



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*  
PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE

ABORDAGEM METALOPROTEÔMICA DO MERCÚRIO EM LEITE MATERNO  
DE COMUNIDADES DA BACIA AMAZÔNICA - BRASIL

MARIA ROSA CERBINO

GOIÂNIA - GO  
2016



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*  
PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE

ABORDAGEM METALOPROTEÔMICA DO MERCÚRIO EM LEITE MATERNO  
DE COMUNIDADES DA BACIA AMAZÔNICA - BRASIL

ACADÊMICA: MARIA ROSA CERBINO  
ORIENTADOR: DR. NELSON JORGE DA SILVA JR.  
CO-ORIENTADOR: DR. LUIZ FABRÍCIO ZARA

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde, da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, como requisito para obtenção do título de Mestre.

GOIÂNIA - GO  
2016

C411a Cerbino, Maria Rosa  
Abordagem Metaloproteômica do em leite materno de  
comunidades da Bacia Amazônica-Brasil [manuscrito]  
/ Maria Rosa Cerbino.-- 2016.  
73 f. ; 11. ; 30 cm

Texto em português com resumo em inglês.  
Dissertação (Mestrado) -- Pontifícia Universidade  
Católica de Goiás, Programa de Pós-Graduação STRICTO  
SENSU em Ciências Ambientais e Saúde, Goiânia, 2016

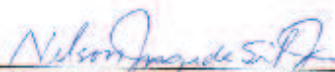
Inclui referências

I. Mercúrio - Toxicologia - Amazônia. 2. Qualidade  
de vida - Amazônia. I. Silva Júnior, Nelson Jorge da.  
II. Pontifícia Universidade Católica de Goiás. III.  
Título.

CDU: 615.9:546.49(043)



DISSERTAÇÃO DO MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE  
DEFENDIDA EM 12 DE ABRIL DE 2016 E CONSIDERADA  
APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA:

1)   
Prof. Dr. Nelson Jorge da Silva Jr. / PUC Goiás (Presidente)

2)   
Prof. Dra. Valéria de Oliveira / UFG (Membro Externo)

3)   
Prof. Dr. Julio Cesar Rubin de Rubin / PUC Goiás (Membro)

4)   
Prof. Dr. Cesar Augusto Sam Tiago Vilarrova-Costa / PUC Goiás (Suplente)

*Dedico este trabalho aos grandes amores da minha vida, Roselío, Frederico, Heitor e Isabella, meus maiores colaboradores. Não poderia deixar de dedicar também a minha amada mãe, Cecília e ao meu amado pai Giovanni (in memoriam), pelo simples fato de me darem a vida. Aos meus queridos irmãos, Rosilena e Giovanni, por sempre estarem por perto.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar comigo em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis.

Agradeço incansavelmente ao meu marido Roselio pelo carinho e incentivo.

Agradeço aos meus filhos pela compreensão e me perdoem os momentos de ausência.

Aos anjos que Deus colocou no meu caminho durante esta jornada, Tânia e Willyane.

Aos colegas do laboratório, Cilene Padilha, José Cavalcante, Alis Bittarello, João Vitor, Bruna Cavecci e Vânia, pelo apoio em minhas análises, e por tornar os meus dias em Botucatu mais fáceis.

Agradeço, em especial, algumas pessoas, pela fundamental participação na elaboração deste trabalho:

Ao Professor Dr. Nelson Jorge da Silva Júnior, meu orientador; pela confiança e por acreditar em mim, mais que eu mesma. Obrigada por tudo, principalmente pelo Roselio.

Ao professor Dr. Luiz Fabrício Zara, co-orientador desta dissertação; pela oportunidade de estar neste projeto.

Ao professor Dr. Pedro de Magalhães Padilha, por sempre me receber em seu laboratório com tanta boa vontade, paciência e disponibilidade. Saiba que se tornou para mim um exemplo de docente, um GRANDE professor.

À Venturo Consultoria Ambiental, pelo apoio nos trabalhos de campo e análises laboratoriais.

Ao Programa de P&D da Energia Sustentável do Brasil (ANEEL/PD-6631-0001/2012), pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a conclusão deste trabalho. Saibam que foram fundamentais para a realização deste sonho.

*“Ninguém caminha sem aprender a caminhar, sem aprender a fazer o caminho caminhando, refazendo e retocando o sonho pelo qual se pôs a caminhar.”*

*Paulo Freire*

## RESUMO

O mercúrio é um elemento potencialmente tóxico com ampla distribuição no ambiente amazônico. Este metal é perigoso e responsável por contaminações ambientais e intoxicações humanas, já que é capaz de biomagnificar e bioacumular através das cadeias alimentares, tornando-se assim a principal via de exposição às comunidades amazônicas ribeirinhas do metilmercúrio, cuja dieta é baseada em peixes. Sendo assim estudos relacionados à toxicidade do mercúrio são de fundamental importância para a saúde e a qualidade de vida das comunidades amazônicas. Este estudo buscou detectar e avaliar possíveis biomarcadores proteicos da toxicidade do mercúrio em amostras de leite materno coletadas de populações ribeirinhas do rio Madeira e do rio Negro, na Amazônia brasileira. Inicialmente, determinou-se mercúrio total no cabelo das lactantes para identificar quais estavam contaminadas com mercúrio, em seguida obteve-se o proteoma das amostras de leite por eletroforese bidimensional (2D-PAGE) após precipitação das proteínas em meio acetônico. Nos *spots* proteicos obtidos no processo de fracionamento das proteínas, nas amostras leite, foram feitas determinações de mercúrio por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS), onde os resultados mostraram que o mercúrio se encontra ligado em proteínas de massa molecular na faixa de 14-26 kDa. A determinação da concentração de mercúrio total por GFAAS foi feita também no leite *in natura*, leite liofilizado e nos *pellets* proteicos, com o objetivo de se fazer um balanço de massa de mercúrio em relação à concentração deste elemento no leite e *pellets*. As medidas de balanço de massa permitiram observar que, em relação às amostras de leite do rio Madeira, cerca de 85 a 95% do mercúrio presente no leite liofilizado encontra-se na fração proteica. Em relação às lactantes do rio Negro, cerca de 50% do mercúrio total está ligado na fração proteica e a diferença de 51% pode estar ligado na fração lipídica. Contudo, mais estudos nesta linha de pesquisa devem ser desenvolvidos, para que se possam ter conclusões mais robustas.

**Palavras-chave:** Mercúrio; metalômica; toxicidade; 2D-PAGE; GFAAS.



## ABSTRACT

Mercury is a potentially toxic element with a wide distribution on the Amazonian environment. This metal is dangerous and responsible for environmental contaminations and human intoxications as it is capable to biomagnifications and bioaccumulate throughout the food chains becoming the main way of exposing the riverine Amazonian communities to methylmercury to whom the main diet is fish. Therefore, studies related to mercury toxicity are of fundamental importance to health and life quality of the Amazonian communities. This study aimed to detect and evaluate possible proteic biomarkers of mercury toxicity in samples of human milk collected in riverine populations of Madeira and Negro rivers in the Brazilian Amazon. Initially total mercury was determined in the hair of breast feeding women to identify who were contaminated with mercury followed by the obtaining of the proteome of milk samples by two-dimensional electrophoresis (2D PAGE) after precipitation of proteins in half acetone. On the proteic spots obtained in the process of protein fractionation of milk samples, detection of mercury was carried out by atomic absorption spectrometry in graphite furnace(GFAAS), where the results showed that mercury was bonded in proteins of molecular weight around 14-26 kDa. The concentration determination of total mercury by GFAAS was also carried out with milk *in natura*, lyophilized milk and the proteic pellets aiming a mass balance of mercury related to the concentration of this element on milk and pellets. The measurements of mass balance permitted to observe that, in relation to the milk samples from Madeira River, about 85 to 95%of the mercury present in the lyophilized milk is on the proteic fraction. In relation to the breastfeeding women of the Negro River, about 50% of the total mercury is bound in the proteic fraction and the difference of 51% might be bound to the lipidic fraction. However, more studies in this line of research need to be pursued to achieve more robust conclusions.

**Key words:** Mercury; metallomics; toxicity; 2D-PAGE; GFAAS.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	xi
LISTA DE TABELAS .....	xiv
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO .....	3
2.1. Mercúrio (Hg) .....	3
2.2. O mercúrio na Amazônia.....	5
2.3. Toxicocinética Hg .....	7
2.4. Mercúrio em leite materno.....	9
2.5. Características gerais do leite materno .....	12
2.6. Proteômica .....	14
2.7. Metalômica .....	15
2.8. Principais técnicas utilizadas em estudos metalômicos .....	17
2.8.1. Eletroforese bidimensional .....	17
2.8.2. Espectrometria de absorção atômica .....	18
3. OBJETIVOS .....	20
3.1. Objetivo Geral .....	20
3.2. Objetivos Específicos .....	20

4. MATERIAL E MÉTODOS .....	21
4.1. Pontos de Coleta .....	21
4.1.1. Região do Rio Madeira - Rondônia .....	21
4.1.2. Região do Rio Negro - Amazonas .....	22
4.2. Coletas das Amostras Biológicas .....	24
4.2.1. Coleta de Cabelo .....	24
4.2.2. Coleta de Leite .....	25
4.3. Reagentes e Soluções .....	25
4.4. Equipamentos e Acessórios .....	27
4.5. Processamento das amostras de cabelo .....	28
4.6. Processamento das amostras de leite .....	28
4.7. Quantificação de Hg total nas amostras de cabelo .....	29
4.8. Estratégias de precipitação das proteínas das amostras de leite materno	29
4.9. Determinação de proteínas totais .....	30
4.10. Separação das proteínas por eletroforese bidimensional (2D-PAGE) ....	31
4.11. Determinação de Hg total nas amostras de leite materno, nos <i>pellets</i> e <i>spots</i> proteicos .....	33
5. RESULTADOS .....	35
5.1. Determinação Hg total nas amostras de cabelo .....	35
5.2. Determinação da concentração de proteína total nos extratos dos <i>pellets</i> proteicos .....	40
5.3. Fracionamento das proteínas por 2D-PAGE .....	40

5.4. Determinação de Hg total nas amostras de leite materno, nos <i>pellets</i> e <i>spots</i> proteicos .....	47
6. DISCUSSÃO .....	54
6.1. Determinação de Hg total nas amostras de cabelo.....	54
6.2. Fracionamento das proteínas por 2D PAGE .....	55
6.3. Determinação de Hg total nas amostras de leite materno, nos <i>pellets</i> e <i>spots</i> proteicos .....	56
7. CONCLUSÕES .....	60
8. REFERÊNCIAS.....	61
ANEXO I - AUXÍLIO FINANCEIRO .....	I
ANEXO II - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNB - PLANALTINA - DF. ....	II

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo mercúrio no ambiente amazônico (WASSEMAN <i>et al.</i> , 2001).....	6
Figura 2. Pontos de coleta de leite e cabelo.....	21
Figura 3. Coleta de amostra de cabelo de lactante ribeirinha. ....	25
Figura 4. Recebimento de amostra de leite.....	25
Figura 5. Curva analítica preparada com concentrações de 10 a 100 g l <sup>-1</sup> de proteína a partir de solução estoque de albumina a 200 g l <sup>-1</sup> .....	31
Figura 6. Distribuição das concentrações de HgT (µg g <sup>-1</sup> ) nas amostras de cabelo das lactantes das comunidades do estudo (alto rio Madeira, alto rio Negro e Goiânia). ....	35
Figura 7. Correlação entre as concentrações de HgT (µg g <sup>-1</sup> ) no cabelo das lactantes em estudo e a frequência do consumo de peixe (Spearman, p < 0,133). ....	36
Figura 8. Ingestão de proteínas animal por lactante das comunidades do alto rio Madeira – Nova Mutum, Abunã e Fortaleza do Abunã.....	38
Figura 9. Ingestão de proteínas animal por lactante do alto rio Negro - comunidade de Livramento. ....	38
Figura 10. Ingestão de proteínas animal por lactante do alto rio Negro - comunidade de Santa Isabel.....	39
Figura 11. Ingestão de proteínas animal por lactante da cidade de Goiânia – grupo Controle.....	39
Figura 12. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da lactante controle 1 (L <sub>c1</sub> ). Condições experimentais: concentração do gel de 12,50 (m/v), gradiente de pH 3 -10, padrão de massa molecular de 14 - 97 kDa, tempo total de corrida - 10 horas.....	41

- Figura 13. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da lactante controle 2 ( $L_{c2}$ ). Condições experimentais: concentração do gel de 12,50 (m/v), gradiente de pH 3 -10, padrão de massa molecular de 14 - 97 kDa, tempo total de corrida - 10 horas..... 41
- Figura 14. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da lactante controle 3 ( $L_{c3}$ ). Condições experimentais: concentração do gel de 12,50 (m/v), gradiente de pH 3 -10, padrão de massa molecular de 14 - 97 kDa, tempo total de corrida - 10 horas..... 42
- Figura 15. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da lactante 1 do rio madeira ( $L_{rm1}$ ). Condições experimentais: concentração do gel de 12,50 (m/v), gradiente de pH3 -10, padrão de massa molecular de 14 - 97 kDa, tempo total de corrida - 10 horas. .... 42
- Figura 16. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da lactante 2 do rio madeira ( $L_{rm2}$ ). Condições experimentais: concentração do gel de 12,50 (m/v), gradiente de pH 3 -10, padrão de massa molecular de 14 - 97 kDa, tempo total de corrida - 10 horas. .... 43
- Figura 17. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da lactante 3 do rio madeira ( $L_{rm3}$ ). Condições experimentais: concentração do gel de 12,50 (m/v), gradiente de pH 3 -10, padrão de massa molecular de 14 - 97 kDa, tempo total de corrida - 10 horas. .... 43
- Figura 18. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da lactante 4 do rio madeira ( $L_{rm4}$ ). Condições experimentais: concentração do gel de 12,50 (m/v), gradiente de pH 3 -10, padrão de massa molecular de 14 - 97 kDa, tempo total de corrida - 10 horas. .... 44
- Figura 19. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da lactante 5 do rio madeira ( $L_{rm5}$ ). Condições experimentais: concentração do gel de 12,50 (m/v), gradiente de pH 3 -10, padrão de massa molecular de 14 - 97 kDa, tempo total de corrida - 10 horas. .... 44

Figura 20. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da lactante 6 do rio madeira ( $L_{rm6}$ ). Condições experimentais: concentração do gel de 12,50 (m/v), gradiente de pH 3 -10, padrão de massa molecular de 14 - 97 kDa, tempo total de corrida - 10 horas. .... 45

Figura 21. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da lactante 1 do rio negro ( $L_{rn1}$ ). Condições experimentais: concentração do gel de 12,50 (m/v), gradiente de pH 3 -10, padrão de massa molecular de 14 - 97 kDa, tempo total de corrida - 10 horas..... 45

Figura 22. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da lactante 2 do rio negro ( $L_{rn2}$ ). Condições experimentais: concentração do gel de 12,50 (m/v), gradiente de pH 3 -10, padrão de massa molecular de 14 - 97 kDa, tempo total de corrida - 10 horas..... 46

Figura 23. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da lactante 3 do rio negro ( $L_{rn3}$ ). Condições experimentais: concentração do gel de 12,50 (m/v), gradiente de pH 3 -10, padrão de massa molecular de 14 - 97 kDa, tempo total de corrida - 10 horas..... 46

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Localização das comunidades e distribuição das lactantes. ....	24
Tabela 2. Concentrações de HgT ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) em amostras de cabelo de lactantes residentes em comunidades do rio Madeira (Nova Mutum Paraná, Abunã, Fortaleza do Abunã) e rio Negro (Livramento e Santa Isabel) e no município de Goiânia.....	37
Tabela 3. Resultados obtidos da análise de imagem com número médio de <i>spots</i> e correlação entre as repetições (n=3) dos géis dos <i>pellets</i> proteicos das amostras de leite das lactantes do controle ( $I_c$ ), do rio Madeira ( $I_m$ ) e do rio Negro ( $I_m$ ).....	47
Tabela 4. Resultados obtidos na determinação de mercúrio total nas amostras de leite materno (amostras <i>in natura</i> e liofilizadas) e <i>pellets</i> proteicos. ....	48
Tabela 5. Resultados obtidos na determinação de mercúrio total nos <i>spots</i> proteicos obtidos no processo de fracionamento das proteínas das amostras de leite materno da lactante 1 do rio Madeira por 2D-PAGE. ....	48
Tabela 6. Resultados obtidos na determinação de mercúrio total nos <i>spots</i> proteicos obtidos no processo de fracionamento das proteínas das amostras de leite materno da lactante 2 do rio Madeira por 2D-PAGE. ....	49
Tabela 7. Resultados obtidos na determinação de mercúrio total nos <i>spots</i> proteicos obtidos no processo de fracionamento das proteínas das amostras de leite materno da lactante 3 do rio Madeira por 2D-PAGE. ....	49
Tabela 8. Resultados obtidos na determinação de mercúrio total nos <i>spots</i> proteicos obtidos no processo de fracionamento das proteínas das amostras de leite materno da lactante 4 do rio Madeira por 2D-PAGE. ....	50
Tabela 9. Resultados obtidos na determinação de mercúrio total nos <i>spots</i> proteicos obtidos no processo de fracionamento das proteínas das amostras de leite materno da lactante 5 do rio Madeira por 2D-PAGE. ....	50



Tabela 10. Resultados obtidos na determinação de mercúrio total nos <i>spots</i> proteicos obtidos no processo de fracionamento das proteínas das amostras de leite materno da lactante 6 do rio Madeira por 2D-PAGE. ....	51
Tabela 11. Resultados obtidos na determinação de mercúrio total nos <i>spots</i> proteicos obtidos no processo de fracionamento das proteínas das amostras de leite materno da lactante 1 do rio Negro por 2D-PAGE.....	51
Tabela 12. Resultados obtidos na determinação de mercúrio total nos <i>spots</i> proteicos obtidos no processo de fracionamento das proteínas das amostras de leite materno da lactante 2 do rio Negro por 2D-PAGE.....	52
Tabela 13. Resultados obtidos na determinação de mercúrio total nos <i>spots</i> proteicos obtidos no processo de fracionamento das proteínas das amostras de leite materno da lactante 3 do rio Negro por 2D-PAGE.....	52
Tabela 14. Resultados obtidos na determinação de mercúrio total nos padrões certificados <i>Protein</i> DORM 4 – NRC e DOLT 4–NRC.....	53

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- AAS** - espectrometria de absorção atômica
- CHAPS** - 3-[(3-colamidopropil)-dimetilamônio]-1-propano sulfonato
- DPR** - Desvio Padrão Relativo
- DTT** - 1,4-ditiotreitol
- ESI/MS/MS** - espectrometria de massas em sequência com ionização por elétrons
- FAAS** - espectrometria de absorção atômica com atomização por chama
- FAO** – Food and Agriculture Organization of the United Nations
- GFAAS** - espectrometria de absorção atômica em forno de grafite
- HCl** - ácido clorídrico
- Hg** - mercúrio
- Hg<sup>+</sup>** - mercúrio iônico ou mercúrico
- Hg<sup>0</sup>** - mercúrio metálico ou elementar
- Hg<sup>2+</sup>** - íon mercurioso
- Hg-I** - mercúrio inorgânico
- HgS** - cinábrio
- HgT** - mercúrio total
- ICPMS** - espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado
- IEF** - isoeletrofocalização
- IgA** - imunoglobulina A
- kDa** - QuiloDalton (1 Da = 1,661 x 10<sup>-24</sup>g)
- LC** - cromatografia líquida
- LOQ** - limite de quantificação
- M** - massa
- mA** - microamperagem
- MALDI/TOF/MS** - espectrometria de massas com ionização e dessorção a laser
- MeHg** – metilmercúrio
- NaOH** - hidróxido de sódio
- nm** - nanômetro
- OMS** - Organização Mundial de Saúde

**PTWI** - Provisional Tolerable Weekly Intake

**pc** - peso corpóreo

**pH** - potencial hidrogeniônico

**pI** - ponto isoelétrico da proteína

**rpm** - rotações por minuto

**SDS** - dodecil-sulfato de sódio

**SNC** - Sistema Nervoso Central

**spot** - ponto 2D de proteínas

**SR-XRF** - fluorescência de raios-X com radiação síncrotron

**TEMED** - N,N',N,N'-tetrametiletilenodiamina

**Tris-HCl** - tris (hidroximetil) aminometano ácido

**UHE** - Usina Hidrelétrica

**UV** - ultravioleta

**V** - voltagem

**v** - volume

**v/v** - percentagem volumétrica/fração volumétrica

**Vh** - volt-hora

**WHO** - World Health Organization

**μL** - microlitro

**μg** - micrograma

**°C** - Grau Celsius

**2D-PAGE** - eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida

**DORM - 4NRC** -Fish protein certified reference material for trace metals -  
National Research Council

**DOLT - 4NRC**-Dogfish liver certified reference material for trace metals -  
National Research Council

## 1. INTRODUÇÃO

A política de ocupação da Amazônia brasileira, iniciada nos anos 70, foi marcada por grandes desmatamentos, os quais foram agravados a partir do século XXI. Graves desequilíbrios ambientais foram causados pela ocupação da floresta por atividades como a exploração mineral, projetos agropecuários e madeireiros, construção de estradas e hidrelétricas e a exploração de outros recursos naturais (BASTOS & LACERDA, 2004; LACERDA & MALM, 2008). De modo geral o resultado deste tipo de degradação ambiental inclui a liberação e remobilização de substâncias tóxicas para o ambiente e consequente contaminação da biota e dos seres humanos.

Diferentes atividades antrópicas liberam metais para os corpos d'água na Amazônia, dentre os quais se destaca o mercúrio, usado também no processo da amalgamação do ouro. Nas duas últimas décadas durante a corrida do ouro a bacia amazônica recebeu em seus rios e atmosfera, grandes quantidades deste poluente e por esse motivo as altas concentrações de mercúrio encontradas no ecossistema amazônico foram atribuídas à atividade de mineração do ouro (LACERDA, 1995; GALVÃO *et al.*, 2008).

Porém, de acordo com alguns pesquisadores, os solos amazônicos são naturalmente ricos em mercúrio (Hg), e a principal via deste metal para os sistemas aquáticos (LACERDA & MALM, 2008; FADINI & JARDIM, 2001). O mercúrio é considerado um elemento ubíquo, que ocorre naturalmente em toda a crosta terrestre, ou seja, um poluente global (SANTOS & FRANCÉS *et al.*, 2011; RANDOLL & CHATTOPADHYAY, 2013). Em um universo de milhões de substâncias encontradas naturalmente no ambiente, o Hg é uma das substâncias mais tóxicas, sendo responsável por graves intoxicações no ser humano. Dependendo da sua forma química pode causar danos sérios e até irreversíveis no sistema urinário, no sistema respiratório, no sistema imunológico, no sistema reprodutor e no sistema nervoso central (FARINA *et al.*, 2013; FAIAL *et al.*, 2014).

Durante o ciclo biogeoquímico do mercúrio, através da participação de microorganismo, no meio aquático, este metal pode ser bioacumulado nos seres vivos e se biomagnificar ao longo das cadeias tróficas (PATRY *et*

*al.*,2013). Vários estudos indicam altas concentrações de mercúrio em peixes amazônicos, o que expõe essa população a este elemento tóxico, já que o peixe é a principal fonte de alimento para as comunidades ribeirinhas desta região (FAIAL *et al.*, 2014). Considerando que o leite materno é uma via de excreção dos mamíferos, o mesmo pode conter tóxicos, principalmente de origem dietética a que a mãe tenha sido exposta. Assim os lactentes podem ser submetidos aos efeitos deletérios e neurotóxicos do mercúrio e serem severamente prejudicados, uma vez que se encontra em diferentes fases de desenvolvimento, principalmente o seu cérebro (AL-SALEH *et al.*, 2013; CUNHA *et al.*,2013; MOLINA-VILLALBA *et al.*, 2015). Dessa forma, estudos relacionados à toxicodinâmica do mercúrio são de fundamental importância para a saúde das populações da região Amazônica.

