o Brasil exporta alguns produtos contendo Hg em sua constituição, como lâmpadas, computadores e televisores, principalmente para países da América Latina. O Brasil importa Hg na forma metálica e na forma de produtos contendo Hg em sua constituição. O principal volume de importação corresponde ao Hg metálico, que totalizou 737 toneladas no período entre 1996 e 2009 (MMA, 2013).

As importações de Hg destinam-se aos seguintes setores, conforme a Comissão Nacional de Segurança Química: revendedoras (83%), odontologia (10,4%), químico (5,5%), termômetros (0,9%), lâmpadas (0,2%) (Guimarães, 2006).

No Brasil, o uso de Hg é representado pelas atividades geradoras de resíduos sólidos contendo Hg, que estão distribuídas de maneira não uniforme no país. Na região Sudeste, particularmente nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro, encontram-se as principais fontes geradoras de resíduos de Hg contidos em produtos e efluentes da indústria química e eletroeletrônica (Moreira e Pivetta, 2001)

Na região Sul, encontram-se as principais usinas termelétricas a carvão. Cerca de 90% do Hg emitido por esta fonte seja liberado na forma de vapor, cerca de 10% está contido em cinzas (Pires, Fiedler e Teixeira, 1997). Na região Norte e Centro-Oeste, as principais fontes de resíduos sólidos contendo Hg são originadas no garimpo de ouro, onde são depositados sob forma de rejeitos de mineração. Em outras áreas importantes de garimpo, como no Estado de Rondônia, os garimpeiros continuam operando majoritariamente através de dragas diretamente no leito de rios, não gerando resíduos sólidos, embora contaminem significativamente o meio aquático (meio receptor) (Lacerda e Salomons, 1998).

A origem e características das principais fontes antropogênicas de Hg no Brasil sofreram alterações nas últimas décadas. As fontes industriais eram responsáveis pela quase totalidade das emissões antropogênicas no país até 1970. A partir desta época, três aspectos principais modificaram radicalmente esta situação: primeiro, o controle mais eficiente das emissões industriais conhecidas e a substituição de tecnologias “sujas”; depois, a explosão do garimpo de ouro na Amazônia, na década de 80; e, por fim, o crescimento acelerado dos grandes centros urbanos (Lacerda, 1997).

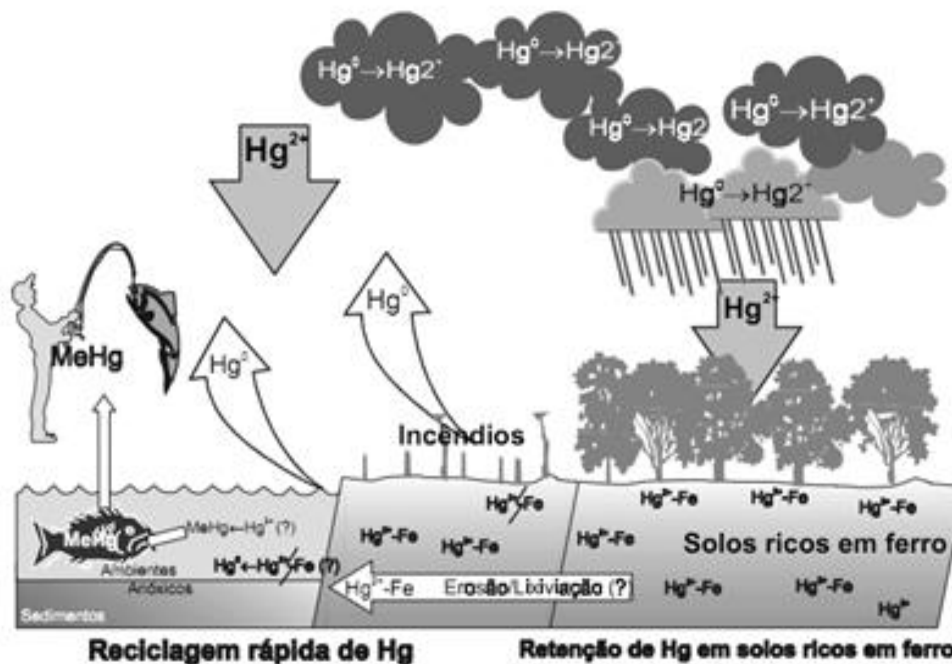
2.1.3) Mercúrio na Amazônia

Durante as últimas décadas do século passado houve um aumento significativo da mineração de ouro em muitos países em desenvolvimento, que oscilou em função do mercado internacional do preço do ouro. Em quase todos os países da Bacia Amazônica, o Hg metálico foi usado como insumo no processo de extração de ouro (amalgamação). No Brasil, uma grande parte da discussão dada aos problemas da contaminação por Hg só surgiu na década de 80. Nessa época, estudos revelaram que grandes quantidades de Hg foram lançadas nos principais rios e na atmosfera do ecossistema amazônico como consequência da “corrida do ouro” (Hacon *et al.*, 2009).

A amálgama é utilizada para recuperação do ouro de granulação fina. Em seguida, a amálgama é queimada, via de regra, ao ar livre, e o Hg liberado para a atmosfera na forma de vapor, restando o ouro (Santos *et al.*, 2003).

Inicialmente, os elevados níveis de Hg encontrados em solos amazônicos foram atribuídos apenas a mineração de ouro. Entretanto, recentemente alguns autores têm sugerido que sedimentos e solos amazônicos teriam elevadas concentrações de Hg de origem natural, o que poderia explicar também os níveis de Hg nos peixes e em humanos da região (Hacon *et al.*, 1995; Roulet e Lucote, 1995; Roulet *et al.*, 1996) Segundo eles, o Hg formaria algum tipo de complexo com o ferro (Fe). A natureza deste processo ainda não é bem conhecida, uma vez que a relação entre estes dois metais foi detectada a partir de coeficientes de correlação feitos em perfis de solo. Diante desta associação entre Hg e Fe, a hipótese é que o Hg do solo amazônico teria uma origem natural, e não somente antropogênica, como era antes discutido. Outros autores levantaram a hipótese de que o transporte atmosférico do Hg antropogênico poderia ser o responsável pelo aumento da contaminação na Bacia Amazônica (Wasserman, Hacon e Wasserman, 2001; Hacon *et al.*, 2009).

Figura 4: O ciclo do Hg no ambiente amazônico (Wasserman, Hacon e Wasserman, 2001)



De acordo com a Figura 4, as concentrações de Hg nas águas devem ser baixas, em razão da baixa solubilidade do elemento. Porém, a parte atmosférica do ciclo do Hg deve ter uma importância significativa, dada a baixa pressão de vapor do metal. A figura indica que ele deve ser volatilizado para a atmosfera como Hg^0 , sofre oxidação, e deve retornar junto com a água de chuva na forma iônica (Hg^{2+}). Os solos representam um reservatório de Hg, onde a permanência é mais longa do que nos outros compartimentos, justificando assim sua maior concentração (Wasserman, Hacon e Wasserman, 2001).

O Hg é reconhecidamente um problema para a saúde ambiental e humana (IPCS, 1989; ATSDR, 1999, UNEP 2013), e isto tem maior relevância devido a utilização do Hg em numerosas atividades econômicas, sobretudo na mineração de ouro. Na década de 1990, a escassez de dados técnicos disponíveis a respeito do assunto mobilizou a academia científica, a fim de levantar informações sobre o caso, gerando estudos com participação de povos indígenas, comunidades ribeirinhas e instituições governamentais e não-governamentais. O objetivo básico da iniciativa consistiu em conhecer a dimensão e a gravidade da intoxicação por Hg em grupos populacionais em risco (Gonçalves e Gonçalves, 2004).

A bacia superior do rio Madeira (região do Alto Madeira) foi a segunda mais importante região produtora de ouro de garimpo na Amazônia durante as décadas de 1980 e 1990. A corrida do ouro nesse rio começou em 1975 como uma atividade individual, não mecanizada,

principalmente em bancos e margens do rio, durante a estação seca. Este processo foi rapidamente seguido pela introdução de balsas, operadas em conjunto com mergulhadores, seguida da introdução de grandes dragas mecânicas, capazes de trabalhar em grandes profundidades (Bastos e Lacerda, 2004).

O desmatamento da Amazônia seguido pela conversão dos solos para diferentes usos é apontado como uma das causas da remobilização do Hg de origem natural ou antrópica. A erosão e lixiviação do Hg presente nos solos e a sua reemissão para a atmosfera mantem elevadas concentrações no ecossistema amazônico, mesmo após a diminuição do garimpo de ouro. Outro fator que também favorece a mobilização do Hg e possivelmente a produção de MeHg na Amazônia é a formação de grandes lagos para geração de energia hidrelétrica, que via de regra resultam na inundação de extensas áreas de floresta. O processo de metilação do Hg é favorecido em ambientes aquáticos anóxicos ou subóxicos, levemente ácidos, com concentrações elevadas de matéria orgânica dissolvida e atividade microbológica intensa. Em áreas de remanso, lagos marginais e de inundação e em reservatórios artificiais, essas características biogeoquímicas estão mais propensas a ocorrer. Os reservatórios de criação recente na região amazônica oferecerem as condições citadas que propiciam a metilação do Hg, sendo estes uma importante fonte adicional de Hg inorgânico, que pode ser convertido a MeHg, por meio da remobilização do metal dos solos dos novos lagos artificiais (Lacerda e Malm, 2008).

No quadro geral da contaminação ambiental por Hg na bacia amazônica e em suas áreas de influência, duas grandes questões se justapõem: a larga complexidade da toxicologia e da ecotoxicologia do metal, e a dimensão da bacia, de sua natureza, e a intrincada teia de relações que internamente a ela se estabelecem (Hacon e Azevedo, 2006).

A bacia amazônica representa um verdadeiro laboratório para estudar os efeitos da exposição crônica ao Hg e suas interações com a dieta, o histórico clínico e a susceptibilidade às doenças endêmicas tropicais. A complexidade do ecossistema amazônico, junto ao limitado conhecimento do ciclo biogeoquímico do Hg na floresta tropical, explica as dificuldades que a comunidade científica enfrenta para avaliar o impacto da contaminação pelo metal. Assim, os conhecimentos atuais sobre o transporte, transformação e destino do Hg no ambiente terrestre e aquático amazônico ainda é muito superficial. Estas questões afetam o potencial da exposição das populações locais e, conseqüentemente, os seus riscos (Hacon *et al.*, 2009).

A contaminação por Hg na região não é nenhuma novidade para as autoridades da Saúde. Desde a década de 70, quando o garimpo do ouro estourou na região, sabe-se que o metal pode afetar a saúde humana e infantil, porém não existem protocolos de investigação adequadamente estabelecidos para identificar populações expostas aos efeitos subclínicos.

2.1.4) Metilmercúrio

O metilmercúrio (MeHg ou CH_3Hg^+) é um composto orgânico de Hg encontrado no ambiente aquático. A maioria do MeHg é derivado da metilação de Hg inorgânico, realizada principalmente por microrganismos aquáticos (Compeau e Bartha, 1985). MeHg é biomagnificado na cadeia alimentar aquática, atingindo concentrações tão altas quanto 1 mg/g em peixes predadores (Hintelmann, 2010).

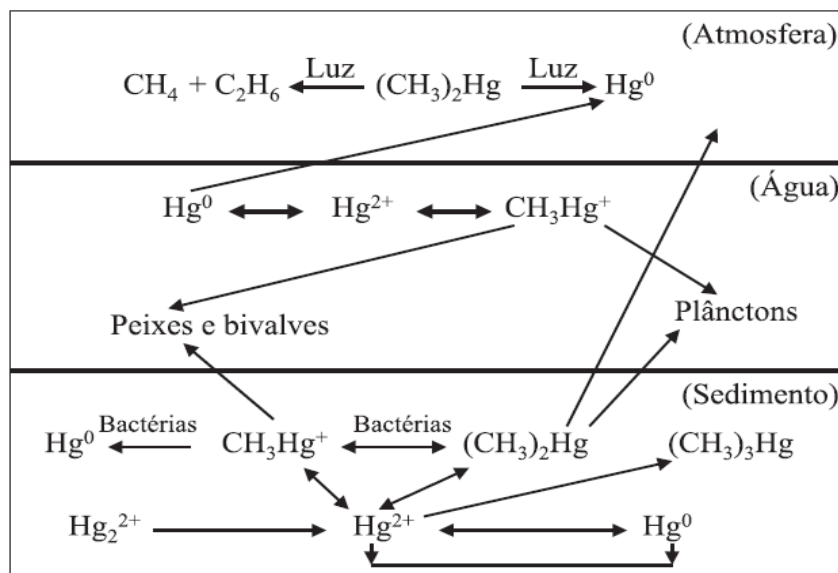
O consumo de peixes, crustáceos e moluscos é o principal meio de exposição humana ao MeHg, sendo este fato uma séria preocupação para a Saúde Pública (IPCS, 1989; IPCS, 1990; ATSDR, 1999; Chen, 2012).

A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC, na sigla em inglês) classifica o MeHg no Grupo 2B (possível carcinógeno para humanos). Há também a classificação da USEPA que é igual à da IARC (C - possível carcinógeno para humanos). Já o Hg^0 e seus derivados inorgânicos estão inseridos no Grupo 3 (não classificáveis quanto a sua carcinogenicidade para humanos) (IARC, 1997). Esses dados estão atualizados e representam a última classificação de carcinogenicidade para o Hg e seus derivados, de acordo com a IARC e USEPA (IARC, 2014; USEPA-IRIS, 2014).

A atenção dada ao MeHg é devida à elevada toxicidade para os seres humanos e animais, seu acúmulo na biota e sua biomagnificação na cadeia alimentar aquática. O conhecimento da concentração, transporte e dinâmica do Hg e MeHg no ambiente é necessário para prever o potencial de impacto sobre os seres humanos. O ciclo biogeoquímico do Hg é caracterizado pelas várias rotas que este pode seguir no ambiente. Quando em contato com o solo ou sedimento, pode ocorrer sorção do Hg na forma insolúvel seguida demetilação/desmetilação. O ciclo é completado pelas rotas de precipitação, bioconversão em formas voláteis ou solúveis, reintegração deste na atmosfera ou bioacumulação na cadeia alimentar aquática ou terrestre. Mais do que 85% do estoque total de Hg na biota de águas doces está na forma de MeHg, indicando que a formação deste é o processo chave que regula o conteúdo de Hg neste compartimento. Há uma grande influência das bactérias e da luz solar no ciclo do Hg,

caracterizando suas transformações, como pode ser observado na Figura 5 (Lacerda *et al.*, 1994, Bisinoti e Jardim, 2004). No ambiente aquático amazônico o MeHg em peixes representa de 85-100% da carga total de Hg (Hacon *et al.*, 1997).

Figura 5: Interconversão entre as formas de Hg (Bisinoti e Jardim, 2004)



O MeHg presente em alimentos contaminados é completamente absorvido a partir do trato gastrointestinal e distribuído para a maioria dos tecidos. MeHg se liga a grupos sulfidríla reduzidos. Uma fração é convertida para Hg^{2+} , e a extensão dessa conversão depende da espécie. O MeHg é excretado principalmente na bÍlis. No intestino, uma fração de MeHg é biotransformada em Hg^{2+} e excretada nas fezes. MeHg passa para o feto e é excretado no leite. Nos seres humanos, MeHg têm um meia-vida de aproximadamente dois meses. As concentrações no sangue e cabelo são úteis para monitorar a exposição ao MeHg (IARC, 1997).

Depois de absorvido, mais de 90% de MeHg no sangue fica ligado à hemoglobina dos eritrócitos). Nos seres humanos expostos por via oral ao MeHg, a percentagem (do total) de Hg inorgânico no sangue, urina e leite materno é de 7%, 39% e 73%, respectivamente, sugerindo que Hg inorgânico é um importante metabólito excretável do MeHg (Kershaw, Clarkson e Dhahir, 1980; Farina *et al.*, 2013).

No homem, o sistema nervoso central (SNC) é o principal órgão atingido pelo MeHg, pois este atravessa a barreira hematoencefálica, e a ocorrência dos sintomas clÍnicos é dose-dependente. A sintomatologia em adultos inclui parestesia (alterações sensoriais), ataxia (falta de coordenação nos movimentos) e disartria (dificuldade na articulação das palavras), além de

distúrbios visuais e auditivos. No homem, os níveis de MeHg no cérebro são aproximadamente 6 vezes maiores do que os níveis de Hg no sangue. O feto é particularmente sensível a exposição ao MeHg, com efeitos no desenvolvimento cognitivo de crianças. Os grupos mais vulneráveis à exposição ao MeHg são as crianças, o feto e a gestante (IPCS, 1990).

Há estudos epidemiológicos que mostram que a exposição materna ao MeHg durante a gravidez provoca déficits neurológicos na prole (Grandjean *et al.*, 1997; Murata *et al.*, 2004). A exposição ao MeHg durante o desenvolvimento fetal é ligada à dano no desenvolvimento cerebral em níveis muito mais baixos do que aqueles que afetam o cérebro de adultos. Provavelmente porque afeta a diferenciação celular, migração e sinaptogênese (Grandjean e Landrigan, 2006).

Os mecanismos moleculares envolvidos na neurotoxicidade e neurodegeneração induzida por MeHg são mais conhecidos, quando comparados com os do Hg⁰. O MeHg é um monoalquilmercurial, portanto seu átomo de Hg é um monocatión (CH₃Hg⁺) que possui propriedades eletrofílicas. Como um composto eletrófilico, o MeHg interage com grupos nucleofílicos de várias biomoléculas, oxidando-os. Grupamentos sulfidrilas (tiol –SH e tiolato –S⁻) são alvos importantes e relevantes de MeHg nos sistemas biológicos. Assim, as interações de MeHg com proteínas contendo sulfidrilas (isto é, receptores de neurotransmissores, transportadores, enzimas antioxidantes, etc), bem como com grupamentos tíois proteicos, isto é, a glutationa, são eventos cruciais na mediação da sua neurotoxicidade (Clarkson, Magos e Myers, 2003; Sumi, 2008).

A população em geral não enfrenta riscos significativos para a saúde em relação a exposição ao MeHg, com exceção de certos grupos com alto consumo de peixes (Järup, 2003). Por exemplo, em comunidades onde, via alimentação, existe um consumo regular de aproximadamente 200 µg Hg/dia, a partir de peixes, os níveis de Hg no sangue e no cabelo são em torno de 200 µg/L e 50 µg/g, respectivamente (IPCS, 1990).

A exposição ao MeHg pode resultar numa variedade de efeitos sobre a saúde de seres humanos, como explicitado anteriormente. No que diz respeito a outros efeitos do MeHg sobre a saúde, alguns estudos epidemiológicos recentes em homens sugerem que o MeHg está associado com um maior risco de infarto agudo do miocárdio, doença cardíaca coronariana e doença cardiovascular em algumas populações (USEPA, 2010).

As populações ribeirinhas da Amazônia que dependem do pescado local estão sob maior risco de desenvolver problemas de saúde causados pelo MeHg que se concentra nos diferentes níveis tróficos das cadeias alimentares. São inúmeras as variáveis que interferem na exposição

destes indivíduos ao Hg, relacionadas tanto ao comportamento do metal nesta cadeia trófica (por exemplo, biomagnificação), quanto ao consumo de pescado (espécies consumidas, sazonalidade e locais de captura) (Boischio e Barbosa, 1993).

2.2) Estresse Oxidativo

Atualmente existe um grande interesse no estudo de antioxidantes devido, principalmente, às descobertas sobre os efeitos dos radicais livres, também conhecidos como espécies reativas, no organismo. A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção metabólica. Encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e danos a proteínas, enzimas, carboidratos e DNA. Dessa forma, encontram-se relacionados com várias patologias, tais como artrite, choque hemorrágico, doenças do coração, catarata, disfunções cognitivas, câncer e AIDS, podendo ser a causa, ou o fator agravante do quadro geral (Barreiros, David e David, 2006).

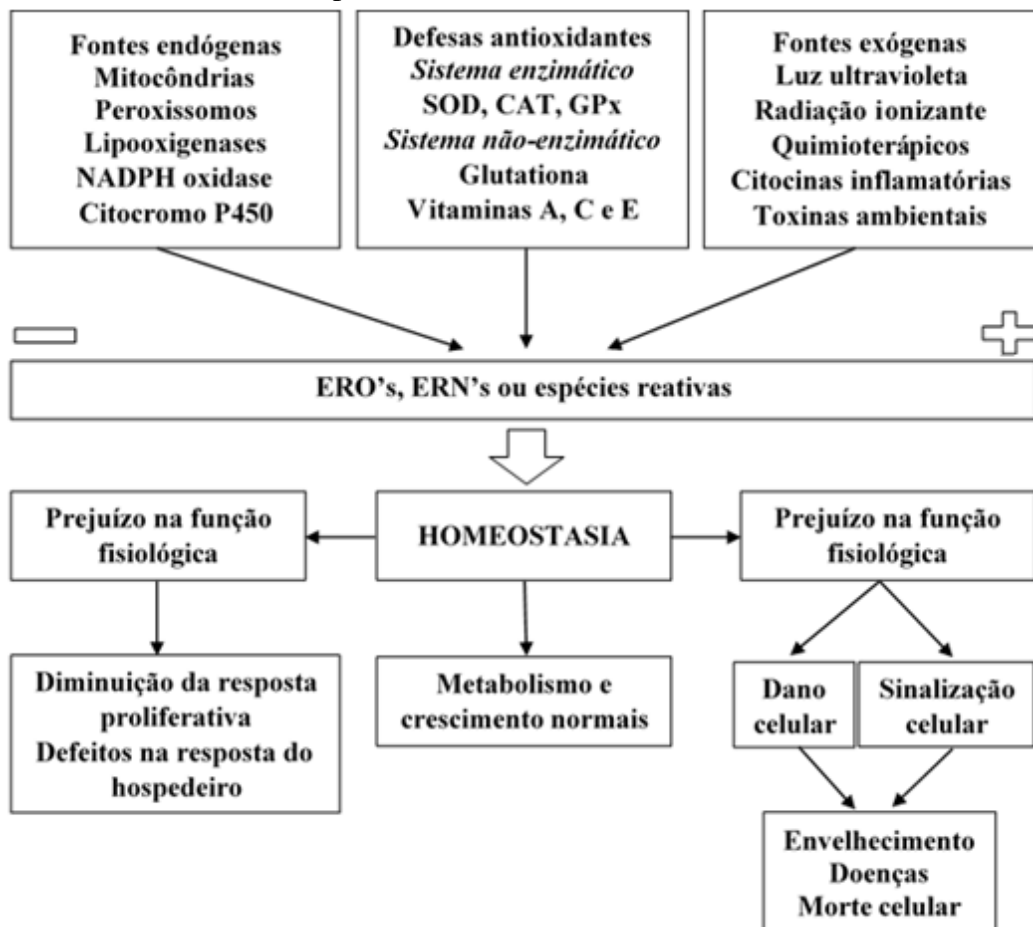
O termo radical livre se refere a um átomo ou molécula altamente reativo, que contém um número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. É este não-emparelhamento de elétrons que confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o O₂ sofre redução e durante esse processo são formados intermediários reativos, conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ERO's) (Ferreira e Matsubara, 1997).

Os principais elementos participantes de reações de óxido-redução no organismo humano são o oxigênio (O₂) e o nitrogênio (N) (Vasconcelos *et al.*, 2007). Os produtos formados nessas reações nem sempre apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada, mas ainda assim são altamente reativos, como por exemplo, o oxigênio singleto (¹O₂), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e ácido hipocloroso (HClO) (Ribeiro *et al.*, 2005). Por este motivo, tais moléculas são atualmente denominadas “espécies reativas”, evitando-se o termo “radical livre” (Ferreira e Matsubara, 1997). As espécies reativas de oxigênio (ERO's, ou ROS – “*reactive oxygen species*”), bem como as espécies reativas de nitrogênio (ERN's, ou RNS – “*reactive nitrogen species*”), são moléculas altamente instáveis, quimicamente muito reativas e apresentam meia-vida curta (McCord, 2000).

O óxido nítrico (NO[•]) é outro tipo de espécie reativa, atuando na sinalização biológica em uma grande variedade de processos fisiológicos, incluindo neurotransmissão, regulação da pressão arterial, mecanismos de defesa, relaxamento da musculatura lisa e regulação imune. Esta molécula contém um elétron não emparelhado, portanto é considerada um radical livre. Outra ERN é o ânion peroxinitrito ONOO⁻, molécula mais oxidativa que o NO[•], que pode causar fragmentação de DNA e oxidação de lipídeos (Valko *et al.*, 2006).

As ERO's e ERN's, participam de inúmeros processos fisiológicos, incluindo crescimento celular normal, morte celular programada e senescência celular. Portanto, espécies reativas têm um papel fisiológico de sinalização celular redox. Apesar de serem essenciais para as respostas biológicas, em algumas ocasiões, o aumento na produção dessas espécies pode resultar em respostas deletérias ao organismo (Oga, Camargo e Batistuzzo, 2008), como demonstrado na Figura 6.

Figura 6: As fontes e a resposta celular às espécies reativas
(Adaptado de Finkel e Holbrook, 2000)



Quando a produção de ERO's ou ERN's é exacerbada, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio (balanço redox). O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante, com predomínio dos oxidantes, com dano consequente. A intensidade e patogenicidade destes desequilíbrios vão depender, naturalmente, das concentrações locais de espécies pró e antioxidantes, das constantes de velocidade de reação com moléculas-alvo e da compartimentalização celular destes processos, onde fatores de solubilidade e difusibilidade são determinantes (Sies, 1991; Vasconcelos *et al.*, 2007).

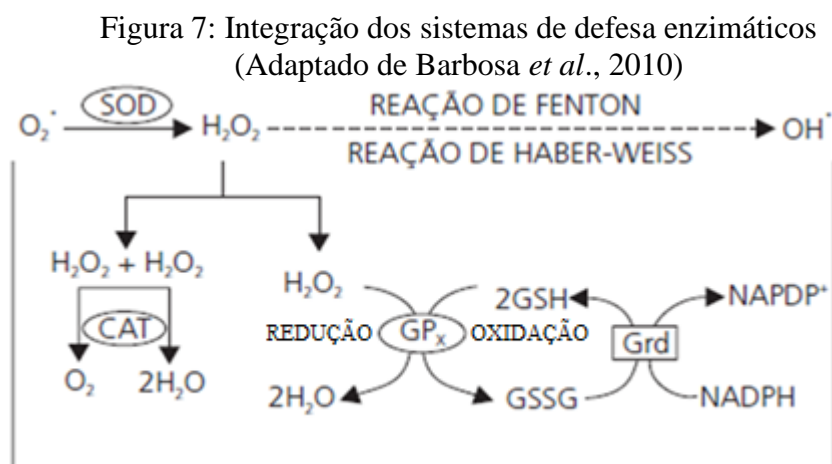
"Antioxidante" é uma palavra muito mal utilizada. Pode-se fazer quase qualquer produto químico exercer efeitos antioxidantes *in vitro*, escolhendo as condições de ensaio apropriadas. Halliwell e Gutteridge (1999), definiram um antioxidante como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em comparação com as de um substrato oxidável, atrasa significativamente, ou evita a oxidação do referido substrato. O termo "substrato oxidável" inclui todo o tipo de molécula encontrada *in vivo*. Esta definição enfatiza a importância dos danos estudados e a fonte de espécies reativas usada quando as ações antioxidante são examinadas (Halliwell e Whiteman, 2004).

Dentre os aspectos preventivos, é interessante ressaltar a correlação existente entre a atividade antioxidante e a capacidade de inibir ou retardar o aparecimento de células cancerígenas, além de retardar o envelhecimento das células em geral (Barreiros, David e David, 2006).

O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta. Os antioxidantes produzidos pelo corpo agem enzimaticamente, a exemplo das enzimas glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) ou, não-enzimaticamente, a exemplo da glutathione (GSH), peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina), melatonina, ácido diidrolipóico, ubiquinonas, metalotioneína e polifenóis (flavonoides e poliflavonoides). Além dos antioxidantes produzidos pelo corpo, o organismo utiliza aqueles provenientes da dieta como o β -caroteno (pró-vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C) e *a*-tocoferol (vitamina E). Há ainda elementos que são antioxidantes pois são cofatores de enzimas antioxidantes: Cu, Zn e Mn (SOD) e Se (GPx) (Barreiros, David e David, 2006; Oga, Camargo e Batistuzzo, 2008; Barbosa *et al.*, 2010)

Pequenos desvios da atividade fisiológica de enzimas antioxidantes podem ter um grande efeito sobre a resistência celular aos danos induzidos por espécies oxidantes (Matés, Pérez-Gómez e Castro, 1999).

