

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

NATÁLIA CARVALHO GUIMARÃES

AVALIAÇÃO DO BIOACÚMULO DE METAIS E ESTRESSE OXIDATIVO EM  
RATOS TRATADOS CRONICAMENTE COM ÁGUA DO RIO DOCE APÓS  
ROMPIMENTO DA BARRAGEM FUNDÃO

Brasília  
2017

NATÁLIA CARVALHO GUIMARÃES

AVALIAÇÃO DO BIOACÚMULO DE METAIS E ESTRESSE OXIDATIVO EM  
RATOS TRATADOS CRONICAMENTE COM ÁGUA DO RIO DOCE APÓS  
ROMPIMENTO DA BARRAGEM FUNDÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Vívian da Silva Santos

Coorientadora: Profa. Dra. Denise Grotto

Brasília

2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

GG963a Guimaraes, Natália Carvalho  
Avaliação do bioacúmulo de metais e estresse oxidativo em ratos tratados cronicamente com água do rio Doce após rompimento da barragem Fundão / Natália Carvalho Guimaraes; orientador Vivian da Silva Santos; co-orientador Denise Grotto. -- Brasília, 2017.  
86 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -- Universidade de Brasília, 2017.

1. rio Doce. 2. metais. 3. bioacúmulo. 4. estresse oxidativo. 5. EROs. I. da Silva Santos, Vivian, orient. II. Grotto, Denise, co-orient. III. Título.

NATÁLIA CARVALHO GUIMARÃES

AVALIAÇÃO DO BIOACÚMULO DE METAIS E ESTRESSE OXIDATIVO EM  
RATOS TRATADOS CRONICAMENTE COM ÁGUA DO RIO DOCE APÓS  
ROMPIMENTO DA BARRAGEM FUNDÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós  
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade  
de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília,  
como requisito parcial à obtenção do título de  
mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 14/06/2017.

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Vívian da Silva Santos – presidente  
Universidade de Brasília – Faculdade de Ceilândia

---

Prof. Dr. Diêgo Madureira de Oliveira  
Universidade de Brasília – Faculdade de Ceilândia

---

Profa. Dra. Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza  
Universidade de Brasília – Faculdade de Ceilândia

*Dedico este trabalho à minha família, especialmente aos meus pais, Elmar e Fátima, que sempre priorizaram minha educação e me fizeram acreditar nos meus sonhos. Dedico também aos meus amigos, sempre companheiros!*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, por sempre me iluminar e me guiar às escolhas certas.*

*Aos meus pais, Elmar e Fátima, pelo exemplo de coragem, força e simplicidade, buscando sempre o melhor para mim, trabalhando muito para que eu pudesse realizar os meus objetivos. E aos meus irmãos, pelas críticas construtivas.*

*Ao meu noivo, Leopoldo Alvim, companheiro no amor, na vida e nos sonhos! Obrigada pela paciência, pelo apoio, pelas palavras de conforto e incentivo, mesmo quando eu me encontrava em momentos difíceis, que não foram poucos.*

*Aos meus avós paternos e maternos pela educação dada aos meus pais, que hoje são meus maiores exemplos. A vocês, minha eterna gratidão.*

*À minha orientadora, profa. Dra. Vívian da Silva Santos, pelas oportunidades que me foram dadas e por todo o aprendizado nesses quatro anos.*

*À minha coorientadora, profa. Dra. Denise Grotto, pela disposição, receptividade e incentivo de me ver crescer.*

*Aos membros da banca avaliadora, prof. Dr. Diêgo Madureira e profa. Dra. Fabiane Hiratsuka, pela disponibilidade em contribuir e me avaliar.*

*Aos ICs, Michelly Gonçalves e Alan Nóbrega, pelo companheirismo e ajuda aos longos dos infinitos dias de manejo e experimentos. Com a ajuda de vocês foi mais fácil e divertido trabalhar. Às alunas Déborah Moraes e Mirella Giovana, pela ajuda na reta final.*

*À UnB-FCE pela profissional que me tem tornado! Sem dúvidas, minha segunda casa.*

*Ao LAPETOX-Uniso, pela parceria e estrutura oferecida, em especial à doutoranda Sara Spim e técnica Thaisa Pickler, pelo acolhimento, disposição, ajuda e alegria de trabalhar. Foram semanas mais leves e altamente produtivas. Aos também parceiros, professores Dra. Fabiane Hiratsuka, Dr. Paulo Narcizo e Dr. Eduardo Antônio Ferreira pelo enriquecimento do meu trabalho.*

*À UCB, nas pessoas da Profas. Dra. Isabelle Patriciá Freitas Soares Chariglione e Dra. Raquel Ramos Ávila, técnicos Vinícius Carolino e Raphael Ribeiro pela estrutura do biotério e animais oferecidos, além dos inúmeros auxílios prestados.*

*Aos peritos da Polícia Civil do Distrito Federal, Rodrigo Heringer e Sílvia Letice, no auxílio das análises no ICP-MS.*

*Ao Laboratório Nanotecnologia Verde: Ambiente, Saúde e Sustentabilidade - FCE/UnB, nas pessoas do Prof. Dr. Marcelo Henrique Sousa e Prof. Dr. Juliano Alexandre Chaker, pelo suporte em alguns experimentos realizados.*

*Aos técnicos dos laboratórios da UnB, Renata Pascoal, seu Teles, Diego Dias, Lorena e Nara pelo apoio nos momentos que mais precisei.*

*Ao GIAIA, principalmente aos companheiros das duas expedições ao longo da Bacia do rio Doce em que participei, Flávia Bottino, André Cordeiro e Eliane Pintor, a oportunidade de dias incríveis em um projeto voluntário. Com vocês cresci profissionalmente e inclusive, pessoalmente.*

*Aos casais amigos e parceiros Camila Lopes e Pedro Limirio, Carine Schumacher e William Ragagnin, Adrielle Johner e Daniel Terra, Vinícius Henrique e Francielly Nunes, Luis Felipe e Mariana Lomazzi, Ulisses Alvim e Isabela Dantas pelos finais de semana, viagens e dias mais divertidos.*