Considerando o exposto, o estudo de metais em sistemas biológicos pode levar a elucidação de possíveis biomarcadores relacionados com a expressão de metaloproteínas associadas ao mercúrio como indicadores prévios de possíveis riscos de contaminação da população amazônica (SANTOS *et al.*, 2015). Considerados campos de pesquisa emergentes a metalômica e a proteômica, combinam a caracterização do proteoma e do metaloma para permitir uma compreensão mais profunda e ampla do equilíbrio, do uso e das funções dos metais, essenciais ou não, nas células e nos sistemas biológicos. A metaloproteômica tornou-se uma ótima ferramenta para o estudo de organismos expostos a metais, pois pode fornecer informações sobre as interações e o transporte destes elementos no organismo em estudo, porém é um campo pouco explorado (YANNONE *et al.*, 2012; GARCIA-SEVILLANO *et al.*, 2014).

Neste contexto, o presente estudo teve como principal objetivo a identificação de possíveis biomarcadores da toxicidade do mercúrio por meio do estudo metaproteômico, em amostras de leite de lactantes residentes em comunidades amazônicas do rio Madeira e do rio Negro.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. Mercúrio (Hg)

O mercúrio é um elemento que ocorre naturalmente na natureza, mobilizado por fontes naturais ou antrópicas. Naturais como erupções vulcânicas, liberação de gases da crosta terrestre ou antrópicas como a queima de combustíveis fósseis e amalgamação de ouro (HSU-KIM *et al.*, 2013).

A utilização do mercúrio e outros metais pelo homem ocorrem pelo fato de serem encontrados na natureza. O mercúrio pode formar compostos orgânicos e inorgânicos, com um processo de purificação simples (CASTILHOS, 2008).

O mercúrio é o único metal líquido a temperatura ambiente e de cor prateada. Assim diziam ter um significado mágico, o que o fez ser chamado de “mensageiro dos deuses” e dominar durante anos o mundo da Alquimia (MICARONI *et al.*, 2000; FARIA, 2003).

O uso da “prata líquida” em cerimônias religiosas foi mencionado por Aristóteles no século 4 a.C. Como preparo externo medicinal foi usado por Hipócrates e os Romanos o usavam em cosméticos (sulfeto de mercúrio) por possuir a cor vermelha. Paracelsus usava o metal em tratamentos contra vermes, piolhos e sífilis. Já no período pré-industrial foi usado principalmente para a extração e purificação do ouro (ALMEIDA, 2005).

O nome e símbolo deste elemento são provenientes da palavra hidrargírio como os romanos o chamavam, palavra derivada do latim *hydrargyrus* (*hydror*=água e *argyrus*=prata), com o símbolo químico Hg, derivado da mesma palavra (ALMEIDA, 2005; SANTOS *et al.*, 2013).

Geralmente o mercúrio não é encontrado isolado na natureza e sim formando compostos com outros elementos químicos, principalmente o enxofre, junto com o qual forma o minério cinábrio (HgS), o qual possui suas maiores reservas em Almadém na Espanha, cuja exploração do metal se deu há pelo menos dois mil anos atrás (MICARONI *et al.*, 2000).

O elemento Hg é classificado na tabela periódica dos elementos químicos como um metal de transição (FARINA *et al.*, 2013), sendo um bom condutor de eletricidade, de fácil volatilização, não possui cheiro e se mistura

sem dificuldades a outros metais, como a prata e o ouro. As variadas características físico-químicas do mercúrio fizeram com que fosse usado de maneira ampla na indústria: produção eletrolítica de cloro-soda, produção de acetaldeído, polpa de papel, incineradores de lixo, baterias de celulares, termômetros, barômetros, pesticidas, fungicidas, lâmpadas fluorescentes, tintas, resíduos de fornos crematórios e no uso de amálgama dentário. E ainda a partir da queima de combustíveis fósseis (MICARONI *et al.*; 2000; ALMEIDA, 2005). Dessa maneira, produtos que utilizam mercúrio fazem parte também da vida contemporânea, podendo provocar contaminação ambiental.

Reconhece-se que o único metal que causou a morte de pessoas em função da via ambiental é o mercúrio (LACERDA & MALM, 2008). Em 1950 na Baía de Minamata – Japão ocorreu um dos casos de maior repercussão de contaminação por mercúrio. A companhia Chisso Fertilizer lançava metilmercúrio nas águas da Baía, contaminando organismos aquáticos que eram consumidos pela população local. No Iran, Paquistão e Guatemala em 1960, a fonte de contaminação foram sementes de trigo tratadas com fungicidas à base de metilmercúrio. Estas sementes foram usadas para produção de pães, consumidos pela população (CECCATELLI *et al.*, 2010; SYVERSEN *et al.*, 2012). E recentemente a pesquisadora Karen Wetterhan, morreu quando gotas de metilmercúrio atingiram sua pele através de suas luvas de látex (BISINOT & JARDIM, 2004).

A contaminação ambiental por mercúrio é uma realidade desde os primórdios da humanidade. Apesar da redução das fontes pontuais nas últimas duas décadas e de uma legislação ambiental mais rígida, altas concentrações deste metal ainda estão presentes nos compartimentos ambientais (LACERDA & MALM, 2008).

Entretanto segundo dados do Ministério do Meio Ambiente (2011), resíduos da mineração, da indústria e urbanos, equipamentos e materiais contendo Hg somados a persistência deste metal no meio ambiente e aos estoques acumulados nos solos e sedimentos aquáticos, faz do Hg uma ameaça aos ecossistemas naturais e a saúde humana. Devido a sua estabilidade química, esse elemento, pode residir na atmosfera por um longo

tempo (1 a 2 anos) e alcançar regiões distantes das fontes de contaminação, o que o torna hoje um poluente global (YANEZ *et al.*, 2013).

## 2.2. O mercúrio na Amazônia

Com início nos anos 70 a política de ocupação da Amazônia brasileira incentivou e facilitou a instalação de várias atividades liberadoras de mercúrio para o ambiente, de forma lenta e progressiva, incluindo o garimpo de ouro, onde os registros iniciais datam ao século XVIII. Graves desequilíbrios ambientais foram causados pela ocupação da floresta através de projetos agropecuários e madeireiros; pela construção de estradas e hidrelétricas; exploração mineral e outros recursos naturais (BASTOS & LACERDA, 2004).

A lavra garimpeira na Amazônia, até a década de 70, era praticamente artesanal e o mercúrio só era usado na concentração final do minério. A partir desta década, a garimpagem passa a ser mecanizada com a utilização de balsas e dragas, quando o meio aquático é mais prejudicado e rapidamente assoreado. Com a mecanização o mercúrio é usado na caixa concentradora e lançado diretamente nos barrancos, o que aumentou a contaminação (SANTOS, 2013).

A chamada corrida do ouro ocorreu em quase todos os países da bacia Amazônica devido à elevação no preço do ouro, que resultou nas duas últimas décadas do século passado na emissão de grandes quantidades de mercúrio na atmosfera amazônica e nos seus principais rios (LACERDA & MALM, 2008).

Segundo Lacerda (1997), no século XVIII o Brasil foi o maior produtor de ouro do mundo, o que fez o país alcançar uma emissão de mercúrio, para toda a bacia amazônica, de 200 toneladas anuais. Outros países são também considerados grandes emissores de Hg para o ambiente, como a Venezuela, a Guiana, a Colômbia e a Bolívia.

Simultaneamente ao desenvolvimento do garimpo, outras atividades capazes de liberar mercúrio foram gradualmente aumentando, como o desmatamento, a agropecuária, a agricultura do tipo corte e queima, as queimadas e a construção de hidrelétricas (MARQUES *et al.*, 2010). Segundo Almeida *et al.* (2005) a principal causa de lixiviação de metais traço nos solos da Amazônia seria a conversão da floresta tropical em pasto e ou o uso



agrícola. Lacerda & Malm (2008) apontam o desmatamento e a conversão do solo para diferentes usos, desde a década de 1970 aos dias de hoje, como uma das principais causas de remobilização de Hg no ambiente amazônico e disponibilização deste para os corpos aquáticos.

Segundo Figueiredo (2015) o Brasil teria liberado entre os anos de 1550 e 1800, cerca de 400 toneladas de mercúrio para o ambiente, proveniente de fontes antropogênicas, oriundas do garimpo ilegal. Os níveis elevados de mercúrio encontrados nos solos, sedimentos, peixes e seres humanos na região amazônica, a princípio, sempre foram atribuídos a atividade garimpeira de ouro. Entretanto pesquisas recentes encontraram concentrações elevadas deste metal em regiões sem fontes antrópicas de contaminação. Os níveis de Hg são elevados tanto nos compartimentos bióticos quanto nos abióticos de regiões, como as do rio Negro (ROULET *et al.*, 1998; FADINI & JARDIM, 2001). Assim as fontes de mercúrio para a Amazônia são também naturais, os solos desta região são enriquecidos com Hg e principais vias para os sistemas aquáticos (FADINI & JARDIM, 2001; SIQUEIRA *et al.*, 2012).

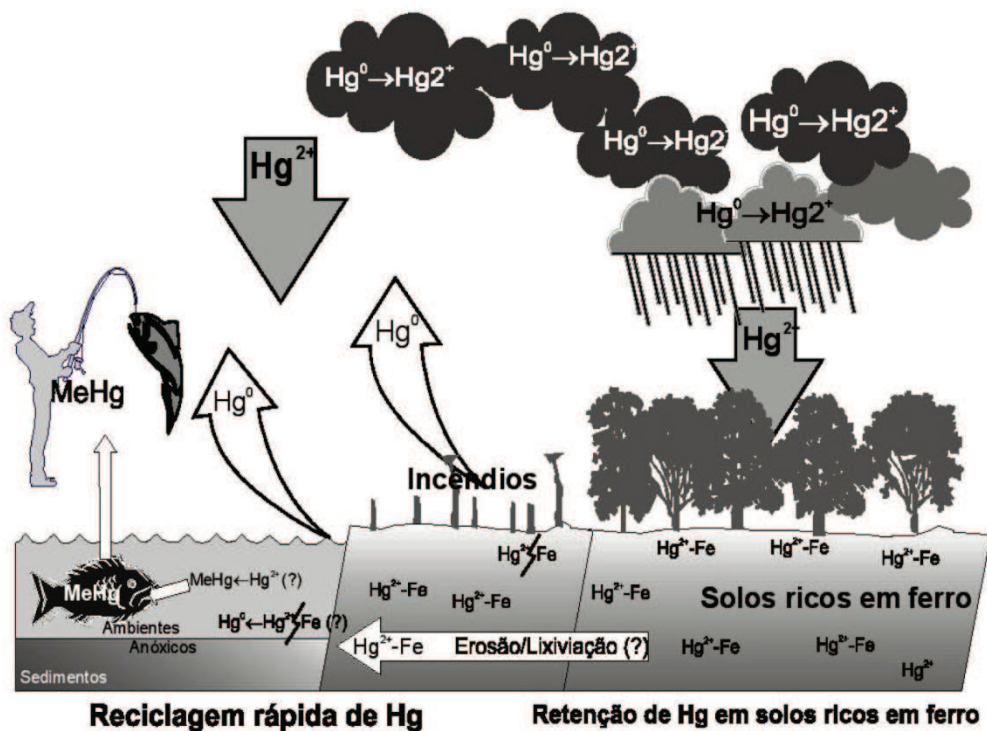


Figura 1. Ciclo mercúrio no ambiente amazônico (WASSEMAN *et al.*, 2001).

Oriundo de fontes naturais ou não o Hg presente no solo pode ser transportado para os corpos aquáticos, onde através do metabolismo de bactérias sulfato redutoras é transformado em metilmercúrio (metilação), forma altamente tóxica do elemento que tende a ficar biodisponível para reações biológicas, químicas e fotoquímicas, podendo ser bioacumulado na cadeia trófica, contaminando os organismos aquáticos, sedimentos e o ser humano (Figura 1) (LACERDA & MALM, 2008; SIQUEIRA *et al.*, 2012). O processo de metilação ocorre no meio aquático favorecido por algumas características ambientais como; anóxia ou subanóxia, pH ácido, concentrações elevadas de matéria orgânica e atividade microbiológica intensa (CECCATELLI *et al.*; 2010; SANTOS - FRANCÉS *et al.*, 2011).

Portanto, a bacia Amazônica apresenta elevados níveis de mercúrio natural, onde o ciclo biogeoquímico deste elemento é determinado principalmente pelas características químicas e físicas da água e a dinâmica do corpo d'água (ALMEIDA *et al.*, 2005).

### 2.3. Toxicocinética Hg

O mercúrio é um elemento químico que existe em três espécies: mercúrio elementar ( $Hg^0$ ), compostos inorgânicos de mercúrio ( $Hg-I$ ) e mercúrio orgânico ( $MeHg$ ). Seus efeitos toxicológicos estão associados à exposição de adultos e crianças a cada espécie química deste elemento (FARINA *et al.*, 2013). A principal via de contaminação humana por  $Hg^0$  se dá através da inalação do vapor, na mineração do ouro. Após ser inalado e absorvido, alcança a corrente sanguínea. A exposição humana ao  $Hg-I$  é principalmente laboral, em atividades relacionadas com a indústria química de produtos médicos, de cosméticos e laboratórios. Esta espécie é tóxica para os sistemas renal, nervoso e reprodutor. Já o  $MeHg$  é apontado como a forma mais tóxica de Hg, o que parece ter relação parcial com sua capacidade de atingir níveis elevados no sistema nervoso central (SNC). O  $MeHg$  é encontrado em peixes e frutos do mar, onde possui a capacidade de se bioacumular e biomagnificar ao longo das cadeias alimentares, podendo atingir o ser humano em níveis elevados (SANTOS-FRANCÉS *et al.*, 2011).

A alta toxicidade do Hg além de decorrente de suas formas químicas também se associa a sua elevada volatilidade e solubilidade na água e em lipídios, características estas que facilitam o seu transporte através das membranas alveolares e da barreira hemato-encefálica (FARIA, 2003).

Mais de 70% do Hg<sup>0</sup> absorvido pelos pulmões é retido no organismo e distribuído pela corrente sanguínea por meio das hemácias. No tecido sanguíneo, sob a ação da enzima catalase sofre oxidação e é transformado nas formas iônicas (Hg<sup>+</sup> e Hg<sup>2+</sup>), as quais se ligam ao grupamento sulfidrílica, possuindo pouca acessibilidade ao cérebro afetando principalmente o córtex renal. (SYVERSEN *et al.*, 2012; FARINA *et al.*, 2013). Cronicamente exposto ao Hg<sup>0</sup> o indivíduo pode desenvolver danos no SNC associados a sintomas como; tremores, delírios, perda de memória e disfunção cognitiva. Já uma exposição aguda pode levar a dispnéia (SYVERSEN *et al.*, 2012). Alguns sintomas podem se assemelham com os da malária como, febre, tosse, fadiga, letargia, diarreia, vômitos, anorexia, tremores, cefaléia, perda da memória, e ansiedade (BASTOS & LACERDA, 2004). O grau de toxicidade do mercúrio elementar parece estar relacionado com sua oxidação e apesar de possuir efeitos toxicológicos em órgãos distintos sua neurotoxicidade é relativamente predominante. As principais vias de excreção desta forma de Hg são as fezes e a urina (FARINA *et al.*, 2013).

O Hg-I também é uma importante fonte de intoxicação em crianças, jovens e adultos, podendo causar alterações neurológicas, cutâneas e no sistema urinário. Em uma intoxicação aguda os órgãos mais afetados são os intestinos e os rins, também podendo estar associado a doenças do sistema imunológico (SYVERSEN *et al.*, 2012).

O MeHg, forma metilada do mercúrio, é um dos maiores agentes citotóxicos para os seres humanos e outros seres vivos (FAIAL *et al.*, 2014). Essa toxicidade se deve a sua capacidade de bioacumulação em organismos aquáticos, através dos quais pode chegar até o homem (BISINOT & JARDIM, 2004; SANTOS-FRANCÉS *et al.*, 2011). O consumo de peixe é considerado a maior porta de entrada do MeHg para a exposição do homem (GROTTO *et al.*, 2010; BASTOS *et al.*, 2008; CHAO *et al.*, 2013; GARCÍA-ESQUINAS *et al.*, 2013). No trato gastrointestinal do ser humano cerca de 90% do MeHg é

absorvido e alcança a corrente sanguínea de onde é distribuído para o corpo. A distribuição corporal ocorrerá principalmente pela ligação do MeHg aos grupos sulfidrila e tióis de proteínas, como a cisteína e glutathione, ou ainda por difusão passiva. Do sangue até outros tecidos do corpo decorre-se um tempo de aproximadamente quatro dias pós exposição (SYVERSEN *et al.*, 2012).

As alterações patológicas celulares relacionados à exposição mercurial (MeHg) estão ligadas diretamente ao sistema nervoso, particularmente nos córtex cerebral e cerebelar, lobos temporais e nervos sensoriais. Os sintomas estão relacionados há estas áreas atingidas, os quais podem ser; ataxia, neurestenia, disartria, distúrbios visuais, tremores musculares, parestesia e em casos mais extremos pode levar a cegueira, coma e morte (BISINOT& JARDIM, 2004; CECCATELLI *et al.*, 2010; KHOURY *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2015). O MeHg pode afetar também o sistema reprodutor, diminuindo a taxa de fertilidade, o sistema imunológico, causando sua debilidade, sistema renal, desestabilizando o nível de creatinina e sistema cardiovascular alterando a homeostase (ZAHIR *et al.*, 2005). JANICKA *et al.*, 2015, sugere ainda que o MeHg tem no estresse oxidativo um importante mecanismo de toxicidade celular e ainda pode mudar os parâmetros sanguíneos, alterando a integridade da membrana dos eritrócitos.

A meia-vida biológica do MeHg é de 44 a 88 dias nos seres humanos e sua excreção ocorre pela urina, fezes e leite materno (BISINOT& JARDIM, 2004).

#### **2.4. Mercúrio em leite materno**

A Academia Americana de Pediatria e a Organização Mundial de Saúde recomendam que o leite materno seja fonte nutricional exclusiva para recém-nascidos até os seis meses de vida (UNICEF, 2014). O leite materno fornece nutrientes e componentes bioativos exclusivos, como anticorpos da mãe que ajudam a combater doenças, levam a nutrição, desenvolvimento e crescimentos ideais para o recém-nascido (JAKAITIS *et al.*, 2014; UNICEF, 2014). Crianças amamentadas possuem menos risco de desenvolverem na vida adulta a obesidade, a hipertensão e o colesterol alto. A amamentação também traz muitas vantagens para a mãe, a família e a sociedade. As

mulheres que amamentam seus filhos logo ao nascerem reduzem o risco de hemorragias pós-parto e possuem menos chances de desenvolverem câncer de mama, no útero e nos ovários (UNICEF, 2014).

Apesar de ser considerado um alimento completo o leite materno pode transportar agentes tóxicos como o Hg, resultantes da exposição ambiental materna (VIEIRA *et al.*, 2013). O mercúrio (orgânico e inorgânico) pode ser excretado pelo leite humano (DÓREA *et al.*, 2013) e assim a amamentação pode funcionar como um mecanismo de transporte de Hg da mãe para o recém-nascido (SUNDBERG *et al.*, 1999). A amamentação pode constituir uma via de exposição a contaminantes bioacumuláveis, como o mercúrio, já que após seu acúmulo ao longo do tempo na gordura corporal pode ser mobilizado para o leite durante a lactação (HACON *et al.*, 2008).

As crianças (especialmente na primeira infância) e os fetos possuem exposições particulares e vulnerabilidades únicas a tóxicos ambientais, uma vez que a absorção destas substâncias é elevada em seu trato gastrointestinal, por estarem em etapas diferentes de desenvolvimento cerebral e por suas vias metabólicas estarem imaturas e poderem ser facilmente perturbadas por substâncias tóxicas como o Hg. Outros fatores como a baixa massa corpórea, o fato de comerem mais, respirarem um volume de ar maior e beberem mais água também aumentam sua suscetibilidade (GUIMARÃES & ASMUS, 2010; AL-SALEH *et al.*, 2013; CHAO *et al.*, 2013).

Homens e mulheres quando na idade reprodutiva, expostos a metais pesados, mesmo em doses pequenas, podem afetar o crescimento e desenvolvimento do feto. Durante a gravidez o Hg atravessa com facilidade a placenta e a barreira hemato-encefálica, podendo atingir o cérebro fetal em desenvolvimento e causar danos como a má formação, afetar o desenvolvimento cognitivo e levar ao nascimento de bebês com baixo peso (GARCÍA-ESQUINAS *et al.*, 2013). A exposição ao Hg tem relações com o desenvolvimento de neuropatologias, principalmente em um SNC em desenvolvimento, ou seja, déficits neurocomportamentais podem estar associados a esta exposição no início da vida (FARINA *et al.*, 2013). A criança pode apresentar atrasos na fala e no início da locomoção, reflexos e tônus muscular podem ser alterados e em casos de níveis de contaminação muito

elevados pode haver sintomas semelhantes à paralisia cerebral (HACON *et al.*, 2008).

Molina-Villalba *et al.* (2015) consideram o mercúrio um dos elementos mais tóxicos que podem afetar o neurodesenvolvimento das crianças tanto na vida intra-uterina quanto após o nascimento, através da amamentação, colocando-as como grupos prioritários em estudos de poluentes ambientais incluindo os metais traço. Durante a infância a exposição pode ser continuada pela contaminação de elementos metálicos em alimentos, na água ou no ar.

A composição do leite materno varia de acordo com a fase de lactação e se relaciona também com a alimentação da mãe, atividade laboral, peso corpóreo, anemia, se é fumante (ativo ou passivo), região onde mora, fatores estes que podem influenciar nos níveis de metais pesados como o Hg, no leite materno. (CHIEN *et al.*, 2006; BALLARD *et al.*, 2013; CUNHA *et al.*, 2013). De acordo com Cunha *et al.* (2013) o leite materno é uma via de excreção em mamíferos, e uma vez que a mãe tenha sido exposta a tóxicos ambientais, principalmente por fontes alimentares, o lactente pode ser também exposto.

O limite máximo de ingestão semanal provisório (*Provisional Tolerable Weekly Intake*, PTWI) é de 5µg/pc de HgT (FAO/WHO, 2004), limite este obtido a partir da relação entre ingestão de peixe contaminado com Hg e a quantidade de Hg no sangue e no cabelo, associando-os aos danos tóxicos do Hg (JARDIM & CALDAS, 2009). Segundo os mesmos autores, estimar a exposição de uma substância nos alimentos para estabelecer os limites máximos esperados ou permitidos não é totalmente previsível, já que não se pode eliminar ou controlar a substância no alimento, porém é de fundamental importância para possíveis riscos desta exposição para a saúde humana. De acordo com Silva (2015) e Jardim & Caldas (2009) pode ser feita uma estimativa em porcentagem, referente ao risco que o leite materno contaminado com Hg pode oferecer ao lactente, fazendo uma relação entre a ingestão calculada e a PTWI determinada pela OMS (5µg/Kg pc de HgT), usando a seguinte equação:

$$PTWI\% = \frac{\text{Ingestão}}{PTWI}$$

PTWI

Sendo um risco eminente de intoxicação quando o resultado ultrapassar a 100%.

## 2.5. Características gerais do leite materno

A WHO e a UNICEF recomendam o leite materno como alimento exclusivo, nos primeiros seis meses de vida, para que o recém-nascido tenha um pleno desenvolvimento. A alimentação exclusiva com o leite materno significa não receber nenhum tipo de alimento líquido, inclusive água, ou sólido. Isso porque a amamentação supre todas as necessidades energéticas e nutricionais dos lactentes.

O leite materno possui uma gama de substâncias, as quais podem ser produzidas pela mãe (substâncias endógenas) ou introduzidas pelo ambiente externo (substâncias exógenas), sendo que sua composição pode variar com o período de lactação. O colostro é produzido entre as primeiras 24 horas e 48 horas após o parto, também chamado de pré-leite e possui grande concentração de imunoglobulinas. O leite de transição é produzido a partir do terceiro dia ao décimo quarto pós-parto, rico em lactose, gordura, vitaminas com níveis elevados de proteínas, sódio, cálcio, zinco e cobre. Já o leite maduro, produzido após duas semanas do parto é menos constituído de nutrientes e sua composição é mantida por aproximadamente um ano após o parto. De modo geral os constituintes principais no leite materno são as proteínas, os carboidratos, as vitaminas, os lipídios, água e minerais. Além de compostos bioativos, que promovem a proteção imunológica e maturação dos intestinos (TUDEHOPE, 2013).