A Figura 7 é uma representação esquemática do sistema enzimático de defesa antioxidante.



Por meio da reação de dismutação (reação onde ocorre uma oxidação e uma redução ao mesmo tempo), a SOD catalisa a geração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a partir do radical superóxido ($O_2\bullet$). As enzimas CAT e GPx se integram para impedir o acúmulo de H_2O_2 que, apesar de não ser um radical livre, é igualmente reativo e capaz de promover danos potenciais. O acúmulo dessa espécie reativa (H_2O_2) possibilita, por meio das reações de *Fenton* e *Haber-Weiss*, a geração do radical hidroxila ($OH\bullet$), contra o qual não existe defesa enzimática. A GPx reduz o H_2O_2 à água, convertendo a glutatona reduzida (GSH) em oxidada (GSSG). A glutatona redutase (GR), responsável pela recuperação da glutatona reduzida (GSH), possibilita a manutenção da integralidade do ciclo redox da GSH e, conseqüentemente, do equilíbrio adequado entre os sistemas de defesa enzimáticos (Barbosa *et al.*, 2010).

Os seres vivos estão continuamente expostos a compostos químicos naturais e/ou não-naturais a eles estranhos. Estes compostos são denominados xenobióticos e podem interagir de maneira deletéria ao organismo. A detoxificação enzimática de xenobióticos pode ser classificada em três fases distintas, porém estritamente relacionadas: fase I, II e III. Nas fases I e II, geralmente se observa a transformação do xenobiótico em uma espécie que apresenta maior solubilidade em água, além de uma menor toxicidade. Na fase III, estes metabólitos são transportados para o exterior da célula e então excretados. De fato, a fase II do metabolismo de

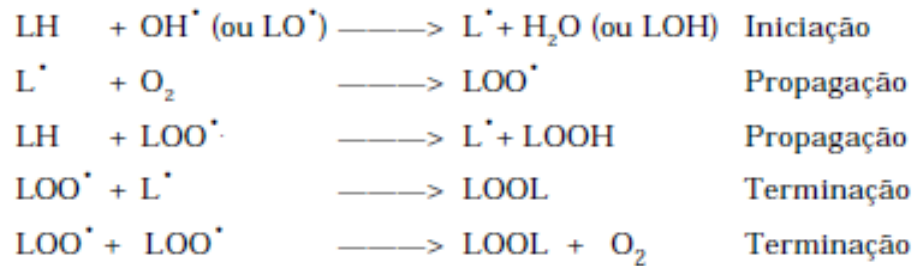
xenobióticos compreende um importante passo para a eliminação destas espécies do meio celular, podendo, em alguns casos, envolver a participação de transportadores (Sheehan *et al.*, 2001; Huber, Almeida e Fátima, 2008).

As Glutathione S-Transferases (GST, EC 2.5.1.18) são famílias de enzimas com diferentes localizações celulares, atuando na detoxificação de xenobióticos nocivos (incluindo poluentes ambientais) e protegendo contra espécies reativas produzidos durante o estresse oxidativo. Nas reações mediadas por GST, a GSH é conjugada com uma variedade de eletrófilos ou produtos finais de oxidação e adutos de GSH são ativamente eliminados pela célula (Hayes *et al.*, 2005). Este efluxo do conjugado de GSH pode resultar na depleção dos níveis de tiol celular.

O organismo humano sofre ação constante de ERO's e ERN's geradas em processos inflamatórios, por alguma disfunção biológica ou provenientes dos alimentos. As principais ERO's distribuem-se em dois grupos, os radiculares: hidroxila ($\text{HO}\bullet$), superóxido ($\text{O}_2\bullet$), peroxila ($\text{ROO}\bullet$) e alcóxila ($\text{RO}\bullet$); e os não-radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Enquanto alguns deles podem ser altamente reativos no organismo atacando lipídios, proteínas e DNA, outros são reativos apenas com os lipídios. Existem ainda alguns que são pouco reativos, mas apesar disso podem gerar espécies com potencial de dano (Barreiros, David e David, 2006).

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação de espécies reativas, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. Consequentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos (como o malondialdeído), culminando com a morte celular. A lipoperoxidação também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, de câncer e à exacerbação da toxicidade de xenobióticos. A lipoperoxidação é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação (Ferreira e Matsubara, 1997), como demonstrado na Figura 8.

Figura 8: Processo de peroxidação lipídica, onde L = lipídeo
(Ferreira e Matsubara, 1997)



A fase de iniciação representa o início da peroxidação, em que o lipídeo sofre ataque de uma espécie que é suficientemente reativa para retirar um átomo de hidrogênio a partir de um grupo metileno (-CH₂), formando um radical de carbono. Este radical é estabilizado por um rearranjo molecular para formar um dieno conjugado, ou seja, duas duplas ligações intercaladas por uma ligação simples. Em meio aeróbio, o radical alquila inicialmente formado se combina com o oxigênio formando o radical peroxila, o qual pode retirar um hidrogênio alílico de um outro ácido graxo, gerando outro radical de carbono e promovendo a etapa de propagação. A reação do radical peroxila com o átomo de hidrogênio retirado gera um hidroperóxido lipídico (LOOH). Peróxidos cíclicos também podem ser formados, quando o radical peroxila reage com uma dupla ligação na mesma cadeia de ácido graxo, o que também pode propagar a lipoperoxidação (Lima e Abdalla, 2001).

A peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados presentes nas membranas celulares resulta na formação de eletrófilos, como aldeídos e, hidroxialdeídos/cetoaldeídos- α,β -insaturados e/ou seus respectivos epóxidos. Alguns destes são altamente genotóxicos, e sua formação excessiva pode ser controlada pela ação de GST's (Huber, Almeida e Fátima, 2008).

O cérebro é especialmente suscetível a danos oxidativos. O cérebro tem um sistema de defesa antioxidante relativamente fraco, apesar da alta taxa de produção de ERO's, devido à alta taxa de metabolismo oxidativo, e a abundância de ácidos graxos polinsaturados em células de membrana. Entre os diferentes antioxidantes, a GSH é de grande importância, atuando nos peróxidos, e regulando o estado redox das células. ERO's são os principais participantes em danos provocados por processos neurodegenerativos, assim como, disfunções em enzimas antioxidantes têm sido associados à esclerose lateral amiotrófica, doença de Alzheimer, doença de Huntington e doença de Parkinson. Entre as células neurais, astrócitos são mais resistentes ao estresse oxidativo. Eles fornecem proteção para os neurônios, e têm sido demonstrado que seu maior teor de GSH é um dos principais motivos para essa capacidade (Matés, 2000).

Durante o processo de eliminação de ERO's, GSH é oxidada e forma dissulfetos de glutathiona-proteína, portanto, a capacidade celular de reduzir ou sintetizar GSH é a chave para a eficácia da célula no gerenciamento do estresse oxidativo (Matés, 2000).

A GSH é um tripeptídeo, formado pelos aminoácidos glicina, ácido glutâmico e cisteína, e constitui o tiol redutor mais abundante no meio intracelular. A manutenção dos níveis adequados de GSH é feita pela GR, a qual utiliza equivalentes redutores de NADPH para manter a GSH na forma reduzida, como substrato para a GPx. Assim a atuação eficiente de GPx exige um sistema enzimático sequencial que envolve a GR as enzimas que mantêm níveis de NADPH, nos compartimentos citossólico e mitocondrial (Sies, 1985, Remacle *et al.*, 1992. Ribeiro *et al.*, 2005)

A GSH possui papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativo. É encontrada intracelularmente em altas concentrações, essencialmente em todos os organismos aeróbicos. A GSH é o mais abundante tiol celular de baixa massa molecular e sua concentração é aproximadamente 2 mM e mais de 10 mM em eritrócitos humanos e hepatócitos, respectivamente (Joseph, Mannervik e Ortiz, 1997).

Muitas das reações da GSH envolvem o grupo sulfidril (SH), altamente polarizável, tornando-o um bom nucleófilo para reações com compostos químicos eletrofílicos. Esta habilidade de doar elétrons a outros compostos também faz da glutathiona um bom redutor. A combinação de sua abundância nos organismos aeróbicos e das propriedades químicas do grupo sulfidril suporta a proposta de que a GSH surgiu na evolução bioquímica como uma proteção contra ERO's e compostos eletrofílicos gerados por processos oxidativos, tanto no organismo quanto no ambiente em que este vive (Huber, Almeida e Fátima, 2008).

Alguns fatores adicionais que interferem no balanço redox (espécies oxidantes x antioxidantes) de uma população devem ser considerados, tais como, influências genéticas (características étnicas), ambientais (poluição do ar), nutricionais (dieta alimentar) e de hábitos de vida (prática de exercício físico intenso, alcoolismo ou tabagismo) (Vasconcelos *et al.*, 2007). Estes fatores não devem ser desconsiderados em uma avaliação de saúde que estude o Estresse Oxidativo.

2.2.1) Mercúrio e Estresse Oxidativo

A neurotoxicidade induzida por MeHg está relacionada a alterações no estado redox de grupamentos nucleofílicos (principalmente tióis e selenóis), a partir de fontes proteicas. Estas

alterações são provavelmente responsáveis pelo estresse oxidativo que ocorre no SNC de animais expostos ao MeHg. De um ponto de vista mecanístico, o estado redox alterado pode representar uma consequência da interação direta dos grupamentos nucleofílicos com o MeHg, bem como efeitos pró-oxidantes resultantes das espécies geradas durante a exposição ao MeHg (Farina *et al.*, 2013).

A toxicidade do Hg e a sua capacidade para reagir com grupos sulfidril livres são bem conhecidos. Hg causa depleção de glutatona, e também uma redução nas atividades das enzimas SOD, CAT e GPx, responsáveis pela proteção das células contra o estresse oxidativo. Assim, a toxicidade do metal está relacionada a alterações induzidas por Hg na integridade de membranas, através da formação de ERO's e da perturbação de mecanismos de defesa antioxidante (Stohs e Bagchi, 1994).

Modelos experimentais sugerem que o estresse oxidativo está relacionado à toxicodinâmica do Hg. Apesar da literatura que documenta a exposição ao Hg e os primeiros sinais de toxicidade, poucos estudos analisaram possíveis eventos biológicos subjacentes. A exposição ao Hg pode causar estresse oxidativo em sistemas biológicos, com a geração de ERO's, redução de glutatona e diminuição de grupamentos sulfidril de proteínas, o que pode levar a processos patológicos. No entanto, ainda existem poucos estudos que avaliaram a associação entre a exposição ao Hg e estresse oxidativo em populações expostas pelo consumo de peixes. Normalmente, os dados de desfechos clínicos sobre exposição ao Hg são derivados principalmente de estudos realizados com trabalhadores expostos ao Hg inorgânico em ambientes ocupacionais (Clarkson, 1975; Farina *et al.*, 2003; Grotto *et al.*, 2010).

GSH é a defesa primária utilizada pelo neurônio contra radicais livres. A diminuição de GSH em ratos pode prejudicar a plasticidade sináptica, evidenciando a importância do equilíbrio redox na função cerebral. Metais, especialmente cobre e Hg, desempenham um papel fundamental na geração de ERO's e redução de GSH (Dufalt *et al.*, 2009).

O estudo sobre os mecanismos de lesão oxidativa têm, progressivamente, confirmado a ação catalítica dos metais nas reações que levam a estas lesões. O papel dos metais na formação *in vitro* das espécies reativas é confirmado pelas reações de Fenton e de Haber-Weiss, como observado nas Figuras 9 e 10, respectivamente. O ferro é o metal mais abundante no organismo e está biologicamente mais capacitado para catalisar as reações de oxidação de biomoléculas. As reações de Fenton e de Haber-Weiss formam diferentes tipos de espécies reativas (Ferreira e Matsubara, 1997).

Figura 9: Reação de Fenton (Ferreira e Matsubara, 1997)

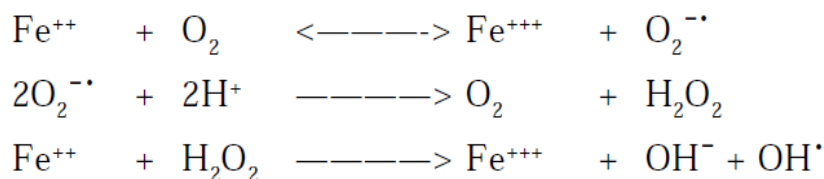
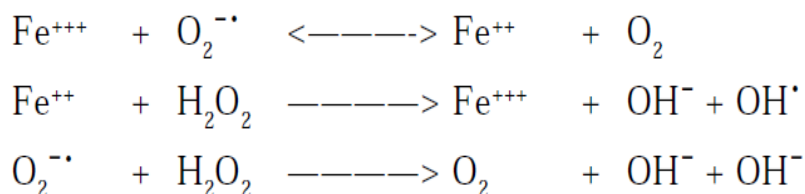


Figura 10: Reação de Haber-Weiss (Ferreira e Matsubara, 1997)



As três fontes primárias de peroxidação lipídica induzida por Hg são a reação de Fenton, a afinidade por grupos sulfidrila, e a deficiência de selênio. Hg serve como um catalisador direto em reações do tipo Fenton e como um catalisador indireto através de estimulação do ferro, o que aumenta a produção ERO's e radicais superóxido. A elevada afinidade do Hg com grupos SH, tais como a glutathiona (GSH), a N-acetil-cisteína (NAC), e ácido alfa lipóico (ALA), que compreendem muito da capacidade antioxidante do plasma, reduz a defesa antioxidante tanto da membrana quanto do plasma. Finalmente, complexos insolúveis de Hg com selênio reduzem a disponibilidade de selênio, o qual é um cofator necessário para a GPx. Juntando todos estes fatores, fica evidente que a exposição ao Hg reduz a capacidade antioxidante do plasma e intracelular (Salonen *et al.*, 1995).

A GST, pertence a uma família multifuncional de proteínas envolvidas no processo de detoxificação celular de xenobióticos como drogas, herbicidas, compostos químicos carcinogênicos e poluentes ambientais. A enzima catalisa a conjugação da GSH com compostos endógenos ou exógenos de poluentes, a fim de torná-los menos tóxicos, mais solúveis em água e mais fáceis de serem degradados e excretados. A GST pode atuar como peroxidases, isomerases ou ainda tiol transferase (Huber, Almeida e Fátima, 2008; Cogo *et al.*, 2009). Isso justifica sua importância como enzima envolvida no metabolismo do Hg.

O Hg induz a disfunção mitocondrial e estresse oxidativo. A disfunção primária resulta em despolarização e auto oxidação da membrana mitocondrial interna com consequente peroxidação lipídica e disfunção mitocondrial grave. Consequências fisiológicas incluem aumento nos níveis de peróxido de hidrogênio, depleção de GSH mitocondrial em mais de 50%,

aumento da peroxidação lipídica (níveis de biomarcadores, tais como MDA, podem aumentar mais que 70%), oxidação de nucleotídeos de piridina, e alterações na homeostase do cálcio. Esta disfunção mitocondrial grave aumenta o estresse oxidativo e reduz as defesas antioxidantes, o que tem enormes implicações sobre a saúde (Lund, Miller e Woods, 1993; Shenker, Guo e Shapiro, 1998; Houston, 2011).

Os mecanismos que precedem a toxicidade dos metais tem sido atribuídos ao estresse oxidativo. Hg^{2+} induz o estresse oxidativo e produção de ERO's através da ligação a tióis intracelulares (glutathiona e proteínas), e agindo como catalisador nas reações de Fenton e Haber-Weiss (Stacchiotti *et al.*, 2009). Desta forma, O envolvimento do Hg nos processos de indução do estresse oxidativo é uma forma de avaliar precocemente o efeito da exposição ambiental ao Hg, na forma de MeHg, à saúde das populações ribeirinhas.

2.3) Avaliação da Exposição e Biomarcadores

A detecção precoce de uma exposição ambiental ou ocupacional pode diminuir significativamente a ocorrência de efeitos adversos na saúde. As informações provenientes da avaliação da exposição possibilitam a implantação de medidas de prevenção e controle apropriadas (Amorim, 2003).

O objetivo da avaliação da exposição é a mensuração da intensidade, da frequência e da duração da exposição humana a um agente presente no ambiente. Na sua forma mais complexa descreve a magnitude, a duração, a via de exposição, o tamanho, a natureza, a classe da população exposta, e as incertezas deste processo. A avaliação da exposição baseia-se nos monitoramentos biológico (MB) e ambiental (MA). Monitoramento consiste em uma avaliação sistemática, em um dado período de tempo. O MA é a determinação dos agentes (substâncias tóxicas) presentes no ambiente, para avaliar o risco à saúde (Oga, Camargo e Batistuzzo, 2008).

O MB é definido como a medição e quantificação de substâncias químicas, ou de seus metabólitos, em tecidos, fluidos, secreções, excreções, ar expirado ou em quaisquer combinações, conduzidas para avaliar exposições e riscos à saúde, comparadas a uma referência apropriada. O MB usa como ferramenta os indicadores biológicos de exposição, também chamados de biomarcadores, no processo de avaliação da exposição. Os indicadores biológicos de dose interna têm como objetivo a quantificação da exposição/absorção de agentes tóxicos. Estes indicadores podem refletir a dose da substância no sítio de ação, a dose armazenada em um ou em vários compartimentos ou aquela recentemente absorvida. Já os indicadores

biológicos de efeito devem ser capazes de demonstrar e quantificar, em uma correlação definida ou previsível com os indicadores de dose interna, um efeito no órgão crítico. O uso desses indicadores de efeito combinado com os de dose interna permite explorar o intervalo existente entre a exposição e a doença, ainda em investigação, para a maioria dos agentes tóxicos (Pivetta *et al.*, 2001).

Vários são os parâmetros biológicos que podem estar alterados como consequência da interação entre um agente químico e o organismo, entretanto, a determinação quantitativa destes parâmetros usados como biomarcadores (indicadores biológicos de exposição) só é possível se existir correlação com a intensidade da exposição e/ou o efeito biológico da substância. Desta forma, o biomarcador compreende toda substância ou seu produto de biotransformação, assim como qualquer alteração bioquímica precoce, cuja determinação nos fluidos biológicos, tecidos ou ar exalado, avalie a intensidade da exposição e o risco à saúde (WHO, 1996).

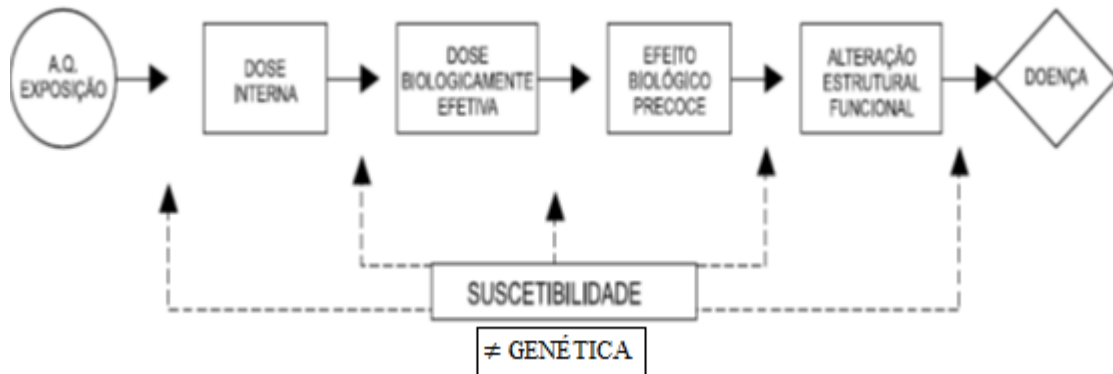
Quando a avaliação biológica é baseada na determinação da substância química ou do seu metabólito no organismo, torna-se essencial o conhecimento da toxicocinética, ou seja, de como a substância é absorvida, distribuída, biotransformada e eliminada, além de ser necessário saber também se a substância se acumula ou não no organismo. Se a avaliação baseia-se na medida de uma alteração no metabolismo causada pela substância tóxica, é necessário conhecer a toxicodinâmica, portanto, é preciso conhecer o mecanismo de ação da substância química, para identificar quais são os efeitos decorrentes daquela ação (Bernard e Lauwerys, 1986; Rudiger, 1999).

Ainda assim, indivíduos podem ter exposições similares, porém há diferenças genéticas no metabolismo, conhecidas como susceptibilidades, que podem produzir doses diferentes no sítio crítico e, conseqüentemente, diferentes níveis de resposta (Amorim, 2003).

A Figura 11 é um esquema representando os tipos de biomarcadores, indicando uma resposta progressiva do organismo à uma exposição à um agente químico (AQ). Esta progressão representa as fases do metabolismo de um agente químico, ou seja, a dose interna é gerada após a fase toxicocinética, enquanto que a dose biologicamente efetiva é obtida após a fase toxicodinâmica. Esta dose gera um efeito biológico precoce, que pode ser uma alteração, ainda reversível, em algum parâmetro bioquímico do organismo. A continuidade do efeito pode acarretar uma alteração de alguma estrutura funcional, e se a exposição não for cessada, esta alteração pode evoluir para uma doença.

Uma alteração metabólica detectada em fases iniciais do processo de adoecimento permite uma intervenção antes do surgimento de sinais e sintomas relativos a um quadro patológico. Interferindo na evolução dos efeitos, podemos evitar o surgimento da doença.

Figura 11: Diagrama esquemático representando os tipos de biomarcadores e o processo metabólico que ocorre entre a exposição e o surgimento da doença (Adaptado de Amorim, 2003)



Os biomarcadores têm características passíveis de avaliação e mensuração, indicando processos biológicos normais ou patogênicos, exposições ocupacionais e ambientais, ou resposta farmacológica a intervenção terapêutica. Um biomarcador ideal deveria reunir as seguintes características: mostrar alta especificidade para o efeito de interesse; refletir o efeito desde o início; ser passível de determinação; ser analisado por técnica não invasiva; ter alta sensibilidade no fluido biológico escolhido. Deve existir uma relação bem estabelecida entre a concentração do biomarcador e a exposição ao agente, o dano induzido e a susceptibilidade pesquisada. Em se tratando dos biomarcadores de estresse oxidativo, estes podem ser mensuráveis em vários fluídos biológicos que incluem sangue, urina, saliva e ar exalado condensado. O sangue total constitui-se em uma boa fonte de marcadores *in vivo* de estresse oxidativo e o balanço redox pode ser avaliado no soro, plasma ou eritrócitos (Vasconcelos *et al.*, 2007).

O estresse oxidativo crônico e acumulativo induz efeitos deletérios em uma variedade de componentes macromoleculares (biomoléculas), tais como DNA, lipídeos e proteínas que, por sua vez, têm permitido o monitoramento destes efeitos pelo desenvolvimento de biomarcadores específicos (Ziech *et al.*, 2010).

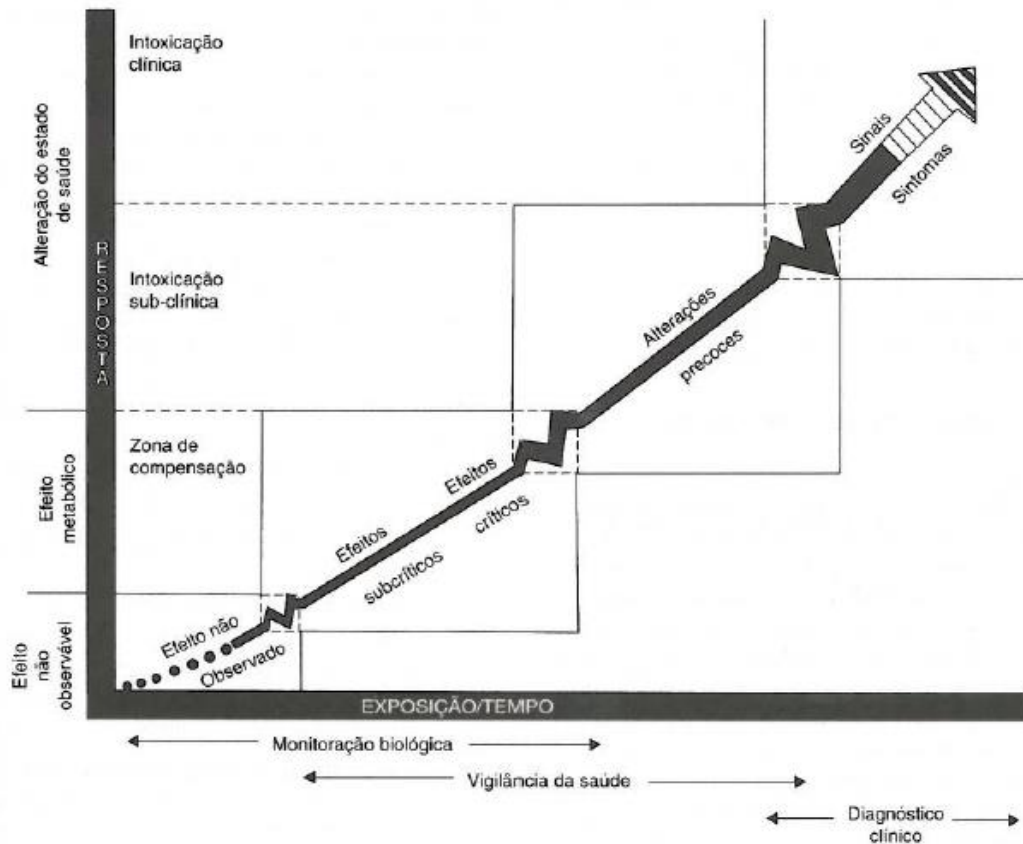
Quadro 1: Biomarcadores de oxidação em DNA, lipídeos e proteínas
(Ziech *et al.*, 2010)

OXIDAÇÃO DO DNA
8-oxo-2' deoxiguanosina (8-oxo-dG) 8-oxo-2' deoxiadenosina (8-oxo-dA) 4,6-diamino-5-formamidopirimidina (FapyAde) 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (FapyGua) Adutos de PAH-DNA <i>Clusters oxidativos de DNA</i>
PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA
Malondialdeído (MDA) 4-hidroxinonenal (HNE) Hidroxipropanodeoxiguanosinas (HO-PdGs) Adutos de etenoDNA exocíclicos (eteno-dA,-dC,-dG) Isoprostanos
OXIDAÇÃO DE PROTEÍNAS
Ligações cruzadas de bitirosina Grupos carbonila Cisões oxidativas Radicais de aminoácidos

Um biomarcador pode ser útil na prevenção e na detecção precoce da doença ou no diagnóstico da intoxicação, uma vez que seus níveis vão aumentando proporcionalmente à intensidade da exposição ou efeito (Oga, Camargo e Batistuzzo, 2008).

De acordo com a Figura 12, a fase de monitoramento biológico contempla efeitos não-observáveis, subcríticos e críticos, mas ainda em uma zona de compensação do metabolismo, ou seja, efeitos ainda reversíveis, se a exposição for cessada. A fase de vigilância da saúde busca desde de efeitos subcríticos e críticos a alterações precoces do metabolismo, que podem indicar uma intoxicação subclínica. Finalmente, o diagnóstico clínico procura alterações no estado de saúde, por meio de sinais (o que o médico vê) e sintomas (o que o paciente relata), em busca da intoxicação clínica. Esses efeitos aqui discutidos, são uma resposta progressiva do organismo frente a uma exposição, como discutido também na Figura 12.

Figura 12: Campos de aplicação do monitoramento biológico (Oga, Camargo e Batistuzzo, 2008)



Portanto, quanto mais sensível o biomarcador, mais cedo pode ser detectada alguma alteração metabólica. Esta sensibilidade dos biomarcadores lhes confere importante capacidade preditiva em estudos de avaliação da exposição.

Os radicais livres e outras espécies reativas desempenham um papel importante em muitas doenças humanas. Estabelecer seu papel preciso requer a capacidade de medi-los e os danos oxidativos que causam (Halliwell e Whiteman, 2004). O Quadro 2 apresenta importantes características que devem ser consideradas quando pensamos em um biomarcador de dano oxidativo ideal.