*À Larizza Matos por dividir comigo as lamúrias e desespero deste aprendizado, além das trocas de dicas e experiências trabalhando com os animais.*

*Às crianças, Elisa, Júlia, Pedro Henrique, Ana Laura, Alice, Lívia, Lavínia e Mateus, minhas fofuras. Vocês são a certeza de um mundo melhor!*

*Aos amigos da Especialização em Análises Clínicas – FCE/UnB, vocês são demais! Quem diria que as aulas aos finais de semana seriam tão divertidas? Obrigada pelos desabaços, conselhos, ombro amigo e torcida.*

*Aos meus sogros, cunhadas, concunhados, à minha nova família, aquela que escolhi fazer parte.*

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – pelo apoio financeiro.*

*E a todos que não estão presentes nestas linhas, mas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, dando-me incentivo, meus sinceros agradecimentos!*

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

## RESUMO

GUIMARÃES, Natália Carvalho. **Avaliação do bioacúmulo de metais e estresse oxidativo em ratos tratados cronicamente com água do rio Doce após rompimento da barragem Fundão**. Brasília, 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

Em 5 de novembro de 2015, ocorreu o rompimento da barragem de rejeitos de mineração Fundão, localizada em Mariana-MG. Dentre as diversas consequências do desastre, têm-se os impactos na qualidade da água do rio Doce e, conseqüentemente, no abastecimento público de água das cidades que captam água diretamente deste manancial. Diante disso, ratos foram cronicamente expostos, via oral, à água de dois pontos do rio (estudo I) e de duas cidades abastecidas com a água captada e tratada do rio (estudo II). A divisão dos grupos de tratamento foi feita através da água administrada aos animais, sendo o estudo I composto por: Grupo C: controle, que recebeu água de abastecimento do biotério; Grupo NI: recebeu água coletada do rio Doce próximo às cidades de Naque e Ipatinga-MG; e Grupo RE: água coletada do rio próximo à foz, em Regência-ES. O estudo II, além do Grupo C, tinha o Grupo GV: que recebeu água de abastecimento de Governador Valadares-MG e Grupo CA: tratado com água de abastecimento de Colatina-ES. Avaliou-se o bioacúmulo de metais no córtex, fígado e rim, biomarcadores de estresse oxidativo nestes tecidos e no sangue, e provas de função renal e hepática. Em relação ao estudo I, encontrou-se que, nas amostras de sangue houve diminuição significativa da atividade da GPx do grupo NI em relação ao controle e aumento da CAT do grupo RE em relação ao grupo NI. Quanto ao córtex, observou-se uma diminuição significativa na atividade da GPx no grupo NI e RE em relação ao controle. Apesar do fígado do grupo RE ter concentrações significativamente menores de Al e Mn, houve aumento significativo da CAT em relação ao grupo controle. No rim, houve maior bioacúmulo de Pb e nenhuma alteração no sistema antioxidante, ambos em relação ao grupo controle. No estudo II, encontrou-se aumento significativo de GSH no sangue do grupo CA em relação ao controle. Houve menor bioacúmulo de Fe no córtex no grupo CA em relação ao controle. Observou-se também neste tecido, diminuição significativa na atividade da GPx no grupo CA e forte tendência do grupo GV, ambos em relação ao controle. No fígado, o grupo CA teve concentrações significativamente menores de Fe e Mn em relação ao controle. Porém, houve aumento significativo na atividade da CAT no grupo

CA em relação ao controle. No rim, encontrou-se uma forte tendência de menor concentração de EROs radicalares quando comparado ao controle ( $p=0,055$ ). Alguns metais diminuem a atividade da GPx, justificando a diminuição da mesma no córtex dos grupos tratados comparados ao controle e, também, no sangue do grupo NI em relação ao controle. Em ambos os estudos, não se observou comprometimento hepático e renal dos diferentes tratamentos quando comparados ao grupo controle. Diante dos resultados apresentados, mesmo em concentrações baixas, os metais foram capazes de provocar alterações no organismo através do bioacúmulo e perturbação na homeostase do sistema antioxidante.

Palavras-chave: rio Doce; metais; bioacúmulo; estresse oxidativo; EROs.

## ABSTRACT

GUIMARÃES, Natália Carvalho. **Evaluation of the bioaccumulation of metals and oxidative stress in rats treated chronically with water from the Doce river after the Fundão iron mining dam.** Brasília, 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

On November 5th, 2015 the Fundão iron mining dam, located in Mariana, Minas Gerais State, collapsed. Among the several consequences of the disaster, the main concerns are related to the impact in the water quality of Doce river and consequently in the water supply to many cities. Rats were chronically exposed to the water collected from two points of the river (study I) and from two cities supplied with water from the Doce river and with public treatment (study II). The studies I and II were divided according to the water supplied to the animals. The study I consisted: Group C: received water from the animal facility (control); Group NI: received water collected from the river near the cities Naque and Ipatinga, Minas Gerais State; and Group RE: received water collected from the river near the river mouth, in Regência, Espírito Santo State. The study II included the Group C; the Group GV: animals receiving water from Governador Valadares (Minas Gerais State); and Group CA: receiving water from Colatina (Espírito Santo State). Bioaccumulation of metals in the cortex, liver and kidney, biomarkers of oxidative stress in these tissues and blood, and evidence of renal and hepatic function were evaluated. In the study I, the blood samples of the NI group showed significant decrease of the GPx activity in relation to the Group C. There was an increase of the CAT of the RE group in relation to the NI group. The cortex exhibited significant decrease in GPx activity in the NI group and RE in relation to the control. Although the liver of the RE group had significantly lower concentrations of Al and Mn, there was a significant increase of the CAT in relation to the control group. There was greater bioaccumulation of Pb and no alteration in the antioxidant system, both in relation to the control group in the kidney. In study II, there was a significant increase of GSH in the blood of the CA group in relation to the control. The bioaccumulation of Fe in the cortex the CA group was lower than the Group C. In this tissue, a significant decrease in GPx activity in the CA group and a strong tendency of the GV group were observed, both in relation to the control. In the liver, the CA group had lower concentrations of Fe and Mn in relation to the control. However, there was a significant increase in the CAT

activity in the CA group in relation to the control. In the kidney, there was a strong trend towards a lower concentration of ROS than in the control. The decrease in the GPx activity in the cortex of most of the groups is due to the presence of some metals. It also occurred in the blood samples of the NI group in relation to the control. In both studies, there was not hepatic and renal impairment in relation to the control group. Given the results presented, even in low concentrations, the metals could cause changes in the organism through the bioaccumulation and disturbance in the homeostasis of the antioxidant system.