Dentre os compostos do leite materno a água é o que se apresenta em maior quantidade, aproximadamente 88%, onde estão íons livres de sódio, potássio, cloro, cálcio e fosfato (JÚNIOR & ROMUALDO, 2002).

No grupo dos carboidratos o dissacarídeo lactose é uma fonte de energia importante, encontrado em níveis mais significativos no leite maduro e de transição do que no colostro. Os oligossacarídeos são o segundo grupo de carboidratos mais abundantes (UNDERWOOD, 2013). Cerca de 90% da lactose é absorvida pelo trato gastrointestinal do recém-nascido, e a que permanece nestes órgãos é usada para dar moliência às fezes, auxiliar na

formação da flora intestinal e na absorção de minerais. Já os oligossacarídeos que também podem permanecer ajudam na prevenção de infecções, funcionando como um pró- biótico (TUDEHOPE, 2013).

No grupo dos lipídios, principalmente os triglicerídeos, encontrados no leite humano são uma importante fonte de energia para o crescimento e transporte de vitaminas lipossolúveis. Quando estes triglicerídeos sofrem a ação das lípases liberam ácidos graxos, que atuam, no estômago, como parte do sistema imune inato (JAKAITIS *et al.*, 2014).

O leite humano contém uma mistura de diferentes proteínas e peptídeos. As proteínas encontradas em maiores quantidades no leite materno são a lactoferrina, a IgA secretora,  $\alpha$ -lactalbumina, lisozima, albumina do soro e a caseína. O nível de proteínas do leite diminui significativamente entre a quarta e sexta semanas de lactação, após as quais se mantém mais estável (BALLARD *et al.*, 2013; POZZI *et al.*, 2015).

As proteínas estão envolvidas com as mais variadas funções no organismo do lactente, como a síntese e expressão do leite ou atividades fisiológicas. A  $\alpha$ -lactalbumina é a principal proteína do leite e corresponde a cerca de 25% a 35% do total de proteínas. Possui grande proporção de aminoácidos essenciais e estudos *in vitro* associam sua função à formação da flora bacteriana intestinal. Presente em grandes concentrações a lisozima é conhecida por sua ação antibacteriana, onde degrada a parede celular de bactérias gram-positivas. Já a glicoproteína de ligação com o ferro, chamada delactoferrina, possui propriedades anti-infecciosas, devido provavelmente a sua capacidade de sequestro de ferro de microorganismos. As caseínas ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ -caseínas) correspondem a 40% das proteínas do leite materno e desenvolvem atividades associadas ao sistema imunológico. A IgA secretora é a imunoglobulina mais abundante no leite humano, mais que 90%, confere imunidade ao lactente através da transferência de seu antígeno no leite da mãe. É presente nas fases iniciais da lactação em concentrações mais elevadas, mas mantém níveis consideráveis nas fases posteriores (BALLARD *et al.*, 2013; JAKAITIS *et al.*, 2014). A albumina do soro é juntamente com a lactoferrina as proteínas do leite que utilizam metais o que contribui para a disponibilidade orgânica do zinco (POZZI *et al.*, 2015).



As vitaminas fazem parte de um grupo de micronutrientes que variam no leite materno de acordo com a dieta da mãe, sendo que as vitaminas lipossolúveis diminuem significativamente no início da lactação (BALLARD *et al.*, 2013). Este grupo de vitaminas pode ser encontrado ligado a proteínas específicas, enquanto que o grupo das vitaminas hidrossolúveis se liga as proteínas específicas do soro do leite materno (POZZI *et al.*, 2015).

Ao contrário das vitaminas a quantidade de mineral presente no leite humano não apresenta relação com a alimentação ou níveis sanguíneos da lactante. Tendo alterações apenas em função da fase de lactação, o que é mais evidente nos primeiros dias após o parto. Os principais minerais são; o cálcio, o cloro, o magnésio, o sódio, o potássio e elementos traço como o fósforo, crômio, ferro, flúor, cobre, manganês, selênio e outros (POZZI *et al.*, 2015).

## 2.6. Proteômica

As proteínas exercem funções essenciais em praticamente todos os processos biológicos, haja vista serem elas que determinam a ocorrência e a forma das transformações químicas que ocorrem intracelularmente. São compostos orgânicos essenciais e se fazem presentes em todos os organismos vivos, intermediando inúmeras funções, como: proteção imunológica, movimentação muscular coordenada, sustentação da pele e dos ossos, geração e transmissão de impulsos nervosos, crescimento e diferenciação celular (LANÇAS *et al.*, 2003; POMASTOWSKI *et al.*, 2014).

As proteínas são polímeros lineares de aminoácidos, aproximadamente 20, os quais se combinam de formas diferentes resultando na grande variedade destas moléculas, fazendo com que desempenhem variadas funções. São estruturas complexas, dinâmicas e diversificadas, por isso fez-se necessário o desenvolvimento de uma abordagem ampla e global para o entendimento destas estruturas celulares. Partindo destes conhecimentos e do pré-suposto de que a complexidade dos organismos se situa no nível de proteínas, Wilkins desenvolveu os primeiros estudos proteômicos em 1994 (GARCIA *et al.*, 2006; PAMASTOWSKI *et al.*, 2014).

A proteômica é a área científica que estuda sistematicamente os complementos de proteínas de células ou tecidos, ou seja, fornece mecanismos para identificar e quantificar proteínas, bem como suas interações, modificações e localização (STULTS & ARMOTT 2005; ROTILIO *et al.*, 2012; PATEL, 2014). A proteômica lida com o proteoma de organismos vivos, sendo este definido como a representação funcional do genoma, ou seja, o conjunto de todas as proteínas de uma espécie sejam elas em seu estado normal ou quando sofrem variações por situações de doenças, stress ou poluição ambiental. Com estudo do proteoma obtemos informações mais precisas sobre um organismo, o que pode contribuir na fabricação de compostos (industriais, agrícolas, veterinários e médicos) menos nocivos aos ecossistemas e aos seres vivos. O principal objetivo da proteômica é caracterizar as proteínas, montar seu perfil, para compará-los e apontar as diferenças entre eles (LANÇAS *et al.*, 2003; KANDO *et al.*, 2014).

Uma abordagem proteômica global pode levar a identificação de biomarcadores eficientes para diferentes objetivos, como no prognóstico e diagnóstico precoce de doenças e respostas a tratamentos (KONDO *et al.*, 2014). Tecnologias proteômicas têm sido promissoras para a descoberta de biomarcadores de doenças psiquiátricas, como a esquizofrenia, ansiedade, depressão, doença de Alzheimer e transtorno bipolar (PATEL, 2014). Licker *et al.* (2014) traz esta abordagem como capaz de abrir novos horizontes de pesquisas, como na elucidação de biomarcadores da doença de Parkinson.

## **2.7. Metalômica**

O estudo de metais em sistemas biológicos é uma área da ciência em ascensão, recebendo grande atenção com um rompimento de fronteira, porque reúne pesquisadores de várias áreas, incluindo a biologia, a química, a bioquímica, a geologia, a medicina, a física, a bioinformática e a farmácia. A abordagem metalômica está relacionada com a expressão e identificação de biomoléculas metálicas em sistemas biológicos, tornando-se uma alternativa significativa para a obtenção de uma visão ampla sobre a movimentação de metais, suas interações com outros elementos e o seu mecanismo de homeostase (GARCIA - SEVILLANO *et al.*, 2014).

Um número significativo de proteínas e enzimas, aproximadamente 40%, necessita da presença de íons metálicos ou metaloides, em sua estrutura para desempenharem sua atividade biológica. Estes íons metálicos representam cerca de 4% do corpo dos organismos e mesmo nesta proporção pequena desempenham papéis importantes nos processos vitais, tanto a nível estrutural quanto a nível funcional. Estruturalmente integram compostos orgânicos, como o ferro na hemoglobina e o cobalto na vitamina B<sub>12</sub>. Funcionalmente atuam como catalisadores enzimáticos. De acordo com suas características e funções os íons metálicos são denominados de metaloproteínas e proteínas de metal ligante (LIMA *et al.*, 2010).

As metaloproteínas são um grupo de proteínas que possuem incorporado a sua estrutura, através de ligações específicas, um co-fator de metal com uma alta afinidade com a proteína. Os metais de transição, como, ferro, cobre, zinco, manganês, molibdênio e cobalto, são fortemente ligados as metalotioneínas isso devido as suas características (interação eletromagnéticas, raio atômico pequeno e densidade) (LIMA *et al.*, 2010). Um grupo importante das metaloproteínas são as metalotioneínas, as quais possuem baixo peso molecular (6 a 10 kDa), com íons metálicos em sua estrutura tridimensional e com um alto teor do aminoácido cisteína (30%) nas quais se encontram o grupo sulfidríla que confere a elas a possibilidade de ligação a metais, não apenas os essenciais como o cobre e o zinco, mas também com metais tóxicos como o cádmio e o mercúrio. Sua função está relacionada principalmente ao metabolismo e cinética de metais, como: transporte de íons metálicos; desintoxicação de íons metálicos; proteção contra a toxicidade de metal; sequestradora de radicais livres; armazenamento e metabolismo de íons metálicos; resposta imune, genotoxicidade e carcinogenicidade. A produção destas moléculas relaciona-se a exposição a metais tóxicos ou essenciais, ao stress e a radiação (PEIXOTO *et al.*, 2007; NORDBERG & NORDBERG, 2009). Algumas metalotioneínas estão sendo sugeridas como possíveis biomarcadores de doenças renais específicas e poluição do ambiente por metais pesados com o Hg (TANG *et al.*, 2015).

Por outro lado, as proteínas de metal ligante incorporam os íons metálicos por ligações químicas não específicas, o que confere a elas uma

baixa afinidade metal-proteína e conseqüentemente a ligação pode ser facilmente rompida, como a ligação entre os íons de sódio e potássio (LIMA *et al.*, 2010).

Como integrantes de quase todos os processos fisiológicos, os metais, sejam essenciais em pequenas ou grandes quantidades, ou tóxicos em níveis elevados ou não, ou simplesmente tóxicos, devem ser estudados para uma melhor compreensão de suas funções nos organismos vivos. Além de implicações na ecologia e em doenças humanas. Assim a metalômica se coloca como uma abordagem fundamental para a compreensão dos efeitos nocivos da exposição a metais tóxicos (YANNONE *et al.*, 2012).

A metalômica combina uma variedade de técnicas como a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE, 2D-PAGE), cromatografia líquida (LC), fluorescência de raios-X com radiação síncrotron (SR-XRF), espectrometria de absorção atômica em chama ou em forno de grafite (FAAS/GFAAS), espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP MS), espectrometria de massas por tempo de voo acoplada à ionização dessortiva de matriz assistida por laser (MALDI-TOF MS) e a espectrometria de massas com ionização por elétrons (ESI-MS) ( GARCIA *et al.*, 2006; LIMA *et al.*, 2010).

## **2.8. Principais técnicas utilizadas em estudos metalômicos**

### **2.8.1. Eletroforese bidimensional**

Os estudos com eletroforese bidimensional tiveram início com O'Farrell em 1975, com o principal objetivo de caracterizar os padrões de expressão de proteínas (BENDIXEN, 2005).

A eletroforese é uma técnica altamente seletiva e relativamente simples, podendo ser aplicada para várias amostras. Geralmente é aplicada para caracterização de sistemas biológicos, seleção de bandas proteicas específicas para identificação e sequenciamento. Dentre as técnicas de eletroforese destaca-se a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE), usada para a análise quantitativa de proteínas em diferentes amostras, apresentando uma grande sensibilidade, já que considera diferentes

características das proteínas. É uma metodologia importante na busca de biomarcadores de doenças, como o câncer, ou na contaminação por exposição a metais tóxicos. A separação das proteínas ocorre em duas etapas: na primeira etapa (primeira dimensão) considera-se o ponto isoelétrico ou focagem isoelétrica e na segunda etapa (segunda dimensão) considera-se a massa molar das mesmas (GARCIA *et al.*, 2006; PATEL, 2014).

A focalização isoelétrica (IEF) é baseada na separação das proteínas através do seu ponto isoelétrico (pI), as quais migram no gel através de um campo elétrico até atingir o seu ponto isoelétrico (carga líquida igual a zero) através de um gradiente de pH. O pI para a maioria das proteínas está no pH de 3 a 12. (WRIGHT *et al.*, 2012).

A separação das proteínas com base em sua massa molar, caracteriza a segunda dimensão da 2D-PAGE, na qual as proteínas são separadas em um gel de poliácridamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS) sob a influência de um campo elétrico, o que faz com que as proteínas migrem no gel. Cada proteína possui uma velocidade de migração diferente, formando manchas (*spots*) no gel. Cada *spot* corresponde a uma ou mais espécies de proteínas, que migraram para suas coordenadas específicas, devido ao seu peso molecular e a carga específica. A visualização dos *spots* é obtida após a aplicação das técnicas de coloração nos géis (BENDIXEN, 2005; STULTS & ARNOTT, 2005; GARCIA, 2006).

Para a garantia de que cada *spot* represente uma espécie de proteína, as interações moleculares proteicas precisam ser rompidas, e para isso as proteínas da amostra devem ser submetidas a processos de desnaturação, desagregação, redução e solubilização (BENDIXEN, 2005). Não existe um protocolo universal para a 2D-PAGE, os mesmos devem ser ajustados em função do tipo de amostra estudada e o tipo de proteína que se deseja pesquisar.

### **2.8.2. Espectrometria de absorção atômica**

A espectrometria de absorção atômica (AAS) é uma técnica analítica empregada para quantificar e qualificar espécies metálicas em amostras biológicas variadas (IVANOVA, 2005).

Os tipos de AAS mais utilizados são: a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS- *Flame Atomic Absorption Spectrometry*) e a espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite (*GFAAS - Graphitte Furnace Atomic Absorption Spectrometry*). Na FAAS ocorre a aspiração da solução da amostra, sendo misturada com acetileno ou óxido nítrico, através de um fluxo de ar comprimido. Nebulizada a solução amostral será levada a chama, atomizada e quantificada a intensidade da radiação emitida pela excitação dos átomos. É utilizada em níveis de mg/L. Já na GFAAS as amostras são colocadas em um tubo de grafite. A vaporização e atomização do analito são obtidas pelo aquecimento do tubo de grafite. A leitura então é feita pela absorção de luz (comprimento de onda específico) pelos átomos livres em nível de  $\mu\text{g/L}$  (MARSHAL, 1997).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Identificar proteínas associadas ao mercúrio em amostras de leite materno coletadas em diferentes comunidades ribeirinhas da bacia Amazônica (rio Madeira e rio Negro).

#### 3.2. Objetivos Específicos

3.2.1. Obter o proteoma de amostras de leite materno coletadas em diferentes comunidades ribeirinhas da bacia Amazônica (rio Madeira e rio Negro) por eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE);

3.2.2. Determinar quantitativamente mercúrio total nas amostras de leite materno do proteoma obtido no processo de fracionamento das proteínas dessas amostras por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS).

3.2.3. Determinar qualitativamente mercúrio total nas amostras de leite materno em *spots* proteicos obtidos no processo de fracionamento das proteínas dessas amostras por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Pontos de Coleta

As amostras de cabelo e leite foram coletadas em comunidades do rio Madeira, sendo elas: Fortaleza do Abunã, Abunã e Nova Mutum Paraná, áreas de influência do reservatório da UHE Jirau, no estado de Rondônia. E em comunidades do Alto rio Negro, que são: Livramento e Santa Isabel, ambas no estado do Amazonas (Figura 2).

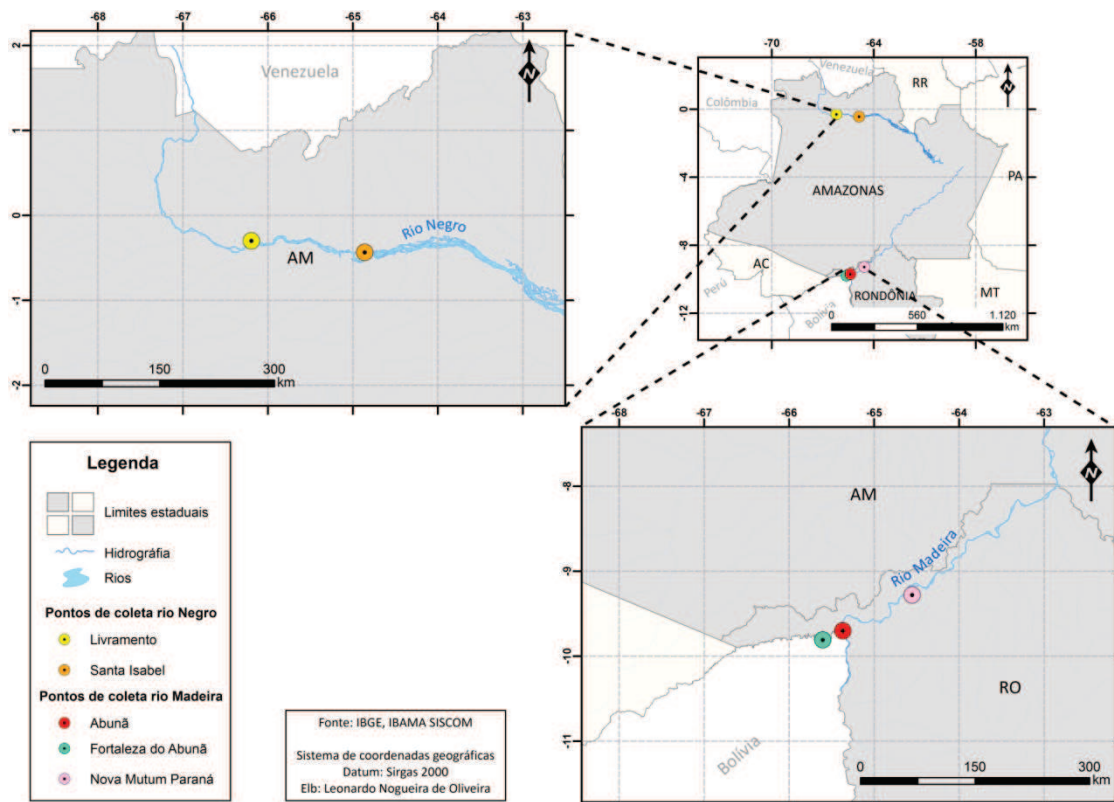


Figura 2. Pontos de coleta de leite e cabelo.

#### 4.1.1. Região do Rio Madeira- Rondônia

Com suas nascentes nos Andes Bolivianos formando o rio Mamoré, o rio Madeira representa aproximadamente de 24% da bacia Amazônica, sendo um dos principais afluentes do rio Amazonas. É caracterizado como um rio de águas brancas, por possuir elevada carga de sedimentos em suspensão, pH neutro, baixa concentração de matéria orgânica e ser rico em nutrientes dissolvidos (BERNARD *et al.*,2008). Devido à elevada carga de sedimentos



suspensos torna-se uma via de transporte de poluentes como o mercúrio (GALVÃO *et al.*, 2008).

A bacia do rio Madeira foi muito impactada entre as décadas de 1970 e 1980 pela mineração de ouro. Atualmente é alvo de grandes empreendimentos na área da geração de energia com a construção de hidrelétricas. A agricultura e a garimpagem são ações antrópicas, que se somam as demais citadas, perturbando o equilíbrio deste ecossistema, afetando a liberação de mercúrio (DÓREA *et al.*, 2006). Apesar deste impacto, as águas deste rio são consideradas de produtividade natural elevada, com fauna e flora diversificadas. Suas planícies são compostas por solos argilosos e relativamente férteis (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

As comunidades ribeirinhas ao rio Madeira, como Abunã, Fortaleza do Abunã e Nova Mutum Paraná, tem como sua principal fonte de renda o trabalho autônomo ou assalariado e outras atividades com perfis tipicamente urbanas. A garimpagem também representa uma importante fonte de renda. A pesca é feita artesanalmente, porém com uma representatividade econômica relevante, o que a levou a se tornar uma atividade profissional em meados do século XX. O principal uso da terra é a agricultura de subsistência. São regiões de fácil acesso a Porto Velho e por isso seus hábitos alimentares são bem diversificados. Estas regiões Amazônicas são também conhecidas como Amazônia de “estradas”, por ter um fluxo migratório de várias regiões do país, que pode ser associado ao garimpo e a construção de hidrelétricas (MARQUES *et al.*, 2014; SILVA, 2015).

#### **4.1.2. Região do Rio Negro- Amazonas**

A bacia do rio Negro representa aproximadamente de 14% da área total da Amazônia, cobre uma extensão de 1700 km em Manaus, onde se une ao rio Solimões formando o rio Amazonas (FADINI & JARDIM, 2001). É um rio de relevos suaves, já que tem suas nascentes nos escudos arqueados das Guianas ou nos sedimentos terciários da bacia Amazônica. Caracteriza-se como um rio de água preta, o que ocorre devido ao alto teor de matéria orgânica dissolvida. Apresenta baixas concentrações de sedimentos e nutrientes. O pH das águas do rio Negro é ácido (3,8 - 4,9) definido

principalmente pela presença de florestas alagáveis, nas quais a quantidade de oxigênio dissolvido é baixa devido a intensa decomposição de matéria orgânica. As características químicas das águas, como anoxia e pH baixo podem aumentar a metilação, favorecendo a contaminação dos peixes e outros organismos aquáticos. Possuem grandes areais nas suas áreas de captação e suas planícies são de modo geral, arenosas e oligotróficas (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

O clima da região do alto rio Negro é quente e úmido, com uma variação de temperatura de 26 e 28°C. Este rio não possui histórico de extração de ouro, nem projetos de desenvolvimento energético ou agrícola, porém as concentrações de mercúrio total nesta região são mais elevadas, o que pode ser proveniente de fontes naturais (DÓREA *et al.*, 2006; FADINI & JARDIM, 2001).

A região do Alto rio Negro, onde se localizam as comunidades de Santa Isabel e Livramento, é habitada por indivíduos que nasceram na própria bacia do rio Negro, a maioria (80%) em comunidades ribeirinhas ou em núcleos urbanos afastados da capital, Manaus. A economia destas regiões é rural de base diversificada e a aposentadoria representa um adicional econômico importante. Dentre as principais atividades econômicas destaca-se a pesca de peixes comestíveis e ornamentais, o extrativismo vegetal (como da castanha e da piaçava) e a caça de animais silvestres (SILVA, 2007).

A comunidade de Santa Isabel está distante por embarcação aproximadamente 115 quilômetros do centro de Manaus. A comunidade somente tem energia elétrica quando é ligado o gerador da escola municipal nos horários de aula. Seus hábitos alimentares são principalmente de caça e pesca, mas também consome alguns produtos vindos das cidades, mas com baixa frequência. Esta região do rio Negro é conhecida como a Amazônia dos “rios”, uma vez que são indivíduos nativos e que sobrevivem principalmente do que o rio oferece (EIA/RIMA, 2005).

Já a comunidade de Livramento é uma vila que pertence ao município de Manaus e está distante da capital por embarcação aproximadamente cerca de 20km. A vila tem energia elétrica e seus habitantes têm hábitos alimentares bem parecidos com os hábitos alimentares dos indivíduos da capital. O acesso

a cidade de Manaus é muito fácil tendo transporte fluvial constante durante todo o dia. Muitas das pessoas trabalham na capital e moram na comunidade (EIA/RIMA, 2005).

#### 4.2. Coletas das Amostras Biológicas

Antes de procedimento de coleta das amostras (cabelo e leite) todas as lactantes que concordaram em participar da pesquisa foram submetidas a uma entrevista de esclarecimento, para o aceite ou não das coletas do material biológico, onde todas que concordaram em participar assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da UNB (Anexo II). Participou deste estudo um total de 28 lactantes, distribuídas em três grupos, como mostra a Tabela 1.