Quadro 2: Critérios importantes para um biomarcador ideal de dano oxidativo (Halliwell e Whiteman, 2004)

A. Critério Central
O biomarcador deve ser preditivo no desenvolvimento da doença
B. Critérios técnicos
(i) O biomarcador deve detectar a maior parte, ou pelo menos um percentual fixo, de dano oxidativo <i>in vivo</i>
(ii) O coeficiente de variação entre os diferentes ensaios com a mesma amostra deve ser pequeno em comparação com a diferença entre as amostras
(iii) Os níveis não devem variar muito nos mesmos indivíduos, nas mesmas condições, em momentos diferentes
(iv) Deve possuir uma tecnologia de quantificação quimicamente robusta
(v) Não deve ser confundido com um elemento da dieta
(vi) Devem ser estáveis em armazenagem, não sendo perdido, ou formado artificialmente, em amostras armazenadas

Para avaliação do estresse oxidativo induzido pelo Hg foram propostos 3 biomarcadores de efeito: Malondialdeído (MDA), produto da peroxidação de lipídeos de membrana; atividade da GST, para avaliar a capacidade de detoxificação do organismo; e Grupamento Tiol (Tiol), relacionado à redução de espécies oxidantes, podendo ser considerado um fator de proteção.

Para avaliar a exposição ao Hg, Mercúrio no sangue (Hg-S) e Mercúrio no cabelo (Hg-C) foram utilizados como biomarcadores de dose interna. Mercúrio na urina (Hg-U) está relacionado à exposição (relativamente recente) aos compostos inorgânicos de Hg, enquanto que Mercúrio no sangue (Hg-S) pode ser utilizado para identificar a exposição ao MeHg. Mercúrio no cabelo (Hg-C) pode ser usado para estimar exposição a longo prazo (Järup, 2003). Além disso, Hg-C é considerado um bom indicador de exposição ao Hg pelo consumo de peixes (Clarkson e Magos, 2006).

A detecção direta de espécies reativas em sistemas biológicos é dificultada por suas concentrações extremamente baixas (da ordem de 10^{-11} mol/L) e por suas altas velocidades de reação, chegando ao ponto de as taxas de produção serem iguais às taxas de reação com biomoléculas. Os métodos mais utilizados para análise são os espectrofotométricos e cromatográficos, que medem a atividade enzimática (SOD, CAT, GPx, GR, GST), e/ou a concentração de tripeptídeos (GSH, GSSG) e aldeídos (MDA) (Ferreira e Matsubara, 1997).

A peroxidação lipídica pode ser avaliada pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBars). Este método analisa o malondialdeído (MDA), último produto da quebra de lipídios, causada pelo estresse oxidativo (Matés, Pérez-Gómez, e Castro, 1999).

2.4) Saúde Infantil

Ameaças ambientais emergentes para a saúde das crianças derivam de altos níveis de substâncias tóxicas naturais ou geradas pelo homem nos compartimentos ambientais (ar, água e solo) e nos alimentos, das mudanças climáticas globais e redução da camada de ozônio, da radiação eletromagnética, da contaminação por poluentes organo-persistentes e disruptores endócrinos. Doenças relacionadas com o meio ambiente são responsáveis por mais de 4,7 milhões de mortes anualmente em crianças com idade inferior a cinco anos (Garbino, 2004).

As condições ambientais são um importante fator determinante da saúde infantil, pois representam a exposição a um agente tóxico ambiental e sua interação com o organismo de uma criança. Situações desfavoráveis referentes ao acesso à água potável, ao saneamento e à habitação contribuem para a morbimortalidade infantil nos chamados países em desenvolvimento. Além disso, nas últimas décadas, tem crescido em todo o mundo a preocupação com a contaminação ambiental por agentes químicos, resultante de atividades industriais, exploração mineral e produção agrícola, e sua possível relação com o aumento observado, em anos recentes, na prevalência de malformações congênitas, asma, câncer, distúrbios neurológicos e comportamentais em crianças (Landrigan e Garg, 2002; Belamy, 2003; Mello-da-Silva e Fruchtengarten, 2005).

As crianças são altamente vulneráveis aos riscos ambientais por diversas razões: têm exposições excessivas a contaminantes ambientais em relação à sua massa corporal, as crianças bebem mais água, comem mais, e respiram maior volume de ar que os adultos. As crianças, nos primeiros 6 meses de vida, bebem sete vezes mais água por quilograma de peso corporal e as crianças de 1-5 anos comem 3-4 vezes mais comida por quilo do que o adulto médio; a entrada de ar de uma criança em repouso é, proporcionalmente, o dobro de um adulto. Como resultado, as crianças possuem exposições sensivelmente mais pesadas do que os adultos a qualquer elemento tóxico presente na água, solo, alimento ou ar. Duas características adicionais das crianças ampliam ainda mais sua vulnerabilidade: seu comportamento “mão-a-boca”, e o fato de que elas vivem e brincam junto ao chão (Guimarães e Asmus, 2010)

As crianças crescem e se desenvolvem rapidamente, e esses processos são facilmente alterados. Seus sistemas biológicos em desenvolvimento (por exemplo, circulatório, respiratório, neurológico, etc) mudam muito rapidamente antes do nascimento, bem como durante os primeiros meses e anos de vida. Estes sistemas são muito delicados e não são capazes de reparar adequadamente danos causados por agentes tóxicos ambientais. Assim, se as células do cérebro de uma criança são destruídas por produtos químicos, como chumbo, mercúrio, ou solventes, ou se falsos sinais são enviados para os órgãos reprodutivos em desenvolvimento por interferentes endócrinos, há um alto risco de que a disfunção resultante seja permanente e irreversível (Garbino, 2004).

A exposição infantil ao MeHg é um fator de risco para o desenvolvimento cognitivo de crianças, principalmente na fase intrauterina, pois aumenta a vulnerabilidade para problemas neurocomportamentais. Níveis elevados de Hg-S e Hg-C maternos podem aumentar o risco de problemas neurológicos nos filhos (IPCS, 1990).

As crianças e as mulheres em idade fértil representam grupos de elevado risco a exposição ao Hg. Crianças apresentam um desenvolvimento incompleto dos mecanismos de detoxificação e imaturidade da barreira hematoencefálica, favorecendo a lesão do sistema nervoso central. Nas mulheres, a maior preocupação está relacionada aos efeitos potencialmente lesivos sobre o sistema reprodutivo, principalmente, na exposição ao MeHg (Xavier *et al.*, 2013).

Crianças que são expostas a baixas concentrações de MeHg no período pré-natal podem estar em risco de baixo desempenho em testes neurocomportamentais, tais como os testes que medem a atenção, função motora fina, habilidades de linguagem, habilidades visuais espaciais e de memória verbal (USEPA, 2010).

O cérebro fetal é mais suscetível do que o cérebro do adulto a danos induzidos pelo MeHg, pois este inibe a divisão e migração de células neuronais e interrompe o desenvolvimento cerebral (Clarkson, Magos e Myers, 2003).

A plasticidade neuronal pode ser prejudicada pela exposição ambiental ao Hg. Em um indivíduo saudável, quando ocorre a exposição ao Hg, a proteína intracelular metalotioneína atua auxiliando na eliminação do Hg. Se o indivíduo tem uma dieta pouco saudável, levando a desequilíbrios minerais, relacionados principalmente a zinco e cobre, é possível que não tenha metalotioneína suficiente para eliminar o Hg, ou a metalotioneína pode não funcionar adequadamente. Em qualquer caso, se o Hg não é eliminado, pode gerar um quadro de estresse oxidativo. O consumo de peixes contaminados com MeHg pode alterar o sistema glutatona,

gerando também um quadro de estresse oxidativo. A interrupção no sistema glutaciona também pode levar a redução da plasticidade neuronal e prejuízos na aprendizagem (Dufalt *et al.*, 2009).

Estudos com crianças expostas a MeHg na fase intrauterina demonstraram impactos adversos sobre a inteligência e desempenho reduzido nas áreas de linguagem, atenção e memória. Estudos mais recentes, realizados nas Ilhas Seychelles no Oceano Índico e Ilhas Faroe no Atlântico Norte, acompanhando crianças cujas mães ingeriram peixes contaminados na gestação, apresentaram resultados controversos. Enquanto no primeiro não houve relação entre os níveis de Hg medidos nas mães e o desenvolvimento cognitivo dos filhos, nas Faroe houve associação entre os níveis de Hg medidos no cordão umbilical ao nascimento (média de 22,9 µg/L) e um fraco desempenho cognitivo aos 8 anos de vida (Grigg, 2004).

O sistema nervoso é mais sensível aos efeitos de substâncias neurotóxicas, tal como o MeHg, durante os dois últimos trimestres da gravidez e durante a vida pós-natal precoce. Após a quase completa absorção a partir do intestino, o MeHg passa pela barreira placentária e pode ser transferido para o bebê através do leite humano (Grandjean *et al.*, 1999)

Em estudos de avaliação da exposição são utilizados os valores de referência, que representam os valores encontrados na população não-exposta ocupacional ou ambientalmente, e servem como base para verificar níveis de exposição a determinada substância.

O valor de referência é um valor derivado de estudos populacionais, independentemente de exposição, que determina a concentração do analito de interesse em fluidos (ou outros materiais biológicos) em indivíduos de uma população, a partir da análise estatística dos valores medidos. É utilizado para determinar o limite superior da exposição basal da população geral, num determinado momento. O valor de referência não representa, portanto, um critério de normalidade para uma análise toxicológica, e deve ser usado para identificar indivíduos com nível de exposição ambiental aumentado (em relação à exposição basal) à determinada substância (Kuno, Roquetti e Umbuzeiro, 2009).

Os valores de referência, às vezes, denominados por alguns autores como “valores normais” ou “*background*”, devem ser revisados sempre que houver alterações nos níveis basais da população geral, com base em estudos recentes e podem, dependendo das suas características, servir de valores para comparação com populações expostas a serem investigadas (Asmus *et al.*, 2013).

Há de se tomar cuidado ao interpretar os níveis de Hg em crianças e adolescentes, pois dadas suas diferenças metabólicas em relação aos adultos, valores para adultos não devem ser usados como referência para este grupo. Os níveis de Hg em estudos de exposição de crianças

e adolescentes devem ser comparados com estudos que utilizam amostras de grupos populacionais infantis ou adolescentes (Xavier *et al.*, 2013).

As crianças têm rápido crescimento e desenvolvimento, e seus processos metabólicos são facilmente alterados. Assim, existe um elevado risco de que prejuízos à saúde sejam irreversíveis. O fato de as crianças em geral terem mais anos de vida futura do que os adultos faz com que elas tenham mais tempo para desenvolvimento de doenças crônicas desencadeadas pela exposição precoce. Muitas doenças que são causadas por substâncias tóxicas no ambiente levam décadas para se desenvolver. Supõe-se que algumas delas, incluindo câncer e doenças neurodegenerativas, podem surgir em uma série de etapas que requerem anos ou mesmo décadas até o início da manifestação real da doença. Desta forma, exposições tóxicas e cancerígenas ocorridas no início da vida, incluindo a exposição pré-natal, possuem maior potencial para causar doenças do que exposições similares ocorridas anos mais tarde (Guimarães e Asmus, 2010).

3. JUSTIFICATIVA

A região do estudo é uma área ambientalmente vulnerável, devido ao histórico da atividade garimpeira, além de grandes empreendimentos em construção. A região tem grande produção pesqueira, que pode ser contaminada pelo Hg. Peixes são a principal fonte proteica para a população ribeirinha, sendo a contaminação destes peixes um grande risco para saúde humana.

A população ribeirinha é formada por diversas comunidades que se destacam por apresentar fatores culturais, sociais e econômicos característicos, como o consumo alimentar a base do pescado do rio Madeira, o que os torna mais vulneráveis aos riscos à saúde associados ao consumo de peixes contaminados com MeHg.

Crianças ribeirinhas têm uma característica social que é o histórico com a comunidade, ou seja, elas nascem e crescem consumindo peixes. A contaminação deste alimento com MeHg e o consumo desde os primeiros estágios da gravidez até a fase adulta, torna a população ribeirinha infantil um grupo altamente exposto aos riscos toxicológicos do MeHg, com possíveis implicações no desenvolvimento cognitivo.

Os efeitos precoces de exposições a substâncias químicas podem ser avaliados de diversas formas e uma delas é o estudo do estresse oxidativo. A quantificação dos níveis de biomarcadores de estresse oxidativo e sua correlação com os níveis de Hg em sangue e cabelo podem fornecer um quadro sobre a exposição ao Hg e seus efeitos sobre a saúde. Assim sendo, as informações que serão geradas neste estudo poderão contribuir para o entendimento da exposição e dos danos no sistema biológico. A importância desses biomarcadores está no seu potencial preditivo de dano

O estresse oxidativo, um desequilíbrio no balanço entre espécies reativas e defesa antioxidante do nosso organismo, desempenha um papel importante na toxicologia de metais, incluindo o Hg. A exposição Hg pode causar estresse oxidativo em sistemas biológicos, o que pode levar a processos patológicos (Grotto *et al.*, 2009). Deste modo, a exposição ao Hg e suas espécies pode conduzir a distúrbios no balanço redox do organismo, com consequente dano celular, e isto pode ser avaliado pelo monitoramento biológico, com o uso de biomarcadores.

As crianças são mais sensíveis à exposição aos agentes químicos presentes no ambiente e a exposição ao Hg é um fator de risco no seu desenvolvimento, portanto, é importante o desenvolvimento de pesquisas, com diferentes abordagens metodológicas, para avaliar os níveis de exposição e as alterações metabólicas associadas.

Estudos deste tipo devem agregar informações laboratoriais e sociodemográficas, com o objetivo de relacionar diferentes variáveis que permitam que indicadores *proxy* possam contribuir para uma melhor compreensão da exposição e seus efeitos à saúde.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Caracterizar a exposição humana ao mercúrio em uma população ribeirinha infantojuvenil (crianças e adolescentes de 5-17 anos) no rio Madeira (RO), e avaliar sua associação com biomarcadores de estresse oxidativo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Caracterizar os níveis de Hg em sangue (Hg-S) em população infantojuvenil (crianças e adolescentes de 5-17 anos) exposta ao Hg (ribeirinhos), através do consumo de peixes, e um grupo não exposto (centro urbano);
- ✓ Caracterizar os níveis de Hg em cabelo (Hg-C) em população infantojuvenil ribeirinha;
- ✓ Determinar os níveis de Glutathione S-Transferase (GST), Malondialdeído (MDA) e Grupo Tiol (Tiol) em uma população infantojuvenil exposta ao Hg, através do consumo de peixes, e um grupo não exposto;
- ✓ Analisar a associação entre dados sociodemográficos e exposição ao Hg;
- ✓ Analisar a associação entre os níveis de Hg e os biomarcadores de estresse oxidativo.

5. METODOLOGIA

Este trabalho é parte integrante de um projeto desenvolvido pela Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca (ENSP):

Projeto INOVA ENSP 2013-2015

Avaliação de Impacto à Saúde: A construção de uma ferramenta para a gestão socioambiental de projetos de desenvolvimento na Amazônia.

O Projeto INOVA ENSP 2013-2015 tem a aprovação do CEP/ENSP nº 423.720/2013, registro CAAE 18634613.0.0000.5240, e está sob responsabilidade da pesquisadora Sandra de Souza Hacon.

O presente trabalho foi apresentado ao CEP/ENSP como emenda ao projeto INOVA ENSP 2013-2015 “Avaliação de Impacto à Saúde: A construção de uma ferramenta para a gestão socioambiental de projetos de desenvolvimento na Amazônia”. O parecer de aprovação autorizando esta emenda é o nº 809.593, de 22/8/2014.

O projeto INOVA ENSP começou em 2010 como uma forma de fazer uma análise integrada de saúde da região de Porto Velho, avaliando o impacto de problemas ambientais na saúde da população desta região. Este projeto não pretendia fazer uma análise de um quadro pontual, mas sim uma avaliação das condições de saúde em uma região que tem diversos tipos de problemas socioambientais, tais como poluição do ar devido a queimadas, formação de grandes lagos para hidrelétricas, histórico de contaminação por Hg, falta de saneamento, dentre outros. O projeto teve a oportunidade de continuidade com a nova fase dos projetos INOVA da ENSP, em 2013.

O projeto INOVA ENSP 2013-2015 é a continuidade de um trabalho iniciado em 2010 na mesma região, juntamente com novas ações pensadas após se conhecer a realidade local e verificar as necessidades de pesquisa.

5.1) Caracterização da Área do Estudo

Rondônia foi criada em 13/09/1943, como Território Federal do Guaporé, posteriormente denominado Rondônia, tendo como capital, o município de Porto Velho, condição conservada quando da elevação do Território a categoria de Estado em 1981 (IBGE, 2015).

No estado, a economia interna é calçada na indústria extrativista de minérios (cassiterita e ouro), na pesca, na agricultura e no comércio. O rio Madeira (principal braço direito do rio Amazonas), que banha Porto Velho, já foi grande produtor de ouro, abrigando anualmente 30 mil garimpeiros. Dois lagos são destaque na região, pela sua importância biológica: Lago do Cuniã, com 104 mil hectares, na reserva biológica de Cuniã, e Lago Belmont, os dois no rio Madeira. Ambas as regiões, Cuniã e Belmont têm a presença de comunidades ribeirinhas (Prefeitura de Porto Velho, 2006).

A cidade de Porto Velho é uma das 52 que fazem parte de Rondônia, estado localizado na região norte do país, fazendo parte do bioma Amazônico. A cidade possui uma área territorial aproximada de 34.100 km² e uma população de 428.500 habitantes em 2010 (estimada em 494.000 para 2014), sendo a densidade demográfica igual a 12,57 hab/km², concentrando 28,2% da população do estado, de acordo com a Tabela 1 (IBGE, 2015).

A cidade localiza-se na Amazônia Ocidental e seu centro urbano fica à margem direita do rio Madeira (um dos principais afluentes do rio Amazonas). A cachoeira de Santo Antônio (onde está sendo construída a Usina Hidrelétrica Santo Antônio) está localizada a 7 quilômetros rio acima da cidade de Porto Velho. Cerca de 91% da população de Porto Velho concentram-se na área urbana. Em 2010, o Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) dessa cidade foi de 0,736, e o Índice de Gini foi 0,45. Em 2012, o Produto Interno Bruto (PIB) *per capita* foi R\$ 22.081,33. A cidade de Porto Velho detém o terceiro maior PIB de toda região norte em 2010 (aproximadamente 7,5 bilhões de reais). A cidade, em 2009, tinha 64 estabelecimentos de saúde públicos e 148 privados. Além disso, apresenta elevada taxa de mortalidade infantil com 21,8 óbitos infantis por mil nascidos vivos SUS (Gonçalves *et al.*, 2013; IBGE, 2015; Oliveira *et al.*, 2013).

Tabela 1: Dados sociodemográficos - Rondônia x Porto Velho
(Adaptado de IBGE, 2015)

	Rondônia	Porto Velho
População estimada 2014	1.748.531	494.013
Área (km ²)	237.590,54	34.096,39
Densidade demográfica (hab/km ²)	6,58	12,57

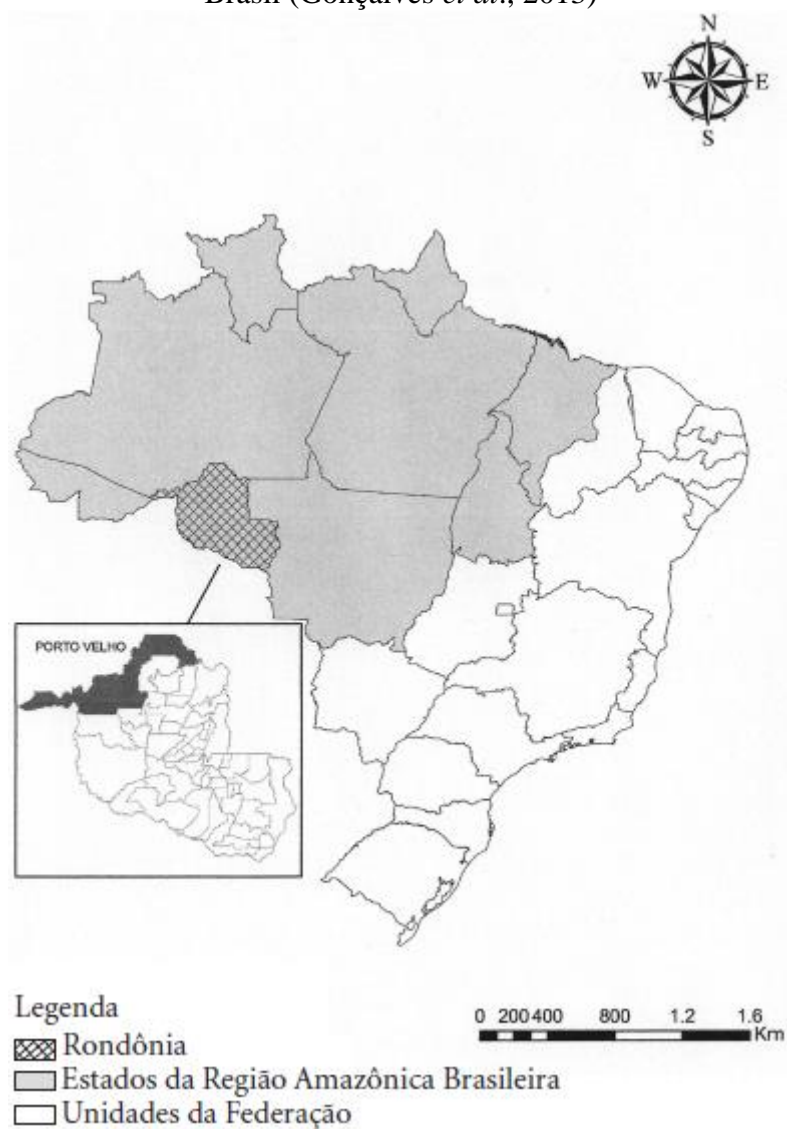
Ainda de acordo com o IBGE, 2015, a Tabela 2 apresenta o censo 2010 da população infantojuvenil da cidade, relativo a faixa etária participante deste estudo:

Tabela 2: População infantojuvenil de Porto Velho em 2010 (Adaptado de IBGE, 2015)

Faixa Etária (anos)	Homens	Mulheres	Total
5-9	18.682	17.718	36.400
10-14	21.240	20.016	41.256
15-19	20.953	20.875	41.829

A ilustração localizando a região do estudo dentro do território brasileiro pode ser observada na Figura 13.

Figura 13: Localização geográfica do município de Porto Velho, no estado de Rondônia, Brasil (Gonçalves *et al.*, 2013)



O trabalho foi desenvolvido em três comunidades com características diferentes entre si. Uma comunidade urbana, na cidade de Porto Velho, uma comunidade ribeirinha urbana próxima da cidade, e uma comunidade ribeirinha isolada, distante da cidade. As comunidades ribeirinhas de Belmont e Cuniã são as margens do rio Madeira, enquanto que o bairro Nacional fica dentro da cidade de Porto Velho, próxima ao rio, mas a população não tem como principal fonte proteica o peixe.

A comunidade urbana está localizada no bairro Nacional, e consiste de crianças e adolescentes alunos de uma escola pública e atendidas na rotina de um posto de saúde, ambos no bairro.

A comunidade ribeirinha urbana é a de Belmont, localizada nas imediações da cidade de Porto Velho, aproximadamente a 12 km de distância do centro da cidade, de acordo com a Figura 14.

A comunidade ribeirinha isolada é a localizada na Reserva Extrativista do Lago Cuniã (RESEX Cuniã), que encontra-se afastada do centro urbano, como representado na Figura 15.

Figura 14: Comunidade ribeirinha urbana de Belmont, próxima a cidade de Porto Velho (Vega, 2015)

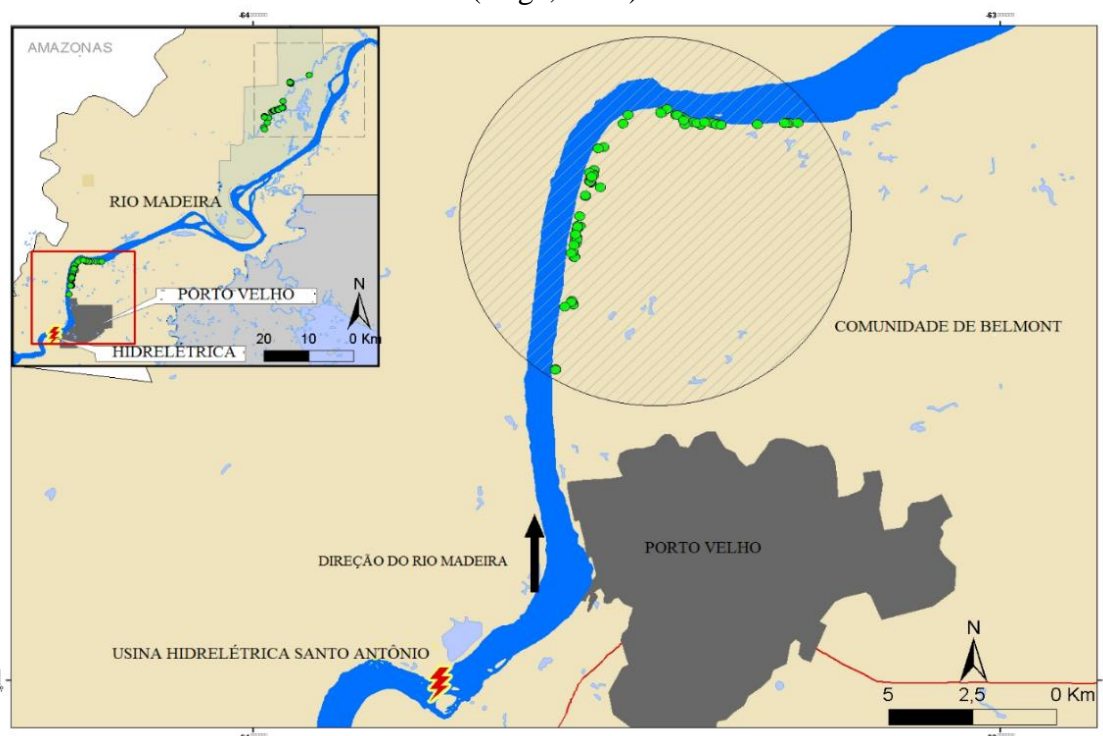
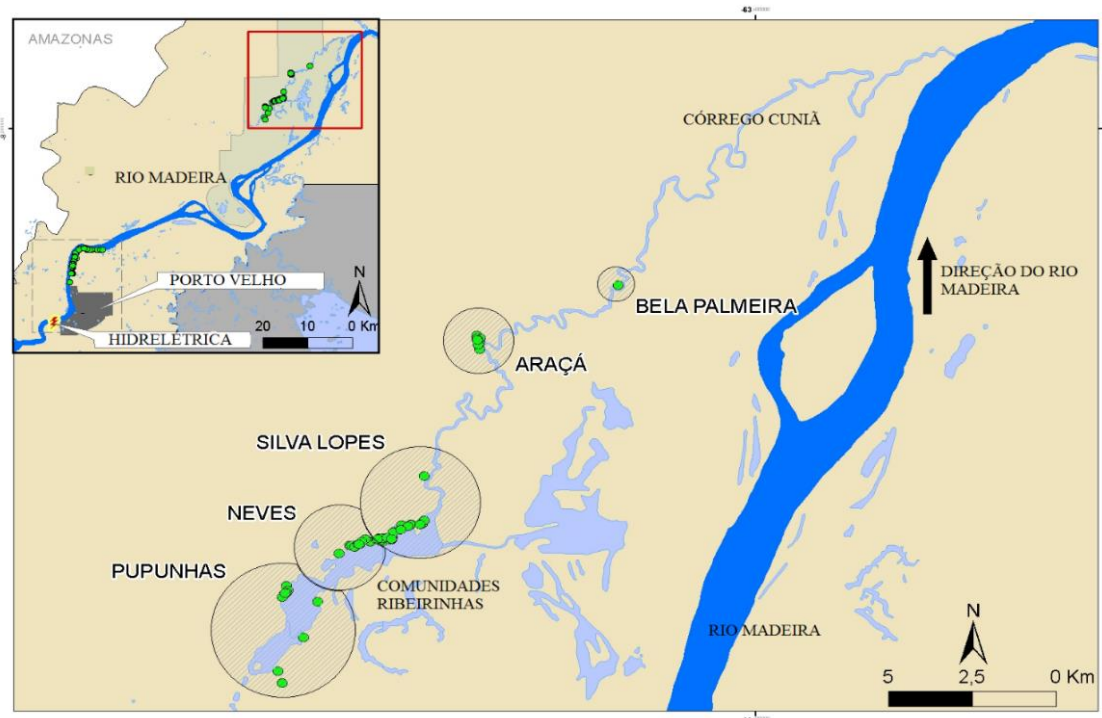


Figura 15: Comunidade ribeirinha do lago Cuniã – comunidade remota (Vega, 2015)



A RESEX Cuniã, criada pelo Decreto nº 3.238 de 10 de novembro de 1999, localiza-se no município de Porto Velho, à margem esquerda do baixo rio Madeira e tem 55.850 hectares de área. Formada por mais de sessenta lagos, ligados por um igarapé de nome Cuniã, que deságua no rio Madeira, a jusante de Porto Velho, a uma distância aproximada de 180 km da cidade. A RESEX Cuniã tem como principal fonte de recurso a pesca, que representa atualmente cerca de 90% de todas as atividades desenvolvidas na área. É considerada uma comunidade tradicional, que segundo o Decreto 6.040/2007: “*são grupos culturalmente diferenciados e que se reconhecem como tais, que possuem formas próprias de organização social, que ocupam e usam territórios e recursos naturais como condição para sua reprodução cultural, social, religiosa, ancestral e econômica, utilizando conhecimentos, inovações e práticas gerados e transmitidos pela tradição*”. As principais atividades da comunidade são a pesca, fabricação de farinha, extrativismo da castanha e do açaí. A RESEX Cuniã é dividida em quatro núcleos: Araçá; Silva Lopes e Araújo, Neves e Pupunhas. A comunidade não possui meios de transporte regulares (Vale, Teixeira e Silva, 2011; Hacon *et al.*, 2014).