Key-words: Doce river; metals; bioaccumulation; oxidative stress; ROS.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rio Doce próximo à (a) Estação de Tratamento de Água (ETA) de Governador Valadares-MG e (b) cidade de Colatina-ES. Fonte: (a) autora e (b) Flávia Bottino. ....	22
Figura 2. Captações superficiais para abastecimento de água na bacia do rio Doce. Fonte: ANA (2016a). ....	22
Figura 3. Atividades minerárias, uso e cobertura do solo na bacia do rio Doce. Fonte: ANA (2016a).....	25
Figura 4. (a) Distrito de Bento Rodrigues e (b) distrito de Paracatu de Baixo, ambos um mês após o acidente. Fonte: autora. ....	26
Figura 5. Localização da barragem Fundão de rejeitos de minério de ferro e a extensão dos danos ambientais causados pela ruptura da barragem. Adaptado de NEVES <i>et al.</i> (2016). ....	26
Figura 6. Formação de espécies reativas de oxigênio e o sistema antioxidante. GSH: glutathiona reduzida, GSSG: glutathiona oxidada, CAT: catalase, GPx: glutathiona peroxidase, GR: glutathiona redutase, SOD: superóxido dismutase. Adaptado de NAVARRO-YEPES <i>et al.</i> (2014). ....	31
Figura 7. Espectro de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) para o CM• (linha escura) (BERG <i>et al.</i> , 2014). ....	33
Figura 8. Ponto amostrado do rio Doce (a) entre as cidades de Naque e Ipatinga-MG e (b) próximo à foz, em Regência-ES. Fonte: autora. ....	38
Figura 9. Água administrada aos animais, sendo (a) Grupo C - controle, (b) Grupo NI - Naque/Ipatinga, (c) Grupo RE - Regência, (d) Grupo GV - Governador Valadares e (e) Grupo CA - Colatina. Fonte: autora. ....	40
Figura 10. Esquema metodológico.....	41
Figura 11. Evolução da massa corporal dos ratos expostos à água do rio Doce e o grupo controle ao longo do tratamento. C=controle; NI=Naque/Ipatinga; RE=Regência. As barras verticais indicam o desvio padrão dos dados.....	50

Figura 12. Relação entre a quantidade de água consumida e a massa corporal do respectivo animal ao longo do tempo de tratamento. C=controle; NI=Naque/Ipatinga; RE=Regência. As barras verticais indicam o desvio padrão dos dados.....	51
Figura 13. Avaliação do estresse oxidativo no sangue dos animais expostos à água do rio e controle. C=controle; NI=Naque/Ipatinga; RE=Regência. Teste estatístico ANOVA, com post hoc Tukey, exceto para CAT que foi Kruskal-Wallis, com post hoc Dunn's. *p<0,05.....	53
Figura 14. Avaliação do estresse oxidativo e da concentração de EROs no córtex dos animais expostos à água do rio e controle. C=controle; NI=Naque/Ipatinga; RE=Regência. Teste estatístico ANOVA, com post hoc Tukey, exceto para [EROs radiculares] que foi Kruskal-Wallis, com post hoc Dunn's. *p<0,05 e **p<0,01. ....	55
Figura 15. Avaliação do estresse oxidativo e da concentração de EROs no fígado dos animais expostos à água do rio Doce e controle. C=controle; NI=Naque/Ipatinga; RE=Regência. Teste estatístico Kruskal-Wallis, com post hoc Dunn's. *p<0,05.....	57
Figura 16. Avaliação do estresse oxidativo e da concentração de EROs no rim dos animais expostos à água do rio e controle. C=controle; NI=Naque/Ipatinga; RE=Regência. Teste estatístico Kruskal-Wallis, com post hoc Dunn's. ....	59
Figura 17. Evolução da massa corporal dos ratos expostos à água de abastecimento e o grupo controle ao longo do tratamento. C=controle; GV=Governador Valadares; CA=Colatina. As barras verticais indicam o desvio padrão dos dados. ....	63
Figura 18. Consumo de água por massa corporal de animal durante o tratamento com água de abastecimento e grupo controle. C=controle; GV=Governador Valadares; CA=Colatina. As barras verticais indicam o desvio padrão dos dados. ....	64
Figura 19. Avaliação do estresse oxidativo no sangue dos animais expostos à água de abastecimento e controle. C=controle; GV=Governador Valadares; CA=Colatina. Teste estatístico Kruskal-Wallis, com post hoc Dunn's. *p<0,05.....	65
Figura 20. Avaliação do estresse oxidativo e da concentração de EROs no córtex dos animais expostos à água de abastecimento e controle. C=controle; GV=Governador Valadares; CA=Colatina. Teste estatístico Kruskal-Wallis, com post hoc Dunn's, exceto para CAT que foi ANOVA, com post hoc Tukey. *p<0,05.....	67

Figura 21. Avaliação do estresse oxidativo e da concentração de EROs no fígado dos animais expostos à água de abastecimento e controle. C=controle; GV=Governador Valadares; CA=Colatina. Teste estatístico ANOVA, com post hoc Tukey para GSH e [EROs radicalares], e para GPx e CAT foi Kruskal-Wallis, com post hoc Dunn's. \*\*p<0,01. ....69

Figura 22. Avaliação do estresse oxidativo e da concentração de EROs no rim dos animais expostos à água de abastecimento e controle. C=controle; GV=Governador Valadares; CA=Colatina. Teste estatístico Kruskal-Wallis, com post hoc Dunn's. ....70

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Resultados encontrados no Estudo I.....	60
Quadro 2 – Resultados encontrados no Estudo II.....	71