**Tabela 1.** Localização das comunidades e distribuição das lactantes.

Comunidades	Lactantes	Regiões	Grupos
Fortaleza do Abunã	1	Alto rio Madeira	1
Abunã	4	Alto rio Madeira	1
Nova Mutum Paraná	2	Alto rio Madeira	1
Livramento	12	Alto rio Negro	2
Santa Isabel	6	Alto rio Negro	2
Goiânia	3	Goiânia	3

##### 4.2.1. Coleta de Cabelo

As amostras de cabelo foram realizadas com o principal objetivo de confirmação da presença de mercúrio nas lactantes e a identificação daquelas que possuíam maior nível de contaminação. As amostras foram coletadas segundo protocolos internacionais, onde aproximadamente 5g de cabelo foram coletados da região da nuca com tesoura de aço inoxidável (Figura 3). Seguidamente as amostras foram acondicionadas em sacos de polietileno, identificadas e armazenadas em local apropriado até o momento da análise.



Figura 3. Coleta de amostra de cabelo de lactante ribeirinha.

#### 4.2.2. Coleta de Leite

O leite materno foi coletado em frascos de vidros, devidamente esterilizados, por expressão manual pelas próprias lactantes. Devidamente identificadas e congeladas logo após a coleta, as amostras foram enviadas para o laboratório de Química Analítica e Eletroforese da UNESP, em Botucatu- SP, onde foram mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até serem analisadas (Figura 4).



Figura 4. Recebimento de amostra de leite.

#### 4.3. Reagentes e Soluções

Os reagentes e soluções usados para a realização desta etapa do estudo estão listados a seguir:

Ácido Acético Glacial,  $C_2H_4O_2$ , MM = 60,05 g/mol (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);

Ácido Clorídrico, HCl, MM = 36,46 g/mol (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);

Ácido Etilenodiaminotetracéticodipotássico ( $K_2EDTA$ ),  $C_{10}H_{14}O_8N_2K_{22}H_2O$ , MM = 404,46 g/mol (Merck, Brasil);

Ácido Fosfórico 85%,  $H_3PO_4$ , MM = 98,00 g/mol (Merck, Darmstadt, Alemanha);

Ácido Nítrico,  $HNO_3$ , MM = 63,01 g/mol (Merck, Darmstadt, Alemanha);

Acrilamida,  $C_3H_5NO$ , MM = 71,08 g/mol (GE Healthcare, Life Sciences, Germany);

Agarose grau Biologia Molecular (BioAgency, São Paulo, Brasil);

Albumina de Soro Bovino (Merck, Darmstadt, Alemanha);

Anfólitos, pH de 3 a 10 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);

Azul de Bromofenol,  $C_{19}H_9Br_4NaO_5S$ , MM = 691,94 g/mol (BioAgency, São Paulo, Brasil);

Coomassie blue G-250,  $C_{47}H_{50}N_3NaO_7S_2$ , MM = 854,03 g/mol (J.T. Baker, Phillipsburg, (EUA);

Ditiotreitol (DTT),  $C_4H_{10}O_2S_2$ , MM = 154,24 g/mol (Amersham Biosciences, Uppsala, (Suécia);

Dodecil Sulfato de Sódio (SDS),  $C_{12}H_{25}OSO_3Na$ , MM = 288,38 g/mol (GE Healthcare Life Sciences, Belgica);

Etanol,  $C_2H_6O$ , MM = 46,07 g/mol (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);

Fitas para focalização isoelétrica com anfólitos imobilizados de pH 3 a 10 (GE Healthcare Life Sciences, Belgica);

Glicerol 87%,  $C_3H_8O_3$ , MM = 92,09 g/mol (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);

Lodoacetamida,  $C_2H_4INO$ , MM = 184,96 g/mol (GE Healthcare Life Sciences, Belgica);

Metanol,  $CH_4O$ , MM = 32,04 g/mol (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);

N, N'-metilenobisacrilamida,  $C_7H_{10}N_2O_2$ , MM = 154,17 g/mol (GE Healthcare Life Sciences, Belgica);

N, N', N, N'-tetrametilenodiamina (TEMED),  $C_6H_{16}N_2$ , MM = 116,20 g/mol (GE Healthcare Life Sciences, Wathin EUA);

Óleo Mineral (GE Healthcare Life Sciences, Germany);  
Padrão Proteico de Massa Molar (GE Healthcare Life Sciences, UK);  
Peroxido de Hidrogênio 30%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, PA (Merck, Germany);  
Persulfato de Amônio, N<sub>2</sub>H<sub>8</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, MM = 228,20 g/mol (GE Healthcare Life Sciences, Belgica, Sweden);  
Sulfato de Amônio, H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S, MM = 132,14 g/mol (J.T. BACKER, USA); 3-[3-colamidopropil-dimetilamônio]-1-propano sulfonato (CHAPS), C<sub>32</sub>H<sub>58</sub>N<sub>20</sub>S, MM = 614,88 g/mol (Merck, Darmstadt, Alemanha);  
Tiourea, CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>S, MM = 76,12 g/mol (GE Healthcare Life Sciences, Bélgica);  
Tris-hidroximetil amino metano, C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>O<sub>3</sub>N, MM = 121,14 g/mol (GE Healthcare Life Sciences, Bélgica, Suécia);  
Ureia, CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O, MM = 60,06 g/mol (GE Healthcare Life Sciences, Wathin EUA).

Todos os reagentes usados foram de pureza analítica. As soluções foram preparadas com água deionizada, obtida pelo sistema de purificação PURELAB ULTRA da ELGA.

#### 4.4. Equipamentos e Acessórios

Todas as vidrarias e demais acessórios laboratoriais usados nesta etapa do trabalho foram esterilizados com ácido nítrico 10% (v/v) por 12h de imersão. Após este período, todo material foi lavado com água ultrapura e seco à temperatura ambiente. Para a execução das análises de laboratório foram usados os seguintes equipamentos e acessórios:

Agitador por efeito Vórtex marca Thermolyne, modelo M-37600 (Dubuque, EUA);  
Balança analítica marca Mettler, modelo AE200 (Bedford, EUA);  
Balança analítica marca Mettler, modelo AE100 (Bedford, EUA);  
Banho Maria, marca UNIQUE, modelo USC 1800 (Indaiatuba, Brasil);  
Cubas para eletroforese do tipo SDS-PAGE, marca GE (Uppsala, Suécia);  
Espectrômetro de Absorção Atômica (CVAAS) SMS 100 Mercury Analyzer (Perkin Elmer, Inc., Shelton, CT);  
Espectrofotômetro UV/Visível, marca Thermo Spectronic, modelo Genesys 6 (Rochester, EUA);  
Mesa Agitadora marca Tecnal, modelo TE - 140 (Piracicaba, Brasil);

Sistema de purificação PURELAB ultra, marca ELGA, modelo Ultraionic (USA);  
Sistema para eletroforese 2D-PAGE, marca GE Healthcare, modelo Ettan™  
Daltsix (Uppsala, Suécia);

Sistema para focalização isoelétrica marca Amersham Biosciences, modelo  
EPS1001 (Uppsala, Suécia);

Centrífuga refrigerada marca Hettich Zentrifugen, modelo Universal 320/320R  
(Newport Pagnell, Reino Unido);

Espectrofotômetro de fluorescência atômica Brooks Rand modelo III;

Tubo de quartzo: (aprox. 10 cm de largura e 7 mm de diâmetro)

Areia recoberta com película de ouro;

Vidrarias utilizadas em laboratório de Química Analítica;

#### **4.5. Processamento das amostras de cabelo**

Com o auxílio de uma tesoura de aço inoxidável as amostras de cabelo foram cortadas em pedaços de aproximadamente 5mm e colocadas em um béquer. Neste mesmo recipiente foi acrescentado acetona em quantidade média do dobro da amostra. Aguardamos aproximadamente 10 min e fizemos a decantação e o sobrenadante foi descartado. Em seguida água destilada foi acrescentada a amostra (aproximadamente o dobro da amostra) e após decantação, desprezada. Repetimos o procedimento com a água por duas vezes. Acrescentamos acetona novamente e após decantação o sobrenadante foi desprezado e a amostra foi então transferida do béquer para um papel filtro para a secagem. Jatos com acetona foram usados para auxiliar na transferência. Após total secagem a amostra foi devidamente identificada e armazenada até o momento da análise.

#### **4.6. Processamento das amostras de leite**

As amostras de leite materno foram mantidas congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , no laboratório de Química Analítica e Eletroforese da UNESP/Botucatu. Para o início dos procedimentos analíticos, as amostras foram descongeladas a temperatura ambiente e centrifugadas em centrífuga refrigerada a 14.000 rpm por seis vezes, 15 min cada, a  $4^{\circ}\text{C}$  para separação da fração lipídica da proteica. A fração proteica foi recolhida para obtenção dos *pellets* proteicos.

Para obtenção destes, foram misturados 400 µL de fração proteica a 1600µL de acetona a 80% (proporção 1:4) e repousado em freezer por 3 horas. Após esse repouso, os tubos contendo extrato e acetona foram centrifugados por 15 min a 4°C a 13000 rpm. Os *pellets* obtidos foram lavados com acetona e usados para a quantificação de proteínas, quantificação de mercúrio total e para as corridas eletroforéticas (2D-PAGE).

#### **4.7. Quantificação de Hg total nas amostras de cabelo**

Na quantificação de HgT das amostras de cabelo utilizou-se o analisador automático para a determinação do mercúrio por decomposição térmica e amalgamação em coluna de ouro, SMS 100 da Perkin Elmer.

No analisador automático para a determinação de mercúrio as amostras de cabelo processadas são inseridas em barquinhas de níquel, onde o registro da massa será feito pelo mesmo. Automaticamente a barquinha é inserida no sistema de análise de mercúrio. A análise envolve a decomposição da amostra através da combustão. Os gases formados são transportados para um tubo catalítico e o Hg elementar levado para o tubo de amalgamação com areia de ouro onde fica preso. O mercúrio gasoso é liberado do tubo de amalgamação após aquecimento. Com o auxílio de um gás de arraste o metal é transferido para o espectrômetro de absorção atômica.

A quantificação de HgT nas amostras de cabelo foi usada para identificarmos quais lactantes possuíam os maiores níveis de Hg, para procedermos com a eletroforese bidimensional (2D-PAGE).

#### **4.8. Estratégias de precipitação das proteínas das amostras de leite materno**

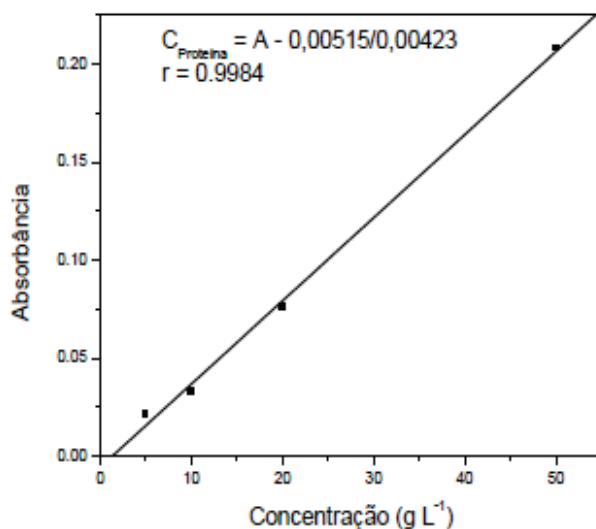
Os *pellets* proteicos das amostras de leite materno foram obtidos utilizando-se os procedimentos descritos por Santos *et al.* (2015) com algumas modificações, conforme descrito a seguir: as amostras de leite após serem descongeladas a temperatura ambiente foram centrifugadas por cerca de seis vezes a 10.000 rpm, para separação da fração lipídica, utilizando-se centrifuga refrigerada. Os extratos obtidos (fração proteica) foram tratados em seguida com solução gelada de acetona 80% (v/v) na proporção de 1:4 (amostra: acetona). Essa precipitação foi conduzida durante 2-3 horas em geladeira a -



20°C, garantindo assim que a precipitação ocorresse de maneira quantitativa. Em seguida o precipitado proteico foi centrifugado novamente a 10.000 rpm em centrífuga refrigerada por 10 min, para separação do sobrenadante. Os *pellets* proteicos foram lavados mais duas vezes com a mesma solução utilizada para a precipitação. Após estes procedimentos, uma parte dos *pellets* foi ressolubilizada em solução a 0,50 mol L<sup>-1</sup> de NaOH para quantificação do teor total de proteínas, e outra parte foi ressolubilizada em tampão específico, contendo ureia a 7 mol L<sup>-1</sup>, tiouréia a 2 mol L<sup>-1</sup>, CHAPS a 2% (m/v), anfólitos de pH 3 a 10 a 0,5% (v/v) e azul de bromofenol a 0,002%; além disso, 2,8 mg de DTT foram adicionados a este tampão. Esta solução foi utilizada nas separações eletroforéticas para obtenção do proteoma das amostras de leite materno.

#### 4.9. Determinação de proteínas totais

A concentração de proteínas totais nos extratos dos *pellets* proteicos foi determinada de acordo com o método do Biureto, empregando albumina de soro bovino como padrão (Doumas *et al.*, 1981). Foi construída curva analítica com concentrações de 5 a 50 g L<sup>-1</sup> a partir de solução padrão estoque de albumina bovina 100 g L<sup>-1</sup> (Figura 5). Para leitura das amostras, os precipitados proteicos foram ressolubilizados em 500 µL de NaOH 0,50 mol L<sup>-1</sup>. Em cubetas de vidro foram adicionados 50 µL de padrão/amostra e 2,5 mL do reagente de Biureto. A mistura padrão ou amostra com o reagente foi mantida a 32 °C em banho Maria durante 15 minutos. Após o tempo de reação, as leituras de absorbância foram medidas a 545 nm, usando espectrofotômetro UV/Visível. A determinação de proteínas totais na amostra estudada permite calcular o volume exato de extrato proteico necessário para aplicar uma massa de aproximadamente 375 µg de proteína em cada amostragem na primeira etapa da eletroforese bidimensional.



**Figura 5.** Curva analítica preparada com concentrações de 10 a 100 g L<sup>-1</sup> de proteína a partir de solução estoque de albumina a 200 g L<sup>-1</sup>.

#### 4.10. Separação das proteínas por eletroforese bidimensional (2D-PAGE)

No primeiro estágio das corridas por 2D-PAGE (focalização isoelétrica - IEF) foram utilizadas fitas de 13 cm que continham gel pré-fabricado com anfólitos imobilizados de pH 3 a 10. Antes do início das separações eletroforéticas, as fitas foram hidratadas com o extrato proteico obtido após a precipitação e ressolubilização das proteínas da amostra (item 4.8). Essas fitas foram colocadas em caixa de hidratação com volume de 250 µL de amostra (extrato proteico diluído) e cerca de 900 µL de óleo mineral, onde permaneceram em temperatura ambiente por um período de 12 h. Dessa maneira, aproximadamente 375 µg de proteína foram aplicadas para cada fita. Após este período, a fita hidratada foi levada ao sistema de focalização isoelétrica para a corrida em primeira dimensão da eletroforese bidimensional. Após a etapa de hidratação das fitas com os extratos proteicos, a primeira dimensão do processo eletroforético foi realizada em sistema para focalização isoelétrica (Amersham Biosciences). Para corrida em primeira dimensão da eletroforese bidimensional, utilizou-se a seguinte programação de tensão: Etapa 1 = 500 V, com acúmulo de 500 Vh; Etapa 2 = 1.000 V, com acúmulo de 38.800 Vh; Etapa 3 = 10.000 V, com acúmulo de 11.300 Vh; Etapa 4 = 10.000

V, com acúmulo de 3.000 Vh. O programa de separação em primeira dimensão durou em média 4,5 horas (SANTOS *et al.*, 2015; POZZI *et al.*, 2015).

Após o término da focalização isoeétrica, as fitas com as proteínas separadas em função do pI foram re-hidratadas e equilibradas em duas etapas. Na primeira etapa foram usados 10 mL de solução contendo uréia 6mol L<sup>-1</sup>, SDS 2 % (m/v), glicerol 30% (v/v), Tris-HCl 50mol L<sup>-1</sup>, azul de bromofenol 0,002% (m/v) e DTT 2% (m/v). Esta etapa denominada “redução” tem a finalidade de manter as proteínas em suas formas reduzidas. Na segunda etapa foi utilizada uma solução de composição similar, porém substituindo-se o DTT por iodoacetamida 2,5% (m/v). Esta etapa é denominada “alquilação” e sua finalidade é alquilar os grupos tióis das proteínas, prevenindo que elas sejam reoxidadas durante o processo eletroforético. Cada uma destas etapas durou 15 minutos e foi feita sob leve agitação em mesa agitadora (SANTOS *et al.*, 2015; POZZI *et al.*, 2015).

Após a etapa de equilíbrio das fitas foi realizada a segunda dimensão do processo eletroforético (SDS-PAGE). A fita foi aplicada em um gel de poliacrilamida 12,50 % (m/v) previamente preparado em placa de vidro de 180x 160 x 1,5 mm. Os géis de poliacrilamida foram preparados a partir das seguintes soluções: Acrilamida, N, N'-metilenobisacrilamida, Tris-hidroximetil amino metano, Ácido clorídrico (HCl), Dodecil sulfato de sódio (SDS), Persulfato de amônio, N, N', N, N'-tetrametilenodiamina (TEMED) e água ultra-pura. Ao lado da fita, foi colocada tira de papel de filtro, ao qual foi aplicado 7 µL de padrão de massa molar contendo as proteínas <sup>2</sup>-fosforilase (97,0 kDa), albumina (66,0 kDa), ovo albumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α-lactoalbumina (14,4 kDa). A fita e a tira de papel de filtro foram vedadas com uma solução quente de agarose 0,5% (m/v), de modo a garantir o contato destes com o gel de poliacrilamida. A corrida eletroforética em segunda dimensão foi feita em sistema para eletroforese 2D-PAGE (GE Healthcare) utilizando a seguinte programação: 1ª etapa: Tensão – 90 V (30 minutos), Corrente Elétrica – 100 mA (30 minutos); 2ª etapa: Tensão – 250 V (300 minutos), Corrente Elétrica – 100 mA (300 minutos) (SANTOS *et al.*, 2015).

Após o período de corrida, de aproximadamente 5,5 h, as proteínas foram reveladas empregando-se o corante Coomassie colidal, que consiste em uma solução de sulfato de amônio 8% (m/v), ácido fosfórico 1,6% (v/v), azul de coomassie G-250 0,08% (m/v) e metanol 25% (v/v). Antes de serem coradas as proteínas foram fixadas, durante 1h, empregando-se uma solução contendo ácido acético 10% (v/v) e etanol 40% (v/v). O corante ficou em contato com o gel durante 72 h e depois foi removido por sucessivas lavagens com água deionizada. Os géis obtidos, feitos em triplicatas, foram escaneados em Scanner GE Healthcare. As imagens escaneadas foram analisadas para se obter a correlação entre as repetições de géis, bem como a contagem de “spots” (proteínas) dos mesmos, utilizando o programa *Image Master Platinum 7.0* (SANTOS *et al.*, 2015; POZZI *et al.*, 2015; BRAGA *et al.*, 2015).

#### **4.11. Determinação de Hg total nas amostras de leite materno, nos *pellets* e *spots* proteicos**

A determinação de mercúrio total nas amostras de leite materno, *pellets* e *spots* proteicos foi feita por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) conforme procedimento já publicado e descrito a seguir (MORAES *et al.*, 2013, BRAGA *et al.*, 2015, VIEIRA *et al.*, 2015). Cerca de 50 mg de *pellets* (massa obtida pela diferença da massa inicial do microtubo e a massa final, depois da precipitação das proteínas) e/ou 250 µL (medidos em triplicata) das amostras de leite materno e/ou três *spots* proteicos recortados dos géis de poliacrilamida foram transferidos para tubos de digestão de 5 mL. Para cada tubo de digestão foram transferidas alíquotas de 1,00 mL de ácido sulfúrico concentrado e 0,25 mL de peróxido de hidrogênio 30% (m/m). O conjunto de tubos foi colocado em bloco digestor com leve aquecimento, até completa mineralização das amostras (extrato transparente). Em seguida, os extratos ácidos obtidos foram transferidos para balões volumétricos de 5 mL completando-se os volumes com água ultrapura (18,2 MΩ cm<sup>-1</sup>). Para validação do método de mineralização foi utilizado padrão certificado *Protein DORM 4 – NRC* contendo 410±55 µg kg<sup>-1</sup> e *DOLT 4–NRC* contendo 2.580±220 µg kg<sup>-1</sup> de mercúrio total.

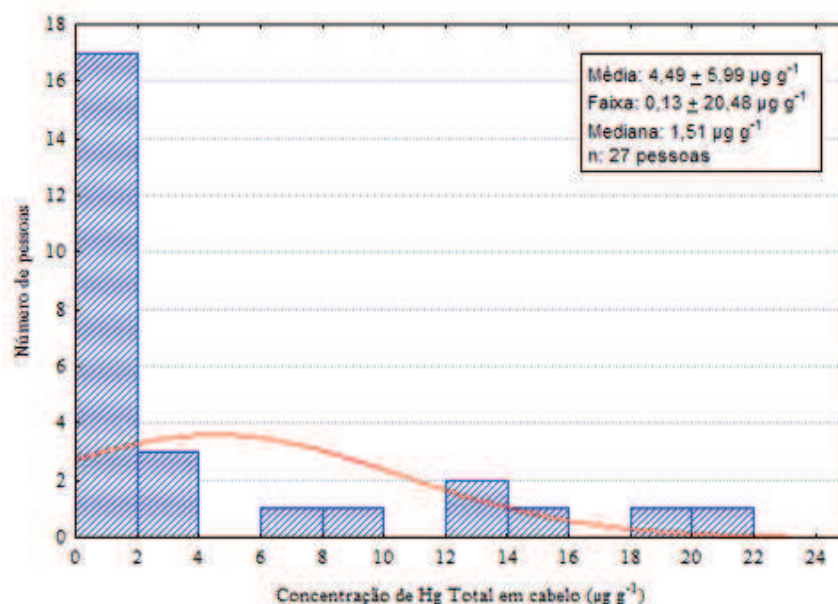
As determinações de mercúrio foram feitas utilizando espectrômetro de absorção atômica SHIMADZU modelo AA-6800, equipado com corretor de absorção de fundo com lâmpada de deutério e sistema *self-reverse* (SR), tubo de grafite pirolítico com plataforma integrada e amostrador automático ASC-6100. Foi utilizada lâmpada de cátodo oco de mercúrio SHIMADZU, operada com corrente mínima de 12 mA e corrente máxima de 400 mA (corrente utilizada na correção de fundo – BG). O comprimento de onda utilizado foi de 253,7 nm e resolução espectral de 0,5 nm. Argônio foi utilizado como gás inerte, mantendo-se um fluxo constante de 1 L min<sup>-1</sup> durante todo o programa de aquecimento, exceto na etapa de atomização, na qual o fluxo de gás foi interrompido. Os sinais de absorbância foram medidos em área de pico por apresentar melhor repetibilidade dos resultados.

As paredes interiores do tubo de grafite com plataforma integrada utilizado nas análises de mercúrio foram recobertos com tungstênio. No processo de recobrimento do tubo, alíquotas de 25 µL de solução modificadora tungstato de sódio 1000 mg L<sup>-1</sup> foram injetadas dentro do atomizador, o qual foi em seguida submetida ao programa descrito por Silva *et al.* (2007). Íons de tungstênio foram depositados sobre a plataforma do tubo de grafite com aquecimento até 500°C, formando camada de carvão de tungstênio, que funciona como modificador químico. Após este tratamento, a vida útil média do tubo foi de 623 queimas (MORAES *et al.*, 2013).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Determinação Hg total nas amostras de cabelo

O cabelo é uma matriz bem estabelecida no estudo de metais tóxicos, sendo considerado um ótimo bio-indicador da contaminação por Hg (HONGE *et al.*, 2013). A Figura 6 apresenta a distribuição das concentrações de HgT determinadas nas amostras de cabelo de todas as 27 participantes da pesquisa, apresentando uma média de  $4,49 \pm 5,99$  variando entre 0,13 e  $20,48 \mu\text{g g}^{-1}$ . As concentrações de HgT determinados nas amostras de cabelo das participantes, em cada região, estão representadas na Tabela 2.