Essa reserva é formada por aproximadamente 400 pessoas, entre adultos e crianças, e possui características sociodemográficas e ambientais que a torna diferenciada quando comparada a comunidade ribeirinha de Belmont. O isolamento geográfico é importante, pois gera dificuldades de acesso por barco no período de seca (Oliveira *et al.*, 2013).

5.2) Desenho do Estudo

O desenho do estudo é observacional descritivo, do tipo transversal.

Este é um estudo de avaliação da exposição ambiental, uma vez que avalia um cenário pontual de uma situação de exposição ambiental. Partimos da exposição, buscando indicadores de exposição e efeito no organismo. Cabe ressaltar que não é um monitoramento biológico, nem ambiental, pois não foi feito de forma rotineira junto à população ou ambiente através do tempo.

A abordagem metodológica da pesquisa iniciou-se com reuniões e seminários junto as comunidades ribeirinhas do rio Madeira, seguida do cadastramento de duas comunidades ribeirinhas (uma remota e outra urbana, mais próxima do centro de Porto Velho) e uma comunidade urbana.

O estudo selecionou como alvo crianças e adolescentes, entre 5 e 17 anos, de acordo com a classificação do artigo 2º do Estatuto da Criança e do Adolescente (Lei 8.069, 1990), devido ao fato de ser um grupo pouco estudado e com maior impacto sobre a saúde, quando exposto ao MeHg.

A amostragem probabilística foi feita por conglomerado nas comunidades de Belmont e Cuniã, uma vez que a lista adequada da população inteira é de difícil compilação (Pagano e Gavreau, 2004). A amostragem no bairro Nacional foi aleatória. O nível de confiança utilizado para todo o estudo foi de 95%.

A amostragem por conglomerados ocorre quando os elementos da população são reunidos em grupos e, por sua vez, alguns destes são sorteados para compor a amostra. A amostragem por conglomerados introduz uma economia na construção do sistema de referência ou cadastro, dispensando a necessidade de listar o total de elementos que compõem a população. Como serão sorteados conglomerados, estes serão identificados e listados em cada estágio (Silva, 2001).

A amostragem por conglomerados foi escolhida pois domicílios residenciais, em geral, são objeto de cadastros quase universais, como os que podem ser obtidos em companhias fornecedoras de energia elétrica, de água encanada e em prefeituras. Por um lado, a amostra de conglomerados tem como vantagem, em relação à amostra aleatória simples, um barateamento no custo por elemento amostrado, devido a um menor gasto na elaboração de cadastros e na localização de indivíduos. Mas por outro, implica em desvantagens importantes: maior complexidade e dificuldade na análise estatística. As dificuldades analíticas são atualmente

superáveis com recursos de programação e computação. Fixados a precisão e o intervalo de confiança desejados, o tamanho amostral necessário é proporcional ao efeito do desenho na amostra de conglomerados. Assim sendo, uma noção prévia desse efeito associado à amostragem de conglomerado é bastante útil no planejamento amostral, principalmente no que se refere às projeções do trabalho de campo necessário e dos custos envolvidos (Cordeiro, 2001).

Foram adotados os seguintes critérios de inclusão: crianças e adolescentes de 5 a 17 anos residentes nas comunidades ribeirinhas de Cuniã, Belmont, e no bairro Nacional (referência), localizadas na cidade de Porto Velho (RO); matriculados nas escolas da região; e residentes na região há, pelo menos, 12 meses. Os critérios de exclusão foram qualquer doença neurológica grave evidente (auto referida, garantida ou diagnosticada por um dos médicos pesquisadores) ou aqueles que se recusaram a participar de estudo, a qualquer momento (Hacon *et al.*, 2014).

5.3) Aplicação de Questionários

Inicialmente o projeto foi apresentado às Secretarias de Saúde e Educação, que aceitaram o desenvolvimento do estudo nas escolas selecionadas. Em seguida, o mesmo procedimento foi realizado junto aos professores das escolas.

As comunidades foram visitadas pela equipe do projeto em seus domicílios e o projeto foi apresentado aos pais. Os que concordaram em participar assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

O projeto INOVA fez uso de três tipos de questionário no inquérito domiciliar: infantil, adulto e domiciliar.

Para o presente trabalho foi utilizado apenas o questionário individual infantil, que contém os seguintes módulos: Identificação, Avaliação da Saúde, Tabagismo no Domicílio, Neurológico, Nutrição, Asma e Exposição. O questionário completo pode ser observado no Anexo I.

As variáveis utilizadas neste trabalho foram as presentes nos módulos Identificação e Nutrição.

As variáveis sociodemográficas do estudo são as do módulo Identificação. Dentre elas, a variável “Tempo de residência” equivale ao tempo de exposição, uma vez que representa o período onde a criança está na área de influência do rio Madeira. Já a variável “Escolaridade”

representa se a criança ou adolescente está cursando o Ensino Fundamental (1-9º ano) ou Ensino Médio (1-3º ano).

Já no módulo Nutrição, foram obtidas as variáveis que avaliaram a frequência de consumo de peixes e qual o peixe mais consumido.

5.4) Coleta e Fracionamento de Amostras de Sangue e Cabelo

Amostras de sangue e cabelo foram coletadas em Setembro de 2011 (1ª coleta). Já em Agosto 2012 (2ª coleta), apenas amostras de sangue foram coletadas. Ambos os períodos são referentes a época de seca na região (menor índice pluviométrico).

O sangue foi coletado com o auxílio de uma seringa, em torno de 10 mL e depois foi transferido para tubos à vácuo contendo anticoagulantes EDTA, heparina de sódio (especial para análise de metais em nível traço) e um tubo sem anticoagulante. Já as amostras de cabelo foram cortadas da parte posterior da cabeça, na região da nuca, próximo à raiz, e acondicionadas em envelopes plásticos transparentes.

Os tubos com as amostras de sangue foram encaminhados para o Laboratório do Hospital 9 de Julho, em Porto Velho, acondicionados em isopores com gelo artificial, para que fosse feito o fracionamento das amostras. Neste laboratório de análises clínicas, o Ceaclin (Centro de Análises Clínicas), foi realizado o hemograma e as análises bioquímicas destas amostras, contempladas no projeto INOVA-ENSP.

Os tubos contendo heparina foram usados na análise de Hg e mantidos armazenados a -20 °C até o momento da análise, estes não foram fracionados. Os tubos com EDTA e os sem anticoagulante foram fracionados em plasma/soro, respectivamente, por centrifugação (3.500 rpm x 10 min). As amostras foram separadas em alíquotas e distribuídas em microtubos do tipo *ependorf*, um para cada tipo de biomarcador, acondicionadas em isopores com gelo seco e colocadas em freezer. Isto permite que a temperatura de armazenamento chegue -80 °C, mantendo a estabilidade dos analitos por mais tempo. As amostras foram mantidas nesta condição durante os dois períodos de coleta em Porto Velho.

Ao fim deste processo elas foram transportadas para o Rio de Janeiro, acondicionadas em isopores com gelo seco, e uma vez que chegaram ao Rio, foram encaminhadas para o Laboratório de Toxicologia do CESTE (ENSP-Fiocruz), para análises de estresse oxidativo (amostras de soro) e para a PUC-Rio, para análise de Hg (amostras de sangue total com

heparina). Em ambos os locais as amostras foram armazenadas, em ultrafreezer a -80 °C no CESTEHE e congelador a -20 °C na PUC, até o momento da análise.

5.5) Análises Laboratoriais

Todos os reagentes utilizados no laboratório foram grau PA, fornecidos pela empresa Sigma-Aldrich/Vetec (Missouri, EUA), e água foi do tipo I, obtida de sistema purificador da Merck Millipore (Darmstadt, Alemanha).

O kit para análise de MDA foi fornecido pela empresa Cayman Chemical Company (Michigan, EUA).

A análise laboratorial das amostras utilizou as metodologias descritas a seguir para os biomarcadores estudados. A análise dos biomarcadores de estresse oxidativo utilizou procedimentos operacionais padrão (POP's) validados no Laboratório de Toxicologia do CESTEHE.

Hg

Hg – Cabelo (Hg-C): método de Campos, 1988

Técnica Instrumental: CV AAS

Equipamento: PerkinElmer 3300 (Massachusetts, EUA)

Pré-tratamento da amostra: Digestão ácida com aquecimento

Procedimento:

As amostras de cabelo foram digeridas (bloco digestor) com uma solução ácida H₂SO₄/HNO₃ 1:1 (v/v) e V₂O₅ 0,1% (m/v) a 80 °C até completa dissolução das amostras. Posteriormente foi adicionada uma solução de KMnO₄ 5% (m/v) até a permanência de coloração violácea. As determinações de Hg foram realizadas pela técnica de CV AAS, em um $\lambda = 253,7$ nm. A exatidão da metodologia foi avaliada mediante análise do material de referência certificado CRM 13 (Human Hair, National Institute for Environmental Studies - NIES, Japão). O cálculo da concentração de Hg nas amostras foi feito por regressão linear, com uso de uma curva do tipo $y = ax + b$, em $\mu\text{g}/\text{g}$.

Hg – Sangue (Hg-S): método de Palmer *et al.*, 2006

Técnica Instrumental: ICP-MS

Equipamento: PerkinElmer NexIon, (Massachusetts, EUA)

Pré-tratamento da amostra: Digestão ácida com aquecimento

Procedimento:

As amostras de sangue total foram digeridas com uma mistura de amostra / HNO₃ 1:2 (m/v), deixadas durante a noite a temperatura ambiente. No dia seguinte a solução ficou a 80 °C por 3 horas, em placa de aquecimento. Após resfriamento, a solução foi avolumada para 5,0 mL em balão volumétrico com água tipo I. As determinações de Hg foram realizadas pela técnica de ICP-MS sem o emprego da cela de reação, empregando o isótopo ²⁰²Hg, e, para fins de correção de interferências não espectrais, Ródio (¹⁰³Rh) foi usado como padrão interno adicionado em linha. O cálculo da concentração de Hg nas amostras foi feito por regressão linear, com uso de uma curva do tipo $y = ax + b$, em µg/L.

Estresse Oxidativo

Técnica Instrumental: Espectrofotometria no UV-Vis

Equipamentos: Espectrofotômetros Jasco V-530 (Kyoto, Japão) e Shimadzu UV-1601 (Kyoto, Japão).

GST: método de Habig, Pabst e Jacoby, 1974, adaptado por Habdous *et al.*, 2002

CDNB + GSH + Amostra → GS-DNB + H⁺ + Cl⁻

(Leitura da atividade enzimática em $\lambda = 340$ nm)

Procedimento:

O meio reacional consiste de 700 µL de tampão fosfato de potássio 0,1 mol/L e pH= 5,5 + 100 µL de CDNB 25 mM e 100 µL de GSH 50 mM. A reação é disparada com a adição de 100 µL da amostra de soro e a formação do produto é monitorada por 5 minutos. O resultado obtido é em Δ Abs/min. Os cálculos de atividade enzimática são baseados na seguinte fórmula, onde é utilizada a unidade internacional de atividade enzimática (U), que equivale a formação de 1 µmol de GS-DNB/min, monitorada em um comprimento de onda de 340 nm, por 300 seg:

$$\frac{\Delta\text{Abs}/\text{min} \times \text{Volume da cubeta (final)}}{\varepsilon} = \frac{(\Delta\text{Abs}/\text{min Am} - \Delta\text{Abs}/\text{min Br}) \times 1 \text{ mL}}{9,6}$$

$$U = \Delta\text{Abs}/\text{min} \times 0,1042 \rightarrow (\mu\text{mol}/\text{min na cubeta})$$

$$\text{Volume de amostra} = 0,1 \text{ mL}$$

$$U/\text{mL} = U \times 10$$

$$U/L = (U/\text{mL}) \times 1000$$

Tiol: método de Hu, 1994

Tampão + DTNB + Amostra \rightarrow GS-TNB

(Leitura da absorvância em $\lambda = 412 \text{ nm}$)

Procedimento:

O meio reacional consiste de 1000 μL de Tampão Tris-Cl 0,25 mol/L + EDTA 0,02 mol/L + 25 μL de DTNB 0,01 mol/L + 25 μL de amostra de soro. Uma curva de calibração foi feita com padrão de glutathiona reduzida (GSH), representando o padrão de grupamentos tiol. Os limites de detecção e quantificação do método foram 0,09 e 0,31 mol/L, respectivamente. O cálculo da concentração de grupamentos tiol presente na amostras foi feito por regressão linear, com uso de uma curva do tipo $y = ax + b$, em mol/L.

MDA: kit comercial Cayman

SDS + TBA + Amostra \rightarrow MDA-TBA

Δ

(Leitura da absorvância em $\lambda = 532 \text{ nm}$)

Procedimento:

O meio reacional consiste de 1000 μL de Reagente de Cor (TBA) + 25 μL de SDS + 25 μL de amostra de soro. O cálculo da concentração malondialdeído presente nas amostras foi feito por regressão linear, com uso de uma curva do tipo $y = ax + b$, em $\mu\text{mol}/\text{L}$. Os limites de detecção e quantificação do método foram 0,79 e 2,63 $\mu\text{mol}/\text{L}$, respectivamente.

5.6) Análise Estatística dos Dados

Foi feita a análise estatística descritiva dos dados e a distribuição destes foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, a fim de verificar se eram resultados de distribuição normal ou não-paramétricos. O nível de confiança utilizado para todo o estudo foi de 95%.

Para as variáveis de distribuição normal, médias foram comparadas utilizando os Testes T e T pareado, já para as variáveis de distribuição não-paramétricas foram aplicados o testes de Mann-Whitney e Wilcoxon para comparar médias. A correlação dos dados foi verificada usando o teste de Spearman. Finalmente, a regressão linear multivariada foi aplicada para verificar a relação entre as variáveis de exposição e os biomarcadores. O teste do Qui-Quadrado foi aplicado na comparação entre proporções.

A associação estatística entre os níveis dos biomarcadores de dose interna e efeito (Hg e estresse oxidativo, respectivamente) foi verificada, e os resultados apresentados a seguir.

O software estatístico utilizado neste estudo foi o *IBM SPSS Statistics*[®] (versão 21).

6. RESULTADOS

Este estudo avaliou a exposição ao Hg e a indução do estresse oxidativo em crianças e adolescentes, entre 5-17 anos, de três locais distintos do município de Porto Velho, no estado de Rondônia. As 3 áreas estudadas são caracterizadas como uma comunidade ribeirinha remota (Cuniã), na margem esquerda do rio Madeira, uma comunidade ribeirinha urbana, próxima da cidade de Porto Velho (Belmont), na margem direita do rio, e uma comunidade urbana (Bairro Nacional), no centro da cidade, sem acesso direto ao rio Madeira.

As comunidades de Belmont e Nacional representam áreas de influência direta da Hidrelétrica Santo Antônio, enquanto que Cuniã, devido à distância, representa uma área de influência indireta da hidrelétrica.

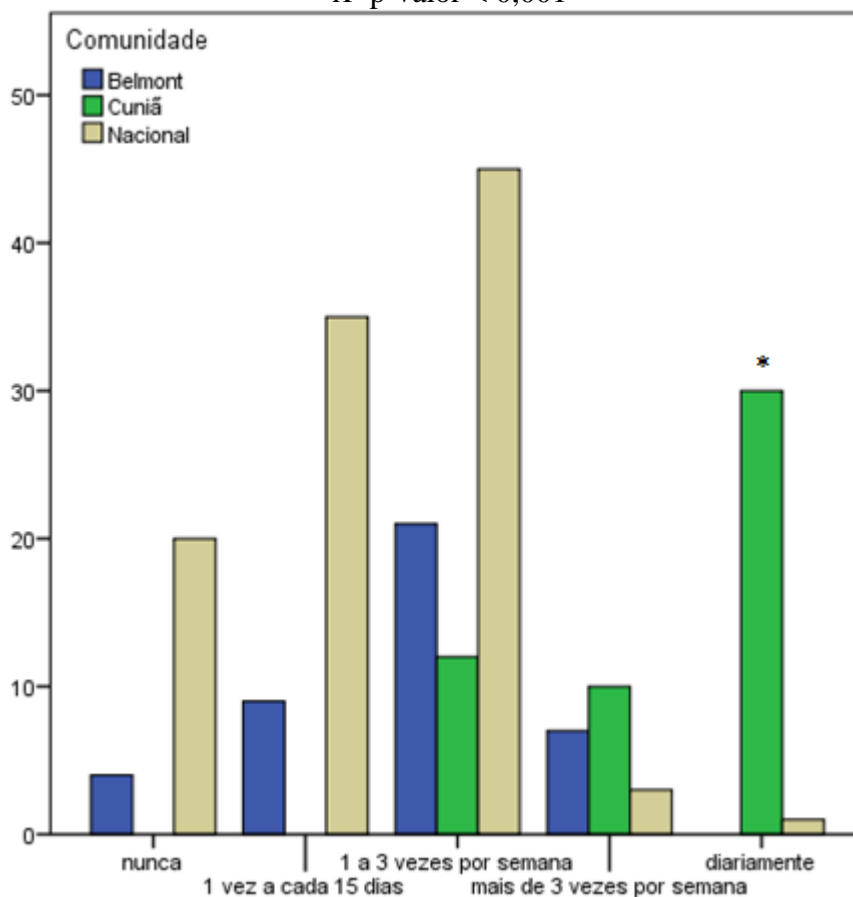
A caracterização das populações estudadas, com dados sociodemográficos, pode ser observada na Tabela 3.

Tabela 3: Informações sociodemográficas da população estudada, categorizadas por comunidades

VARIÁVEIS	Comunidades (n total = 198)					
	Belmont (n = 42)		Cuniã (n = 52)		Nacional (n = 104)	
	n	Média ± DP	n	Média ± DP	n	Média ± DP
Masculino	19		22		37	
Feminino	23		30		67	
Criança	27		35		69	
Adolescente	15		17		35	
Faixa etária (anos)	42	11 ± 3	52	11 ± 3	104	11 ± 3
Peso (kg)	42	34 ± 12,5	52	38 ± 11,9	104	40 ± 15,3
Altura (m)	42	1,43 ± 0,16	52	1,44 ± 0,13	104	1,45 ± 0,16
IMC	42	16,65 ± 1,72	52	17,56 ± 2,79	104	18,42 ± 3,74
Cor						
Branco	9		10		24	
Negro	8		7		7	
Pardo	22		29		69	
Outra (moreno)	0		5		0	
Tempo de residência (anos)	42	8 ± 4	52	8 ± 3	104	9 ± 4
Escolaridade						
Ensino Fundamental	40		43		104	
Ensino Médio	1		0		0	
Frequência de consumo de peixes						
nunca	4		0		20	
1x / 15 dias	9		0		35	
1-3x / semana	21		12		45	
> 3x / semana	7		10		3	
diariamente	0		30		1	
Tempo de amamentação (meses)	42	6 ± 2	52	5 ± 2	104	6 ± 2

Este estudo avaliou a exposição ambiental ao Hg, pela ingestão de peixes do rio Madeira, nas comunidades direta e indiretamente expostas, e a indução de efeitos do estresse oxidativo. Devido a isso, primeiramente foi verificado se o comportamento de consumo de peixes entre as 3 comunidades era diferente. O teste do Qui-Quadrado (X^2) confirmou (p -valor $< 0,001$) que o consumo de peixes é diferente entre as comunidades, sendo maior na comunidade de Cuniã. Entre as comunidades de Belmont e Nacional o teste do X^2 também apresentou diferença entre o perfil de consumo de peixes (p -valor $< 0,05$). O Gráfico 1 representa a frequência de consumo de peixes nas comunidades estudadas.

Gráfico 1: Frequência de consumo de peixes entre as 3 comunidades estudadas
* X^2 p-valor $< 0,001$



O presente estudo verificou que os peixes mais consumidos nas 3 comunidades estudadas foram os seguintes, em ordem decrescente, de acordo informação fornecida pelo questionário aplicado nos participantes: tambaqui (*Colossoma sp*), pacu (*Mylossoma sp*), e tucunaré (*Cichla sp*). Uma análise categorizada por comunidade, mostra que nas comunidades de Belmont e

Nacional, tabaqui e pacu são os mais consumidos, enquanto que Cuniã, onde a frequência de consumo é superior as demais comunidades, o peixe mais consumido é o tucunaré.

Este estudo avaliou os seguintes biomarcadores nas comunidades: Em 2011, somente os biomarcadores Hg-S, Hg-C e GST foram avaliados nas 2 comunidades ribeirinhas, Belmont e Cuniã. Já em 2012, os biomarcadores Hg-S, Hg-C, MDA, Tiol e GST foram avaliados em todas as 3 comunidades (Belmont, Cuniã e Nacional) que participaram do estudo. Os períodos de coleta de 2011 e 2012 representam a estação seca na região e o mesmo grupo de indivíduos.

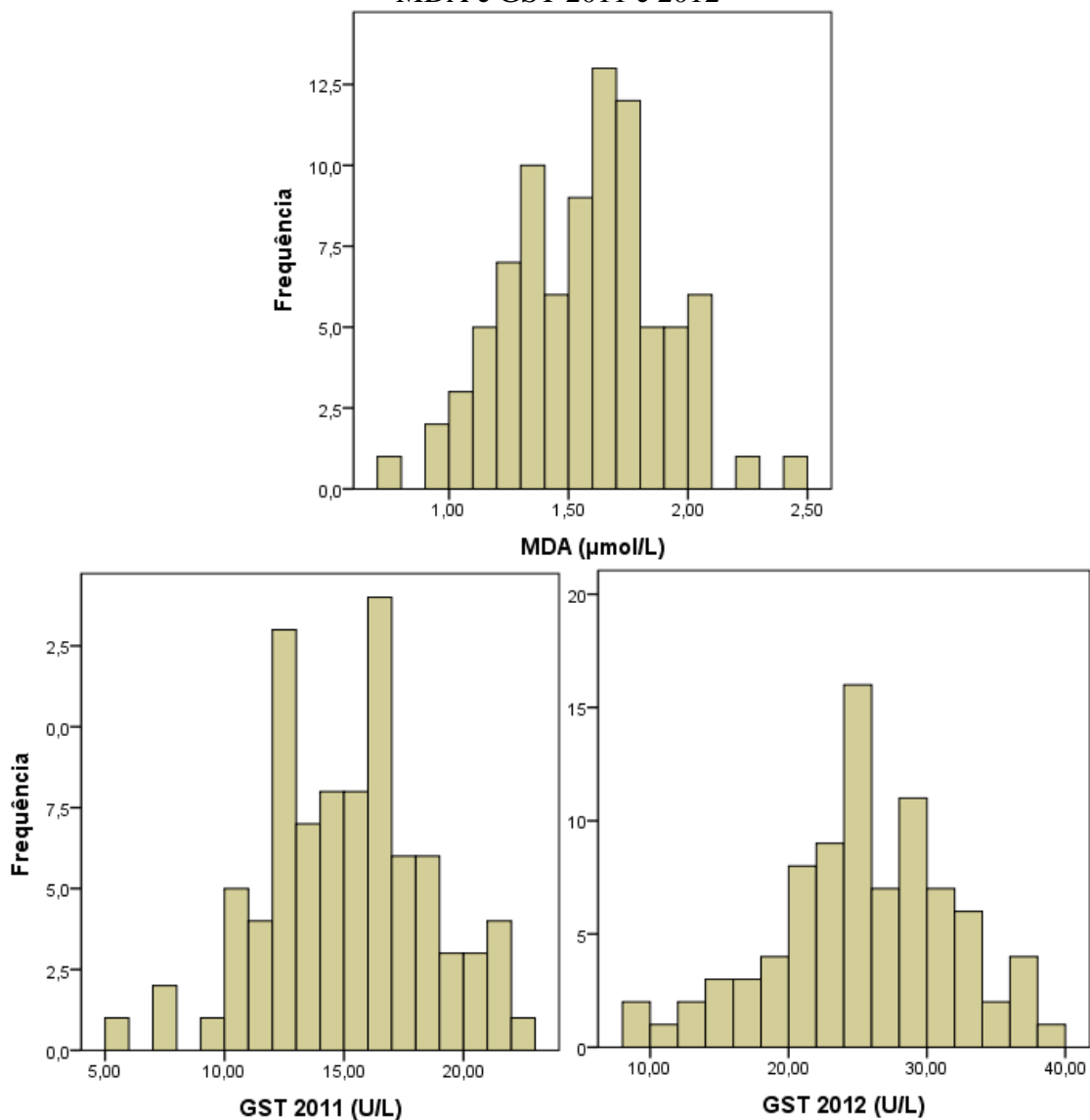
Os resultados dos biomarcadores de dose interna e efeito relativos a exposição ao Hg, avaliados nas 3 comunidades participantes do estudo, podem ser observados na Tabela 4:

Tabela 4: Resultados dos biomarcadores na população estudada, categorizados por comunidades

Biomarcadores	Comunidades (n total = 198)		
	Belmont (n = 42)	Cuniã (n = 52)	Nacional (n = 104)
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
Hg-S 2011 (µg/L)	11,60 ± 7,29	25,78 ± 15,20	---
Hg-C 2011(µg/g)	2,71 ± 2,00	7,18 ± 4,80	---
GST 2011 (U/L)	15,90 ± 3,23	14,56 ± 3,35	---
Hg-S 2012 (µg/L)	7,84 ± 11,01	20,57 ± 18,06	5,22 ± 6,05
Tiol 2012 (mmol/L)	0,53 ± 0,22	0,46 ± 0,05	0,48 ± 0,05
MDA 2012(µmol/L)	1,34 ± 0,28	1,69 ± 0,27	1,37 ± 0,32
GST 2012 (U/L)	22,37 ± 7,77	27,26 ± 4,94	15,18 ± 4,42

Os resultados dos biomarcadores avaliados em toda a população do estudo apresentaram uma distribuição normal para os biomarcadores MDA e GST 2011 e 2012 (teste de Kolmogorov-Smirnov, p-valor > 0,05), como verificado nos histogramas do Gráfico 2. Os resultados de Hg-S 2011 e 2012, Hg-C e Tiol não apresentaram uma distribuição normal (teste de Kolmogorov-Smirnov, p-valor < 0,05). Como recurso para aproximar a distribuição dos dados de uma distribuição normal, as variáveis Hg-S 2011 e 2012, Hg-C e Tiol foram logaritimizadas (log e ln). Com o uso deste recurso o p-valor manteve-se abaixo de 0,05 (variáveis de distribuição não-normal) para Hg-S 2011, Hg-C e Tiol, porém para Hg-S 2012 o p-valor ficou acima de 0,05. Devido a estas distribuições, foram utilizados testes paramétricos para análise das variáveis Hg-S 2012 (Log), MDA, GST 2011 e 2012, e testes não-paramétricos para análise das variáveis Hg-S 2011, Hg-C e Tiol.

Gráfico 2: Histogramas representando a distribuição normal dos resultados dos biomarcadores MDA e GST 2011 e 2012



Os níveis de Hg em sangue e cabelo foram verificados em cada comunidade, e foram relacionados com a frequência de consumo de peixes. Os Gráficos 3 e 4 demonstraram que as concentrações de Hg-S e Hg-C, respectivamente, aumentaram conforme aumentou a frequência de consumo de peixes.