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração de metais na água administrada aos grupos expostos à água do rio Doce e controle. ....	48
Tabela 2 - Resultados da quantificação de hemoglobina dos grupos expostos à água do rio Doce e controle. ....	51
Tabela 3 - Bioacúmulo de metais no córtex dos grupos expostos à água do rio Doce e controle. ....	53
Tabela 4 - Bioacúmulo de metais no fígado dos grupos expostos à água do rio Doce e controle.....	56
Tabela 5 - Bioacúmulo de metais no rim dos grupos expostos à água do rio Doce e controle. ....	58
Tabela 6 - Resultados dos parâmetros bioquímicos ureia, creatinina, $\gamma$ -GT, ALT e AST nos ratos tratados com água do rio Doce e controle. ....	60
Tabela 7 - Concentração de metais na água dos grupos expostos à água de abastecimento e controle. ....	61
Tabela 8 - Resultados da quantificação de hemoglobina dos grupos expostos à água de abastecimento e controle. ....	64
Tabela 9 - Bioacúmulo de metais no córtex dos grupos expostos à água de abastecimento e controle. ....	66
Tabela 10 - Bioacúmulo de metais no fígado dos grupos expostos à água de abastecimento e controle. ....	67
Tabela 11 - Bioacúmulo de metais no rim dos grupos expostos à água de abastecimento e controle. ....	69
Tabela 12 - Resultados dos parâmetros bioquímicos ureia, creatinina, $\gamma$ -GT, ALT e AST nos ratos tratados com água de abastecimento e controle. ....	71
Tabela 13 – Potenciais efeitos na saúde humana causados por alguns metais encontrados em fluidos biológicos. Adaptado de NORDBERG et al. (2007). ....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	alanina aminotransferase
Ag	prata
Al	alumínio
As	arsênio
AST	aspartato aminotransferase
ANA	Agência Nacional de Águas
ATP	adenosina trifosfato
Au	ouro
Ba	bário
Be	berílio
CAT	catalase
Cd	cádmio
Co	cobalto
CP•	3-carboxi-proxilo
Cr	cromo
Cu	cobre
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CMH	1-hidroxi-3-metóxicarbonil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina
DETC	trihidrato de dietilditiocarbamato de sódio
DMT1	transportador de metal divalente
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DP	desvio padrão
DTNB	5-5-ditio-bis-2-ácido nitrobenzóico
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs	espécies reativas de oxigênio
ES	Espírito Santo
ETA	estação de tratamento de água
FCE	Faculdade de Ceilândia
Fe	ferro

$\gamma$ -GT	$\gamma$ -glutamil transferase
GIAIA	Grupo Independente de Avaliação do Impacto Ambiental
GSH	glutaciona reduzida
GSSG	glutaciona oxidada
GPx	glutaciona peroxidase
GR	glutaciona redutase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogênio
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	ácido fosfórico
Hb	hemoglobina
Hg	mercúrio
HNO <sub>3</sub>	ácido nítrico
I	iodo
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICP-MS	espectrômetro de massas com plasma acoplado indutivamente
KHB	tampão Krebs HEPES
LAPETOX	Laboratório de Pesquisas Toxicológicas
Li	lítio
MDA	malondialdeído
MG	Minas Gerais
Mg	magnésio
Mn	manganês
Mo	molibdênio
NAD <sup>+</sup>	nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADPH	fosfato nicotinamida adenina dinucleotídeo
NaOH	hidróxido de sódio
NBR	Norma Brasileira
Ni	níquel
Pb	chumbo
RPE	ressonância paramagnética eletrônica
Sb	antimônio
SDS	dodecil sulfato de sódio
Se	selênio

SOD	superóxido dismutase
SPAL	Serviço de Perícias e Análises Laboratoriais
$O_2^{\cdot-}$	superóxido
$\cdot OH$	radical hidroxil
$OH^-$	hidroxila
TCA	ácido tricloroacético
TFK	tampão fosfato de potássio
TMAH	hidróxido de tetrametilamônio
UFSCar	Universidade de São Carlos
UnB	Universidade de Brasília
UV-VIS	ultravioleta visível
V	vanádio
VMP	valor máximo permitido
Zn	zinco

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>24</b>
2.1	BACIA DO RIO DOCE.....	24
2.2	ROMPIMENTO DA BARRAGEM EM MARIANA-MG.....	25
2.3	EXPOSIÇÃO AOS METAIS E SEUS PROVÁVEIS EFEITOS .....	28
2.4	ESTRESSE OXIDATIVO.....	30
2.5	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO .....	32
2.6	PARÂMETROS BIOQUÍMICOS .....	34
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>36</b>
3.1	GERAL .....	36
3.2	ESPECÍFICOS .....	36
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
4.1	EQUIPAMENTOS.....	37
4.2	REAGENTES E SOLUÇÕES.....	37
4.3	COLETA DAS AMOSTRAS DE ÁGUA E QUANTIFICAÇÃO DE METAIS.....	38
4.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	39
4.5	ANIMAIS.....	39
4.6	EUTANÁSIA E COLETA DOS TECIDOS.....	41
4.7	AVALIAÇÃO DO BIOACÚMULO DE METAIS NOS TECIDOS .....	42
4.8	DETERMINAÇÃO DA HEMOGLOBINA .....	42
4.9	SISTEMA ANTIOXIDANTE .....	43
	<b>4.9.1 Homogenato dos tecidos</b> .....	<b>43</b>
	<b>4.9.2 Determinação de GSH</b> .....	<b>43</b>
	<b>4.9.3 Atividade da GPx</b> .....	<b>44</b>
	<b>4.9.4 Atividade da CAT</b> .....	<b>44</b>
4.10	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS).....	45
4.11	AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA.....	45
	<b>4.11.1 Determinação de ureia</b> .....	<b>46</b>
	<b>4.11.2 Determinação de creatinina</b> .....	<b>46</b>
	<b>4.11.3 Determinação de <math>\gamma</math>-GT</b> .....	<b>46</b>
	<b>4.11.4 Determinação de ALT</b> .....	<b>46</b>
	<b>4.11.5 Determinação de AST</b> .....	<b>47</b>
4.12	ANÁLISE DOS DADOS.....	47

<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>48</b>
5.1	ESTUDO I: .....	48
5.2	ESTUDO II .....	61
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>75</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>76</b>
	<b>ANEXO I.....</b>	<b>84</b>
	<b>ANEXO II.....</b>	<b>85</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A barragem de Fundão, localizada no município de Mariana-MG, faz parte da mina de Germano controlada pela empresa Samarco. A mineradora Samarco atua desde 1977 na produção de minério de ferro para produção de aço, com empreendimentos nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo. A barragem de Fundão foi construída, juntamente com a barragem de Santarém para acomodar resíduos da atividade mineradora (IBAMA, 2015).