**Figura 6.** Distribuição das concentrações de HgT ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) nas amostras de cabelo das lactantes das comunidades do estudo (alto rio Madeira, alto rio Negro e Goiânia).

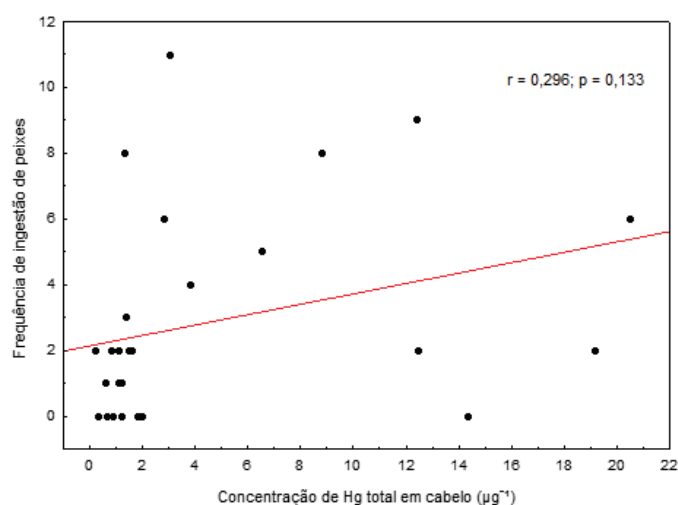
Nas lactantes do alto rio Madeira as concentrações de HgT apresentaram média de  $1,07 \pm 0,64$ , variando entre 0,21 e  $1,99 \mu\text{g g}^{-1}$ . Estas mães declararam ter na carne bovina sua principal fonte de proteína, seguida da carne de frango e de peixe (Figura 8).

Na comunidade de Livramento, no alto rio Negro, a média de concentração de HgT foi de  $2,12 \pm 1,72$  variando entre 0,33 e  $6,53 \mu\text{g g}^{-1}$ . Nesta comunidade as participantes declararam comer principalmente peixe, seguido da carne bovina e da carne de frango (Figura 9).

Ainda na região do alto rio Negro, na comunidade de Santa Isabel, a média da concentração de HgT foi de  $14,62 \pm 4,44$  variando entre 8,81 e  $20,48 \mu\text{g g}^{-1}$ . Estes valores são superiores ao limite preconizado pela Organização Mundial da Saúde que é de  $14 \mu\text{g}$  de Hg por grama de cabelo (FAO/WHO, 2004), o que pode ser indicativo de possíveis efeitos neurotóxicos. Em Santa Isabel todas as lactantes declararam ter no pescado a sua principal fonte de proteína, com uma ingestão praticamente diária, seguida do frango e outros (Figura 10).

Já as concentrações de HgT no cabelo para o grupo controle, Goiânia, apresentou a média de  $0,36 \pm 0,25$  variando entre 0,13 e  $0,62 \mu\text{g g}^{-1}$ . As participantes deste grupo se alimentam principalmente de carne de gado, seguida do frango (Figura 11).

Para avaliar a relação entre as concentrações de Hg total em cabelo e o consumo de peixe pelas lactantes das comunidades em estudo, foi utilizada a análise não paramétrica de correlação (Spearman), apresentada na figura 7. Ao se fazer uma análise dos resultados obtidos, verifica-se uma correlação positiva entre o consumo de peixe e as concentrações de HgT no cabelo ( $r = 0,296$ ), ou seja, uma correlação baixa, porém com uma tendência ascendente. Contudo essa correlação, não se mostrou significativa ( $p = 0,133$ ). Estes resultados podem ser possivelmente, associados ao pequeno número amostral do estudo em questão.



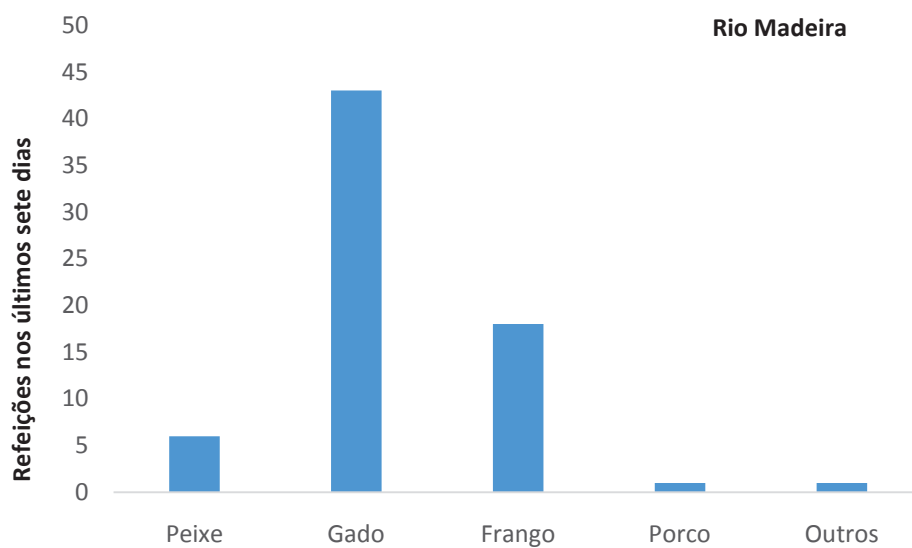
**Figura 7.** Correlação entre as concentrações de HgT ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) no cabelo das lactantes em estudo e a frequência do consumo de peixe (Spearman,  $p < 0,133$ ).

**Tabela 2.** Concentrações de HgT ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) em amostras de cabelo de lactantes residentes em comunidades do rio Madeira (Nova Mutum Paraná, Abunã, Fortaleza do Abunã) e rio Negro (Livramento e Santa Isabel) e no município de Goiânia.

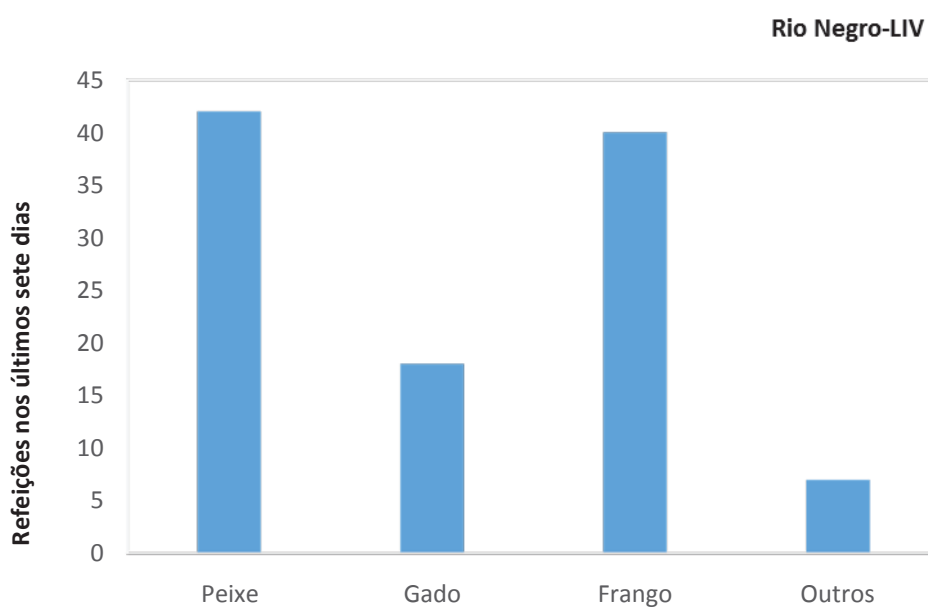
Comunidades	Lactantes	HgT ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
Nova Mutum	M 01	*
Nova Mutum	M 02	0,21
Abunã	M 03	1,6
Abunã	M 04	0,91
Abunã	M 05	0,64
Abunã	M 06	1,99
Fortaleza do Abunã	M 07	1,51
Livramento	LIV 01	0,89
Livramento	LIV 02	3,04
Livramento	LIV 03	1,22
Livramento	LIV 04	3,82
Livramento	LIV 05	1,08
Livramento	LIV 06	0,33
Livramento	LIV 07	1,22
Livramento	LIV 08	1,37
Livramento	LIV 09	6,53
Livramento	LIV 10	1,32
Livramento	LIV 11	2,81
Livramento	LIV 12	1,84
Santa Isabel	SI 01	19,18
Santa Isabel	SI 02	20,48
Santa Isabel	SI 03	14,34
Santa Isabel	SI 04	12,49
Santa Isabel	SI 05	8,81
Santa Isabel	SI 06	12,39
Goiânia	C 01	0,62
Goiânia	C 02	0,13
Goiânia	C 03	0,33

\*Abaixo do limite de quantificação.

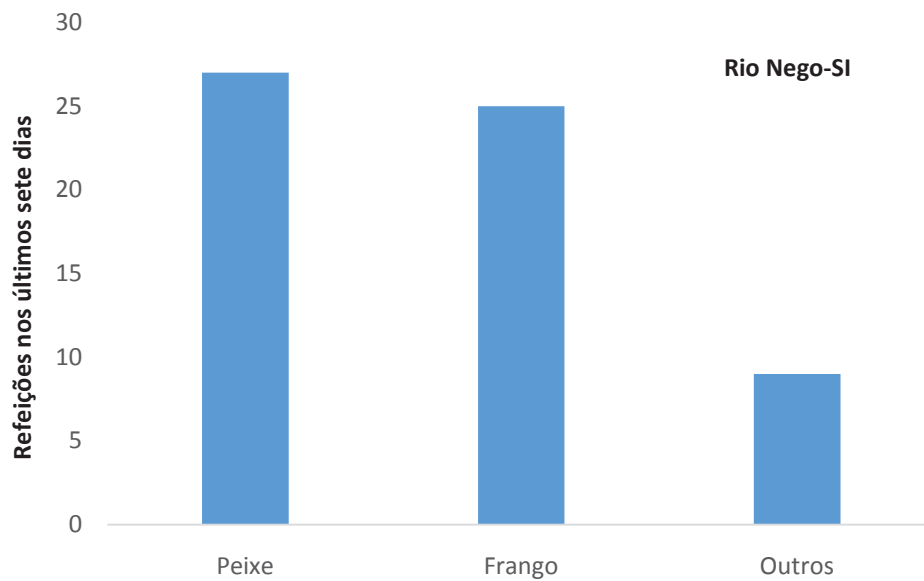




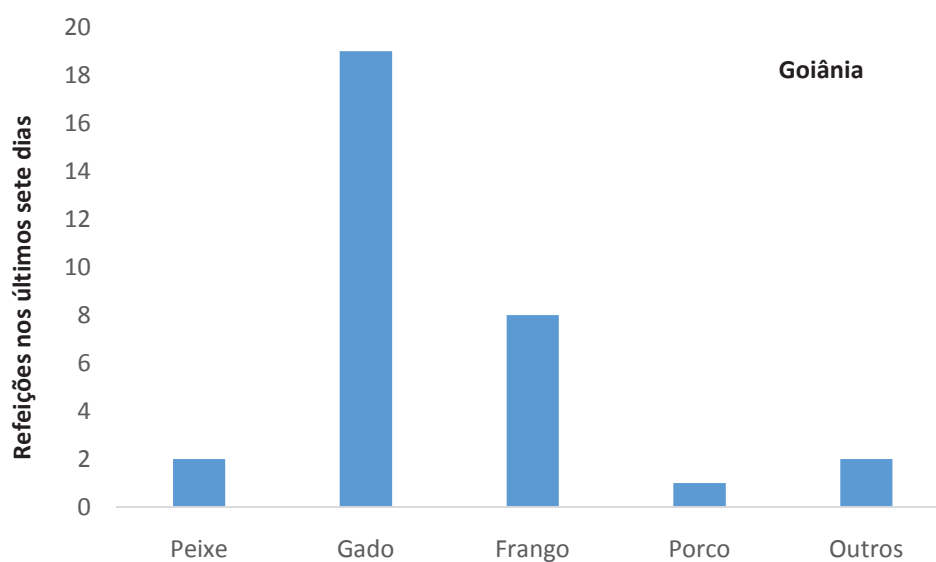
**Figura 8.** Ingestão de proteínas animal por lactante das comunidades do alto rio Madeira – Nova Mutum, Abunã e Fortaleza do Abunã.



**Figura 9.** Ingestão de proteínas animal por lactante do alto rio Negro - Comunidade de Livramento.



**Figura 10.** Ingestão de proteínas animal por lactante do alto rio Negro - Comunidade de Santa Isabel.



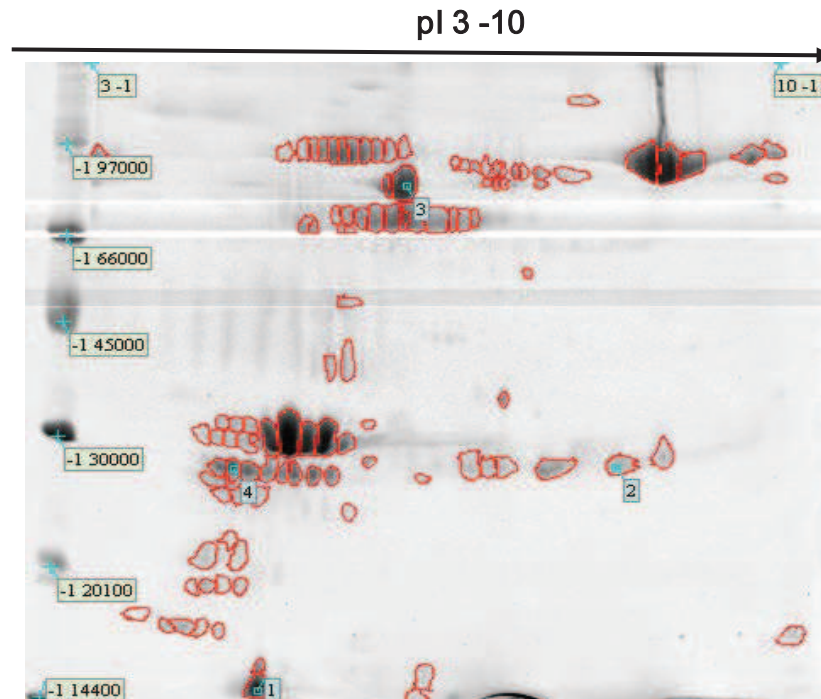
**Figura 11.** Ingestão de proteínas animal por lactante da cidade de Goiânia – Grupo controle.

## 5.2. Determinação da concentração de proteína total nos extratos dos *pellets* proteicos

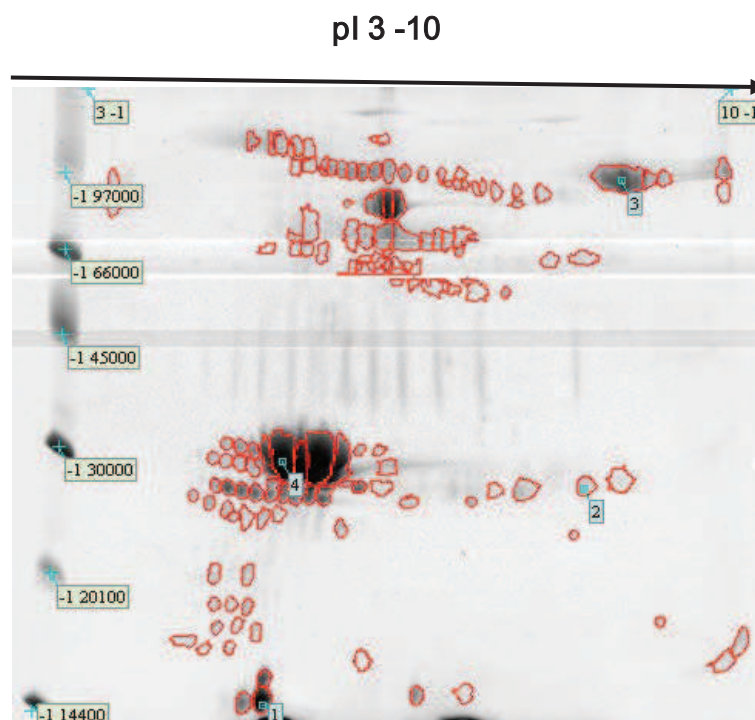
A quantificação da concentração total de proteínas nos extratos dos *pellets* proteicos das amostras de leite materno possibilita calcular a massa proteica a ser aplicada no gel de poliacrilamida, levando em consideração a concentração do gel (12,5%). O resultado dessas determinações indicou que os extratos obtidos pela solubilização dos *pellets* proteicos contêm: Lactantes do grupo controle ( $L_c$ )=  $22,80 \pm 0,51 \text{ g L}^{-1}$ ; Lactantes do rio Madeira ( $L_{rM}$ )=  $21,70 \pm 0,38 \text{ g L}^{-1}$ ; Lactantes do rio Negro ( $L_{rN}$ )=  $21,20 \pm 0,38 \text{ g L}^{-1}$ .

## 5.3. Fracionamento das proteínas por 2D-PAGE

As Figuras 12 a 23 mostram exemplos dos géis obtidos nas condições experimentais descritas na metodologia (item 4.10), onde a concentração de acrilamida nos géis foi de 12,50 % (m/v), gradiente de pH de 3 a 10 e padrão de massa molecular de 14 a 97 kDa. Os *spots* marcados com círculo e numerados são os que apresentaram mercúrio nas determinações por GFAAS. Os resultados das análises de imagem dos géis, utilizando o programa *Image Master Platinum 7.0* são mostrados na Tabela 3.

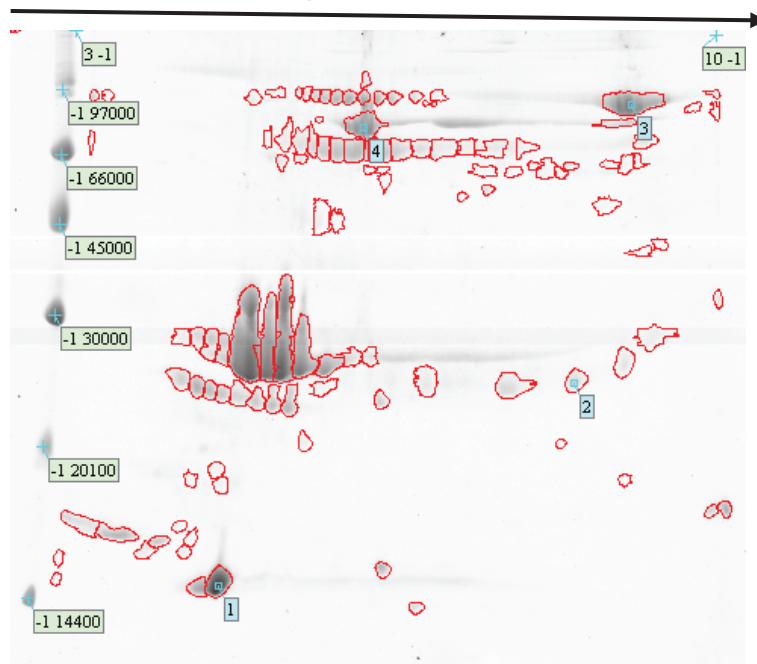


**Figura 12.** Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante Controle 1 ( $L_{C1}$ ). Condições experimentais: concentração do gel de 12,50 (m/v), gradiente de pH 3 -10, padrão de massa molecular de 14 - 97 kDa, tempo total de corrida - 10 horas.



**Figura 13.** Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante Controle 2 ( $L_{C2}$ ). Condições experimentais: concentração do gel de 12,50 (m/v), gradiente de pH 3 -10, padrão de massa molecular de 14 - 97 kDa, tempo total de corrida - 10 horas.

pI 3 – 10

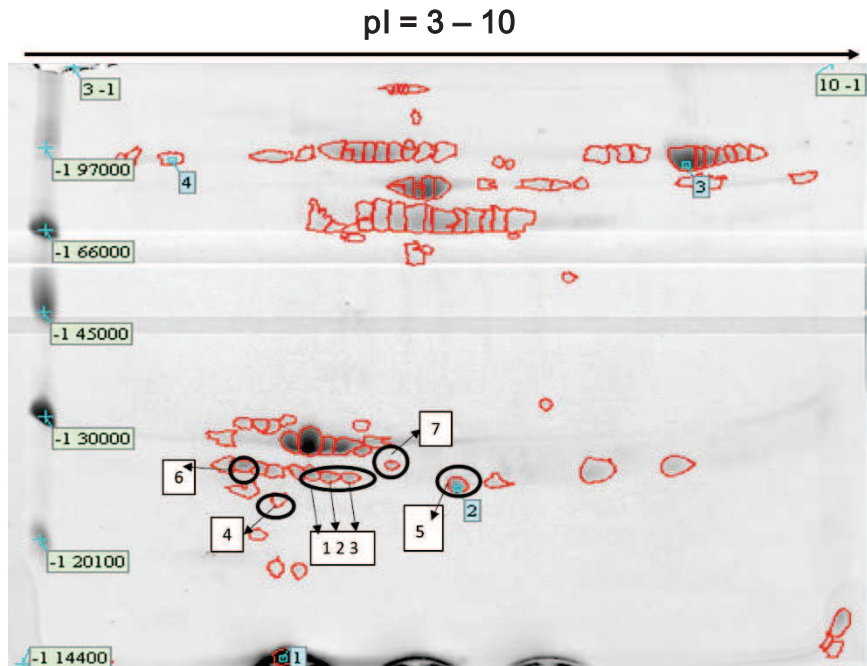


**Figura 14.** Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante Controle 3 ( $L_{C3}$ ). Condições experimentais: concentração do gel de 12,50 (m/v), gradiente de pH 3 -10, padrão de massa molecular de 14 - 97 kDa, tempo total de corrida - 10 horas.

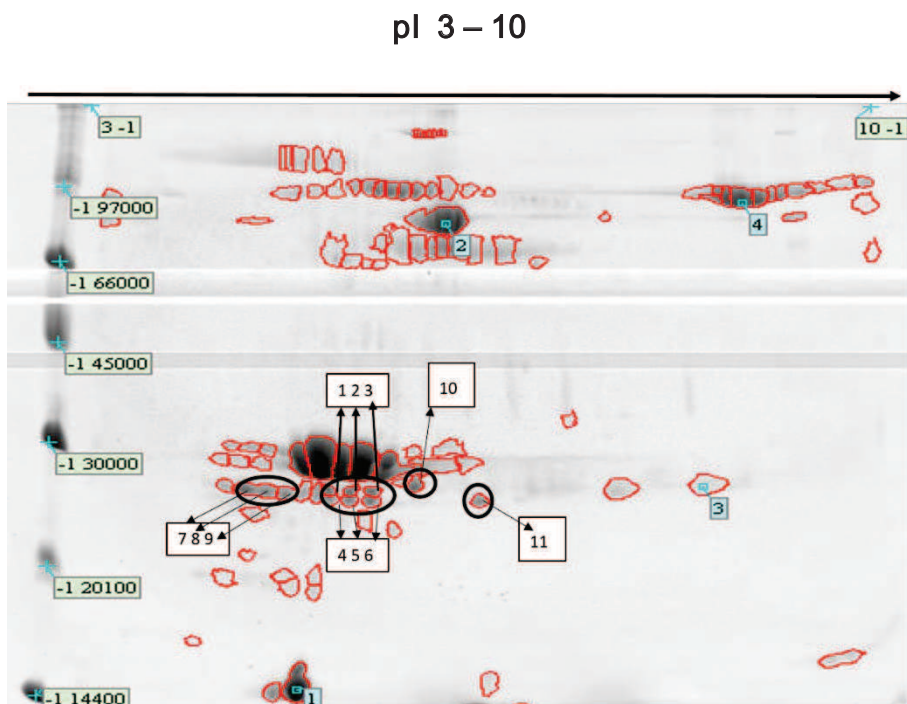
pI 3 – 10



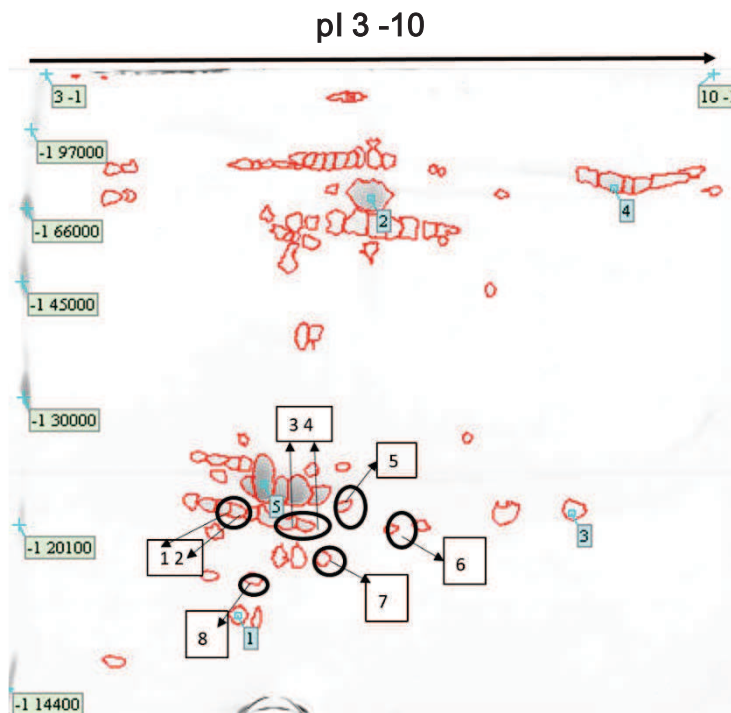
**Figura 15.** Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 1 do rio Madeira ( $L_{M1}$ ). Condições experimentais: concentração do gel de 12,50 (m/v), gradiente de pH 3 -10, padrão de massa molecular de 14 - 97 kDa, tempo total de corrida - 10 horas.