Gráfico 3: Concentrações médias de Hg-S ($\mu\text{g/L}$), em 2012, de acordo com a frequência de consumo de peixes, categorizadas por comunidades (Belmont, Cuniã e Nacional)

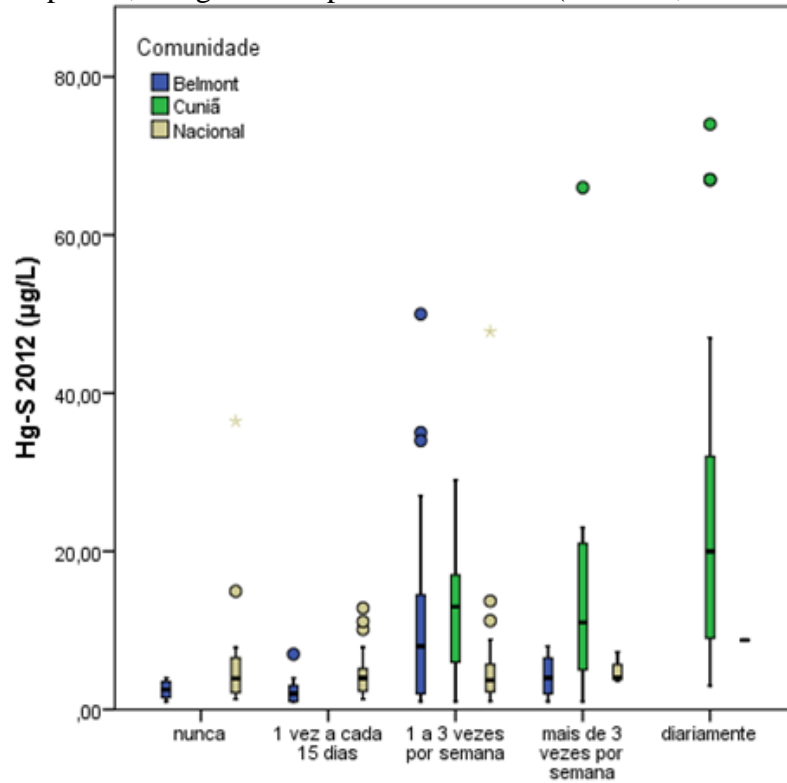
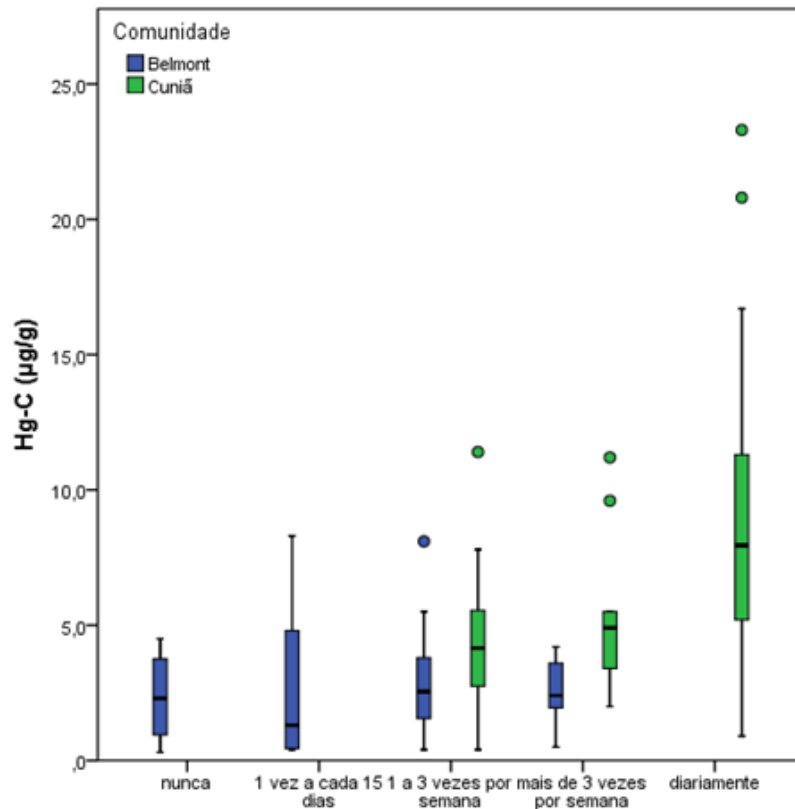
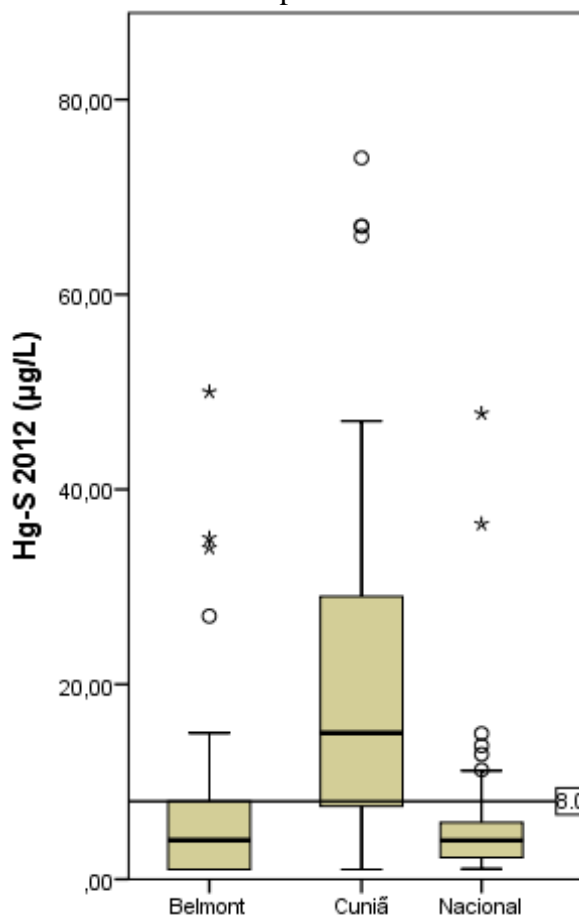


Gráfico 4: Concentrações médias de Hg-C ($\mu\text{g/g}$), em 2011, de acordo com a frequência de consumo de peixes, somente nas comunidades ribeirinhas de Belmont e Cuniã



Uma vez que a exposição ao Hg está relacionada ao consumo de peixes, e o mesmo foi diferente entre as comunidades do estudo, foram verificados os níveis de Hg-S entre elas (Gráfico 5). Adicionalmente, foi inserido no Gráfico 4 o valor de referência (VR) para Hg-S de 8 µg/L, recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para populações não-expostas (IPCS, 1990). O gráfico mostra que os maiores níveis de Hg-S foram encontrados na comunidade ribeirinha de Cuniã, que foi a que apresentou a maior frequência de consumo de peixes, e que estes estavam acima do VR recomendado. Já as comunidades de Belmont e Nacional apresentaram médias abaixo do VR da OMS.

Gráfico 5: Box-plot com resultados de concentrações médias de Hg-S (µg/L), em 2012, nas 3 comunidades estudadas e linha representando o VR de 8 µg/L da OMS



A Tabela 5 apresenta alguns dados que podem ser observados do Gráfico 4. Em Cuniã, tanto média como mediana estão acima do VR, e 71% dos seus resultados de médias para Hg-S são superiores ao VR de 8 µg/L. Além disso, a média de Hg-S de Cuniã é 2,5x mais altas que o VR.

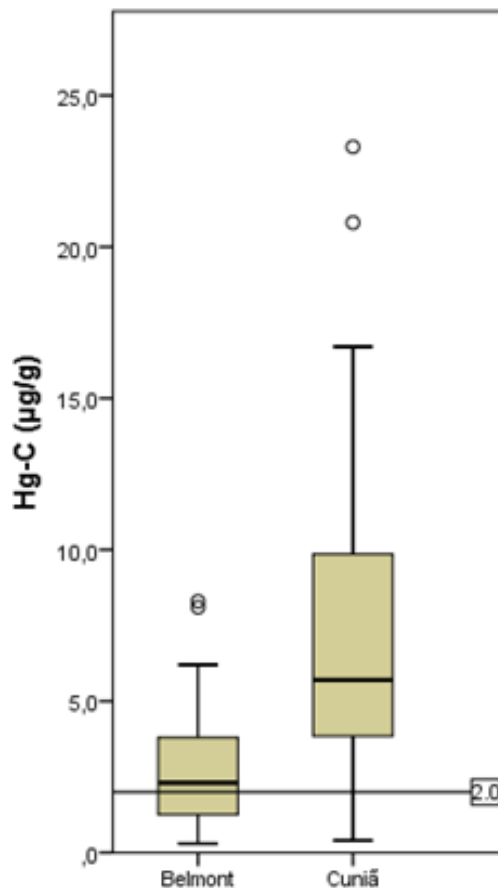
Tabela 5: Resultados de média e mediana para Hg-S, em 2012, e percentual de médias acima do VR de 8 µg/L, nas 3 comunidades do estudo

	Belmont	Cuniã	Nacional
Hg-S Média (µg/L)	7,84	20,57	5,22
Hg-S Mediana (µg/L)	4,00	15,00	3,98
Médias de Hg-S acima do VR (%)	31	71	14

VR = valor de referência da OMS

A exposição ao Hg também foi verificada pelos níveis de Hg-C. Este biomarcador só foi avaliado em 2011 nas comunidades ribeirinhas de Cuniã e Belmont (Gráfico 6). Também foi inserido no Gráfico 5 o VR para Hg-C de 2 µg/g, recomendado pela OMS para populações não-expostas (IPCS, 1990). O gráfico mostra que os maiores níveis de Hg-C foram encontrados na comunidade ribeirinha de Cuniã, com médias de Hg-C até 4x mais altas que o VR, e que a comunidade de Belmont também apresentou médias acima do VR da OMS.

Gráfico 6: Box-plot com resultados de concentrações médias de Hg-C ($\mu\text{g/g}$), em 2011, nas comunidades ribeirinhas de Belmont e Cuniã e linha representando o VR de 2 $\mu\text{g/g}$ da OMS



A Tabela 6 apresenta alguns dados que podem ser observados do Gráfico 5. As duas comunidades ribeirinhas apresentam médias e medianas acima do VR, sendo que em Cuniã, 90% dos resultados de médias para Hg-C são superiores ao VR de 2 $\mu\text{g/g}$. A média de Hg-C de Cuniã é quase 3x mais alta que o VR da OMS e que a média de Hg-C de Belmont.

Tabela 6: Resultados de média e mediana para Hg-C, em 2011, e percentual de médias acima do VR de 2 $\mu\text{g/g}$, nas comunidades ribeirinhas de Belmont e Cuniã

	Belmont	Cuniã
Hg-C Média ($\mu\text{g/g}$)	2,71	7,18
Hg-C Mediana ($\mu\text{g/g}$)	2,3	5,7
Médias de Hg-C Acima do VR (%)	57	90

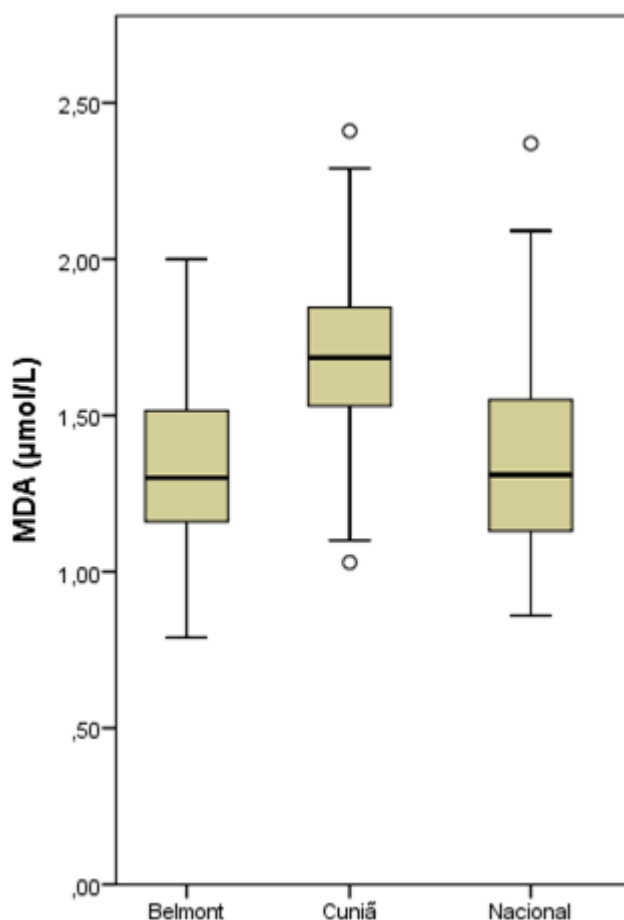
VR = valor de referência da OMS

Estes dados de frequência de consumo de peixes, Hg-S e Hg-C na população estudada demonstraram que os maiores níveis de exposição ao Hg foram encontrados em Cuniã, mas que também há diferenças na exposição entre as comunidades de Belmont e Nacional, portanto, as análises estatísticas foram baseadas nesta categorização: comunidade ribeirinha remota (Cuniã), comunidade ribeirinha urbana (Belmont) e comunidade urbana (Bairro Nacional).

Uma vez que foram apresentados os resultados encontrados para os biomarcadores de dose interna do Hg, agora serão apresentados os resultados dos biomarcadores de efeito, referentes ao estresse oxidativo gerado pela exposição ao Hg.

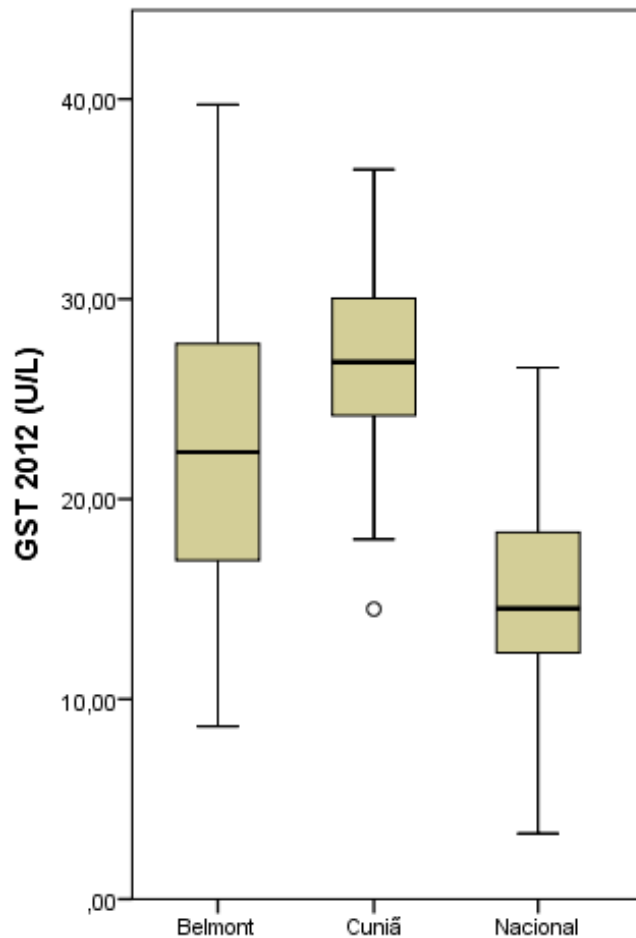
Este estudo encontrou as seguintes médias para MDA (μM), em 2012: Belmont = $1,34 \pm 0,28$, Cuniã = $1,69 \pm 0,27$ e Nacional = $1,37 \pm 0,32$. As maiores concentrações de MDA foram observadas em Cuniã. A distribuição desses resultados entre as comunidades pode ser observada no Gráfico 7.

Gráfico 7: Box-plot com resultados de concentrações médias de MDA (μM), em 2012, nas 3 comunidades estudadas



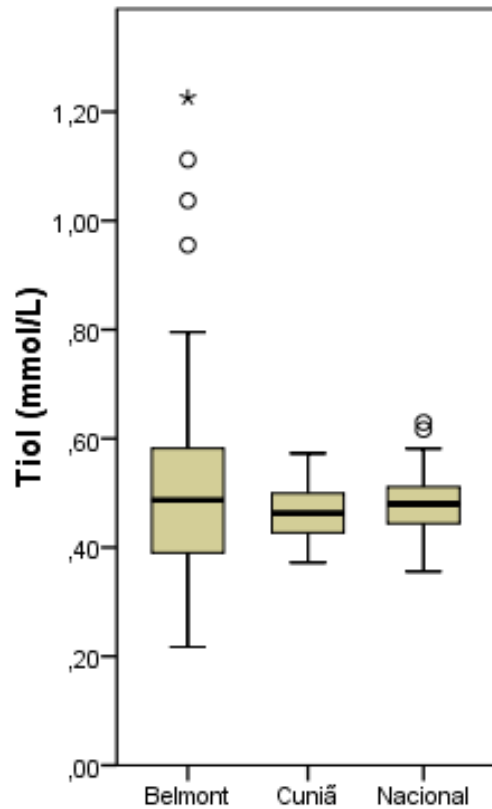
Os resultados de atividade enzimática para GST 2012 (U/L), em 2012, foram: Belmont = $22,37 \pm 7,77$, Cuniã = $27,26 \pm 4,94$, e Nacional = $15,18 \pm 4,42$. As maiores concentrações de GST foram observadas em Cuniã, assim como para MDA. O Gráfico 8 apresenta a distribuição dos resultados para GST nas populações estudadas:

Gráfico 8: Box-plot com resultados de concentrações médias de GST 2012 (U/L), em 2012, nas 3 comunidades estudadas



Os resultados de concentrações médias de Tiol (mM), em 2012, foram: Belmont = $0,53 \pm 0,22$, Cuniã = $0,46 \pm 0,05$, e Nacional = $0,48 \pm 0,05$. As 3 populações estudadas apresentaram concentrações médias e medianas muito próximas, como observado no Gráfico 9.

Gráfico 9: Box-plot com resultados de concentrações médias de Tiol (mM), em 2012, nas 3 comunidades estudadas



Nos Gráficos 5, 6, 7, 8 e 9 podem ser observados valores *outliers*, que são representados por pequenos círculos ou asterísticos. Estes valores *outliers* podem ser comumente encontrados na população devido a variabilidade biológica, porém não somente devido a este fator.

Com o objetivo de comparar as distribuições de médias dos biomarcadores entre as 3 comunidades estudadas, a Tabela 7 foi construída:

Tabela 7: Comparação das distribuições de médias dos biomarcadores estudados entre as comunidades

		p-valor		
		Belmont x Cuniã	Nacional x Cuniã	Belmont x Nacional
Hg-S 2011	Não-paramétricos (Mann-Whitey)	0,001	---	---
Hg-C		0,001	---	---
Tiol		0,239	0,074	0,678
LOG Hg-S 2012		0,001	0,001	0,974
MDA	Paramétricos	0,056	0,001	0,630
GST 2011	Teste T	0,001	---	---
GST 2012		0,001	0,001	0,001

A Tabela 7 mostra que os resultados dos biomarcadores estudados em Cuniã foram diferentes ($p\text{-valor} < 0,001$) daqueles encontrados para Belmont e Nacional, com exceção do Tiol. Já o biomarcador GST apresentou médias diferentes nas 3 comunidades ($p\text{-valor} < 0,001$).

Para todos os biomarcadores estudados em 2011 e 2012 (Hg-S, Hg-C, MDA, GST e Tiol), entre as 3 comunidades, não houve diferença, nas concentrações, estatisticamente significativa ($p\text{-valor} > 0,05$) e entre sexos (masculino e feminino).

Já para crianças e adolescentes só houve diferença estatisticamente significativa ($p\text{-valor} < 0,05$) nos biomarcadores GST 2012 e Tiol, na comunidade de Cuniã.

Os testes T pareado e de Wilcoxon foram utilizados para comparar os resultados de GST 2011 x 2012 e Hg-S 2011 x 2012, respectivamente, e somente em ribeirinhos, categorizados por comunidades (Cuniã e Belmont). Estes testes foram utilizados já que eram categorias ligadas (mesma variável, na mesma população, mas em diferentes anos). Ambos os testes demonstraram que houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados de 2011 e 2012, com valores de significância ($p\text{-valor}$) apresentados na Tabela 8. Cabe lembrar que os dois biomarcadores GST e Hg-S, em 2011 e 2012, representam a mesma época do ano, que é a estação seca, e o mesmo grupo de indivíduos.

Tabela 8: Resultados de p-valor para comparação de médias de GST 2011 x 2012 e Hg-S 2011 x 2012

	Belmont	Cuniã
	p-valor <	
GST 2011 x 2012	0,000	0,001
Hg-S 2011 x 2012	0,05	0,001

Com o objetivo de avaliar a correlação entre os biomarcadores estudados foi utilizado o teste não-paramétrico de Spearman. A Tabela 9 apresenta os níveis de correlação encontrados.

Tabela 9: Correlação de Spearman entre os biomarcadores estudados

		Hg-S 2012 ($\mu\text{g/L}$)	Hg-C ($\mu\text{g/g}$)	Tiol (mmol/L)	MDA ($\mu\text{mol/L}$)	GST 2012 (U/L)
Hg-S 2012 ($\mu\text{g/L}$)	r	---				
	p-valor	---				
	N	---				
Hg-C ($\mu\text{g/g}$)	r	0,722	---			
	p-valor	0,000	---			
	N	87	---			
Tiol (mmol/L)	r	0,117	0,085	---		
	p-valor	0,109	0,435	---		
	N	187	86	---		
MDA ($\mu\text{mol/L}$)	r	0,222	0,411	-0,075	---	
	p-valor	0,002	,000	0,299	---	
	N	188	87	192	---	
GST 2012 (U/L)	r	0,397	0,249	0,032	0,305	---
	p-valor	0,000	0,021	0,664	0,000	---
	N	185	86	188	191	---

r = coeficiente de correlação e p-valor = nível de significância

Hg-S apresentou correlação forte com Hg-C, com significância estatística ($r = 0,72$ e $p\text{-valor} < 0,001$), correlação moderada com GST, com significância estatística ($r = 0,40$ e

p-valor < 0,001). Com MDA, Hg-S apresentou correlação fraca, porém significativa ($r = 0,22$ e p-valor < 0,002).

Hg-C apresentou correlação moderada com MDA, com significância estatística ($r = 0,41$ e p-valor < 0,001). Com GST, Hg-C apresentou correlação fraca, porém significativa ($r = 0,22$ e p-valor < 0,05).

MDA apresentou correlação moderada com GST, com significância estatística ($r = 0,30$ e p-valor < 0,001).

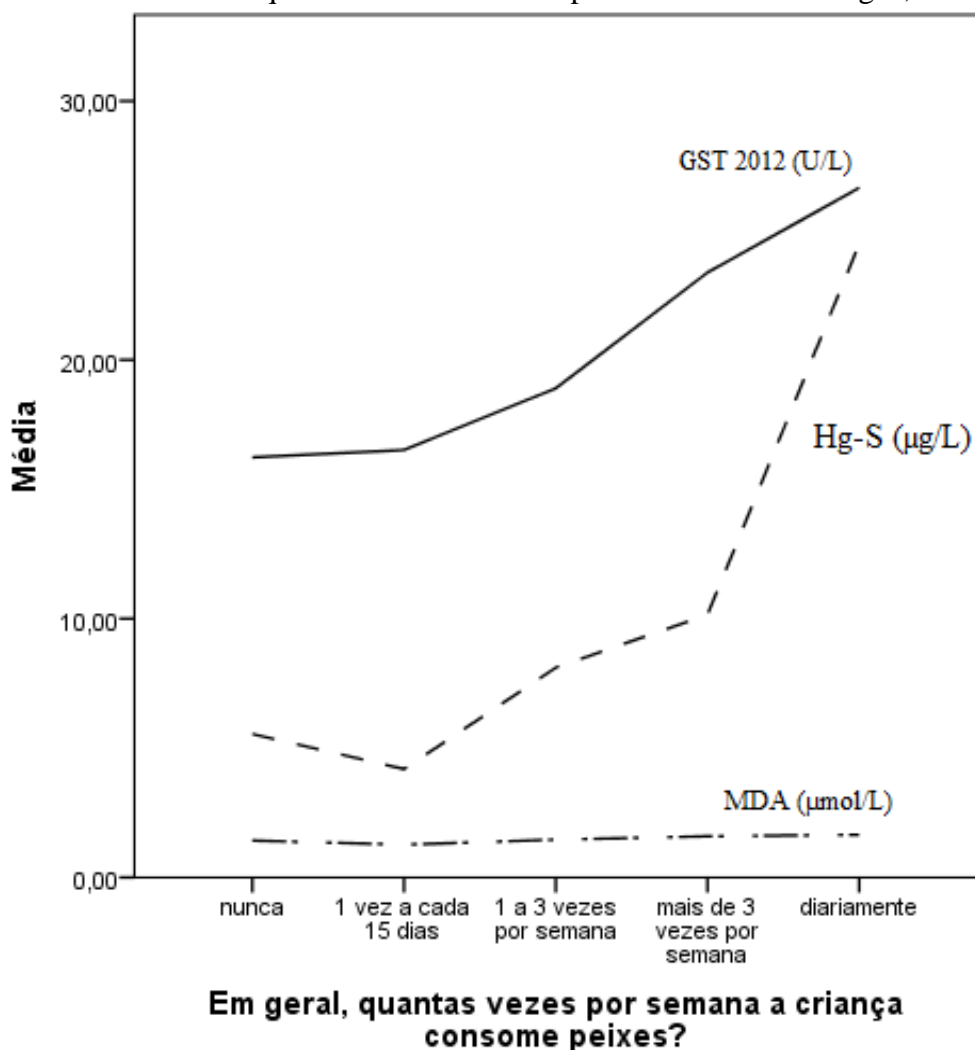
As outras associações ou foram muito baixas ($r < 0,20$), não tendo força estatística, ou não apresentaram significância, pois p-valor > 0,05.

Estas correlações apresentadas acima demonstram como os níveis elevados de exposição ao Hg, avaliados pelos biomarcadores Hg-S e Hg-C, tem correlação com o estresse oxidativo, representado pela avaliação dos biomarcadores GST e MDA.

O biomarcador Tiol não apresentou correlação com a exposição ao Hg, possivelmente não sendo um bom indicador de efeito (sub-clínico) da exposição ao Hg.

O Gráfico 10 apresenta a influência do consumo de peixes nos níveis sanguíneos de Hg, MDA e GST, confirmando as correlações encontradas, onde, um maior consumo de peixes aumenta os níveis de exposição ao Hg, o que induz efeitos do estresse oxidativo, aumentando os níveis sanguíneos dos biomarcadores GST e MDA.

Gráfico 10: Influência da frequência do consumo de peixes nos níveis de Hg-S, GST e MDA



Uma análise de regressão linear multivariada foi feita a fim de verificar quais variáveis eram mais importantes na avaliação da exposição ao Hg. Como variável dependente foi utilizado o Log de Hg-S 2012, e as seguintes variáveis independentes foram consideradas na análise: idade, sexo, frequência de consumo de peixes, comunidade, amamentação, Hg-C, Tiol, MDA, GST e tempo de exposição. Todas as categóricas foram transformadas em variáveis *dummy* previamente.

De acordo com o modelo gerado na análise de regressão linear multivariada (Tabela 10), as variáveis que mais relacionadas os níveis de Hg-S são o Hg-C e Comunidade Cuniã, obtendo-se um coeficiente de determinação ajustado de 0,46 (p-valor < 0,001), mostrando-se portanto que 46% da variação das concentrações de Hg-S, neste grupo de crianças e adolescentes, é explicado pela concentração de Hg-C e pelo fato da criança ser moradora da comunidade de Cuniã, onde foi observada uma frequência maior no consumo de peixes.

Tabela 10: Modelo de regressão linear múltipla para os níveis sanguíneos de Hg*

Variáveis Preditivas	Beta	p-valor	R ²
Hg-C	0,061	0,000	0,460
Comunidade Cuniã	0,260	0,017	

* Variável dependente normalizada logaritmicamente

Hg = mercúrio em sangue ($\mu\text{g/L}$)

Hg-C = mercúrio em cabelo ($\mu\text{g/g}$)

R² = coeficiente de determinação ajustado

Beta = coeficiente angular para a variável

p-valor = valor de significância para a variável Beta

7. DISCUSSÃO

7.1) Mercúrio

A avaliação da exposição ao Hg, em crianças e adolescentes ribeirinhos do rio Madeira, foi baseada nos biomarcadores de dose interna Hg-S e Hg-C. Os resultados encontrados para os biomarcadores analisados podem ser observados na Tabela 4. A comunidade ribeirinha isolada de Cuniã foi a que apresentou maiores concentrações de Hg, em sangue e cabelo, em sua população, em relação as outras duas comunidades de Belmont e Nacional. Esta relação é influenciada pelo consumo de peixes do rio Madeira, com possível contaminação pelo Hg em sua forma orgânica (MeHg). Este resultado corrobora com os estudos realizados por Hacon *et al.*, 2014.