Na tarde do dia 5 de novembro de 2015, ocorreu o rompimento de um dos diques da barragem Fundão, que liberou cerca de 40 milhões de m<sup>3</sup> de rejeito de minério de ferro, causando o pior desastre ambiental do Brasil (MATOS, 2016.).

Bowker Associates, uma empresa que realiza análises de riscos e avaliações, classificou o acidente como o maior da história com base no volume de resíduos, na área afetada e no prejuízo de 5,2 bilhões de dólares (GUIDI, 2015).

A enxurrada de lama atingiu o rio Gualaxo do Norte, o qual é afluente do rio do Carmo, um dos formadores do Rio Doce e atingiu o Oceano Atlântico no estado do Espírito Santo depois de 16 dias do desastre. Ao todo a lama percorreu, aproximadamente, 600 km em direção ao litoral, causando danos ambientais, sociais e econômicos.

Sabendo que parte do material proveniente do rompimento da barragem ainda se encontra depositado nos corpos hídricos, destaca-se como consequência os impactos na qualidade da água. Os principais usos dos recursos hídricos na bacia do rio Doce como geração de energia elétrica, indústria, pesca e lazer foram afetados (ANA, 2016a). Além disso, o grande volume de rejeitos acumulados nas margens dos cursos de água afeta o equilíbrio dos ecossistemas aquáticos, comprometendo a fauna, flora e serviços ecossistêmicos, como a autodepuração, principalmente nos períodos chuvosos. Esse fato agrava também o abastecimento público de água, que se torna mais oneroso devido ao aumento de sólidos em suspensão na água e elevada turbidez.

Há registro de 169 pontos de captação de água por usuários na calha do rio Doce (Figura 1) (ANA, 2016b), justificando a investigação de possíveis danos

que a água contaminada pelo rejeito de mineração poderia causar na fauna que utiliza esse recurso para dessedentação, por exemplo (estudo I) e àqueles que consomem a água de abastecimento oriunda do rio Doce que está sendo distribuída em algumas cidades (estudo II).



Figura 1. Rio Doce próximo à (a) Estação de Tratamento de Água (ETA) de Governador Valadares-MG e (b) cidade de Colatina-ES. Fonte: (a) autora e (b) Flávia Bottino.

Na cidade de Governador Valadares-MG concentra-se a maior população abastecida pelo rio Doce, seguida de Colatina-ES (Figura 2) (ANA, 2016a), justificando a escolha desses dois municípios para a realização desta pesquisa, mais especificamente o estudo II, detalhado a seguir e que simula os possíveis danos que a água de abastecimento pode ocasionar.

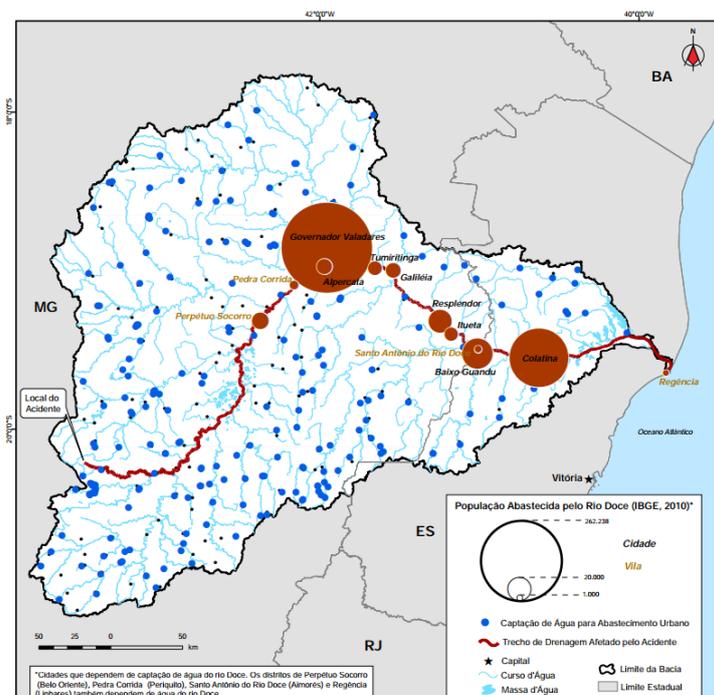


Figura 2. Captações superficiais para abastecimento de água na bacia do rio Doce. Fonte: ANA (2016a).

Neste sentido, diante do exposto acima, há a necessidade de verificar os efeitos da ingestão da água da região do acidente, que está com elevadas concentrações de metais e avaliar as possíveis alterações que essa mistura de elementos inorgânicos poderia desencadear no sistema antioxidante e sobre as funções renais e hepáticas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 BACIA DO RIO DOCE

A drenagem da bacia do rio Doce corresponde a cerca de 84 mil km<sup>2</sup>, dos quais 86% encontram-se em Minas Gerais e 14% no Espírito Santo (COELHO, 2009). Compreende 255 municípios, sendo 200 mineiros e 25 capixabas (ANA, 2016a).

Os recursos hídricos desempenham um papel fundamental na economia do leste mineiro e do noroeste capixaba, fornecendo a água necessária aos usos domésticos, agropecuária, indústria, geração de energia elétrica, entre outros (1).

O crescimento econômico centrado sobre a exploração de *commodities* pressiona os recursos naturais do vale do rio Doce, onde existe importantes reservas minerais. Por isso, a bacia do rio Doce abriga diversas barragens utilizadas para deposição de rejeitos dessa atividade (ANA, 2016a).

Diante disso, os cursos d'água da bacia funcionam como canais receptores, transportadores e autodepuradores dos rejeitos e efluentes produzidos por essa atividade e, também, dos esgotos domésticos da grande maioria dos municípios existentes na bacia, comprometendo a qualidade da água (ANA, 2016a).