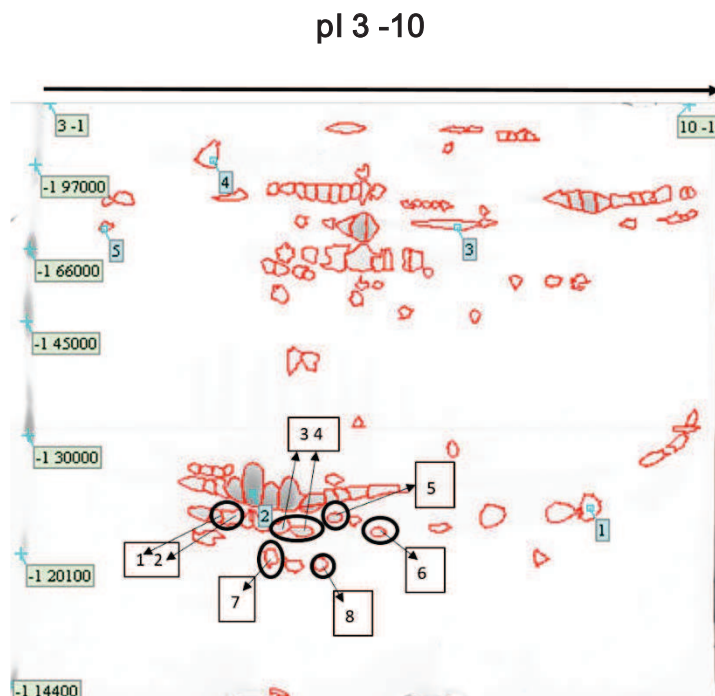
**Figura 16.** Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 2 do rio Madeira ( $L_{rM2}$ ). Condições experimentais: concentração do gel de 12,50 (m/v), gradiente de pH 3 -10, padrão de massa molecular de 14 - 97 kDa, tempo total de corrida - 10 horas.



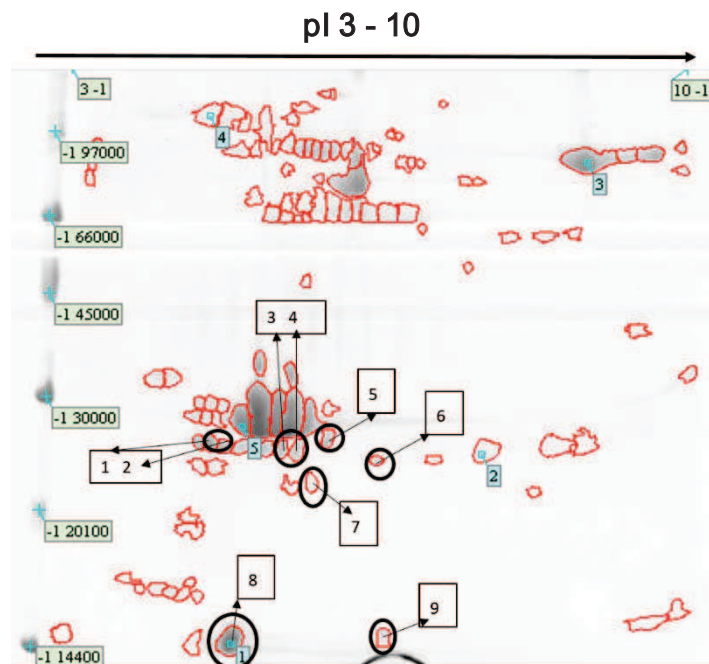
**Figura 17.** Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 3 do rio Madeira ( $L_{rM3}$ ). Condições experimentais: concentração do gel de 12,50 (m/v), gradiente de pH 3 -10, padrão de massa molecular de 14 - 97 kDa, tempo total de corrida - 10 horas.



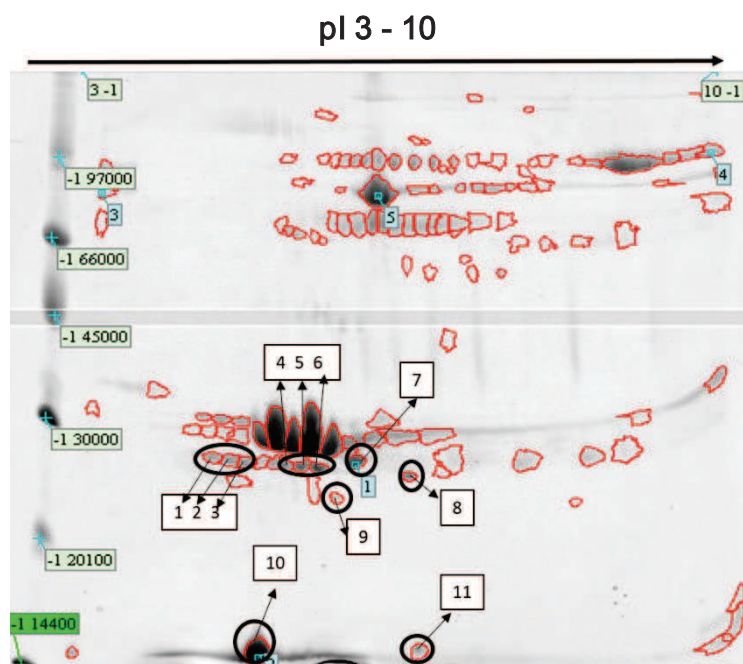
**Figura 18.** Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 4 do rio Madeira ( $L_{rM4}$ ). Condições experimentais: concentração do gel de 12,50 (m/v), gradiente de pH 3 -10, padrão de massa molecular de 14 - 97 kDa, tempo total de corrida - 10 horas.



**Figura 19.** Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 5 do rio Madeira ( $L_{rM5}$ ). Condições experimentais: concentração do gel de 12,50 (m/v), gradiente de pH 3 -10, padrão de massa molecular de 14 - 97 kDa, tempo total de corrida - 10 horas.

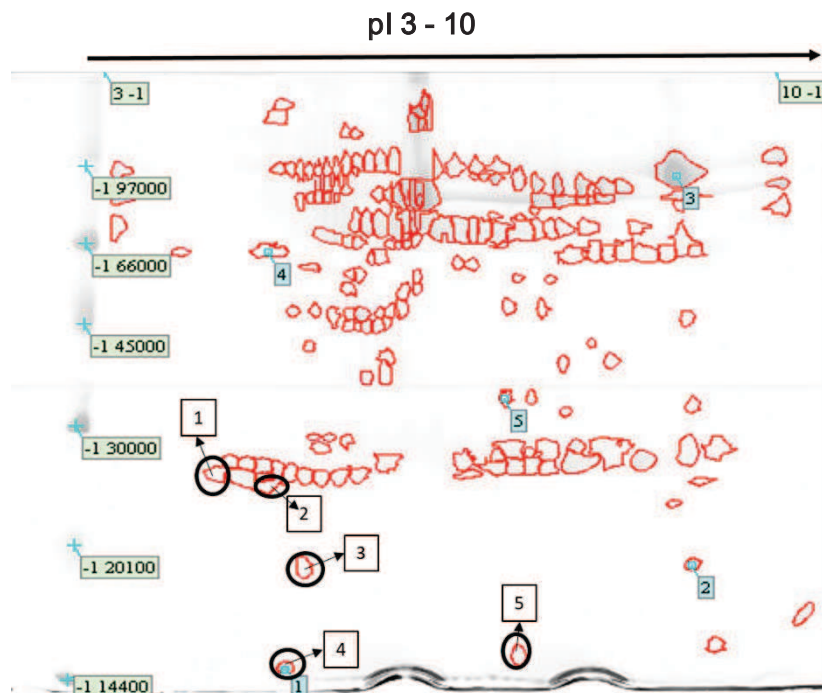


**Figura 20.** Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 6 do rio Madeira ( $L_{rM6}$ ). Condições experimentais: concentração do gel de 12,50 (m/v), gradiente de pH 3 -10, padrão de massa molecular de 14 - 97 kDa, tempo total de corrida - 10 horas.

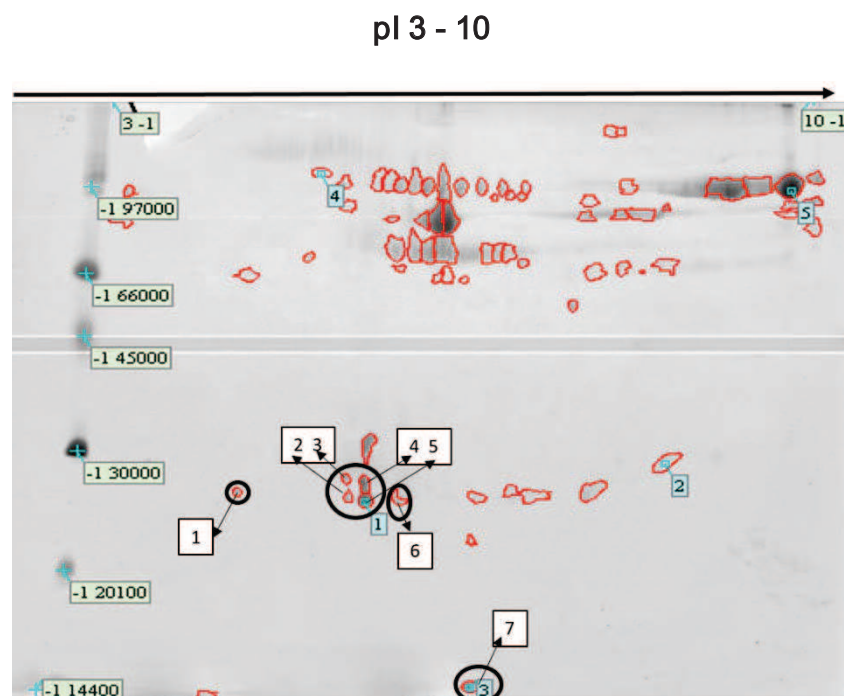


**Figura 21.** Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 1 do rio Negro ( $L_{rN1}$ ). Condições experimentais: concentração do gel de 12,50 (m/v), gradiente de pH 3 -10, padrão de massa molecular de 14 - 97 kDa, tempo total de corrida - 10 horas.





**Figura 22.** Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 2 do rio Negro ( $L_{RN2}$ ). Condições experimentais: concentração do gel de 12,50 (m/v), gradiente de pH 3 -10, padrão de massa molecular de 14 - 97 kDa, tempo total de corrida - 10 horas.



**Figura 23.** Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 3 do rio Negro ( $L_{RN3}$ ). Condições experimentais: concentração do gel de 12,50 (m/v), gradiente de pH 3 -10, padrão de massa molecular de 14 - 97 kDa, tempo total de corrida - 10 horas.

**Tabela 3.** Resultados obtidos da análise de imagem com número médio de *spots* e correlação entre as repetições (n=3) dos géis dos *pellets* proteicos das amostras de leite das lactantes do controle (L<sub>c</sub>), do rio Madeira (L<sub>rM</sub>) e do rio Negro (L<sub>rN</sub>).

Lactantes	Número de <i>Spots</i>	Correlação Média (%)
L <sub>C1</sub>	111,50±2,90	84,30±3,54
L <sub>C2</sub>	132,00±2,7	83,50±7,78
L <sub>C3</sub>	114,50±2,40	92,50±4,95
L <sub>rM1</sub>	101,50±0,70	91,50±0,70
L <sub>rM2</sub>	126,50±2,10	70,50±0,70
L <sub>rM3</sub>	104,50±0,70	93,50±0,07
L <sub>rM4</sub>	98,50±3,40	86,00±1,10
L <sub>rM5</sub>	122,50±2,50	85,00±2,80
L <sub>rM6</sub>	112,50±2,10	95,00±1,40
L <sub>rN1</sub>	122,00±1,40	97,50±0,70
L <sub>rN2</sub>	200,00±1,40	98,00±0,10
L <sub>rN3</sub>	82,00±1,40	90,50±2,10

#### 5.4. Determinação de Hg total nas amostras de leite materno, nos *pellets* e *spots* proteicos

As determinações de mercúrio total nas amostras de leite materno (amostras *in natura* e liofilizadas), *pellets* e *spots* proteicos foram feitas com o objetivo de se fazer balanço de massa e balanço do mercúrio em relação à concentração desse elemento nas amostras de leite, *pellets* e *spots* proteicos obtidos no processo de fracionamento das proteínas por 2D-PAGE. Nas Tabelas 4a 14 são apresentadas as concentrações de mercúrio total nas amostras de leite *in natura* e leite liofilizado, dos *pellets* e dos *spots* proteicos obtidos conforme procedimento descrito no item 4.11. Também são mostrados os resultados obtidos em relação aos padrões certificados *Protein DORM 4 – NRC* e *DOLT 4–NRC* utilizados para validar o procedimento de análise.

**Tabela 4.** Resultados obtidos na determinação de mercúrio total nas amostras de leite materno (amostras *in natura* e liofilizadas) e *pellets* proteicos.

Lactantes	Leite <i>in natura</i> *	Leite Liofilizado <sup>#</sup>	<i>Pellets</i> <sup>#</sup>
L <sub>C1</sub>	<LOQ	<LOQ	<LOQ
L <sub>C2</sub>	<LOQ	<LOQ	<LOQ
L <sub>C3</sub>	<LOQ	<LOQ	<LOQ
L <sub>rM1</sub>	0,25±0,003	0,03±0,0004	0,027±0,0003
L <sub>rM2</sub>	0,38±0,004	0,05±0,0007	0,047±0,0002
L <sub>rM3</sub>	0,72±0,008	0,09±0,001	0,079±0,0006
L <sub>rM4</sub>	0,30±0,006	0,04±0,0005	0,034±0,0003
L <sub>rM5</sub>	0,34±0,005	0,05±0,0006	0,041±0,0003
L <sub>rM6</sub>	0,74±0,009	0,11±0,0016	0,093±0,001
L <sub>rN1</sub>	3,30±0,04	0,48±0,005	0,23±0,003
L <sub>rN2</sub>	3,70±0,04	0,53±0,006	0,26±0,003
L <sub>rN3</sub>	2,50±0,03	0,37±0,004	0,18±0,002

L<sub>C</sub> – Lactante controle; L<sub>rM</sub> – Lactante do rio Madeira; L<sub>rN</sub> – Lactante do rio Negro \*Concentração de Hg em  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; <sup>#</sup>Concentração de Hg em  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; LOQ =  $0,044 \mu\text{g L}^{-1}$  -  $11,50 \mu\text{g kg}^{-1}$ ; LOQ = Limite de quantificação do método de análise

**Tabela 5.** Resultados obtidos na determinação de mercúrio total nos *spots* proteicos obtidos no processo de fracionamento das proteínas das amostras de leite materno da lactante 1 do rio Madeira por 2D-PAGE.

<i>Spots</i> Proteicos	Massa Molecular (kDa)	Massa (Proteína) ( $\mu\text{g}$ )	[Hg] <sub>Total</sub> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
LrM <sub>1-spot1</sub>	24,2	8,7	0,032±0,0002
LrM <sub>1-spot2</sub>	23,74	6,9	0,024±0,0003
LrM <sub>1-spot3</sub>	23,17	10,2	0,028±0,0004
LrM <sub>1-spot4</sub>	22,73	10,5	0,031±0,0005
LrM <sub>1-spot5</sub>	20,49	2,4	0,016±0,0001
LrM <sub>1-spot6</sub>	23,51	10,6	0,043±0,0005
LrM <sub>1-spot7</sub>	22,4	1,8	0,014±0,0001

**Tabela 6.** Resultados obtidos na determinação de mercúrio total nos *spots* proteicos obtidos no processo de fracionamento das proteínas das amostras de leite materno da lactante 2 do rio Madeira por 2D-PAGE.

<i>Spots</i> Proteicos	Massa Molecular (kDa)	Massa (Proteína) (µg)	[Hg] Total (µg g <sup>-1</sup> )
LrM <sub>2-spot1</sub>	27,1	5,6	0,058±0,0008
LrM <sub>2-spot2</sub>	25,2	4,8	0,047±0,0005
LrM <sub>2-spot3</sub>	23,7	3,5	0,025±0,0003
LrM <sub>2-spot4</sub>	23	1,2	0,015±0,0002
LrM <sub>2-spot5</sub>	21,5	12,4	0,16±0,002
LrM <sub>2-spot6</sub>	26,5	8,6	0,11±0,002
LrM <sub>2-spot7</sub>	22,8	2,4	0,013±0,002

**Tabela 7.** Resultados obtidos na determinação de mercúrio total nos *spots* proteicos obtidos no processo de fracionamento das proteínas das amostras de leite materno da lactante 3 do rio Madeira por 2D-PAGE.

<i>Spots</i> Proteicos	Massa Molecular (kDa)	Massa (Proteína) (µg)	[Hg] Total (µg g <sup>-1</sup> )
LrM <sub>3-spot1</sub>	25,8	3,4	0,039±0,0004
LrM <sub>3-spot2</sub>	25,64	3,96	0,046±0,0005
LrM <sub>3-spot3</sub>	25,64	4,21	0,049±0,0006
LrM <sub>3-spot4</sub>	24,84	3,11	0,036±0,0004
LrM <sub>3-spot5</sub>	25,06	3,87	0,045±0,00045
LrM <sub>3-spot6</sub>	24,72	4,35	0,051±0,0006
LrM <sub>3-spot7</sub>	26,41	3,01	0,035±0,0004
LrM <sub>3-spot8</sub>	25,93	7,42	0,086±0,0009
LrM <sub>3-spot9</sub>	25,29	4,76	0,055±0,0006
LrM <sub>3-spot10</sub>	25,99	5,61	0,065±0,0007
LrM <sub>3-spot11</sub>	24,84	3,98	0,046±0,0005
LrM <sub>3-spot12</sub>	22,57	1,22	0,014±0,0002

**Tabela 8.** Resultados obtidos na determinação de mercúrio total nos *spots* proteicos obtidos no processo de fracionamento das proteínas das amostras de leite materno da lactante 4 do rio Madeira por 2D-PAGE.

<i>Spots</i> Proteicos	Massa Molecular (kDa)	Massa (Proteína) ( $\mu\text{g}$ )	[Hg] Total ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
LrM <sub>4-spot1</sub>	21,304	6,03	0,097 $\pm$ 0,001
LrM <sub>4-spot2</sub>	20,926	4,7	0,076 $\pm$ 0,0009
LrM <sub>4-spot3</sub>	20,281	8,31	0,13 $\pm$ 0,0002
LrM <sub>4-spot4</sub>	20,014	1,61	0,025 $\pm$ 0,0003
LrM <sub>4-spot5</sub>	21,304	3,44	0,053 $\pm$ 0,0006
LrM <sub>4-spot6</sub>	19,956	1,6	0,025 $\pm$ 0,0004
LrM <sub>4-spot7</sub>	18,814	0,9	0,024 $\pm$ 0,0003
LrM <sub>4-spot8</sub>	17,994	0,5	0,018 $\pm$ 0,0002

**Tabela 9.** Resultados obtidos na determinação de mercúrio total nos *spots* proteicos obtidos no processo de fracionamento das proteínas das amostras de leite materno da lactante 5 do rio Madeira por 2D-PAGE.

<i>Spots</i> Proteicos	Massa Molecular (kDa)	Massa (Proteína) ( $\mu\text{g}$ )	[Hg] Total ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
LrM <sub>5-spot1</sub>	22,86	9,3	0,076 $\pm$ 0,0009
LrM <sub>5-spot2</sub>	22,86	8,5	0,069 $\pm$ 0,0008
LrM <sub>5-spot3</sub>	22,13	7,8	0,063 $\pm$ 0,0007
LrM <sub>5-spot4</sub>	21,82	6,74	0,058 $\pm$ 0,0007
LrM <sub>5-spot5</sub>	22,65	5,51	0,044 $\pm$ 0,0005
LrM <sub>5-spot6</sub>	21,7	1,14	0,024 $\pm$ 0,0003
LrM <sub>5-spot7</sub>	19,9	0,74	0,015 $\pm$ 0,0002
LrM <sub>5-spot8</sub>	19,7	0,8	0,016 $\pm$ 0,0002

**Tabela 10.** Resultados obtidos na determinação de mercúrio total nos *spots* proteicos obtidos no processo de fracionamento das proteínas das amostras de leite materno da lactante 6 do rio Madeira por 2D-PAGE.

<i>Spots</i> Proteicos	Massa Molecular (kDa)	Massa (Proteína) ( $\mu\text{g}$ )	[Hg] Total ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
LrM <sub>6-spot1</sub>	25,57	9,83	0,042 $\pm$ 0,0005
LrM <sub>6-spot2</sub>	25,32	7,26	0,032 $\pm$ 0,0004
LrM <sub>6-spot3</sub>	24,95	7,93	0,036 $\pm$ 0,0005
LrM <sub>6-spot4</sub>	24,95	6,65	0,031 $\pm$ 0,0004
LrM <sub>6-spot5</sub>	27,03	11,4	0,046 $\pm$ 0,0006
LrM <sub>6-spot6</sub>	23,99	1,41	0,014 $\pm$ 0,0002
LrM <sub>6-spot7</sub>	22,07	0,99	0,012 $\pm$ 0,0002
LrM <sub>6-spot8</sub>	14,45	45,26	0,11 $\pm$ 0,002
LrM <sub>6-spot9</sub>	14,7	3,15	0,026 $\pm$ 0,0003

**Tabela 11.** Resultados obtidos na determinação de mercúrio total nos *spots* proteicos obtidos no processo de fracionamento das proteínas das amostras de leite materno da lactante 1 do rio Negro por 2D-PAGE.

<i>Spots</i> Proteicos	Massa Molecular (kDa)	Massa (Proteína) ( $\mu\text{g}$ )	[Hg] Total ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
LrN <sub>1-spot1</sub>	26,39	2,23	0,022 $\pm$ 0,0003
LrN <sub>1-spot2</sub>	26,03	4,73	0,044 $\pm$ 0,0005
LrN <sub>1-spot3</sub>	25,87	4,9	0,046 $\pm$ 0,0006
LrN <sub>1-spot4</sub>	25,7	4,34	0,041 $\pm$ 0,0005
LrN <sub>1-spot5</sub>	25,6	6,4	0,048 $\pm$ 0,0006
LrN <sub>1-spot6</sub>	25,33	8,4	0,056 $\pm$ 0,0007
LrN <sub>1-spot7</sub>	25,91	14,44	0,075 $\pm$ 0,0009
LrN <sub>1-spot8</sub>	24,64	3,7	0,034 $\pm$ 0,0004
LrN <sub>1-spot9</sub>	23,22	0,91	0,014 $\pm$ 0,0002
LrN <sub>1-spot10</sub>	14,74	80,63	0,21 $\pm$ 0,003
LrN <sub>1-spot11</sub>	14,96	2,62	0,032 $\pm$ 0,0004

**Tabela 12.** Resultados obtidos na determinação de mercúrio total nos *spots* proteicos obtidos no processo de fracionamento das proteínas das amostras de leite materno da lactante 2 do rio Negro por 2D-PAGE.