O Hg pode ser mobilizado para as águas de reservatórios de barragens pela pelas condições favoráveis que se criam neste compartimento ambiental. Essa hipótese é confirmada em estudos que verificaram aumento nos níveis de Hg (rio abaixo) em peixes, solo e outros indicadores, ambientais e humanos, após a construção de barragens para complexos hidrelétricos (Schetagne, Doyon e Fournier, 2000; Hylander *et al.*, 2006; Marques *et al.*, 2010). Entre seres humanos, a principal fonte de exposição ao MeHg é o consumo de peixes e mamíferos marinhos. As concentrações de Hg no ar e na água são baixas para representar um sério risco para a população em geral, embora tenham sua parcela de contribuição (Clarkson, Magos e Myers, 2003).

O estudo de Hacon *et al.*, 2014 avaliou a exposição ao Hg via ingestão de peixes. As espécies mais consumidas pelos ribeirinhos amazônicos dependem da captura, que varia com a localização e sazonalidade. As concentrações totais de Hg em músculos de peixes variaram de 0,02 a 1,58 µg/g. Espécies no topo da cadeia alimentar classificadas por grupos (carnívoros e piscívoros) apresentaram concentrações medianas de Hg no tecido muscular mais altas (0,68 e 0,37 µg/g, respectivamente), enquanto que as espécies detritívoros e herbívoros apresentaram as menores medianas de Hg no tecido muscular (0,06 e 0,09 µg/g, respectivamente). Estes resultados evidenciam que a maior frequência no consumo de peixes, associada ao consumo de espécies carnívoras, geram maiores níveis de exposição ao Hg.

Em um trabalho recente, Marques *et al.*, 2013 discutiu sobre o consumo de peixes durante a gestação e níveis de Hg-C. O trabalho mostrou que mães ribeirinhas apresentavam maiores valores de Hg-C quando comparados a outras populações da região, inclusive com níveis de

Hg-C maiores conforme aumentava a frequência de consumo de peixes, ratificando a importância do consumo de peixes na exposição ao Hg e sua relação com dietas ricas em pescado.

Em um estudo realizado por Xavier *et al.*, 2013, foi determinada a concentração de Hg-S (sangue capilar) em 220 crianças escolares (8-10 anos), de ambos os sexos, de 2 escolas da rede municipal de ensino, na região metropolitana da cidade do Rio de Janeiro. A média encontrada de Hg-S foi de 0,89 µg/L, enquanto que a mediana 0,71 µg/L. A autora defendeu que estes resultados podem ser utilizados para comparação com pesquisas em áreas impactadas pelo metal, pois representa a média de populações não-expostas ambientalmente ao Hg, e são compatíveis com inquéritos internacionais. Seu trabalho ressalta que valores normais de Hg-S em população não exposta ao Hg são inferiores a um 1 µg/L, resultado bem inferior ao valor de referência da OMS, de 8 µg/L, recomendado para populações não expostas ambientalmente ao Hg.

No presente estudo, a concentração média de Hg-S, em 2012, foi 5,22 µg/L na população urbana (bairro Nacional), valor 5x maior que o sugerido por Xavier *et al.*, 2013, para população não exposta ao Hg.

Quando consideramos o valor médio 1 µg/L Hg-S, discutido por Xavier *et al.*, 2013 em população urbana, a princípio, sem exposição ambiental ao Hg, os valores das 3 comunidades do presente estudo estão muito elevados (Hg-S, em µg/L: Belmont = $7,84 \pm 11,11$, Cuniã = $20,57 \pm 18,06$, e Nacional = $5,22 \pm 6,05$). Isto gera uma preocupação acerca da contaminação destas populações com um elemento químico tão perigoso para o seu desenvolvimento. É evidente que a população ribeirinha isolada (Cuniã) tem níveis de Hg-S mais preocupantes que população ribeirinha urbana ou somente urbana, que teoricamente não teria exposição ao Hg, mas fica claro que populações amazônicas estão sob o maior risco da exposição ao Hg.

Com relação ao valor de referência para Hg-S de 8 µg/L, recomendado pela OMS para populações não expostas ambientalmente ao Hg, somente os ribeirinhos de Cuniã apresentaram concentrações médias de Hg-S acima do VR (71% de Hg-S acima de 8 µg/L). Ribeirinhos de Belmont e da comunidade urbana do bairro Nacional estavam com concentrações médias abaixo do VR (Hg-S = $7,84 \pm 11,01$ e $5,22 \pm 6,05$ µg/L, respectivamente), como observado no Gráfico 4. É importante ressaltar que a dispersão das médias é elevada, em todas as comunidades, fazendo com que, mesmo onde concentrações médias estavam abaixo do VR, ainda sim alguns indivíduos podem apresentar médias superiores a de 8 µg/L Hg-S. Em

Belmont e Nacional, 31 e 14% das concentrações médias de Hg-S foram superiores ao VR da OMS.

Isto evidenciou que quanto maior foi o consumo de peixes nas comunidades (Cuniã > Belmont > Nacional), maiores foram as concentrações médias de Hg-S (Cuniã > Belmont > Nacional) na população estudada.

No presente estudo, as médias de Hg-C, em 2011, foram $2,71 \pm 2,00$ e $7,18 \pm 4,80$ $\mu\text{g/g}$, nas populações ribeirinhas de Belmont e Cuniã, respectivamente. Este biomarcador só foi avaliado em 2011 nestas duas comunidades. A comunidade urbana do bairro Nacional não foi avaliada para Hg-C. Tanto Belmont, como Cuniã estavam acima do VR de 2 $\mu\text{g/g}$ para Hg-C, recomendado pela OMS para populações não expostas ambientalmente ao Hg, como pode ser observado no Gráfico 5. Porém, ficou evidente que a comunidade de Cuniã tem concentrações médias de Hg-C mais elevadas que em Belmont, fato relacionado ao seu maior consumo de peixes e, conseqüentemente, maior exposição ao Hg. Enquanto que em Cuniã 90% das concentrações médias de Hg-C foram superiores ao VR de 2 $\mu\text{g/g}$, em Belmont isso aconteceu com 57% das concentrações médias.

Em um estudo de revisão sobre exposição humana ao Hg na Amazônia, Passos e Mergler (2008) demonstraram que entre os consumidores de peixe, comunidades ribeirinhas apresentaram o mais alto grau de exposição, com estudos apresentando resultados de Hg-C tão altos quanto $38,6 \pm 14,4$ $\mu\text{g/g}$ e 65 ± 58 $\mu\text{g/g}$. E mostraram que, em geral, consumidores urbanos de peixe são menos expostos, apresentando níveis médios de Hg-C em torno de 2 $\mu\text{g/g}$. Apesar de não termos estudado as concentrações de Hg-C em urbanos, o presente estudo mostrou o mesmo que Passos e Mergler (2008), ou seja, que o maior consumo de peixes (contaminados) leva a maiores concentrações de Hg-C.

No estudo longitudinal de Dutra *et al.*, 2012, a média de Hg-C encontrada em crianças de 8 anos residentes em uma área urbana do município de Itaituba (Bacia do rio Tapajós, PA, Brasil) foi aproximadamente 1 $\mu\text{g/g}$ (entre 2004 e 2010). Este valor foi coerente com o VR para Hg-C de 2 $\mu\text{g/g}$ em populações não expostas. E quando comparado com nossos resultados, mostrou como as populações de Belmont e Cuniã apresentaram níveis elevados de Hg-C.

Neste mesmo estudo de Dutra *et al.*, 2012, as crianças apresentavam concentrações médias de Hg-S de $10,5 \pm 7,4$ $\mu\text{g/L}$, valores altos quando comparado aos recomendados pela OMS, de 8 $\mu\text{g/L}$. Os autores explicaram que estes valores podem ser relacionados a exposição ambiental ao Hg metálico, presente na região devido a exploração de ouro.

Em uma revisão bem extensa, Barbieri e Gardon (2009), discutiram sobre a presença do Hg em solos amazônicos, a frequência de consumo de peixes e a exposição ao Hg, avaliada pelos níveis de Hg-C. Os autores reforçaram a afirmativa, discutida e demonstrada também no presente estudo, de que populações ribeirinhas da Amazônia são grandes consumidores de peixe, e, por causa de seus hábitos alimentares, são expostas ao Hg, via MeHg, gerando riscos à saúde, principalmente em relação a disfunções neurológicas. Assim como no nosso estudo, os valores de Hg-C foram altos em ribeirinhos, com valores sempre bem dispersos, em diversas localidades da região (Andes, Guiana Francesa, rios Tapajós e Madeira). Especificamente na região da bacia do rio Madeira, os autores afirmaram que a maioria dos estudos encontraram valores de Hg-C entre 11 e 15 µg/g, valor muito acima do VR recomendado pela OMS. Os valores encontrados no presente estudo foram um pouco inferiores, faixa de 6-11 µg/g na comunidade mais exposta ao Hg (Cuniã), mais ainda sim, bem superior ao VR.

Barbieri e Gardon (2009) concluíram sua revisão com a mesma ideia discutida neste estudo, e que vale para qualquer estudo com comunidades tradicionais ribeirinhas: *“comunidades pequenas e isoladas, com estilos de vida tradicionais, parecem ser os mais expostos ao Hg. Esta situação é muito complexa para estas populações, dado que muitas delas dependem de peixes como quase única fonte de proteína na dieta”*.

Isto evidencia claramente que populações amazônicas, principalmente as que consomem mais peixes, tendem a apresentar maior contaminação com Hg, fato também observado por Mahaffey, Clickner e Jeffries, 2009, para populações costeiras americanas (mulheres em idade fértil).

Um detalhe importante sobre os valores que foram discutidos aqui para Hg-S e Hg-C em crianças e adolescentes é que eles foram comparados com outros estudos de populações infantojuvenis, fator que deixou estas comparações mais confiáveis (Xavier *et al.*, 2013, Dutra *et al.*, 2012). Como citado anteriormente, temos que tomar cuidado ao utilizar níveis de biomarcadores em população adulta e compará-los com populações infantojuvenis, dadas suas diferenças metabólicas em relação aos adultos. Quando faltam valores de referência adequados, a comparação entre populações distintas (expostos e não-expostos) representa uma boa resposta na avaliação da exposição.

Nos últimos 15 anos ou mais, estudos epidemiológicos têm dado maior atenção aos efeitos da exposição pré-natal. A diretriz da USEPA é derivada de relatos de alterações neuropsicológicas em crianças no estudo das Ilhas Faroé, cuja exposição foi principalmente devida ao consumo de carne de baleia. Um estudo semelhante nas Ilhas Seychelles não

encontrou efeitos adversos ao consumo unicamente de peixes. O consumo de peixe tem evidentes benefícios à saúde, e o risco representado pela exposição ao Hg é atualmente especulativo. A FDA recomenda que mulheres grávidas e crianças pequenas evitem comer peixe com alto teor de Hg (> 1 ppm) (Clarkson, Magos e Myers, 2003), o grande problema envolvido nesta recomendação gira em torno de populações tradicionalmente pesqueiras, tais como ribeirinhos, que não podem abrir mão deste alimento.

Um estudo do desenvolvimento infantil nas Ilhas Seychelles também encontrou associações benéficas com os níveis de Hg pós-natal. Quando as crianças de 5 anos e 6 meses de idade eram examinadas por uma bateria de testes neuropsicológicos, vários resultados dos testes indicaram um maior desenvolvimento associados com o aumento dos níveis de Hg-C. Os autores sugeriram que este resultado inesperado foi provavelmente devido aos benefícios da nutrição com peixes. No entanto, quando foram reexaminadas aos 9 anos de idade, vários resultados dos testes indicaram uma efeito adverso sobre o desenvolvimento da criança. Os dados disponíveis mostraram que, na infância, os benefícios nutricionais da amamentação e consumo de peixes podem superar quaisquer potenciais efeitos adversos do MeHg. Uma importante pergunta ainda sem resposta é sobre os potenciais efeitos adversos durante a adolescência. (Davidson *et al.*, 1998; Myers *et al.*, 2003; Clarkson e Magos, 2006).

7.2) Estresse Oxidativo e Mercúrio

Os biomarcadores Hg-S e Hg-C, ou indicadores biológicos de exposição de dose interna, representam a quantidade de Hg presente no organismo dos indivíduos expostos. Já o biomarcadores do estresse oxidativo representam um efeito (ou alteração bioquímica precoce) no metabolismo. Desta forma, todos eles têm um relação entre si. Indivíduos com valores mais elevados de Hg no organismo (sangue e cabelo) tendem a apresentar maiores valores de MDA, pois este representa um dano ao organismo (peroxidação lipídica), gerado pelo estresse oxidativo induzido por exposição ao Hg. Da mesma forma que o Hg pode induzir aumento nos níveis de MDA ele pode induzir também aumento na atividade enzimática da GST, já que esta é relacionada com processos de detoxificação do organismo, conjugando GSH a substratos eletrofílicos, portanto, pode estar associada à eliminação do Hg, e produtos gerados durante seu metabolismo. A GST pode gerar uma diminuição nos níveis de grupamentos Tiol, já que a principal fonte endógena deste grupamento é a GSH.

MDA é um produto da peroxidação lipídica, gerada pelo estresse oxidativo, que pode ser associado à exposição ao Hg (Houston, 2011). Como observado no Gráfico 6, as maiores médias de MDA foram encontradas em Cuniã, a população com consumo mais frequente de peixes, e com maiores níveis de Hg.

Este estudo encontrou as seguintes médias para MDA (μM), em 2012: Belmont = $1,34 \pm 0,28$, Cuniã = $1,69 \pm 0,27$ e Nacional = $1,37 \pm 0,32$. Com uma faixa de trabalho entre 1-2 μM , os resultados encontrados para MDA no presente estudo estavam dentro dos valores de referência discutidos na literatura (Yagi, 1998; Gupta, Bhatt e Misra, 2009). Os resultados apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre Cuniã e Belmont/Nacional. Isto mostra a importância do MDA como um biomarcador de efeito na avaliação da exposição ao Hg. Este dado ainda é reforçado pelas correlações fraca e moderada, porém significativas, entre MDA e Hg-S e Hg-C, respectivamente.

Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBars) e MDA têm sido usados como biomarcadores de lipoperoxidação há mais de 30 anos. Embora estes sejam utilizados em muitos laboratórios, devido à simplicidade e baixo custo, a validade deles tem sido frequentemente criticada por falta de especificidade e problemas pós-amostragem. MDA-TBars foi analisado originalmente por espectrofotometria, mas, recentemente, adutos de MDA-TBA são medidos por HPLC UV-VIS ou detecção por fluorescência, ou mesmo GC-MS, após derivatização. Os valores encontrados para MDA em plasma humano são muitas vezes superiores a 1 μM (Lykkesfeldt, 2007; Niki, 2009), o que confirma como normal a faixa de trabalho encontrada no presente estudo.

Este biomarcador foi escolhido para este estudo pela simplicidade do método. O problema da especificidade foi contornado pela análise de biomarcadores de dose interna específicos para avaliação da exposição ao Hg sendo avaliados concorrentemente.

O valor de referência para MDA, fornecido pelo kit Cayman, é 1,86-3,94 μM , baseado no trabalho de Yagi, 1998. Neste estudo Yagi propôs um método para MDA-TBars com detecção fluorimétrica e determina níveis de MDA por faixa etária. Para homens e mulheres ≤ 10 anos, MDA (μM) = $1,86 \pm 0,60$ e $2,08 \pm 0,48$, respectivamente. Já homens e mulheres entre 11-20 anos, MDA (μM) = $2,64 \pm 0,60$ e $2,64 \pm 0,54$, respectivamente. Ele ressalta no estudo que os valores tendem a aumentar com idade, mas não ultrapassam 4 μM . Cabe lembrar que o método utilizado em nosso estudo para determinação de MDA foi espectrofotométrico.

Em um estudo conduzido por Gupta, Bhatt e Misra, 2009, em pacientes com carcinoma celular, foram estudados o *status* antioxidante e peroxidação lipídica. Os autores encontraram

níveis de MDA de $1,16 \pm 0,48$ em pacientes saudáveis ($n = 12$). Os autores sugerem que os níveis de estresse oxidativo (MDA) foram maiores nos pacientes com câncer, e que os níveis de antioxidantes (SOD, Tiol e ácido ascórbico) foram menores.

Já no trabalho de Costa *et al.*, 2006, as médias encontradas para MDA (μM) foram $5,41 \pm 5,4$ (Homem) e $5,32 \pm 6,7$ (Mulher). Os resultados para MDA são 3,5 a 4 vezes maiores que os do presente estudo, porém o trabalho de Costa, Santos e Lima, 2006 apresentou um DP igual ou maior que a média, representando grande dispersão das médias de MDA. O fato interessante do trabalho de Costa, Santos e Lima, 2006 é que, a correlação de Spearman foi moderada e negativa, com significância estatística ($r = -0,33$, $p < 0,001$), entre Tiol e MDA. O presente estudo encontrou correlação bem fraca e negativa, mas não-significativa entre Tiol e MDA ($r = -0,08$, $p < 0,001$).

Os resultados de Costa, Santos e Lima, 2006 corroboram a hipótese de que quando os níveis de estresse oxidativo aumentam, mais MDA é gerado, consumindo mais GSH (fonte de Tiol) para auxiliar na eliminação do MDA, e aumento na atividade da GST. Nossos resultados não podem ser usados com segurança para confirmar esta hipótese.

A enzima GST sempre foi associada a processos de detoxificação. Na fase II do metabolismo, conjuga GSH a um substrato eletrofílico, no citossol da célula, o que permite sua excreção. Atualmente, outras funções são associadas a estas enzimas, tais como remover espécies reativas e regenerar proteínas S-tioladas (ambas produtos do estresse oxidativo), catálise de conjugações com ligantes endógenos e catálise de outras vias metabólicas não associadas com detoxificação (Sheehan *et al.*, 2001).

Os resultados de atividade enzimática para GST (U/L), em 2012, foram: Belmont = $22,37 \pm 7,77$, Cuniã = $27,26 \pm 4,94$, e Nacional = $15,18 \pm 4,42$. Assim como para MDA, as maiores concentrações de GST foram observadas em Cuniã, a comunidade com maiores níveis de Hg. Isto corrobora o papel importante desta enzima na avaliação da exposição ao Hg, assim como as correlações moderadas e fracas, porém significativas, encontradas entre atividade da enzima e níveis de Hg em sangue e cabelo, respectivamente.

Os valores médios da atividade enzimática da GST em Belmont e Nacional estão dentro do valor de referência, porém o mesmo não aconteceu em Cuniã. A atividade da enzima foi mais alta em Cuniã, fato que pode ser associado a processos de detoxificação do Hg e os produtos do seu metabolismo. A comparação das médias de GST das 3 comunidades teve diferença estatística (p -valor $< 0,001$). Apesar da proximidade de resultados entre Belmont e Cuniã, a diferença foi bem evidente entre ribeirinhos (Belmont e Cuniã) e urbanos (Nacional).

No estudo realizado por Habdous *et al.*, 2002, baseado no método clássico de Habig, Pabst e Jacoby, 1974, para determinação de atividade enzimática da GST, ele valida a metodologia para GST-Soro, que foi utilizada neste estudo e também fornece um valor de referência. Ele estudou 374 indivíduos saudáveis (178 homens e 196 mulheres), entre 4-80 anos, e determinou uma média de $28,2 \pm 3,0$ U/L. Este foi o valor de referência usado para este estudo. Com uma faixa de trabalho entre 15-30 U/L, os valores de GST, como um todo, estão dentro da faixa de normalidade apresentada por Habdous *et al.*, 2002.

Grotto *et al.*, 2010, estudou a exposição ao Hg e estresse oxidativo em comunidades amazônicas. O trabalho usou como biomarcadores a atividade das enzimas Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPx) e Ácido delta-aminolevulínico Desidratase (ALAD), além dos níveis plasmáticos de GSH. O Hg foi determinado em sangue, plasma e cabelo. A correlação foi inversa (negativa), com significância estatística (p -valor $< 0,05$), entre Hg-S e Hg-C e GPx, CAT, ALA-D e GSH. Isso reforça a importância da GSH no mecanismo de indução do estresse oxidativo mediado pela exposição ao Hg e sua importância como antioxidante celular, fato bem discutido na literatura (Meister 1988, Clarkson, 1997; Nogueira *et al.*, 2003, Rico *et al.*, 2006). Este mesmo fato é discutido neste trabalho, ressaltando a importância da GST e GSH (representada pelo grupamento Tiol), no mecanismo do estresse oxidativo induzido pela exposição ao Hg.

Grupamentos tiol são susceptíveis a danos oxidativos, pois são polarizáveis e agem como nucleófilos (Hu, 1994; Huber, Almeida e Fátima, 2008). Isto os torna bons biomarcadores de estresse oxidativo. Os resultados de concentrações médias de Tiol (mM), em 2012, foram: Belmont = $0,53 \pm 0,22$, Cuniã = $0,46 \pm 0,05$, e Nacional = $0,48 \pm 0,05$. Não houve diferença estatisticamente significativa (p -valor $> 0,05$) entre as 3 comunidades estudadas.

No estudo de Hu, 1994, a referência do método utilizado neste estudo para determinação dos níveis séricos de Grupamento Tiol, a concentração deste analito no plasma é na faixa de 0,4-0,6 mM, o que pode ser utilizado também para resultados no soro. A faixa de trabalho deste estudo ficou em torno de 0,4-0,7 mM, sendo igual a proposta por Hu, 1994.

No trabalho de Costa *et al.*, 2006, o mesmo citado acima para MDA, os valores encontrados para Tiol (mM) foram $0,48 \pm 0,18$ (Homem) e $0,49 \pm 0,17$ (Mulher). Apesar da faixa etária ser bem diferente do presente estudo, os valores encontrados para Tiol estão na mesma faixa dos nossos.

Diante disso, os valores de Tiol encontrados para as 3 comunidades deste estudo estavam dentro da faixa de normalidade citadas por Hu, 1994 e Costa *et al.*, 2006, porém não houve

diferença estatisticamente significativa de Tiol entre as comunidades. Para este estudo, o biomarcador Tiol não apresentou um resultado satisfatório, o que não exclui sua importância como biomarcador de estresse oxidativo em outras situações e estudos.

Afim de salientar a importância do Tiol na avaliação da exposição ao Hg, o trabalho de Farina *et al.*, 2013 é discutido. De acordo com o autor, com base na interação química entre GSH (no presente estudo, tratado como Tiol) e MeHg, a depleção de GSH decorrente da exposição ao MeHg representa um fenômeno esperado. Porém, é razoável supor que a interação MeHg-GSH não é a única causa de oxidação de GSH induzida por MeHg. Este parece induzir a formação de espécies reativas por mecanismos GSH-independentes, levando a posterior oxidação de GSH, o que confirma ainda mais a importância deste biomarcador, via determinação dos níveis de Tiol, na avaliação da exposição ao Hg. Ainda de acordo com Farina *et al.*, 2013, este caso parece ser também importante em termos de oxidação de proteínas, onde espécies reativas geradas a partir de MeHg podem modular o estado redox de proteínas, afetando sua função.

Uma ferramenta importante na avaliação da exposição são estudos experimentais que corroborem a hipótese testada. Assim, foram buscados estudos que avaliassem níveis de estresse oxidativo *in vitro* relacionados ao Hg.

Em um estudo experimental conduzido por Stacchiotti *et al.*, 2009, células foram expostas a Hg e Pb inorgânicos e parâmetros do estresse oxidativo foram estudados, a fim de avaliar a relação. A linha de células NRK-52E teve aumento da atividade da GST para ambos os metais. Maiores níveis de atividade da GST também foram encontrados neste estudo, associados a maiores níveis de Hg-S, confirmando o papel desta enzima na resposta antioxidante celular ao Hg.

Em uma revisão sobre toxicidade do Hg e antioxidantes, Patrick, 2002, fala sobre a importância da GSH e ALA (*alpha lipoic acid*) na toxicidade deste metal. Ele cita que linhas de células de mamíferos resistentes a toxicidade do Hg foram clonadas. Elas não acumulavam facilmente o Hg e eram resistentes aos efeitos tóxicos do MeHg e Hg. Uma característica marcante da linhagem celular era que os níveis de GSH eram cinco vezes maiores nestas células do que as células-mãe a partir das quais elas foram originadas. Isso mostrava que os mecanismos de resistência eram principalmente devido a capacidade de GSH para facilitar o efluxo de Hg a partir de células e a ligação de proteção de Hg com GSH para prevenir danos celulares.

Um ponto importante quando se discute exposição ao Hg, é o consumo de alimentos com alto teor de selênio (Se) na região amazônica, tais como a castanha do Pará (Lemire *et al.*, 2006; Lemire *et al.*, 2010). A glutathiona peroxidase (GPx) é uma importante enzima do sistema de defesa antioxidante e tem como cofator o Se (Huber, Almeida e Fátima, 2008; Cogo *et al.*, 2009). O consumo deste alimento (castanha) pode ser um fator de proteção para o estresse oxidativo e estar relacionado a inexistência de alterações metabólicas em algumas populações expostas ao Hg. Este trabalho não abordou este biomarcador (GPx), mas é inegável sua influência no metabolismo envolvendo espécies reativas e o Hg.

Estudos sugerem que há interação entre o Hg e Se, no entanto, não é claro se o Se protege contra os efeitos tóxicos do Hg ou Hg interfere nos benefícios do Se (Ganther, 1972; Ohi *et al.*, 1976; Vasconcellos, Bode e Paletti, 2001). Grupamentos selenol (~SeOH) são mais nucleofílicos do que grupamentos tiol (~SH), o que torna selenoproteínas alvos moleculares preferenciais de MeHg em comparação com contendo tióis de proteínas. Este fato baseia-se na maior afinidade de Hg para selenóis quando comparado com tióis. Esta afinidade mais elevada de Hg para selenóis também torna a ligação Se-Hg estável, mesmo na presença de altas concentrações de tióis (Sugiura *et al.*, 1976, Farina, Aschner e Rocha, 2012; Farina *et al.*, 2013).

Hg-S e Hg-C são biomarcadores de dose interna específicos, portanto, estão diretamente relacionados com a exposição ao Hg, ou MeHg. Já os biomarcadores de efeito do estresse oxidativo, MDA, Tiol e GST, são inespecíficos, pois representam alterações metabólicas precoces relacionadas a diversos tipos de exposições ambiental ou ocupacional (multicausais). Um importante debate que deve ser abordado é sobre o uso de biomarcadores de efeito inespecíficos (estresse oxidativo) em estudos de avaliação da exposição. A questão é qual a importância deles para avaliar uma exposição, já que sua alteração é multicausal?

O uso de um biomarcador inespecífico representa uma dificuldade, em termos de interpretação de dados, uma vez que sua correlação com outros biomarcadores específicos deve ser muito bem estudada. Fatores de influência não específicos devem ser avaliados e vieses excluídos para não gerarem resultados falsos.

O uso destes biomarcadores inespecíficos é um olhar contemporâneo em estudos de avaliação da exposição, pois combinado com o uso de diversos biomarcadores ao mesmo tempo, traz informações bem precoces de alterações metabólicas, que ainda em fases muito iniciais, podem ser relacionadas a exposição. Eles tem uma característica preditiva, que é um fator de suma importância, quando pensamos que pequenas alterações detectadas em fases

muito iniciais, podem prevenir a evolução para quadros de doença mais críticos, evitar maiores danos ao desenvolvimento e impedir o surgimento de doenças.

A presença de radicais livres tem sido correlacionada com um grande número de doenças, indicando que estas espécies não têm um papel etiológico na grande maioria dos estados patológicos, mas que participam diretamente dos mecanismos fisiopatológicos que determinam a continuidade e as complicações presentes nestes processos, pois as espécies radicalares estão envolvidas nos mecanismos de reações inflamatórias ou atuam como segundos mensageiros para manter diversas funções celulares. Assim, o equilíbrio entre a formação e a remoção de espécies radicalares no organismo deve ser regulado de forma que as reações e processos metabólicos dependentes das mesmas possam ocorrer em um nível adequado para a manutenção da fisiologia das células (Rover Júnior, Höehr e Vellasco, 2001). Portanto, o estudo do estresse oxidativo é importante em qualquer tipo de pesquisa da avaliação da exposição, seja ela ambiental ou ocupacional, pois trará informações bem precoces sobre alterações em mecanismos fisiopatológicos relacionados à progressão de uma doença.

A capacidade de sobreviver à ameaça representada pelos xenobióticos ou espécies reativas produzidos endogenamente ou não, representa uma adaptação biológica fundamental para nossa sobrevivência (Hayes e Pulford, 1995; Hayes e MacLellan, 1999).