Os cursos d'água da cidade de Mariana têm alta contaminação por agentes tóxicos (CBHDOCE, 2010.), resultante das condições geoquímicas da região e das atividades antrópicas desenvolvidas no entorno da bacia (Figura 3). A contaminação das águas superficiais é consequência das ações das empresas mineradoras e siderúrgicas, seja pelo aumento de sólidos suspensos ou pela alteração química da água nas lagoas de decantação, utilizadas no beneficiamento do minério (ENGENHARIA, 2014.).

Neste município, os maiores impactos relacionados à contaminação das águas ocorrem na bacia do rio do Carmo (afluente do rio Doce), devido às atividades de mineração e siderurgia, as quais apresentam elevadas demandas de água e alto potencial poluidor inorgânico (ENGENHARIA, 2014.).

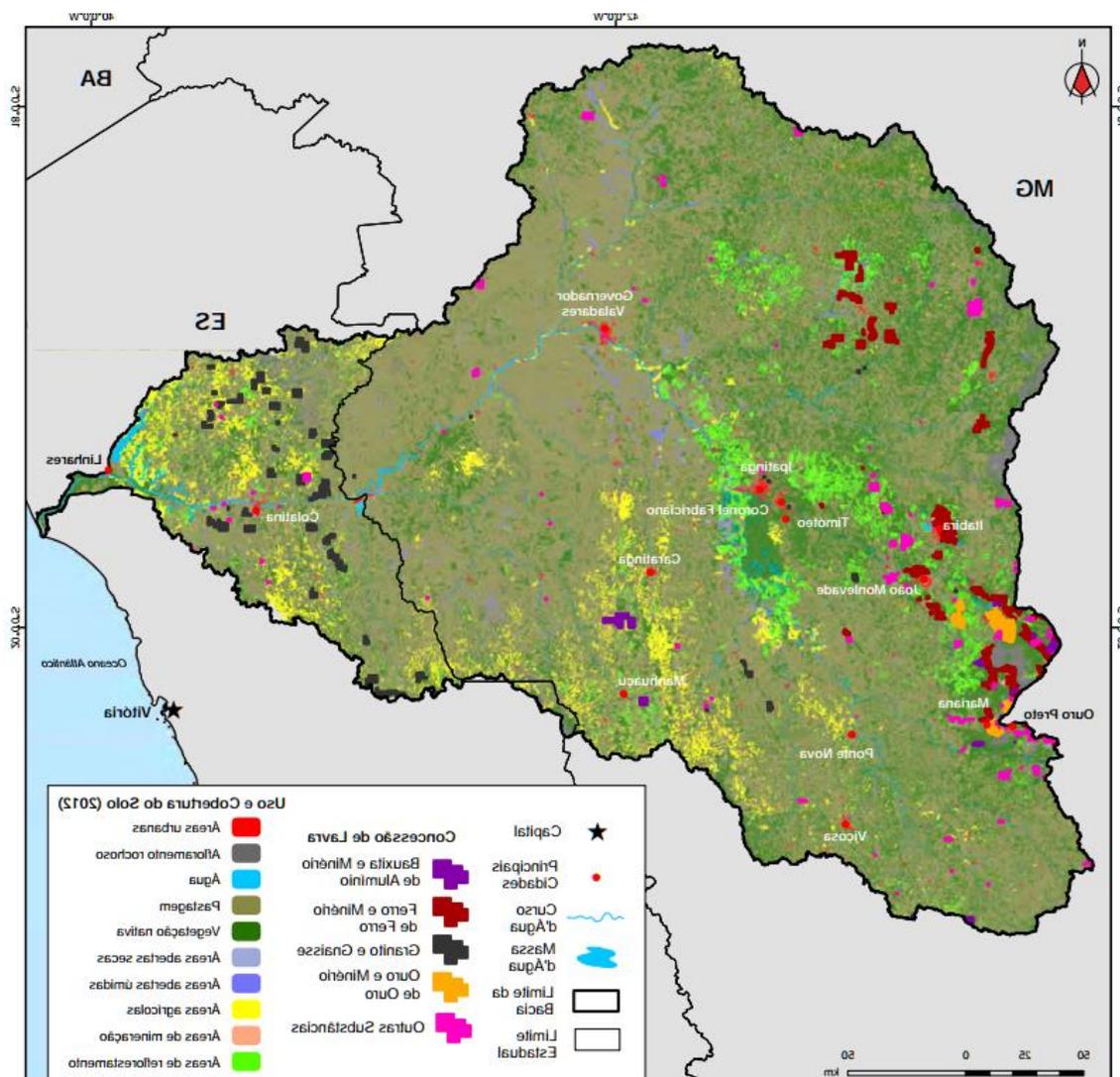


Figura 3. Atividades minerárias, uso e cobertura do solo na bacia do rio Doce. Fonte: ANA (2016a).

## 2.2 ROMPIMENTO DA BARRAGEM EM MARIANA-MG

No dia 5 de novembro de 2015, o rompimento da barragem de rejeitos Fundão e o galgamento da barragem de Santarém da mineradora Samarco, cujos donos são a Vale S.A. e a anglo-australiana BHP Billiton Brasil Ltda, resultou em um desastre ambiental de grande magnitude e repercussão. O rompimento liberou um volume estimado de 34 milhões de m<sup>3</sup> de rejeitos, água e materiais utilizados na mineração, causando diversos impactos socioeconômicos e ambientais na bacia do rio Doce (ANA, 2016a).

Nos trechos imediatamente a jusante da barragem de Fundão, a enxurrada de lama de rejeitos eliminou parte da vegetação que compunha

importante área de preservação ambiental, agravando os danos nos trechos de cabeceira. O distrito de Bento Rodrigues, pertencente ao município de Mariana-MG, situado a pouco mais de 5 km das barragens, e Paracatu de Baixo-MG foram praticamente soterrados (Figura 4).