<i>Spots</i> Proteicos	Massa Molecular (kDa)	Massa (Proteína) (µg)	[Hg] Total (µg g <sup>-1</sup> )
LrN <sub>2-spot1</sub>	25, 571	1,86	0,41±0,005
LrN <sub>2-spot2</sub>	24, 245	2,93	0,65±0,008
LrN <sub>2-spot3</sub>	18, 906	1,08	0,24±0,003
LrN <sub>2-spot4</sub>	14, 924	14,5	2,40±0,032
LrN <sub>2-spot5</sub>	15, 180	2,31	0,51±0,007

**Tabela 13.** Resultados obtidos na determinação de mercúrio total nos *spots* proteicos obtidos no processo de fracionamento das proteínas das amostras de leite materno da lactante 3 do rio Negro por 2D-PAGE.

<i>Spots</i> Proteicos	Massa Molecular (kDa)	Massa (Proteína) (µg)	[Hg] Total (µg g <sup>-1</sup> )
LrN <sub>3-spot1</sub>	26,23	1,01	0, 073±0,0008
LrN <sub>3-spot2</sub>	25,74	2,32	0,16±0, 0020
LrN <sub>3-spot3</sub>	27,37	2,9	0,21±0, 0030
LrN <sub>3-spot4</sub>	26,6	9,73	0,58±0, 0060
LrN <sub>3-spot5</sub>	25,26	1,96	0,12±0, 0020
LrN <sub>3-spot6</sub>	25,26	4,21	0,26±0, 0035
LrN <sub>3-spot7</sub>	14,54	10,01	0,62±0, 0075

**Tabela 14.** Resultados obtidos na determinação de mercúrio total nos padrões certificados *Protein* DORM 4 – NRC e DOLT 4–NRC.

Padrões Certificados	[Hg] <sub>Total</sub> Certificado ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	[Hg] <sub>Total</sub> Determinado ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
DORM 4-NRC	0,410 $\pm$ 0,055	0,405 $\pm$ 0,005
DOLT 4-NRC	2,58 $\pm$ 0,034	2,55 $\pm$ 0,032

As concentrações de mercúrio total nos *spots* proteicos foram determinadas após mineralização dos *spots* e considerando-se a massa de proteína nos *spots* calculada utilizando-se o programa *Image Master Platinum 7.0*. Os resultados obtidos e mostrados nas Tabelas 5-13, representam em média 95-98% do mercúrio presente nos *pellets* proteicos, considerando a massa de proteína aplicada nos géis (375  $\mu\text{g}$ ) no processo de fracionamento por 2D-PAGE o somatório das massas de proteína nos *spots* que apresentaram mercúrio nas determinações por GFAAS.



## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Determinação de Hg total nas amostras de cabelo

Pesquisas realizadas na Amazônia relatam que a população amazônica possui uma das mais elevadas exposições ao Hg do mundo. Este fato pode estar relacionado ao processo de formação geológica da bacia, onde o mercúrio fica concentrado no solo pelo processo de pedogênese, além da contaminação proveniente do garimpo. Assim, as comunidades ribeirinhas, cuja dieta diária consiste principalmente de peixes dos rios, podem estar facilmente expostas ao mercúrio, uma vez que este elemento é incorporado nos tecidos dos organismos aquáticos, após sofrer metilação (ROCHA *et al.*, 2014).

Estudos realizados pelos mesmos pesquisadores, em comunidades ribeirinhas da região amazônica, nas quais a ingestão de peixes dos rios é praticamente diária, verificou-se que a concentração média de mercúrio no cabelo é de  $19,10 \mu\text{g g}^{-1}$ . Os resultados aqui encontrados são inferiores a essa média, porém com exceção aos encontrados na comunidade de Santa Isabel. Vieira *et al.*, (2013), verificou em seus estudos, uma concentração média de  $8,20 \mu\text{g g}^{-1}$  de Hg nos cabelos de 82 mães de comunidades tradicionais do rio Madeira e uma média de  $1,30 \mu\text{g g}^{-1}$  em mães da área urbana de Porto Velho (Rondônia).

Para Dórea *et al.* (2012) as mulheres, principalmente as de comunidades isoladas do rio Negro, como a comunidade de Santa Isabel, que consomem pelo menos uma refeição a base de peixe por dia, mostram uma das mais elevadas concentrações de HgT no cabelo em relação a outras de qualquer outra parte do mundo. O autor reporta uma média de  $18,30 \mu\text{g g}^{-1}$  para esta região, o que se assemelha ao que encontramos na região de Santa Isabel.

Faial *et al.* (2014) em estudo para a verificação da concentração de mercúrio nos cabelos de 141 voluntários, residentes em Barreiras, no rio Tapajós, constatou que 84,40% de suas amostras estavam acima limite de tolerância estabelecido pela OMS, que é de  $14 \mu\text{g}$  de Hg por grama de cabelo.

Diversas pesquisas realizadas com populações ribeirinhas da Amazônia indicam que o peixe constitui um elemento importante no regime alimentar desse grupo (DA SILVA *et al.*, 2006). A contaminação de Hg na biota aquática

vem sendo amplamente estudada devido à sua relação direta com a saúde humana, já que a principal fonte de exposição do homem ao Hg se dá através da ingestão de peixe (KASPER *et al.*, 2014).

Ao analisarmos as concentrações de HgT nas amostras de cabelos das mães desta pesquisa, observamos concentrações médias bem semelhantes entre as comunidades do rio Madeira e a comunidade de Livramento, no rio Negro. Esta semelhança pode estar principalmente, relacionada ao fato de em sua maioria, serem comunidades mais urbanizadas e com fluxos migratórios provenientes de outras partes do país, fatores estes que segundo MARQUES *et al.* (2014) podem se relacionar ao baixo consumo de peixe.

Segundo Pinheiro *et al.* (2012) a exposição ao mercúrio na Amazônia ocorre principalmente em comunidades ribeirinhas, mais afastadas dos centros urbanos. Este fato pode explicar os valores encontrados em Santa Isabel, uma comunidade ribeirinha ao alto rio Negro, onde a ingestão do pescado é sua principal fonte de proteína, uma área de privação socioeconômica, com energia elétrica por gerador a gasolina, onde o acesso se dá apenas de barco e a 115 km de Manaus.

O grupo controle apresentou valor médio muito baixo o que talvez tenha relação ao baixo consumo de peixe e sua atividade laboral não ser vinculada ao garimpo ou áreas próximas a ele. De acordo com Pirard e colaboradores (2014), o consumo de peixe e a inexistência de atividades profissionais relacionadas ao mercúrio, são as variáveis mais importantes para se prever a concentração de mercúrio no cabelo.

## 6.2. Fracionamento das proteínas por 2D PAGE

O processo de fracionamento das proteínas das amostras de leite materno por 2D-PAGE, conforme mostra as Figuras 10 – 21 apresentou baixa diversidade de *spots* proteicos, com valores de massa molecular média entre 100 – 13 kDa. As imagens foram comparadas entre as repetições de géis por meio do matching feito pelo programa *Image Master Platinum 7.0*, que consiste em identificar quais *spots* são equivalentes entre as repetições (Tabela 2). Analisando-se os resultados apresentados na Tabela 2, observa-se que as repetições entre as corridas dos géis das amostras controle (Lc); rio Madeira

(LrM) e rio Negro (LrN) apresentaram correlação média de 80 a 94%. Os valores de *matching*  $\approx 80\%$  indicam que no mínimo  $\pm 80\%$  dos *spots* estão presentes nas repetições dos géis, o que caracteriza excelente repetibilidade e reprodutibilidade entre as corridas (POZZI *et al.*, 2015; BRAGA *et al.*, 2015; VIEIRA *et al.*, 2015). Moraes *et al.* (2013) analisando a correlação de quatro géis, de amostras de tecido muscular de dourada e pacu, respectivamente, verificou que 68% e 70% dos *spots* de proteína estavam presentes entre os géis. Além disso, o número médio de *spots* encontrados nos géis -  $168 \pm 15$  em dourada e  $98 \pm 8$  em pacu - apresentou um desvio padrão relativo de menos de 10%, o que foi considerado muito bom para fracionamento de proteínas por PAGE-2D para estas espécies. Apesar do número médio de *spots* proteicos ser inferior, o processo de fracionamento das proteínas mostrou-se mais eficiente que quando comparado aos resultados obtidos por Santos *et al.*, 2011. O proteoma de leite materno obtido por esses autores em amostras de lactantes, também do rio Madeira, por 2D-PAGE apresentou muito arraste e muita sobreposição de *spots*, com valores de *matching*  $< 70\%$ . Resultados obtidos nestas condições não representam bom fracionamento das proteínas e os arrastes dificultam a análise das imagens dos géis.

### 6.3. Determinação de Hg total nas amostras de leite materno, nos *pellets* e *spots* proteicos

Com base nos resultados apresentados na Tabela 3 e fazendo-se cálculo de balanço de massa considerando-se a concentração de mercúrio total nas amostras de leite liofilizadas e nos *pellets* proteicos, observa-se que em relação às amostras de leite das lactantes do rio Madeira, cerca de 85 a 95% do mercúrio presente no leite liofilizado encontra-se na fração proteica. Esses resultados corroboram com os resultados obtidos por Santos *et al.* (2015) que trabalhando também com lactantes do rio Madeira determinou que cerca de 95% do mercúrio total presente no leite materno estava ligado na fração proteica. No entanto, esses autores apresentaram resultados para uma única lactante, enquanto que no presente trabalho são apresentados resultados médios em relação a seis lactantes. Considerando que 85 a 95% do mercúrio está ligado a fração proteica, pode-se inferir que 15 a 5% do mercúrio total está

ligado na fração lipídica na forma orgânica, como metilmercúrio mercúrio, que apresentam grande afinidade por compostos apolares como os lipídios (YANG *et al.*, 1997; GUNDACKER *et al.*, 2002; JENSEN *et al.*, 2005; HERCULANO *et al.*, 2006). Os resultados obtidos em relação às lactantes do rio Negro (Tabela 3) reforçam essa inferência. Os cálculos de balanço de massa considerando a concentração de mercúrio total nos *pellets* proteicos e nas amostras de leite liofilizadas permitem observar que cerca de 50% do mercúrio total está ligado na fração proteica e que a diferença de 51% pode estar ligada na fração lipídica.

Diversos trabalhos (LEBEL *et al.*, 1998; AMORIM *et al.*, 2000; BASTOS *et al.*, 2008; NEVADA *et al.*, 2010) têm demonstrado que devido aos elevados níveis de metilação, consequentes das altas concentração de matéria orgânica presente no rio Negro, baixo pH e anoxia, grande parte do mercúrio presente nos organismos aquáticos, particularmente em peixes, estão na forma orgânica (metilmercúrio), composto lipossolúvel facilmente absorvido pelos tecidos dos organismos vivos. Segundo Vieira *et al.* (2013) mudanças socioeconômicas ocorridas na região do rio Madeira têm diminuído o hábito do consumo de peixe por esta população, diferente das populações das regiões do rio Negro, onde o consumo de peixe é alto, o que pode afetar as concentrações de metilmercúrio e mercúrio total no leite materno e no cabelo destas mães. Devido a longa duração do período de amamentação, até por volta dos 30 meses, as crianças desta região podem se tornar mais vulneráveis, podendo ingerir uma quantidade de Hg substancial. Deve-se ressaltar ainda que os solos da região amazônica sejam naturalmente ricos em mercúrio, o qual foi acumulado e preso ao solo durante sua formação e a principal via deste metal para os corpos aquáticos, o que expõe a população amazônica a elevados níveis de mercúrio diariamente (ROCHA *et al.*, 2014).

Os resultados das determinações de mercúrio total nos *spots* proteicos (Tabelas 4-12) representam em média 95 – 98% do mercúrio presente nos *pellets* proteicos conforme demonstraram os cálculos de balanço de massa feitos como base na concentração de mercúrio presente no somatório das massas de proteína dos *spots*. Como exemplo, abaixo é mostrado esse cálculo feito em relação aos resultados obtidos para a lactante 1 do rio Madeira.

Dados (Tabela 3 e 4):

Concentração de mercúrio total no *pellet* ( $L_{rM1}$ ) =  $0,027 \mu\text{g g}^{-1}$

Massa de proteína aplica no gel nas corridas 2D PAGE =  $375 \mu\text{g}$

Somatório das massas de proteína nos *spots* proteicos =  $51,10 \mu\text{g}$

$$\begin{array}{rcl} \text{Considerando esses dados:} & 0,027\mu\text{g} & \longrightarrow 1 \cdot 10^{-6} \mu\text{g} \\ & x & \longrightarrow 375 \mu\text{g} \\ & & x = 1,013 \cdot 10^{-5} \mu\text{g de Hg}_{\text{total}} \end{array}$$

$x$  = massa de mercúrio total presente nos sete *spots* da lactante 1 do rio Madeira

Dessa forma: Concentração de  $\text{Hg}_{\text{total}}$  nos sete *spots* =  $1,013 \cdot 10^{-5} \mu\text{g} = 0,20 \mu\text{g g}^{-1}$

$$51,10 \cdot 10^{-6} \text{g}$$

Calculando-se o somatório das concentrações de mercúrio total ( $\Sigma_{\text{Hg-t}}$ ) teremos:

$$\Sigma_{\text{Hg-t}} (\mu\text{g g}^{-1}) = 0,032 + 0,024 + 0,028 + 0,031 + 0,016 + 0,043 + 0,014$$

$$\Sigma_{\text{Hg-t}} (\mu\text{g g}^{-1}) = 0,188 \cong 0,19 \mu\text{g g}^{-1}$$

Assim:

$$\begin{array}{rcl} 0,20 \mu\text{g g}^{-1} & \longrightarrow & 100\% \\ 0,19 \mu\text{g g}^{-1} & \longrightarrow & x \quad \quad \quad x = 95\% \end{array}$$

Utilizando-se esse mesmo raciocínio de cálculo obtêm-se valores de porcentagem na faixa de 85 a 95% (conforme já comentado acima), valores esses que demonstram que praticamente todo mercúrio presente na massa de proteína aplicada no processo de fracionamento das proteínas por 2D-PAGE, está presente na massa de proteína dos sete *spots* proteicos nos quais foi determinado a presença de mercúrio por GFAAS. Os resultados obtidos foram validados por determinação de mercúrio total nos padrões certificados *Protein DORM 4 – NRC* e *DOLT 4–NRC*, conforme mostram os resultados apresentados na Tabela 13. Analisando-se os valores de concentração de mercúrio total determinados, observa-se que os desvios padrões relativos (%DPR) calculados são inferiores a 2% o que representa excelente

repetibilidade (precisão). Como também, comparando-se os valores de concentração de mercúrio total certificados com os valores determinados, observa-se que os valores determinados são bem próximos dos certificados, apresentando erro absoluto de 1,20%, o que caracteriza excelente exatidão (Andrade, 1987). Segundo Santos (2013), valores determinados com uma diferença menor que 2%, em relação aos valores certificados comprovam exatidão e precisão do método.

Os *spots* proteicos que apresentaram mercúrio nas determinações por GFAAS podem conter uma ou mais proteínas que apresentem características de biomarcador em nível proteômico, dos efeitos tóxicos do mercúrio em lactantes contaminadas por este elemento. Santos *et al.*, 2015, trabalhando com lactantes do rio Madeira, determinou por GFAAS a presença de mercúrio em um *spot* de proteína, que foi em seguida, caracterizada por ESI-MS/MS. Com base em pesquisas na base de dados UniProt, este *spot* de proteína foi identificado como lisozima C e continha Hg incorporado em sua estrutura. Os autores sugerem que essa proteína pode ser um forte candidato a biomarcador da exposição ao Hg. A lisozima C atua diretamente sobre bactérias e aumenta a atividade da IgA, exercendo assim um papel importante nos mecanismos de defesa de recém-nascidos.

## 7. CONCLUSÕES

A eletroforese bidimensional (2D-PAGE) como componente de seletividade no fracionamento de proteínas das amostras de leite materno mostrou-se bastante eficiente, permitindo a obtenção do proteoma dessas amostras com média de 150 *spots* proteicos e *matching*  $\approx 80\%$ .

A espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) como componente de sensibilidade permitiu determinação de mercúrio total nas amostras de leite *in natura* e liofilizadas; nos *pellets* e *spots* proteicos obtidos no processo de fracionamento das proteínas por 2D-PAGE.

Os resultados obtidos na análise das imagens dos géis de eletroforese 2D-PAGE e no mapeamento do mercúrio por GFAAS nos *spots* proteicos, indicaram que o mercúrio se encontra ligado em proteínas de massa molecular na faixa de 26 – 14 kDa.

Uma melhor caracterização das proteínas nos *spots* proteicos nos quais foi confirmada a presença de mercúrio ligado a essas proteínas será necessária, para que se possa avaliar se essas proteínas apresentam características de biomarcador em nível proteômico, dos efeitos tóxicos do mercúrio em lactantes contaminados por esse elemento.

## 8. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M.D.; LACERDA, L.D.; BASTOS, W.R.; HERRMANN, J.C. Mercury loss from soils following conversion from forest to pasture in Rondônia, Western Amazon, Brazil. *Environmental Pollution*. v.137, p.179-186, 2005.

AL-SALEH, I.; ABDULJABBAR, M.; AL-ROUQI, R.; ELKHATIB, R.; ALSHABBAHEEN, A.; ESHINWARI, N. Mercury (Hg) exposure in breast-fed infants and their mothers and the evidence of oxidative stress. *Biological Trace Element Research*. v. 153, n. 1-3, p. 145 - 154, jun. 2013.

AMORIM, M.I.M.; MERGLER, D.; BAHIA, M.O.; DUBEAU, H.; MIRANDA, D.C.; LEBEL, J; BURBANO, R.R.; LUCOTTE, M. Cytogenetic damage related to low levels of methylmercury contamination in the Brazilian Amazon. *Academia Brasileira de Ciências*. v. 72, n. 4, p. 497-507, 2000.

ANDRADE, J.C. O papel dos erros determinados em análises química. *Química Nova*.v.10,p.159-165, 1987.

BALLARD, O.; MORROW, A.L. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatric Clinics of North America*. v. 60, n. 1, p. 49 - 74, fev. 2013.

BASTOS, W. R.; LACERDA, L.D. A contaminação por mercúrio na bacia do rio Madeira: Uma breve revisão. *Geochim. Brasil*. v. 18, n. 2, p. 99-114, 2004.

BASTOS, W.R.; REBELO, M.F.; FONSECA, M.F.; ALMEIDA, R.; MALM, O. A description of mercury in fishes from the Madeira river basin, Amazon, Brazil. *Acta Amazônica*. v. 38, n. 3, p. 431 - 438, 2008.

BENDIXEN, E. The use of proteomics in meat science. *Meat Science*. v. 71, n. 1 p. 138–149, set. 2005.

BERNARD, J.V.; LACERDA, L.D.; DÓREA, J.G.; LANDIM, P.M.B.; GOMES, J.P.O.; ALMEIDA, R.; MANZATTO, A.G.; BASTOS, W.R. Estudo da variabilidade das condições físico-químicas no alto rio Madeira e afluentes utilizando análise das componentes principal. I Conferência Programa Piloto



para a Proteção das Florestas Tropicais - PPG7 Subprograma de Ciência e Tecnologia – SPC&T - Fase II (Belém- novembro 2008).

BISINOT, M.C.; JARDIM, W.F. O comportamento do metilmercúrio (MetilHg) no ambiente. *Química Nova*. v. 27, n. 4, p. 593-600, 2004.

BRAGA, C.P.; BITTARELLO, A.C.; PADILHA, C.C.F.; LEITE, A.L.; MORAES, P.M.; BUZALAF, M.A.R.; ZARA, L.F.; PADILHA, P.M. Mercury fractionation in dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) of the Madeira river in Brazil using metalloproteomic strategies. *Talanta*, v.132, p.239-244, 2015.

CASTILHOS, Z.C. Avaliação da potencial da acumulação de mercúrio em peixes dos reservatórios (previstos) de Jirau e de Santo Antônio, rio Madeira, RO/ Zuleica C. Castilhos, Ana Paula C. Rodrigues. \_\_\_ Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2008.

CECCATELLI, S.; DARÉ, E.; MOORS, M. Methylmercury-induced neurotoxicity and apoptosis. *Chemico-Biological Interactions*. v.188, p.301-308, 2010.

CHAO, H.H.; GUO, C.H.; HUANG, C.B.; CHEN, P.C.; LI, H.C.; HSIUNG, D.Y.; CHOU, Y.K. Arsenic, cadmium, lead, and aluminium concentrations in human milk at early stages of lactation. *Pediatrics and Neonatology*. v.XX, p.1e8, 2013.

CHIEN, L.C.; HAN, B.C.; HSU, C.S.; JIANG, C.B.; YOU, H.J.; SHIEH, M.J.; YEH, C.Y. Analysis of the health risk of exposure to breast milk mercury in infants in Taiwan. *Chemosphere*. v. 64, p. 79- 85, 2006.

CUNHA, L.R; COSTA, T.H.M.; CALDAS, E.D. Mercury concentration in breast milk and infant exposure assessment during the first 90 days of lactation in a midwestern region of Brazil. *Biological Trace Element Research*. v. 151, n. 1 p. 30 - 37, jan. 2013.

DA SILVA, G.S.; JARDIM, W.F.; FADINI, P.S. Elemental gaseous mercury flux at the water/air interface over the Negro river basin, Amazon, Brazil. *Science of the total environment*. v. 368, n. 1, p. 189-198, set. 2006.

DÓREA, J.G. & DONANGELO, C.M. Early (in uterus and infant) exposure to mercury and lead. *Clinical Nutrition*. v. 25, n. 3, p. 369 - 376, jun. 2006.

DÓREA, J.G.; FARINA, M.; ROCHA, J.B.T. Toxicity of ethylmercury (and Thimerosal): a comparison with methylmercury. *Journal Applied Toxicology*. v. 33, n. 8, p. 700 - 711, fev. 2013.

DOUMAS B. T., BAYSE D. B., BORNER K., CARTER R. J. A candidate reference method for determination of total protein in serum II. Test for transferability. *Clin. Chem*.v. 27, p. 1651-1654, 1981.

FADINI, P.S. & JARDIM, W.F. Is the Negro river basin Amazon/ impacted by naturally occurring mercury? *The Science of the Total Environment*. v. 275, n. 1 p. 71-82, jul. 2001.

FAIAL, K.; DEUS, R.; DEUS, S.; NEVES, R.; JESUS, I.; SANTOS, E.; ALVES, C. N.; BRASIL, D. Mercury levels assessment in hair of riverside in habitants of the Tapajós river, Pará State, Amazon, Brazil: Fish consumption as a possible route of exposure. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2014.10.009>>. Acesso em 11 de novembro de 2014.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization). Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Methylmercury. WHO Food Additives Series.v. 52, p. 565-623, 2004.

FARIA, M.A.M. Mercúrio metálico crônico ocupacional. *Revista de Saúde Pública*. v. 37, n. 1, p. 116-27, 2003.

FARINA, F.; AVILA, D.S.; ROCHA, J.B.T.; ASCHNER, M. Metals, oxidative stress and neurodegeneration: A focus on iron, manganese and mercury. *Neurochemistry International*. v. 62, n. 5, p. 575 - 594, abr. 2013.

FIGUEIREDO, W.S. Estratégias metaloproteômicas na investigação de biomarcadores de mercúrio em amostras de tecido muscular de tucunarés.

Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Desenvolvimento Rural) – Faculdade UnB Planaltina, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

GALVÃO, R.C.F.; BERNARDI, J.V.E.; DÓREA, J.G.; BARBOSA, A.C.; BASTOS, W. R.; MANZATTO, A.G.; LANDIM, P.M.B. Uso de krigagem indicativa para verificação da distribuição de mercúrio total em sedimentos de fundo no alto rio Madeira. In: I Conferência Programa Piloto para a Proteção das Florestas Tropicais - PPG7 Subprograma de Ciência e Tecnologia – SPC&T - Fase II, 2008, Belém. Anais. Belém: PPG7, SPC&T - Fase II, 2008.

GARCIA, J.S.; MAGALHÃES, C.S.; ARRUDA, M.A.Z. Trends in metal-binding and metalloprotein analysis. *Talanta*, v. 69, n. 1, p. 1–15, mar. 2006.

GARCÍA-ESQUINAS, E.; PÉREZ-GÓMEZ, B.; FERNÁNDEZ-NAVARRO, P.; FERNÁNDEZ, M.A.; PAZ, C.; PÉREZ-MEIXEIRA, A.M.; GIL, E.; IRISO, A.; SANZ, J.C.; ASTRAY, J.; CISNEROS, M.; SANTOS, A.; ASENSIO, A.; GARCÍA-SAGREDO, J.M.; GARCÍA, J.F.; VIOQUE, J.; LÓPEZ-ABENTE, G.; POLLÁN, M.; GONZÁLEZ, M. J.; MARTÍNEZ, M.; ARAGONÉS, N. Lead, 85 anadia and cádmium in umbilical cord blood and its association with parental epidemiological variables and birth factors. *BMC Public Health*.v.13: 841, p. 1-11, set. 2013.

GARCÍA, S.M.A.; GARCÍA, B. T.; NAVARRO, R. F.; MONTERO, L. Z.; GÓMEZ-A.R.; J.L. A combination of metallomics and metabolomics studies to evaluate the effects of metal interactions in mammals. Application to musculusmiceunder arsenic/cadmium exposure. *Journal of proteomics*. v.104, p .66 -79, 2014.

GROTTO, D.; VALENTINI, J.; FILLION, M.; PASSOS, C.J.S.; GARCIA, S.C.; MERGLER, D.; BARBOSA JÚNIOR, F. Mercury exposure and oxidative stress in communities of the Brazilian Amazon. *Science ofthe Total Environment*. v. 408, n. 4, p. 806-811, jan. 2010.

GUIMARÃES, R.M. & ASMOS, C.I.R.F. Por que uma saúde ambiental infantil? Avaliação da vulnerabilidade de crianças a contaminantes ambientais. *Pediatria*. São Paulo, v. 32, n. 4, p. 239-245, 2010.

GUNDACKER, C.; PIETSCHNIG, B.; WITTMANN, K.J.; LISCHKA, A.; SALZER, H.; HOHENAUER, L. et al, Lead and mercury in breast milk. *Pediatrics*. v. 110, p. 873-878, 2002.

HACON, S.; BARROCAS, P.R.G.; VASCONCELLOS, A.C.S.; BARCELLOS, C., WASSERMAN, J.C.; CAMPOS, R.C.; RIBEIRO, C., AZEVEDO-CARLONI, F.B. An overview of mercury contamination research in the Amazon basin with an emphasis on Brazil. *Caderno Saúde Pública*. Rio de Janeiro, v. 24 n. 7, p. 1479-1492, jul. 2008.

HERCULANO, P.M.; CRESPO-LÓPEZ, M.E.; LIMA, S.M.A.; PICANÇO-DINIZ, D.L.W.; NASCIMENTO, J.L.M. Intoxicação por metilmercúrio ativa a óxido nítrico sintase em cultura de células da retina chick. *Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Braz. J. Méd. Biol. Res.* v. 39, p. 415-418, 2006.

HONG, D.; CHO, S.;H.; PARK, S.; J.; KIM, S.;Y.; PARK, S.;B. Hair mercury level in smokers and its influence on blood pressure and lipid metabolism. *Environmental toxicology and pharmacology*. v. 36, p. 103-107, 2013.

HSU-KIM, H.; KUCHARZYK, K.H.; ZHANG, T.; DESHUSSES, M.A. Mechanisms Regulating Mercury Bioavailability for Methylating Microorganisms in the Aquatic Environment: A Critical Review. *Environ. Sci. Technol.*, n. 47, p. 2441-2456, 2013.

IVANOVA, E.H. Atomic Absorption Spectrometry. In: TOWNSEND, A.; POOLE, C.F.; WORSFOLD, P. J. *Encyclopedia of analytical science*. 2a. ed. New York: Academic Press. p. 149-156, 2005.

JAKAITIS, B.M.; DENNING, P.W. Human Breast Milk and the Gastrointestinal Innate Immune System. *Clinics Perinatol.* v. 41, n. 2, p. 423 - 435, jun. 2014.

JANICKA, M.; BINKOWSKI, Ł. J.; BŁASZCZYK, M.; PALUCH, J.; WOJTÁS, W.; MASSANYI, P.; STAWARZ, R. Cadmium, lead and mercury concentrations and their influence on morphological parameters in blood donors from different age groups from southern Poland. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. v. 29, p. 342 - 346, jan. 2015.

JARDIM, A.N.O & CALDAS, E.D. Exposição humana a substâncias químicas potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para saúde. *Química Nova*. v. 32, n. 7, p. 1898-1909, 2009.

JENSEN, T.K.; GRANDJEAN, P.; JORGENSEN, E.B.; WHITE, R.F.; DEBES, F.; WEIHE, P. Effects of breast feeding on neuropsychological development in a community with methylmercury exposure from seafood. *J Exp Anal EnvironEpidemiol*. v. 15, p. 423-430, 2005.

JÚNIOR, W.; ROMUALDO, G. S. Anatomia e fisiologia da lactação. In: CARVALHO, M.R.; TAMEZ, R. N. Amamentação – Bases científicas para a prática profissional. RJ: Guanabara. Koogn. p. 25-36, 2002.

KASPER, D.; FORSBERG, B.R.; AMARAL, J.H.F.; LEIT O, R.P.; PY-DANIEL, S.S.; BASTOS, W.R.; MALM, O. Reservoir stratification affects methylmercury levels in river water, plankton, and fish downstream from Balbina hydroelectric dam, Amazonas, Brazil. *Environmental Science Technology*. v. 48, n. 2, p. 1032-1040, jan. 2014.

KHOURY, E.D.T.; SOUZA, G.S.; SILVEIRA, L.C.L.; COSTA, C.A.; ARAÚJO, A.A.; PINHEIRO, M.C.N. Manifestações neurológicas em ribeirinhos de áreas expostas ao mercúrio na Amazônia brasileira. *Caderno de Saúde Pública*. v. 29, n. 11, p. 2307-2318, nov, 2013.

KONDO, T.; KAWAI, A. A proteomics approach for the development of sarcoma biomarkers. *EuPA Open Proteomics*. v. 4, p. 121-128, set. 2014.

LACERDA, L.D. & MALM, O. Mercury contamination in aquatic ecosystems: an analysis of the critical areas. *Estudos Avançados*. v. 22, n. 63, p. 173-190, 2008.

LACERDA, L.D. Amazon mercury emissions. *Nature*. v. 374, p. 20-21, 1995.

LACERDA, L.D. Global mercury emissions from gold and silver mining. *Water, Air and Soil Pollution*. v. 97, p. 209-221, 1997.

LANÇAS, F.M.; SILVA, J.C.R.; BICUDO, R.C.; NETO, M.B. A química analítica do proteoma. *Revista Analytica*. v.6 p.60-66, 2003.

LEBEL, J.; MERGLER, D.; RAMOS, F.; LUCOTTE, M.; AMORIM, M.; LARRIBE, F.; DOLBEC, J. Neurotoxic effects of methylmercury contamination in the Amazonian Basin low level. *Environ. Res*. v. 79, p. 20-32, 1998.

LICKER, V.; BURKHARD, P.R. Proteomics as a new paradigm to tackle Parkinson's disease research challenges. *Transl Proteomics*. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trprot.2014.08.001>. Acesso em: 17 de setembro de 2014.

LIMA, P.M.; NEVES, R.C.F.; SANTOS, F.A.; PÉREZ, C.A.; SILVA, M.O.A.; ARRUDA, M.A.Z.; CASTRO, G.R.; PADILHA, P.M. Analytical approach to the metallomic of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver tissue by SRXRF and FAAS after 2D-PAGE separation: Preliminary results. *Talanta*. v. 82, n. 3, p. 1052 - 1056, ago. 2010.

MARQUES, R.C.; BERNARDI, J.V.E.; DÓREA, F.G.; MOREIRA, M.F.R.; MALM, O. Exposição perinatal múltipla para substâncias neurotóxicas (chumbo, o metilmercúrio, etilmercúrio e alumínio) e neurodesenvolvimento em seis e 24 meses de idade. *Environmental Pollution*. v.187, p. 130 e135, 2014.

MARQUES, R.C.; DÓREA, J.; MCMANUS, C.; LEÃO, R.S.; BRANDÃO, K.G.; VIEIRA, I.H.; GUMARÃES, J-R.D.; 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*. v. 14, n. 4, p. 661-669, abr. 2010.

MARQUES, R.C.; DÓREA, J.G.; BASTOS, W.R.; REBELO, M.F.; FONSECA, M.F.; MALM, O. Maternal mercury exposure and neuro-motor development in

breast fed infants from Porto Velho (Amazon), Brazil *Int. J. Hyg. Environ.-Health* v.210, p. 51 - 60, 2012.

MARSHAL, W.D. Atomic absorption, emission and fluorescence spectrometry: principles and applications. In: PARÉ, J.R.J.; BÉLANGER, J.M.R. *Instrumental methods in food analysis*. Amsterdam: Elsevier Science. p. 141-178, 1997.

MICARONI, R.C.C.M.; BUENO, M.I.M. S.; JARDIM, W. F. Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. *Química Nova*. v. 23, n. 4, p. 487 - 495, fev. 2000.

MOLINA-VILLALBA, I.; LACASAÑA, M.; RODRÍGUEZ-BARRANCO, M.; HERNÁNDEZ, M.F.; GONZALEZ-ALZAGA, B.; AGUILAR-GARDUÑO, C.; GIL, F. Biomonitoring of arsenic, cadmium, lead, manganese and mercury in urine and hair of children living near mining and industrial areas. *Chemosphere*. v. 124, p. 83 - 91, abr. 2015.

MORAES, P.M.; SANTOS, F.A.; CAVECCI, B.; PADILHA, C.C.F.; VIEIRA, J.C.S; ROLDAN, P.S.; PADILHA, P.M. GFAAS determination of mercury in muscle samples of fish from Amazon, Brazil. *Food Chemistry*. v. 141, n.3, p. 2614 - 2617, 2013.

NEVADO, J.J.B.; MARTÍN-DOIMEADIOS, R.C.R.; BERNARDO, F.J.G.; MORENO, M.J.; HERCULANO, A.M.; NASCIMENTO, J.L.M.; CRESPO-LÓPEZ, M.E. Mercury in the Tapajós river basin, Brazilian Amazon: a review. *Environ. Int.* v. 36, p. 593 - 608, 2010.

NORDBERG, M.; NORDBERG, G.F. Metallothioneins: historical development and overview. *Met. Ions Life Sci.* v.5, p.1 - 29, 2009.

OLIVEIRA, L.C.; BOTERO, W.G.; SANTOS, A.; CORDOVIL, M.C.O.; ROCHA, J.C.; SILVA, H.C. Influência das características físico-químicas dos solos no ciclo hidrobiogeoquímico do mercúrio na região do rio Aracá – AM. *Química Nova*. v. 34, n. 8, p. 1303 - 1308, 2011.

PATEL, S. Chapter Three – Role of proteomics in biomarker discovery: prognosis and diagnosis of neuropsychiatric disorders. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. v. 97, p. 39 - 75, 2014.

PATRY, C.; DAVIDSON, R.; LUCOTTE, M.; BÉLIVEAU, A. Impact of forested fallows on fertility and mercury content in soils of the Tapajós river region, Brazilian Amazon. *Science of the Total Environment*. p. 458 - 460, 228 - 237, 2013.

PEIXOTO, N.C.; SERAFIM, M.A.; FLORES, E.M.M.; BEBIANNO, M.J.; PEREIRA, M.E. Metallothionein, zinc, and mercury levels in tissues of young rats exposed to zinc and subsequently to mercury. *Life Sciences*. v. 81, n.16, p. 1264 - 1271, set, 2007.

PINHEIRO, M.C.N.; FARRIPAS, S.S.M.; OIKAWA, T.; COSTA, C.A.; AMORAS, W.W.; VIEIRA, J.L.F.; SILVEIRA, A.J.A.; LIMA, A.C.M.; SOUZA, G.S.; SILVEIRA, L.C.L. Temporal evolution of exposure to mercury in riverside communities in the tapajos basin, from 1994 to 2010. *Bull Environ Contam Toxicol*. v.89, p.119 - 124, 2012.

PIRARD, C.; KOPPEN, G.; DE CREMER, K.; OVERMEIRE, I.V.; GOVARTS, E.; DEWOLF, M.C.; DE MIEROOP, E.V.; AERTS, D.; BIOT, P.; CASTELEYN, L.; KOLOSSA-GEHRING, M.; SCHWEDLER, G.; ANGERER, J.; KOCH, H. M.; SCHINDLER, B. K; CASTAÑO, A.; ESTEBAN, M.; SCHOETERS, G.; HOND, E.D.; SEPAI, O.; EXLEY, K.; HORVAT, M.; BLOEMEN, L.; KNUDSEN, L.E.; JOAS, R.; JOAS, A.; LOCO, J.V.; CHARLIER, C. Hair mercury and urinary cadmium levels in Belgian children and their mothers within the framework of the COPHES/DEMOCOPHES Projects. *Science of the Total Environment*. v. 472, p. 730 - 740, fev. 2014.

POMASTOWSKI, P.; BUSZEWSKI, B. Two-dimensional gel electrophoresis in the light of new developments. *Trends in Analytical Chemistry*. v. 53, p. 167–177, jan. 2014.



POZZI, C.M.C.; BRAGA, C.P.; VIEIRA, J.C.S; CAVECCI, B.; QUEIROZ, J.V.; BARBOSA, H.S.; ARRUDA, M.A.Z.; GOZZO, F.C.; PADILHA, P.M. Metal ions bound to the human milk immunoglobulin A: Metalloproteomic approach. *Food Chemistry*. v. 166, p. 492 - 497, 2015.

RANDALL, P. M.; CHATTOPADHYAY, S. Mercury contaminated sediment sites - An evaluation of remedial options. *Environmental Research*. v.125, p.131 - 149, 2013.

ROCHA, A.V.; CARDOSO, B.R.; COMINETTI, C.; BUENO, R.B.; DE BORTOLI, M.C.; FARIAS, L. A.; FAVARO, D.I.T.; CAMARGO, L.M.A.; COZZOLINO, S.M.F. Selenium status and hair mercury levels in riverine children from Rondônia, Amazônia. *Nutrition*. v. 30, n.11-12, p. 1318-1323, nov. /dez. 2014.

ROTILO, D.; CORTE, A.D.; D'IMPERIO, M.; COLETTA, W.; MARCONE, S.; SILVESTRI, C.; GIORDANO, L.; DI MICHELE, M.; DONATI, M. B. Proteomics: Bases for protein complex it yunderstanding. *Thrombos is Research*. v. 129, n. 3, p. 257 - 262, mar. 2012.

ROULET, M.; LUCOTTE, M.; SAINT-AUBIN, A.; TRAN, I.S.; RHEAULT, I.; FARELLA, N.; SILVA, E.J.; DEZENCOURT, J.; PASSOS, C.J.S.; SOARES, G.S.; GUIMARÃES, J.R.D.; MERGIER, D.; AMORIM, M. The geochemistry of mercury in central Amazonian soil developed on the Alter-do-Chão formation of the lower Tapajós river valley, Pará state, Brazil. *The Science of Total Environment*. v. 223, n. 1, p. 1 - 24, nov. 1998.

SANTOS, F, A. Estudo metalômico do mercúrio em leite materno coletado da população ribeirinha da área de influência do AHE Jirau - bacia do rio Madeira. Tese (Doutorado em Biologia Geral e Aplicada). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

SANTOS, F.A.; LIMA, P.M.; NEVES, R.C.F.; MORAES, P.M.; PEREZ, C.A.; DA SILVA, M.A.O.; ARRUDA, M.A.Z.; CASTRO, G.R.; PADILHA, P.M. Metallomic study of plasma samples from Nile tilapia using SR-XRF and GFAAS after

separation by 2D PAGE: initial results. *MicrochimicaActa*. v. 173, p. 43 - 49, 2011.

SANTOS, F.A.; CAVECCI, B.; VIEIRA, J.V.S.; FRANZINI, V.P.; SANTOS, A.; LEITE, A.L.; BUZALAF, M.A.R.; ZARA, L.F.; PADILHA, P.M. A Metalloproteomics study on the association of mercury with breast milk in samples from lactating women in the amazon region of Brazil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology (Print)*. , v. 69, p. 223-229, 2015.

SANTOS-FRANCÉS, F.; GARCÍA-SÁNCHEZ, A.; ALONSO-ROJO, P.; CONTRERAS, F.; ADAMS, M. Distribution and mobility of mercury in soils of a gold mining region, Cuyuni river basin, Venezuela. *Journal of Environmental Management*. v. 92, n. 4, p. 1268-1276, abr. 2011.

SILVA, A. L. Comida de gente: preferências e tabus alimentares entre os ribeirinhos do Médio Rio Negro (Amazonas, Brasil). *Revista de Antropologia*. v. 50, n. 01, junho, 2007.

SILVA, F.A.; NEVES, R.C.F.; QUINTERO-PINTO, L.G.; PADILHA, C.C.F.; JORGE, S.M.; BARROS, M.M.; PEZZATO, L.E.; PADILHA, P.M. Determination of selenium by GFAAS in feces slurries of fish to estimate the bioavailability of this micronutrient in feed used for fish. *Chemosphere*. v. 68, p.1542 - 1547, 2007.

SILVA, T. M. Metalômica aplicada ao estudo de toxicidade do mercúrio em amostras de leite humano coletadas em comunidades do alto rio Madeira, Rondônia, Brasil. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Desenvolvimento Rural) – Faculdade UnB Planaltina, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

SIQUEIRA, G.W. & APRILE, F.M. Distribuição de mercúrio total em sedimentos da Plataforma Continental Amazônica – Brasil. *Acta Amazônica*. v. 42, n. 2, p. 259 - 268, 2012.

STULTS, J.T.; ARNOTT, D. Proteomics. *Methods in Enzymology*. v. 402, p. 245 - 289, 2005.

SUNDBERG, J.; JONSSON, S.; KARLSSON, M.O.; OSKARSSON, A. lactational exposure and neonatal kinetics of methylmercury and inorganic mercury in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*. v. 154, n. 2 p. 160 - 169, jan. 1999.

SYVERSEN, T.; KAUR, P. The toxicology of mercury and its compounds. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. v. 26, n. 4, p. 215 - 226, out. 2012.

TANG, X.; WANG, Y.S.; XUE, J.H.; ZHOU, B.; CAO, J.X.; CHEN, S.H.; LI, M.H.; WANG, X.F.; ZHU, Y.F.; HUANG, Y.Q. A novel strategy for dual-channel detection of metallothioneins and mercury based on the conformational switching of functional chimera aptamer. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. v. 107, p. 258 - 264, mar. 2015.

TUDEHOPE, D.I.; AM, MBBS, FRACP. Human Milk and the Nutritional Needs of Preterm Infants, *J Pediatr*. v.162, p.17-25, 2013.

UNDERWOOD, M.A.; MD, MAS. Human Milk for the Premature Infant, *PediatrClin N Am*. v. 60 p.189-207, 2013.

UNICEF.2014.Amanentação/nutrição.[http://www.inicef.org/nutrition/index\\_24824.html](http://www.inicef.org/nutrition/index_24824.html). Acesso: 29 de setembro de 2014.

VIEIRA, J.C.S.; CAVECCI, B.; QUEIROZ, J.V.; BRAGA, C.P.; PADILHA, P.M.; PADILHA, C.C.F.; LEITE, A.L.; FIGUEIREDO, W.S.; BUZALAF, M.A.R.; ZARA, L.F.; PADILHA, P.M. Determination of the Mercury fraction linked to protein of muscle and liver tissue of tucunaré (*Cichla spp.*) from the amazona region of Brazil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology (Print)*. v.69, p.422 - 430, 2015.

VIEIRA, S.M; ALMEIDA, R.; HOLANDA, I.B.B.; MUSSY, M.H.; GALVÃO, R.C.F.; CRISPIM, P.T.B.; DÓREA, J.G. BASTOS, W.R. Total and methylmercury in hair and milk of mothers living in the city of Porto Velho and in villages along the rio Madeira, Amazon, Brazil. *International Journal of Hygiene and environmental health*. v. 216, n. 6, p. 682 - 689, 2013.

WASSERMAN, J.C.; HACION, S.S.; WASSERMAN, M. A. O ciclo do mercúrio no ambiente amazônico. *Mundo e vida*. v. 2, p. 1 e 2, 2001.

WRIGHT, P.C.; NOIREL, J.; OW, S.Y.; FAZELI, A. A review of current proteomics technologies with a survey on their widespread use in reproductive biology investigations. *Theriogenology*. v. 77, n. 4, p. 738 - 765, mar. 2012.

YÁÑEZ, J.; GUAJARDO, M.; MIRANDA, C.; César SOTO, C.; MANSILLA, H.D.; FLEGAL, A.R. New assessment of organic mercury formation in highly polluted sediments in the Lenga estuary, Chile. *Marine Pollution Bulletin*. v.73, p.16 - 23, 2013.

YANG, J.; JIANG, Z.; WANG, Y.; QURESHI, I.A.; WU, X.D. Maternal-fetal transfer of metallic mercury via the placenta and milk. *Ann Clin Lab Sci*. v. 27, p. 135 - 141, 1997.

YANNONE, S. M.; HARTUNG, S.; MENON, A. L.; ADAMS, M. W. W.; TAINER, J. A. Metals in biology: defining metalloproteomes. *Current opinion in Biotechnology*. v. 23, n. 1, p. 89 - 95, 2012.

ZAHIR, F.; RIZWI, S.J.; HAQ, S.K.; KHAN, R.H. Low dose mercury toxicity and human health. *Environmental toxicology and pharmacology*. v.20, p.351 - 360, 200

## Anexo I -Auxílio Financeiro

### AUXÍLIO FINANCEIRO

Projeto regulamentado pela Agência Nacional de Energia Elétrica - ANEEL e desenvolvido no âmbito do Programa P&D da Energia Sustentável do Brasil S.A.

P&D: 6631-0001/2012

Contrato Jirau 004/13



**ANEXO II - Parecer do Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da UNB - Planaltina - DF.**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

**ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA**

**Registro de Projeto:** CEP-FM 038/2010.

**Título:** "Aproveitamento hidrelétrico Jirau (AHE Jirau, estado de Rondônia): programa de monitoramento hidrobiogeoquímico da mercúria e de riscos à saúde humana".

**Pesquisador Responsável:** Carlos José Sousa Passos

**Documentos analisados:** Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo (s) de pesquisador (es).

**Data de entrega:** 30/04/2010.

Parecer do (a) relator (a)

Aprovação

Não aprovação.

**Data da primeira análise pelo CEP-FM/UNB:** 09/06/2010.

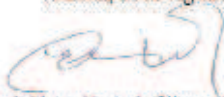
**Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UNB:** 02/08/2010.

**PARECER**

Com base na Resolução CNS/MS nº 196/96 e resoluções posteriores, que regulamentam a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília decidiu **APROVAR "ad referendum"**, conforme parecer do (a) relator (a), o projeto de pesquisa acima especificado quanto aos seus aspectos éticos.

1. Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves;
2. O (s) pesquisador (es) deve (m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM, sendo o 1º previsto para até 10 de fevereiro de 2011.

Brasília, 06 de Agosto de 2010.

  
Prof. Elaine Maria de Oliveira Alves  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa  
Faculdade de Medicina-UnB