A hipótese oxidativa de doenças é um termo que deve ser entendido como a ocorrência da condição oxidativa na célula durante o processo patológico, e não como exclusivamente a existência do estresse oxidativo como etiologia da doença (Ribeiro et al., 2005). A associação do estresse oxidativo em várias condições patológicas é uma realidade. A questão é a compreensão se ele é uma causa ou a consequência da perda de homeostase celular (Sorg, 2004).

7.3) Questões Sociais e Ambientais

Um importante debate acerca dos riscos da exposição a substâncias químicas é apontado pelo Ministério da Saúde, através do Programa Nacional de Vigilância Ambiental em Saúde Relacionado a Substâncias Químicas - VIGIQUIM. Este programa elenca 5 substâncias químicas importantes, em termos de vigilância para a saúde ocupacional e ambiental, devido aos riscos para a população, e dentre elas está o Hg. O VIGIQUIM justifica a importância e a necessidade de implementação de um sistema de Vigilância em Saúde Ambiental para o Hg, pois não existem “Limites de Tolerância” seguros, para substâncias neurotóxicas e

mutagênicas, assim o efeito neurotóxico e mutagênico do Hg permite a consideração de que nenhuma exposição ocupacional e ambiental deveria ser tolerada, para prevenir agravos. Desta forma, a criação de um sistema de vigilância ambiental e epidemiológica, elaborado a partir das informações organizadas nos Estados e Municípios, permitiria o mapeamento das áreas críticas e do perfil de morbimortalidade nestas áreas, assim como o acompanhamento do quadro clínico, funcional e neurológico das populações atingidas (MS, 2009). Esta discussão se torna ainda mais importante quando pensamos que populações ribeirinhas são isoladas, sendo esquecidas por programas de Saúde, e outras áreas, do Governo Federal.

O princípio norteador deste estudo foca na questão ambiental envolvendo a saúde infantil, Hg, rio Madeira e a usina hidrelétrica Santo Antônio, porém não podemos deixar de lembrar da questão ocupacional, envolvida na construção de um grande empreendimento como este. Assim como os danos ambientais não são completamente pensados na etapa de planejamento de um empreendimento deste porte, a falta de políticas para minimizar os danos das atividades nas hidrelétricas sobre a saúde dos trabalhadores também é uma importante questão de saúde e não pode ser esquecida (ENSP, 2014).

Ainda pensando em outros debates que não somente a questão ambiental envolvendo saúde infantil, devemos lembrar que o dano social de nosso modelo energético (hidrelétricas) é esquecido, pois só se discute que energia hidrelétrica é mais limpa que a termelétrica. Outros aspectos dessa discussão ficam em segundo plano.

Quando se discute o impacto socioambiental e na saúde, gerado por uma hidrelétrica, não quer dizer que se é contra o empreendimento. A energia é um item imprescindível para o desenvolvimento tecnológico de nosso país, e um bem indispensável para a população como um todo. O problema é que o objetivo destas empresas não é dar energia a quem não tem, é ter lucro.

O que é discutido aqui, é o modelo de implantação destes empreendimentos, onde saúde e ambiente não são adequadamente contemplados na etapa de planejamento e mitigação de danos. E ainda pior, neste modelo de implantação, populações tradicionais, sejam elas ribeirinhas ou indígenas, não são respeitadas, e sofrem com os desdobramentos destas obras, gerando danos ambientais, de saúde e psicossociais nestas populações. Em geral, a população é ouvida por último, com o intuito de legitimar o licenciamento ambiental. Não há uma compensação efetiva de danos, pois os grandes empreendimentos, em geral, violam direitos da Saúde, Ambiente e Direitos Sociais.

De acordo com Schütz *et al.*, 2014, os cursos d'água da região amazônica são vias de circulação de matéria biótica e abiótica fundamentais (às vezes, as únicas disponíveis), inclusive, para a comunicação e o transporte entre assentamentos humanos. O rio Madeira é uma hidrovia estratégica fundamental, e uma das mais importantes do Brasil para o escoamento da produção agrícola produzida em Rondônia, Mato Grosso e no sul do Amazonas (ANTAq, 2010). Sob uma perspectiva socioecológica, os ribeirinhos, em geral, são incluídos na categoria ambientalista “povos das águas”, portanto, dependem mais da integridade ecológica do compartimento ambiental aquático. Esta perspectiva corrobora todo o debate entorno dos impactos socioambientais em populações tradicionais vulneráveis, causados pelas usinas hidrelétricas do Complexo do rio Madeira.

Ainda ressaltando a importância do bioma Amazônico, Freitas e Giatti (2009) destacam que desde a segunda metade do século XX esta região vem sofrendo intensos processos de mudanças socioeconômicas, ambientais, de saúde e bem-estar e onde os conflitos entre desenvolvimento econômico e degradação ambiental são constantes. Como resultado dos diferentes processos de ocupação e desenvolvimento socioeconômico houve melhorias em alguns indicadores tradicionais de saúde e bem-estar (redução da mortalidade infantil e aumento da expectativa de vida), mas também nítida degradação ambiental. Fica claro que, em termos ambientais essa é uma região de elevada importância, pois concentra aproximadamente 74% das disponibilidades nacionais dos recursos hídricos, possui a maior reserva de biodiversidade do mundo, possui reconhecida importância em termos de “serviços ambientais” para o planeta, como os de regulação do clima por meio da reserva e difusão de umidade pela floresta e de captura de gás carbônico. Porém, ao mesmo tempo, sua floresta apresenta fragilidades, já que encontra-se assentada em planície sedimentar dotada de camada orgânica delgada e superficial, dependente da manutenção da cobertura vegetal para sua auto reprodução e para a estabilidade dos solos. Os autores também falam sobre os megaprogramas de investimentos na região, tais como o Avança Brasil e PAC (Programa de Aceleração do Crescimento), constantemente associados à implementação de infraestrutura na Amazônia por meio da construção de hidrelétricas, rodovias e demais facilidades, contribuindo direta ou indiretamente no uso e ocupação do solo na região.

De acordo com a Lei 8.080, de 1990, que norteia a Saúde em nosso país, a saúde é um direito fundamental do ser humano, devendo o Estado prover as condições indispensáveis ao seu pleno exercício. O mesmo deve garantir políticas econômicas e sociais que visem à redução de riscos de doenças e de outros agravos. A lei deixa claro que a Saúde tem como determinantes

e condicionantes, entre outros, a alimentação, a moradia, o saneamento básico, o meio ambiente, o trabalho, a renda, a educação, a atividade física, o transporte, o lazer e o acesso aos bens e serviços essenciais. Desta forma, O Estado deve lembrar que Saúde é componente complexo. A questão “Saúde na Amazônia” deve ser amplamente debatida em qualquer instância, quando se pensa em instalação de grandes empreendimentos na região

Infelizmente, enquanto não houver organização popular e luta por melhores condições de vida, seja no campo da Saúde, Ambiente ou Social, não haverá avanço em questões que oprimem os mais carentes. A população (movimentos sociais) deve ser capacitada para exercer pressão social e política nos governantes e mídia, para que seja percebida como parte integrante de um sistema, que muitas vezes faz questão de esquecê-los.

8. CONCLUSÕES

Este estudo evidenciou a estas populações infantojuvenis, urbana e ribeirinha, residentes em área de influência do rio Madeira, tem exposições distintas ao Hg. Esta exposição pode ser relacionada ao consumo de peixes contaminados com o metal.

O consumo de peixes entre as 3 comunidades estudadas foi diferente (X^2 , p-valor < 0,001), sendo maior entre ribeirinhos isolados de Cuniã.

Os níveis de Hg-S e Hg-C aumentaram de acordo com a maior frequência de consumo de peixes. Devido a isso, as maiores concentrações de Hg-S e Hg-C foram encontrados em Cuniã.

As concentrações médias de Hg-S e Hg-C em Cuniã estavam acima dos valores de referência recomendados pela OMS para estes biomarcadores, 8 µg/L e 2 µg/g, respectivamente, em populações não-expostas.

Os biomarcadores Hg-S, Hg-C, MDA e GST apresentaram diferença estatisticamente significativa (p-valor < 0,001) entre Cuniã em relação as outras duas comunidades. Somente o biomarcador Tiol não apresentou diferença estatisticamente significativa entre as comunidades. Em todos os biomarcadores estudados não houve diferença estatisticamente significativa entre crianças e adolescentes, e entre sexos. O biomarcador de efeito do estresse oxidativo Tiol não apresentou diferença significativa entre as categorias estudadas.

A enzima GST apresentou resultados atividade aumentada na população com maiores níveis de Hg-S, assim como MDA apresentou maiores níveis séricos nos mais expostos ao Hg. Ambos os biomarcadores tiveram correlação positiva e significativa entre atividade/níveis e exposição ao Hg (Hg-S e Hg-C).

A utilização de biomarcadores de efeito do estresse oxidativo pode trazer um importante panorama de alterações metabólicas precoces, relacionadas a uma situação de exposição ambiental ou ocupacional, porém este tipo de estudo sempre deve ser feito utilizando também biomarcadores de dose interna específicos, para que associações possam ser feitas com maior validade estatística e confiabilidade

Programas de monitoramento são muito importantes, visando avaliar as quantidades de Hg antes e depois da construção das usinas, em peixes, água, solo e ar, e sua influência no Ambiente e na Saúde do povo desta região

A Saúde e Educação nas regiões amazônicas é fraca, e assim, problemas de saúde relacionados a exposições ambientais e seus desdobramentos no desenvolvimento e aprendizado infantil são de difícil detecção.

Este trabalho não se encerra com apenas uma avaliação, ele evidencia uma das muitas pesquisas que podem ser realizadas envolvendo o rio Madeira e Saúde Ambiental em relação à construções de hidrelétricas.

A região amazônica deve ser compreendida como um ambiente natural extremamente complexo, onde a interferência em qualquer compartimento ambiental pode ter uma influência maior do que a esperada. Aliado a isso, as populações tradicionais desta região, ribeirinhos e índios, têm maior vulnerabilidade a estas alterações, sofrendo mais com tais problemas, porém sendo menos lembrados que nós das grandes cidades.

A questão ambiental na Amazônia é complexa. Mais complexo ainda são seus desdobramentos sobre a saúde humana. De simples nesta região só tem um fato: quem mais sofre é sempre quem mais precisa de assistência.

9. REFERÊNCIAS

- Agência Nacional de Transportes Aquaviários (ANTAq). Transporte de Cargas na Hidrovia do Rio Madeira. Brasília, 2010. Acesso em 21/4/2014. Disponível em: <http://www.antaq.gov.br/Portal/pdf/HidroviaDoMadeiraTransportedeCargas>.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), USA. Toxicological profile for Mercury. 1999
- Akyol, Ö.; Herken, H.; Uz, E.; Fadillioğlu, E.; Ünal, S.; Söğüt, S.; Özyurt, H.; Savaş, HA. The indices of endogenous oxidative and oxidative processes in plasma from schizophrenic patients – The possible role of oxidant/antioxidant imbalance. *Progress in Neuro-Psychopharmacology e Biological Psychiatry*. 26: 995-1005. 2005
- Amorim, LCA. O uso de biomarcadores na avaliação da exposição ocupacional a substâncias químicas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 6 (Sup1): 1-13. 2003
- Asmus, CIRF.; Barker, SL.; Ruzany, MH.; Meirelles, ZV. Riscos ocupacionais na infância e na adolescência: uma revisão. *Jornal de Pediatria*. 72 (4): 203-208. 1996
- Azevedo, FA.; Chasin, AAM. Metais - Gerenciamento da Toxicidade. Editora Atheneu, 2003
- Barbosa, KBF.; Costa, NMB.; Alfenas, RCG.; de Paula, SO.; Minim, VPR.; Bressan, J. Estresse Oxidativo: conceitos, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição, Campinas*. 23 (4): 629-643. 2010
- Barcellos, C. Quem sustenta tanto desenvolvimento? *Ciência e Saúde Coletiva*. 14 (6): 1972-1974, 2009
- Barreiros, ALBS.; David, JM.; David, JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas de oxigênio e defesa do organismo. *Química Nova*. 29 (1): 113-123. 2006
- Bastos, WR.; Lacerda, LD. A contaminação por mercúrio na bacia do rio Madeira: uma breve revisão. *Geochimica Brasiliensis*. 18 (2): 99-114. 2004
- Bernard A.; Lauwerys R. Assessment of human exposure to chemicals through biological monitoring. In: Kopfler FC, Craun, GF (eds). *Environmental Epidemiology*. Chelsea: Lewis Publ. Inc. 1986
- Biester, H.; Gosar, M.; Muller, G.; Mercury speciation in tailings of the Idrija Mercury mine. *Journal of Geochemical Exploration*. 65 (3): 195-204. 1999
- Bisinoti, MC.; Jardim, WF. O comportamento do metilmercúrio no ambiente. *Química Nova*. 27 (4): 593-600. 2004

- Boischio, AAP.; Barbosa, A. Exposição ao mercúrio orgânico em populações ribeirinhas do Alto Madeira, Rondônia, 1991: Resultados preliminares. *Cadernos de Saúde Pública*. 9 (2): 155-160. 1993
- Brasil. Lei Nº 8.069, de 13 de Julho de 1990. Estatuto da Criança e do Adolescente _____. Lei Nº 8.080, de 19 de Setembro de 1990. Lei Orgânica da Saúde
- Campos, RC. Estudo da determinação de mercúrio por espectrometria de absorção atômica pela técnica do vapor frio. Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio). 1988
- Chen, C. Methylmercury effects and exposures: Who is at risk? *Environmental Health Perspectives*, 120 (6): A224-A225. 2012
- Clarkson TW. The pharmacology of mercury compounds. *Annu Rev Pharmacol*. 12: 375–406. 1975
- Clarkson TW. The toxicology of mercury. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 34: 369–403. 1997
- Clarkson, TW. Mercury: major issues in environmental health. *Environmental Health Perspectives*. 100: 31-38. 1992
- Clarkson, TW.; Magos, L.; Myers, GJ. The toxicology of mercury – current exposures and clinical manifestations. *The New England Journal of Medicine*. 349 (18): 1731-1737. 2003
- Clarkson. TW.; Magos, L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Critical Reviews in Toxicology*. 36: 609–662. 2006
- Cogo, AJD.; Siqueira, AF.; Ramos, AC.; Cruz, ZMA.; Silva, AG. Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. *Natureza online*. 7 (1): 37-42. 2009
- Compeau, GC.; Bartha, R.. Sulfate-reducing bacteria: principal methylators of mercury in anoxic estuarine sediment. *Applied and Environmental Microbiology*. 50: 498–502. 1985
- Cordeiro, R. Efeito do desenho em amostragem de conglomerado para estimar a distribuição de ocupações entre trabalhadores. *Revista de Saúde Pública*. 35 (1): 10-15. 2001
- Costa, CM.; Santos, RCC.; Lima, ES. A simple automated procedure for thiol measurement in human serum samples. *J Bras Patol Med Lab*. 42 (5): 345-350. 2006
- Davidson, PW.; Myers, GJ.; Cox, C.; Axtell, C.; Shamlaye, C.; Sloane-Reeves, J.; Cernichiari, E.; Needham, L.; Choi, A.; Wang, Y.; Berlin, M.; Clarkson, TW. Effects of prenatal and postnatal methylmercury exposure from fish consumption on neurodevelopmental outcomes at 66 months of age in the Seychelles Child Development Study. *Journal of the American Medical Association*. 280: 701–707. 1998

- Dufalt, R.; Schnoll, R.; Lukiw, WJ.; LeBlanc, B.; Cornett, C.; Patrick, L.; Wallinga, D.; Gilbert, SG.; Crider, R. Mercury exposure, nutritional deficiencies and metabolic disruptions may affect learning in children. *Behavioral and Brain Functions*. 5: 44-58. 2009
- Dutra, MDS.; Jesus, IM.; Santos, ECO.; Lima, MOL.; Medeiros, RLF.; Cavadas, M.; Luiz, RR.; Câmara, VM. Longitudinal assessment of mercury exposure in schoolchildren in an urban area of the Brazilian Amazon. *Cadernos de Saúde Pública*. 28 (8): 1539-1545. 2012
- Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca (ENSP). Acesso em 25/09/2014. Disponível em www.ensp.fiocruz.br/portal-ensp/informe/site/materia/detalhe/36425
- Farina, M.; Aschner, M.; Rocha, JB. Redox state in mediating methylmercury neurotoxicity. In: Aschner, M.A., Ceccatelli, S. (Eds.), *Methylmercury and Neurotoxicity*, vol. 2. Springer, pp. 101–125. 2012
- Farina, M.; Avila, DS.; Rocha, JBT.; Aschner, M. Metals, oxidative stress and neurodegeneration: A focus on iron, manganese and mercury. *Neurochemistry International*. 62: 575-594. 2013
- Farina, M.; Soares, FA.; Feoli, A.; Roehring, C.; Brusque, AM.; Rotta, L.; Perry, ML.; Souza, DO.; Rocha, JBT. In vitro effects of selenite and mercuric chloride on liver thiobarbituric acid-reactive substances and non-protein thiols from rats: Influences of dietary cholesterol and polyunsaturated and saturated fatty acids. *Basic Nutr Investig*. 19: 531–535. 2003
- Fearnside, PM Environmental impacts of Brazil's Tucuruí dam: unlearned lessons for hydroelectric development in Amazonia. *Environmental Management*. 27 (3): 377-396. 2001
- Fearnside, PM. Brazil's Samuel dam lessons for hydroelectric development policy and the environment in Amazonia. *Environmental Management*. 35 (1): 1-19, 2005
- Fearnside, PM. A floresta Amazônia nas mudanças globais. Manaus, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Editora INPA. 2003
- Ferreira, ALA.; Matsubara, LS.; Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista Associação Médica Brasileira*. 43 (1): 61-68. 1997
- Finkel, T.; Holbrook, NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 408 (9): 239-247. 2000
- Freitas, CM.; Giatti. Indicadores de sustentabilidade ambiental e de saúde na Amazônia Legal, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*. 25(6): 1251-11266. 2009

- Fundacentro, 2013. Acesso em 23/12/2014. Disponível em http://www.fundacentro.gov.br/Arquivos/sis/EventoPortal/AnexoPalestraEvento/SeminarioMercurio_Fundacentro_ConvencaoMinamata_6e7%2008%2013.pdf
- Ganther, HE. Selenium: relation to decreased toxicity of methylmercury in diets containing tuna. *Science*. 175: 1122-1124. 1972
- Garbino, JP. Children's health and the environment - A global perspective. World Health Organization (WHO). Genebra, Suíça. 2004
- Gonçalves, A.; Gonçalves, NNS. Exposição humana ao mercúrio na Amazônia brasileira: uma perspectiva histórica. *Revista Panamericana de Saúde Pública*. 15 (6): 415-419. 2004
- Gonçalves, KS.; Siqueira ASP.; Castro, HA.; Hacon SS. Indicador de vulnerabilidade socioambiental na Amazônia Ocidental. O caso do município de Porto Velho, Rondônia, Brasil. *Ciência e Saúde Coletiva*, 19 (9): 3809-3817. 2014
- Grandjean, P.; Landrigan, PJ. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *Lancet*. 368: 2167-2178. 2006
- Grandjean, P.; Weihe, P.; White, RF.; Debes, F.; Araki, S.; Yokoyama, K.; Murata, K.; Sorensen, N.; Dahl, R.; Jorgensen, PJ. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicology and Teratology Journal*. 19: 417-428. 1997
- Grandjean, P.; White, RF.; Nielsen, A.; Cleary, D.; Santos, ECO. Methylmercury neurotoxicity in amazonian children downstream from gold mining. *Environmental Health Perspectives*. 107 (7): 587-591. 1999
- Grigg, J. Environmental toxins: their impact on childrens health. *Archives of Disease in Childhood*. 89: 244-250. 2004
- Grotto, D.; Valentini, J.; Fillion, M.; Passos, CJS.; Garcia, SC.; Mergler, D.; Barbosa Jr., F. Mercury exposure and oxidative stress in communities of brazilian Amazon. *Science of the Total Environment*. 408: 806-811. 2010
- Grupo Energia Sustentável do Brasil. Acesso em 05/12/2013. Disponível em <http://www.energiasustentaveldobrasil.com.br>
- Grupo Santo Antônio Energia, 2013. Acesso em 17/12/14. Disponível em <http://www.santoantonioenergia.com.br>
- Guimarães, JRPF. Relatório sobre o Mercado de Hg no Brasil. Associação de Combate aos Poluentes. São Paulo, Brasil. 2006

- Guimarães, RM.; Asmus, CIRF. Por que uma saúde ambiental infantil? Avaliação da vulnerabilidade de crianças a contaminantes ambientais. *Pediatria, São Paulo*. 32 (4): 239-245. 2010
- Gupta, A.; Bhatt, MLB.; Misra MK. Lipid peroxidation and antioxidant status in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2 (2): 68-72. 2009
- Habdous, M.; Vincent-Viry, M.; Visvikis, S.; Siest, G. Rapid spectrophotometric method for serum glutathione S-transferases activity. *Clinica Chimica Acta*. 326: 131–142. 2002
- Habig, WH.; Pabst, MJ.; Jacoby, WB. Glutathione S-Transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*. 249 (22): 7130-7139. 1974
- Hacon, SS. Avaliação e gestão do risco ecotoxicológico à saúde humana. In: *As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia*. Coordenadores: Azevedo, FA e Chasin, AAM. Editora RiMa. 2003
- Hacon, SS.; Artaxo, P.; Gerab, F.; Yamasoe, MA.; Campos, RC.; Conti, LF.; Lacerda, LD. Atmospheric mercury and trace elements in the region of Alta Floresta in the Amazon basin. *Water, Air, and Soil Pollution*. 80: 273-283, 1995
- Hacon, SS.; Azevedo, F. Plano de ação regional para prevenção e controle da contaminação por Hg nos ecossistemas amazônicos. Organização do Tratado para Cooperação Amazônica (OTCA) e Ministério do Meio Ambiente Brasil (MMA), Brasil. 2006
- Hacon, SS.; Barrocas, P.; Vasconcellos, ACS.; Barcellos, C.; Wasserman, JC.; Campos, RC. Um panorama dos estudos sobre contaminação por mercúrio na Amazônia Legal no período de 1990 a 2005 - Avanços e Lacunas. *Geochimica Brasiliensis*. 23 (1): 29-48. 2009
- Hacon, SS.; Dórea, JG.; Fonseca, MF.; Oliveira, BA.; Mourão, DS.; Ruiz, CMV.; Gonçalves, RA.; Mariani, CF.; Bastos, W. The Influence of Changes in Lifestyle and Mercury Exposure in Riverine Populations of the Madeira River (Amazon Basin) near a Hydroelectric Project. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 11: 2437-2455. 2014
- Hacon, SS.; Rochedo, ERR.; Campos, RC.; Lacerda, LD. Mercury exposure through fish consumption in the urban area of Alta Floresta in the Amazon Basin. *Journal of Geochemical Exploration*. 58: 209-216. 1997
- Halliwell, B.; Gutteridge, JM. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford, U.K.: Oxford University Press. 1999

- Halliwell, B.; Whiteman, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*. 142: 231–255. 2004
- Hayes, JD.; Flanagan, JU.; Jowsey, IR. Glutathione transferases. *Ann. Rev. Pharm. Toxicol.* 45: 51–88. 2005
- Hayes, JD; McLellan, LI. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a coordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radical Res.* 31: 273-300. 1999
- Hayes, JD; Pulford, DJ. The glutathione S-transferase supergene family: Regulation of GST and the contributions of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30: 445-600. 1995
- He, T; Feng, X; Guo, Y; Qiu, G; Li, Z ; Liang, L ; Lu, J The impact of eutrophication on the biogeochemical cycling of mercury species in reservoir: A case study from Hongfeng Reservoir, Guizhou, China. *Environmental Pollution*. 154: 56-67. 2008
- Hintelmann, H. Organomercurials: Their formation and pathways in the environment. *Met. Ions Life Sci.* 7: 365–401. 2010
- Houston, MC. Role of Mercury Toxicity in Hypertension, Cardiovascular Disease, and Stroke. *The Journal of Clinical Hypertension*. 13 (8): 621-627. 2011
- Hu, ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods in Enzymology*. 233: 380-385. 1994
- Huber, PC.; Almeida, WP.; Fátima, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova*. 31 (5): 1170-1179. 2008
- Huguet, L; Castelle, S; Schäfer, J; Blanc, G; Maury-Brachet, R; Reynouard, C; Jorand, F. Mercury methylation rates of biofilm and plankton microorganisms from a hydroelectric reservoir in French Guiana. *Science of Total Environment*. 408: 1338-1348. 2010
- Hylander, LD.; Gröhn, J.; Tropp, M.; Vikström, A.; Wolpher, H.; Silva, EC.; Meili, M.; Oliveira, LJ. Fish mercury increase in Lago Manso, a new hydroelectric reservoir in tropical Brazil. *Journal of Environmental Management* 81: 155–166. 2006
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Acesso em 04/02/2015. Disponível em <http://cidades.ibge.gov.br/>
- International Agency for Research on Cancer (IARC) – World Health Organization (WHO). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Volume 58: beryllium, cadmium, mercury and exposures in the glass manufacturing industry. 1997

- International Agency for Research on Cancer (IARC) – World Health Organization (WHO).
Acesso em 7/04/2014. Disponível em
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol58/mono58-8.pdf>
- International Programme on Chemical Safety (IPCS) – World Health Organization (WHO).
Inorganic Mercury - Environmental Health Criteria 118. Genebra, Suíça. 1991
- International Programme on Chemical Safety (IPCS) – World Health Organization (WHO).
Mercury – Environmental Aspects. Environmental Health Criteria 86. Genebra, Suíça. 1989
- International Programme on Chemical Safety (IPCS) – World Health Organization (WHO).
Methylmercury – Environmental Health Criteria 101. Genebra, Suíça. 1990
- Järup, L. Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*. 68: 167–182. 2003
- Joseph, PD.; Mannervik, B.; Ortiz, PM. *Molecular Toxicology*. 1st Ed. Oxford University Press: New York. 1997
- Kehrig, HE; Palermo EFA; Seixas, TG; Santos, HSB; Malm, O; Akati, H. Methyl and total mercury found in two man-made amazonian reservoirs. *J. Braz. Chem.Soc.*, Vol. 20 (6): 1142-1152. 2009
- Kershaw, TG.; Clarkson, TW.; Dhahir, PH. The relationship between blood levels and dose of methylmercury in man. *Arch. Environ. Health* 35 (1): 28–36. 1980
- Kuno, R.; Roquetti, MH.; Umbuzeiro, GA. Indicadores biológicos de exposição ocupacional x ambiental. *INTERFACEHS – Revista de Gestão Integrada em Saúde do Trabalho e Meio Ambiente*. 4 (1): artigo 5. 2009
- Lacerda, LD e Salomons, W. *Mercury from gold and silver mining: A chemical time-bomb?* Ed. Springer. Berlin. 1998
- Lacerda, LD. Contaminação por mercúrio no Brasil: Fontes industriais vs Garimpo de ouro. *Química Nova*. 20 (2): 196-199. 1997
- Lacerda, LD. Minamata Livre de Mercúrio. *Ciência Hoje*, 133 (23): 25-31. 1997
- Lacerda, LD.; Bidone, ED.; Guimarães, AF.; Pfeiffer, WC. Mercury concentrations in fish from the Itacaiunas - Parauapebas River system, Carajás region, Amazon. *Anais Academia Brasileira de Ciências*, 66 (3): 373-379. 1994
- Lacerda, LD.; Malm, O. Contaminação por mercúrio em ecossistemas aquáticos: uma análise das áreas críticas. *Estudos Avançados*. 22 (63): 173-190. 2008
- Landrigan PJ, Garg A. Chronic effects of toxic environmental exposures on childrens health. *Journal of Toxicology – Clinical Toxicology*. 40: 449-56. 2002