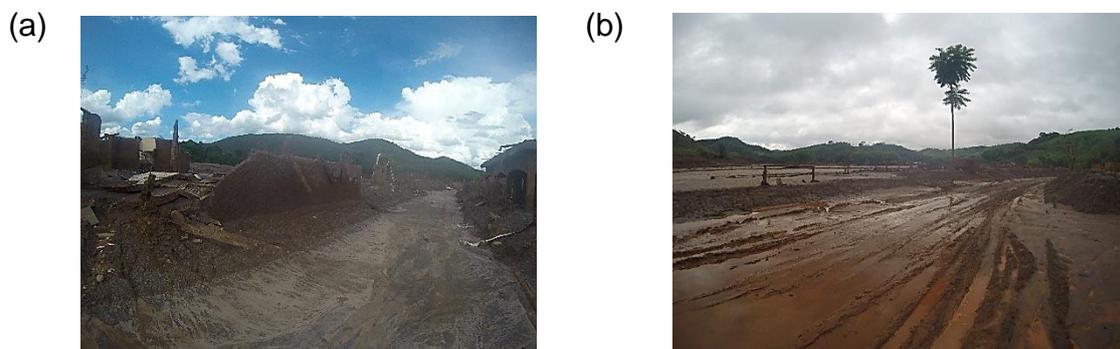


Figura 4. (a) Distrito de Bento Rodrigues e (b) distrito de Paracatu de Baixo, ambos um mês após o acidente. Fonte: autora.

Durante duas semanas após o acidente, a lama de rejeitos de mineração percorreu mais de 600 km até a foz, atingindo o oceano Atlântico e reservas marinhas costeiras (Figura 5) (ANA, 2016a).

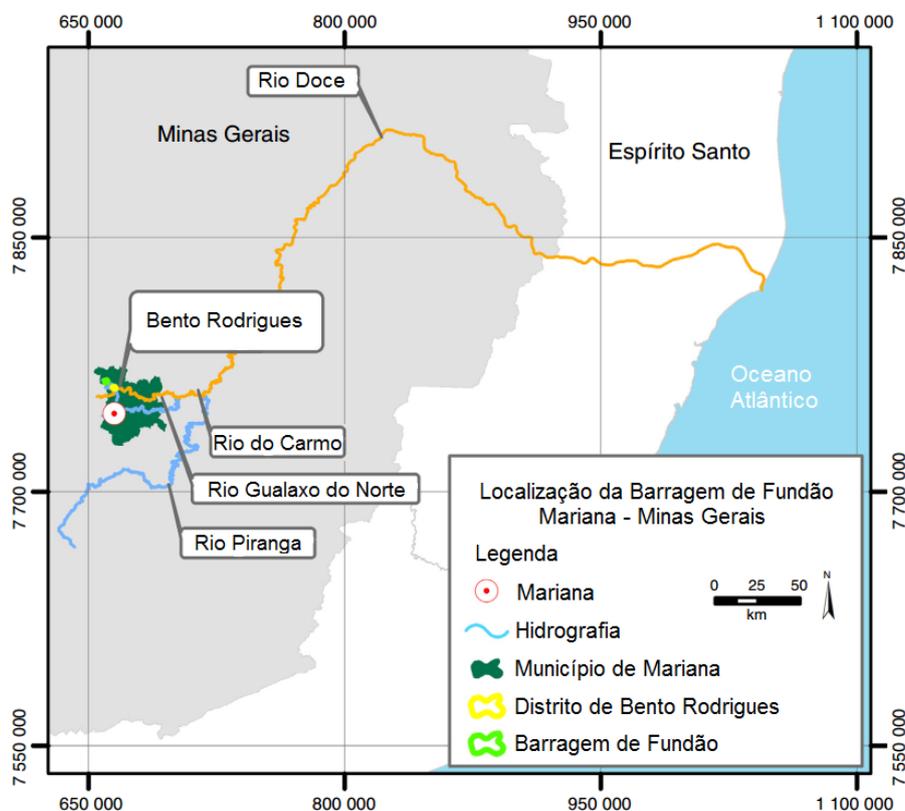


Figura 5. Localização da barragem Fundão de rejeitos de minério de ferro e a extensão dos danos ambientais causados pela ruptura da barragem. Adaptado de NEVES *et al.* (2016).

A passagem da onda de rejeitos elevou a concentração de partículas em suspensão na água e os níveis de turbidez em todo o rio, resultando na interrupção parcial ou total do abastecimento de água de 12 cidades que captam água diretamente do rio Doce, afetando cerca de 424 mil pessoas (ANA, 2016a).

De acordo com o Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM), órgão responsável pela fiscalização de barragens de rejeitos, a barragem de Fundão é considerada de baixo risco. Assim o rejeito de minério seria inofensivo para a saúde por ser classificado como resíduo não perigoso e não inerte para ferro e manganês (classe II A), conforme NBR 10.004 (LENHARO, 2015.; ANA, 2016a).

O Grupo Independente de Avaliação de Impactos Ambientais (GIAIA) encontrou na água coletada em alguns pontos do rio, em suas análises preliminares (GIAIA, 2016), concentrações de metais superiores ao valor máximo permitido (VMP) quando comparados com a legislação vigente CONAMA 357/2005, que dispõe sobre a classificação dos corpos hídricos e define as diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências (BRASIL, 2005).

As concentrações de metais consideradas preocupantes foram as de arsênio (As), manganês (Mn), chumbo (Pb) e ferro (Fe). Vale ressaltar que estes metais têm alta probabilidade de desencadear efeitos tóxicos às exposições de longo prazo.

A Agência Nacional de Águas, em encarte especial sobre a bacia do rio Doce, publicou que:

Não houve aporte de nenhum elemento químico novo na bacia. No entanto, durante a passagem da pluma de sedimentos foram observadas elevações significativas nas concentrações de metais pesados, provavelmente adsorvidos aos sedimentos finos, como alumínio, arsênio, cádmio, chumbo, cobre, cromo, mercúrio e níquel. Esses micropoluentes inorgânicos são geralmente pouco solúveis na água, sendo sua solubilidade dependente do pH e do potencial de oxirredução do ambiente aquático. Alguns desses metais são comprovadamente prejudiciais à saúde humana, mesmo quando ingeridos em pequenas concentrações. Quando presentes na água podem inviabilizar o abastecimento público, uma vez que o tratamento do tipo convencional não os remove eficientemente. Podem também se acumular na biota aquática e, devido à sua toxicidade, causar prejuízos aos ecossistemas aquáticos naturais. O consumo de pescado contaminado com esses metais pode resultar em problemas de saúde para a população (ANA, 2016a).