- Lemire, M.; Fillion, M.; Barbosa Jr., F.; Guimarães, JRD.; Mergler, D. Elevated levels of selenium in the typical diet of Amazonian riverside populations. *Science of the Total Environment*. 408: 4076–4084. 2010
- Lemire, M.; Mergler, D.; Fillion, M.; Passos, CJS.; Guimarães, JRD.; Davidson, R.; Lucotte, M. Elevated blood selenium levels in the Brazilian Amazon. *Science of the Total Environment*. 366: 101–111. 2006
- Lima, ES.; Abdalla, DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 37 (3): 293-303. 2001
- Lund, BO.; Miller, DM.; Woods, JS. Studies on Hg(II)-induced H₂O₂ formation and oxidative stress in vivo and in vitro in rat kidney mitochondria. *Biochem Pharmacol*. 45: 2017–2024. 1993
- Lykkesfeldt, J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clinica Chimica Acta*. 380: 50–58. 2007
- Mahaffey, KR.; Clickner, RP.; Jeffries, RA. Adult women's blood mercury concentrations vary regionally in the United States: association with patterns of fish consumption (NHANES 1999-2004). *Environ Health Perspect*. 117 (1): 47-53. 2009
- Mailman, M.; Stepnuk, L.; Cicek, N.; Bodaly, RA. Strategies to lower methyl mercury concentrations in hydroelectric reservoirs and lakes: A review. *Science of the Total Environment*. 368: 224-235. 2006
- Marques, RC.; Bernardi, JVE.; Dórea, JG.; Brandão, KG.; Bueno, L.; Leão, RS.; Malm, O. Fish consumption during pregnancy, mercury transfer, and birth weight along the Madeira river basin in Amazonia. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 10: 2150-2163. 2013
- Marques, RC.; Dórea, JG.; McManus, C.; Leão, RS.; Brandão, KG.; Marques, RC.; Vieira, IHI.; Guimarães, JRD.; Malm, O. Hydroelectric reservoir inundation (Rio Madeira Basin, Amazon) and changes in traditional lifestyle impact on growth and neurodevelopment of pre-school children. *Public Health Nutrition*. 14 (4): 661-669. 2010
- Matés, JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*. 153: 83–104. 2000
- Matés, JM.; Pérez-Gómez, C.; Castro, IN. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*. 32 (8): 595-603. 1999
- McCord, JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American Journal of Medicine*. 108: 652–659. 2000

- Meister, A. Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem.* 263: 17205–17208. 1988
- Mello-da-Sila, CA.; Fruchtengarten, L. Riscos químicos ambientais à saúde da criança. *Jornal de Pediatria.* 81 (Supl 5): S205-S211. 2005
- Micaroni, RCCM.; Bueno, MIMS.; Jardim, WF. Compostos de mercúrio: revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. *Química Nova.* 23 (4): 487-495. 2000
- Minamata Convention on Mercury. Acesso em 23/12/2014. Disponível em <http://www.mercuryconvention.org/Convention/tabid/3426/Default.aspx>
- Minamata Disease. Study group of Minamata Disease – Part 1, Kumamoto University. Japão. 1968
- Ministério da Saúde (MS). Programa Nacional de Vigilância Ambiental em Saúde Relacionado a Substâncias Químicas – VIGIQUIM. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília, Brasil. 2009
- Ministério de Minas e Energia (MME). Plano Nacional de Energia 2030; Colaboração da Empresa de Pesquisa Energética. Brasília, Brasil. 2007
- Ministério do Meio Ambiente (MMA). Acesso em 23/12/2014. Disponível em <http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/mercurio>
- Ministério do Meio Ambiente (MMA). Diagnóstico Preliminar sobre o Mercúrio no Brasil. Brasília, Brasil. 2013
- Miranda, AC.; Castro, HA.; Augusto, LGS. Saúde ambiental e territórios sustentáveis. *Ciência e Saúde Coletiva.* 14: 1962. 2009
- Moreira, J.C. e Pivetta, M. 1997. Human and environmental contamination by mercury from industrial uses in Brazil. *Water Air Soil Pollution* 97: 241-246.
- Murata, K.; Weihe, P.; Budtz-Jorgensen, E.; Jorgensen, PJ.; Grandjean, P. Delayed brainstem auditory evoked potential latencies in 14-year-old children exposed to methylmercury. *The Journal of Pediatrics.* 144: 177–183. 2004
- Myers, GJ.; Davidson, PW.; Cox, C.; Shamlaye, C.; Palumbo, D.; Cernichiari, E.; Sloane-Reeves, J.; Wilding, GE.; Kost, J.; Haung, LS.; Clarkson, TW. Pre natal methylmercury exposure from ocean fish consumption in the Seychelles Child Development Study. *Lancet.* 361: 1686–1692. 2003
- Niki, E. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. *Free Radical Biology e Medicine* 47: 469–484. 2009

- Nogueira, CW.; Soares, FA.; Nascimento, PC.; Muller, D.; Rocha, JBT. 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonic acid and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid increase mercury and cadmium induced inhibition of σ -aminolevulinic acid dehydratase. *Toxicology*. 184: 85–95. 2003
- Oga, S.; Camargo, MMA.; Batistuzzo, JAO. *Fundamento de Toxicologia*. 3ª ed. Editora Atheneu. 2008
- Ohi G., Nishigaki S.; Seki, H.; Tamura, Y.; Maki, T. Efficacy of selenium in tuna and selenite in modifying methylmercury intoxication. *Environmental Research*. 12: 49-58. 1976
- Oliveira, BFA.; Mourão, DS.; Gomes, N.; Costa, JMC.; Souza, AV.; Bastos, WR.; Fonseca, MF.; Mariani, CF.; Abbad, G.; Hacon, SS. Prevalência de hipertensão arterial em comunidades ribeirinhas do Rio Madeira. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 29 (8): 1617-1630. 2013
- Pagano, M.; Gauvreau, K.; *Princípios de Bioestatística*. 2ª ed. Editora Cengage Learning. 2004
- Pak, KR.; Bartha, R. Mercury methylation and demethylation in anoxic lake sediments and by strictly anaerobic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1013-1017. 1998
- Palmer, CD.; Lewis Jr., ME.; Geraghty, CM.; Barbosa Jr., F.; Parsons, PJ. Determination of lead, cadmium and mercury in blood for assessment of environmental exposure: A comparison between inductively coupled plasma–mass spectrometry and atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B* (61): 980–990. 2006
- Passos, CJS.; Mergler, D. Human mercury exposure and adverse health effects in the Amazon: a review. *Cadernos de Saúde Pública*. 24 (Sup 4): S503-S520. 2008
- Patrick, L. Mercury toxicity and antioxidants: Part I: Role of glutathione and alpha-lipoic acid in the treatment of mercury toxicity. *Alternative Medicine Review*. 7 (6): 456-471. 2002
- Pires, M.; Fiedler, H.; Teixeira, EC. Geochemical distribution of trace elements in coal: modeling and environmental aspects. *Fuel* 76: 1425-1427. 1997
- Pivetta, F.; Machado, JMH.; Moreira, MFR.; Apostoli, P. Monitoramento biológico: conceitos e aplicações em saúde pública. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro. 17 (3): 545-554. 2001
- Portal de notícias EBC. Acesso em 05/12/2013. Disponível em <http://www.ebc.com.br/noticias/brasil/2013/09/autorizado-o-inicio-da-operacao-comercial-da-usina-hidreletrica-de-jirau>
- Prefeitura de Porto Velho, outubro de 2006. Acesso em 02/7/2013. Disponível em <http://www.portovelho.ro.gov.br>

- Remacle, J.; Lambert, D.; Raes, M.; Pigeolet, E.; Michiels, C.; Toussaint, O. Importance of various antioxidant enzymes for cell stability. *The Biochemical Journal*. 286: 41–46. 1992
- Ribeiro, SMR.; Queiroz, JH.; Pelúzo, MCG.; Costa, NMB.; Matta, SLP.; Queiroz, MELR. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *Bioscience Journal*. 21 (3): 133-149. 2005
- Rico, GM.; Puchades, MJ.; Ramón, RG.; Sáez, G.; Tormos, MC.; Miguel, A. Effect of hemodialysis therapy on oxidative stress in patients with chronic renal failure. *Nefrología*. 26: 218–25. 2006
- Roulet, M.; Lucote, M. Geochemistry of mercury in pristine and flooded ferrallic soils of a tropical rain forest in French Guiana, South America. *Water, Air and Soil Pollutin*. 80: 1079-1088. 1995
- Roulet, M.; Lucote, M.; Canuel, R.; Rheault, I.; Tras, S.; Gog, YGF.; Farella, N.; Valle, RS.; Passos, CJS.; Silva, EJ.; Mergler, D.; Amorim, M. Distribution and partition of total mercury in waters of the Tapajós River Basin, Brazilian Amazon. *The Science of Total Environment*. 213: 203-211. 1998
- Rover Júnior, L.; Höehr, NF.; Vellasco, AP. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Química Nova*. 24 (1): 112-119. 2001
- Rüdiger HW. Biomonitoring in occupational medicine. In: Marquart H, Schäfer SG, McClellan R, Welsch F (eds.). *Toxicology*. San Diego: Academic Press. 1999
- Salonen, JT.; Seppänen, K.; Nyssönen, K.; Korpela, H.; Kauhanen, J.; Kantola, M.; Tuomilehto, J.; Esterbauer, H.; Tatzber, F.; Salonen, R. Intake of mercury from fish, lipid peroxidation, and the risk of myocardial infarction and coronary, cardiovascular, and any death in eastern Finnish men. *Circulation*. 91: 645–655. 1995
- Santos, ECO.; Câmara, VM.; Brabo, ES.; Loureiro, ECB.; Jesus, IM.; Fayal, K.; Sagica, F. Avaliação dos níveis de exposição ao mercúrio entre índios Pakaanóva, Amazônia, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro. 19 (1): 199-206. 2003
- Schetagne, R.; Doyon, JF.; Fournier, JJ. Export of mercury downstream from reservoirs. *The Science of the Total Environment*. 260: 135-145. 2000
- Schütz, GE.; Mello, MCS.; Carvalho, MAR.; Câmara, VM. Sobredeterminação socioecológica da saúde da ruralidade em Humaitá, AM, Brasil. *Ciência e Saúde Coletiva*. 19 (10): 4051-4059. 2014

- Sheehan, D.; Meade, G.; Foley, VM.; Dowd, CA. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal*. 360: 1–16. 2001
- Shenker, BJ.; Guo, TL.; Shapiro, IM. Low-level methylmercury exposure causes human T-cells to undergo apoptosis: evidence of mitochondrial dysfunction. *Environ Res*. 77: 149–159. 1998
- Sies, H. *Oxidative stress*. London: Academic Press. 1985
- Sies, H. *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. New York: Academic Press. 1991
- Silva, NN. *Amostragem Probabilística*. Editora USP. 2001
- Sorg, O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *Comptes Rendus Biologies*. 327: 649–662. 2004
- Stacchiotti, A.; Morandini, F.; Bettonib, F.; Schena, I.; Lavazza, A.; Grigolato, PG.; Apostoli, P.; Rezzani, R.; Aleo, MF. Stress proteins and oxidative damage in a renal derived cell line exposed to inorganic mercury and lead. *Toxicology*. 264: 215–224. 2009
- Stein, ED.; Cohen, Y.; Winer, AM. Environmental distribution and transformation of mercury compounds. *Crit Rev Environ Sci Technol* 26 (1): 1-43. 1996
- Stohs, SJ.; Bagchi, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biologie Medicine*. 18 (2): 321-336. 1995
- Sugiura, Y.; Hojo, Y.; Tamai, Y.; Tanaka, H. Selenium protection against mercury toxicity. Binding of methylmercury by the selenohydril-containing ligand. *J. Am. Chem. Soc*. 98, 2339–2341. 1976
- Sumi, D. Biological effects of and responses to exposure to electrophilic environmental chemicals. *Journal of Health Science*. 54 (3): 267-272. 2008
- Tolmasquim, MT.; Motta, RS.; La Rovere, EL.; Barata, MML.; Monteiro, AG. Environmental valuation for long-term strategic planning - the case of the Brazilian power sector. *Ecological Economics*. 37 (1): 39-51. 2001
- United Nations Environment Programme (UNEP) – Global Mercury Assessment 2013: sources, emissions, releases and environmental transport. Genebra, Suíça. 2013
- United Nations Environment Programme (UNEP). *Global Mercury Assessment*. Genebra, Suíça. 2002
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). Acesso em 27/11/2013. Disponível em <http://www.epa.gov/hg/exposure.htm>

- United States Environmental Protection Agency (USEPA). Guidance for implementing the January 2001 methylmercury water quality criterion. Office of Water, Washington, DC. 2010
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). Integrated Risk Information System (IRIS). Acesso em 09/09/2014. Disponível em <http://www.epa.gov/iris/subst/0073.htm>
- Vale, CAS.; Teixeira, FA.; Silva, JA. Diagnóstico da reserva extrativista do lago do Cuniã - versão não finalizada. Gestão Integrada Cuniã-Jacundá, Porto Velho. Ministério do Meio Ambiente (MMA) - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), Brasil. 2011
- Valko, M.; Rhodes, CJ.; Moncol, J., Izakovic, M.; Mazura, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 160: 1–40. 2006
- Vasconcellos, M.; Bode, P.; Paletti, G. Determination of mercury and selenium in hair samples of Brazilian Indian populations living in the Amazon region by neutron activation analyses. *Proceedings of the International Symposium on Trace Elements in Humans: New Perspectives*, 3rd, 4-6 October 2001. Athens, Greece. 2001
- Vasconcelos, SML.; Goulart, MOF.; Moura, JBF.; Manfredini, V.; Benfato, MS.; Kubota, LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*. 30 (5): 1323-1338. 2007
- Vega, C.M. Interações mercúrio-selênio: uma abordagem integrada de Avaliação de Exposição ao Mercúrio em populações ribeirinhas no município de Porto Velho, Rondônia. Tese de Doutorado. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio). 2015
- Wasserman, JC.; Amouroux, D.; Wasserman, MAV.; Donard, OFX. Mercury Speciation in sediments of a tropical coastal environment. *Environmental Technology*. 23 (8): 899-910. 2002
- Wasserman, JC.; Hacon, SS.; Wasserman MA. O ciclo do mercúrio no ambiente amazônico. *Mundo e Vida*. 2 (1/2): 46-53. 2001
- World Health Organization (WHO) – Biological Monitoring of Chemical Exposure in the Workplace. Vol 1 e 2. Genebra, Suíça. 1996
- World Health Organization (WHO) – Environmental Health Criteria 1: Mercury. Genebra, Suíça. 1976
- World Health Organization (WHO). Mercury flyer – Exposure to Mercury, 2007

- Xavier, OLP.; Asmus, CIRF.; Tambellini, AT.; Meyer AM.; Câmara, VM. Contribuição para o estabelecimento de níveis de referência para concentração de mercúrio no sangue de crianças na cidade do RJ. *Cadernos de Saúde Coletiva*, Rio de Janeiro. 21 (2):182-187. 2013
- Yagi, K. Simple assay for level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Methods in Molecular Biology*. 108: 101-106. 1998
- Ziech, D.; Franco, R.; Georgakilas, AG; Georgakila, S; Malamou-Mitsi, V.; Schoneveld, O.; Pappa, A.; Panayiotidis, MI. The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development. *Chemico-Biological Interactions*.188: 334-339. 2010

ANEXO I



AVALIAÇÃO DA SAÚDE DAS COMUNIDADES RIBEIRINHAS POTENCIALMENTE EXPOSTAS À CONTAMINAÇÃO POR MERCÚRIO NO RIO MADEIRA

QUESTIONÁRIO INDIVIDUAL INFANTIL – ATÉ 16 ANOS E 11 MESES

SE A ENTREVISTADA JÁ TIVER ENGRAVIDADO, APLICAR O QUESTIONÁRIO ADULTO

CÓDIGO DO QUESTIONÁRIO: _____	DATA DA ENTREVISTA: _____	HORÁRIO DE INÍCIO: _____
CÓDIGO DO ENTREVISTADOR: _____		

NOME COMPLETO DA CRIANÇA: _____		
NOME COMPLETO DO RESPONSÁVEL: _____		
GRAU DE PARENTESCO DO RESPONSÁVEL: _____		
ENDEREÇO COMPLETO DA CRIANÇA: _____		
COMUNIDADE: _____		
TELEFONE PARA CONTATO: _____		
COORDENADAS DA CASA – GPS	LAT: _____	LONG: _____
COLETA DE CABELO () REALIZADA () NÃO REALIZADA		

SEMPRE MENCIONAR O NOME DA CRIANÇA EM VEZ DE [NOME]

MÓDULO DE IDENTIFICAÇÃO:				
1	Sexo:	1. () Masculino	2. () Feminino	
2	Data de Nascimento:	_____/_____/_____		Idade: _____
3	Cor:	1. () Branca	2. () Negra	3. () Parda 4. () Outra
4	Série Escolar:	1. () 1º ano 2. () 2º ano 3. () 3º ano 4. () 4º ano 5. () 5º ano	6. () 6º ano 7. () 7º ano 8. () 8º ano 9. () 9º ano 10. () 1º ano do Ensino Médio	11. () 2º ano do Ensino Médio 12. () 3º ano do Ensino Médio 13. () Não Estuda 14. () Parou de Estudar. Em qual série? _____

5	O pai e a mãe do [NOME] possuem algum grau de parentesco?	1. () Sim, Qual? _____	2. () Não			
6	Quanto tempo você mora na Reserva de Cunha ? (Especificar se o entrevistado se refere à sua própria idade ou à duração em anos)	1. () Desde os _____ anos		2. () Há _____ anos		
MÓDULO DE AVALIAÇÃO DA SAÚDE						
7	O(a) [NOME] já foi vacinado?	1. () Sim		2. () Não Se NÃO, vá para a pergunta 9		
8	Quais vacinas tomou? (Só preencher com o cartão de vacinação da criança.)	a) BCG	1. () Sim	2. () Não		
		b) Parasílica Infantil	1. () Sim	2. () Não		
		c) Difteria, Tetano e Coqueluxe	1. () Sim	2. () Não		
		d) Sarampo, Rubéola e Caxumba	1. () Sim	2. () Não		
		e) Meningite	1. () Sim	2. () Não		
		f) Febre Amarela	1. () Sim	2. () Não		
		g) Hepatite B	1. () Sim	2. () Não		
		h) Rotavírus	1. () Sim	2. () Não		
		i) Outra?	1. () Sim	2. () Não		
9	Como o(a) Sr (a) avalia a saúde do seu filho?	1. () Muito Boa	2. () Boa	3. () Regular	4. () Ruim 5. () Muito Ruim	
10	A Sra. fez o teste do pezinho em [NOME] quando ele(a) nasceu?	1. () Sim		2. () Não		
11	Com quantos quilos [NOME] nasceu?	____, ____ kg				
12	Que doenças seu filho já teve?				Ele (a) recebeu algum tratamento médico para esta doença?	
		1. () Doença da coluna ou costas			1. () Sim 2. () Não	
		2. () Micose ou algum problema de pele			1. () Sim 2. () Não	
		3. () Leishmaniose			1. () Sim 2. () Não	
		4. () Bronquite			1. () Sim 2. () Não	
		5. () Malária			1. () Sim 2. () Não	
		6. () Lepra ou hanseníase			1. () Sim 2. () Não	
		7. () AIDS / HIV			1. () Sim 2. () Não	
		8. () Febre Amarela			1. () Sim 2. () Não	
		9. () Toxoplasmose			1. () Sim 2. () Não	
		10. () Caxumba			1. () Sim 2. () Não	
		11. () Sarampo			1. () Sim 2. () Não	
		12. () Rubéola			1. () Sim 2. () Não	
		13. () Paralisia Infantil / Poliomielite			1. () Sim 2. () Não	
		14. () Epilepsia			1. () Sim 2. () Não	
		15. () Catapora			1. () Sim 2. () Não	
		16. () Coqueluche			1. () Sim 2. () Não	
		17. () Meningite			1. () Sim 2. () Não	
		18. () Hepatite A			1. () Sim 2. () Não	
		19. () Hepatite B			1. () Sim 2. () Não	
		20. () Dengue			1. () Sim 2. () Não	
		21. () Tuberculose			1. () Sim 2. () Não	
		22. () Hipotireoidismo			1. () Sim 2. () Não	
		23. () Alergia			1. () Sim 2. () Não	
24. () Outro? _____			1. () Sim 2. () Não			
13	Qual o posto de saúde ou hospital que você leva [NOME] quando necessário?	1. () Em Porto Velho. Qual? _____		2. () Fora de Porto Velho. Qual? _____		

14	Algum médico já falou que o desenvolvimento mental de [NOME] é anormal?	1. () Sim	2. () Não Se NÃO, vá para 16.
15	A Sra. fez algum exame para confirmar?	1. () Sim Qual? _____	2. () Não
16	[NOME] possui alguma deficiência física?	1. () Sim Qual? _____	2. () Não
17	Seu filho faz ou já fez tratamento para:	a) Diabetes? 1. () Sim	2. () Não
		b) Tuberculose? 1. () Sim	2. () Não
		c) Hanseníase? 1. () Sim	2. () Não
		d) Problemas mentais? 1. () Sim	2. () Não
		e) Problema de Nervos? 1. () Sim	2. () Não
18	Algum médico já disse que [NOME] tem problema de coração?	1. () Sim	2. () Não
19	[NOME] já teve sua pressão arterial medida?	1. () Sim	2. () Não
MÓDULO DE TABAGISMO NO DOMICÍLIO			
Se a entrevistada for a Mãe, vá para a pergunta 20. Caso contrário, vá para o Módulo Neurológico.			
20	A Sra. fumou durante a gravidez do / da [NOME] ?	1. () Sim	2. () Não Se NÃO, vá para o próximo Módulo. 99. () NS / NR Se NS / NR, vá para o próximo Módulo.
21	Quantos cigarros por dia a Sra. fumava durante a gravidez do / da [NOME] ?	1. _____	99. () NS / NR
22	Durante a gravidez, em quais meses a Sra. fumou?	a. Primeiro: 1. () Sim	2. () Não 99. () NS / NR
		b. Segundo: 1. () Sim	2. () Não 99. () NS / NR
		c. Terceiro: 1. () Sim	2. () Não 99. () NS / NR
		d. Quarto: 1. () Sim	2. () Não 99. () NS / NR
		e. Quinto: 1. () Sim	2. () Não 99. () NS / NR
		f. Sexto: 1. () Sim	2. () Não 99. () NS / NR
		g. Sétimo: 1. () Sim	2. () Não 99. () NS / NR
		h. Oitavo: 1. () Sim	2. () Não 99. () NS / NR
		i. Nono: 1. () Sim	2. () Não 99. () NS / NR
MÓDULO NEUROLÓGICO			
23	Nos últimos 12 meses [NOME] teve algum problema dos nervos?	1. () Sim Qual? _____	2. () Não
24	Quem lhe disse que [NOME] tinha problemas de nervos?	1. () Médico 2. () Enfermeiro 3. () Vizinhos	4. () Amigos 5. () Outros
25	[NOME] tem dificuldade em	1. Se concentrar? 1. () Sim	2. () Não
		2. Enxergar? 1. () Sim	2. () Não
		3. De memória? 1. () Sim	2. () Não
		4. Diferenciar as cores? 1. () Sim	2. () Não
		5. Caminhar? 1. () Sim	2. () Não
		6. Remar? 1. () Sim	2. () Não
		7. Pescar? 1. () Sim	2. () Não
26	[NOME] usa óculos?	1. () Sim	2. () Não
27	[NOME] é uma criança mais agitada do que o normal?	1. () Sim	2. () Não
28	[NOME] tem dificuldades para ter reflexos rápidos, como por exemplo, tirar a mão rapidamente quando encosta em algo muito quente?	1. () Sim	2. () Não
29	Você considera [NOME] uma criança irritada?	1. () Sim	2. () Não
30	Você considera [NOME] uma criança paciente?	1. () Sim	2. () Não

3 1	Seu filho(a) tem algum problema de equilíbrio ou cai com frequência?	1. () Sim	2. () Não				
3 2	Seu filho (a) já repetiu de ano na escola? Em qual série e quantas vezes? (Marcar nos parentes o número de vezes que a série escolar foi repetida.)	1. () 1º ano 2. () 2º ano 3. () 3º ano 4. () 4º ano 5. () 5º ano	6. () 6º ano 7. () 7º ano 8. () 8º ano 9. () 9º ano 10. () 1ª série EM				
3 3	A professora de [NOME] já disse que ele (a) havia dificuldade de concentração?	1. () Sim	2. () Não				
3 4	A professora de [NOME] já disse que ele (a) havia dificuldade de memorização?	1. () Sim	2. () Não				
3 5	Quantas horas por dia em média, [NOME] fica assistindo televisão?	1. () _____ horas por dia	2. () Não tenho televisão em casa				
MÓDULO DE NUTRIÇÃO							
3 6	[NOME] foi amamentado?	1. () Sim	2. () Não Se NÃO, vá para a 38.				
3 7	Até qual idade [NOME] foi amamentado?	a) _____ meses	b) _____ anos				
3 8	Em geral, quantas vezes por semana o(a) Sr(a) consome os seguintes alimentos?		Nunca	1 vez a cada 15 dias	De 1 a 3 vezes por semana	Mais do que 3 vezes por semana	Diariamente
		Peixe –					
		Feijão					
		Arroz					
		Frango					
		Ovos					
		Carne de boi ou de porco					
		Cereais (milho, soja, trigo)					
		Verduras ou legumes (batata, espinafre, alface, cenoura)					
		Frutas					
		Mandioca					
		Leite, manteiga, iogurte ou queijo					
		Castanha do Pará					
Enlatados De que tipo?							
3 9	Quais frutas o/a[NOME] mais come?	1) _____ 2) _____					
4 0	Qual(is) peixe(s) [NOME] mais come?	1) _____ 2) _____					
4 1	Você comeu peixe ontem? Se sim, qual peixe?	1. () Sim _____	2. () Não				
4 2	Na última semana quantas vezes você comeu peixe?	_____ vezes por semana.					
4 3	Qual quantidade de peixe ingerida na última refeição?	_____					
MÓDULO DE ASMA							
4 4	Alguma vez na vida seu filho(a) teve chiado no peito (sibilos)?	1-() Sim	2-() Não				
4 5	Nos últimos 12 meses seu filho(a) teve chiado no peito (sibilos) ?	1-() Sim	2-() Não				

4 6	Nos últimos 12 meses quantas crises de chiado no peito (sibilos) seu filho(a) teve?	1-() Nenhuma 2-() 1-3	3-() 4-12 4-() + que 12
4 7	Nos últimos 12 meses com que frequência seu filho(a) teve o sono perturbado por chiado no peito?	1-() Nunca acordou com chiado no peito 2-() Menos de 1 noite por semana	3-() 1 ou mais noites por semana
4 8	Nos últimos 12 meses o chiado do seu filho(a) foi tão forte a ponto de impedir que ele(a) conseguisse dizer mais de 2 palavras entre cada respiração?	1-() Sim	2-() Não
4 9	Alguma vez seu filho(a) teve asma?	1-() Sim	2-() Não
5 0	Nos últimos 12 meses seu filho(a) teve chiado no peito após exercício físico?	1-() Sim	2-() Não
5 1	Nos últimos 12 meses seu filho(a) teve tosse seca à noite sem estar gripado ou com infecção respiratória	1-() Sim	2-() Não
MÓDULO DE EXPOSIÇÃO			
5 2	Seu filho (a) é alérgico (a) a algum produto de limpeza?	1-() Sim	2-() Não (Se não, pular para Q54)
5 3	Qual (is)?		
5 4	Seu filho (a) é alérgico (a) a algum produto químico?	1-() Sim	2-() Não (Se não, pular para Q56)
5 5	Qual (is)?		
5 6	Sua casa fica numa região próxima a: (pode marcar mais de 1 opção)	1-() Rio Madeira 2-() Área de queimada	3-() Área de agricultura 4-() Outra Qual? _____
5 7	Próximo a sua casa ocorre queimadas com fumaça no ambiente?	1-() Sim	2-() Não (Se não, pular para Q59)
5 8	Qual a razão da queimada? (pode marcar mais de 1 opção)	1-() Queima de lixo, Quantos metros da casa? _____ 2-() Queima da floresta, Quantos metros da casa? _____ 3-() Queima de pasto, Quantos metros da casa? _____ 4-() Queima de vegetação do quintal, Quantos metros da casa? _____ 5-() Outros? _____, Quantos metros da casa? _____	
5 9	A família prepara farinha em casa?	1-() Sim	2-() Não
6 0	Você verifica alguma mudança na saúde do (a) [NOME] com a mudança do tempo/clima?	1-() Sim	2-() Não (Se não, pular para Q62)
6 1	Em que mês é mais freqüente a mudança?	_____	() Não sabe
6 2	Você observa alguma alteração na saúde do (a) [NOME] no período da seca (quando o rio fica seco)?	1-() Sim	2-() Não
DATA FINAL DA ENTREVISTA: ___/___/___		HORÁRIO DE TÉRMINO: ___:___ HS	

ENCERRE A ENTREVISTA E AGRADEÇA A PARTICIPAÇÃO
Existe alguma observação a ser feita por parte do entrevistador?