O rompimento da barragem provocou diversas alterações no ambiente aquático e a recuperação da qualidade da água será um processo lento e gradual, uma vez que o rejeito depositado na calha dos corpos de água poderá ser revolvido após a ocorrência de determinados eventos como por exemplo, chuvas e ações antrópicas (IGAM, 2016).

### 2.3 EXPOSIÇÃO AOS METAIS E SEUS PROVÁVEIS EFEITOS

Alguns metais desempenham funções importantes no metabolismo fisiológico normal e, entre eles, os mais expressivos são: ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu), magnésio (Mg), molibdênio (Mo), selênio (Se), iodo (I) e cobalto (Co). Entre os 92 elementos naturais, aproximadamente 22 são conhecidos como elementos essenciais para o organismo de mamíferos e são referidos como micronutrientes. Contudo, chumbo (Pb), mercúrio (Hg) e cádmio (Cd) são considerados contaminantes, tendo limites máximos estabelecidos (NASCIMENTO e ESTEBAN, 2016).

O aumento da exposição aos metais pode resultar em consequências indesejáveis para a saúde humana, sendo o encéfalo um órgão-alvo bastante vulnerável. Além disso, esses elementos químicos podem ser mantidos durante anos no organismo (GRANDJEAN e LANDRIGAN, 2014; GRANDJEAN e HERZ, 2015).

As consequências de tais exposições podem ser sérias e de longa duração. A multiplicação celular, diferenciação, migração e geração de sinapses são sensíveis aos efeitos causados por elementos químicos neurotóxicos, como por exemplo, o Pb (GRANDJEAN e HERZ, 2015).

Estudos epidemiológicos demonstram que a exposição a metais tem efeitos tóxicos e carcinogênicos tanto em animais como em seres humanos. A água potável de países do oriente, como China e Índia, tem elevados níveis de As e cromo hexavalente (Cr VI) e seu consumo tem sido associada à incidência de câncer de pele, fígado e pulmão (VALKO *et al.*, 2007).

O Mn, apesar de ser um elemento traço essencial e estar envolvido em uma variedade de processos enzimáticos e celulares, quando em excesso no organismo, pode ser tóxico. A neurotoxicidade induzida por Mn, conhecida como

manganismo, tem sintomas semelhantes à doença de Parkinson (TAKEDA, 2003; PASSAGLI e PAULA, 2013; KRISHNA *et al.*, 2014).

Os metais essenciais geralmente compartilham o mesmo mecanismo de transporte, como por exemplo, o Fe e o Mn podem ser transportados para a célula pelo ciclo da transferrina e pelo transportador de metal divalente 1 (DMT1). Este também pode transportar o Cu e o zinco (Zn). Dessa forma, Mercadante e colaboradores (2016) sugeriram que a ingestão excessiva de Mn provavelmente ocasionará alteração do transporte dos metais Fe, Cu e Zn nos tecidos.

Estudo de Erikson e colaboradores (2004) demonstrou que ambas as vias de exposição, oral e inalada, levaram a alterações bioquímicas mínimas indicativas de estresse oxidativo induzido por Mn nos tecidos do cérebro. Sendo assim, são necessárias maiores investigações sobre exposição ao Mn via oral.

A formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio mediada por metais provoca várias modificações nas bases de DNA, peroxidação lipídica aumentada e homeostase alterada de cálcio e sulfidrilas (VALKO *et al.*, 2005; VALKO *et al.*, 2006).

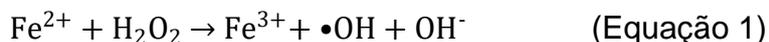
Fe, Cu, Cr, V e Co podem levar ao estresse oxidativo celular devido às suas reações redox, enquanto Hg, Cd e Ni diminuem a ação antioxidante da glutatona ao se ligarem ao grupo sulfidrilas deste peptídeo não proteico, causando toxicidade às células (VALKO *et al.*, 2005).

Acreditava-se que a ligação do Cu à glutatona reduzida era um mecanismo para diminuir a atividade redox dos íons de Cu. No entanto, no estudo recentemente publicado por Aliaga e colaboradores (2016), há evidências de que a ligação do metal à GSH leva a formação do complexo  $Cu(I)=[GSH]_2$  capaz de reduzir o oxigênio molecular à superóxido, sendo um possível mecanismo de toxicidade do Cu. Sob condições que conduzem à remoção de tais radicais, o complexo é prontamente oxidado em  $Cu(II)=GSSG$ .

Compostos de As, por sua vez, são carcinógenos humanos bem estabelecidos, pois são capazes de se ligar a grupos tióis e inibir várias enzimas antioxidantes como, por exemplo, a catalase. No entanto, mecanismos envolvendo a formação de peróxido de hidrogênio em condições fisiológicas também são propostos (ACHARYYA *et al.*, 2015).

O fator unificador na determinação da toxicidade e carcinogenicidade para a maioria dos metais é a geração de espécies reativas, sejam elas de oxigênio

ou nitrogênio. Mecanismos comuns envolvendo a reação de Fenton (Equação 1), geração de radicais superóxido e hidroxila, parecem estar envolvidos com Fe, Cu, Cr, V, Co associados as mitocôndrias, microsomas e peroxissomos (VALKO *et al.*, 2005; POPRAC *et al.*, 2017; REHMAN *et al.*, 2017).



## 2.4 ESTRESSE OXIDATIVO

A geração de espécies reativas é resultante do metabolismo energético, sendo a mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons, a principal fonte geradora (BARBOSA *et al.*, 2010; VAKIFAHMETOGLU-NORBERG *et al.*, 2017). O oxigênio é reduzido pela citocromo oxidase à água e o NADH é oxidado à  $\text{NAD}^+$ , para que haja produção de ATP (SASTRE *et al.*, 2003; ENGERS *et al.*, 2011). Durante este transporte, 1 a 2% dos elétrons são liberados (ABDELRAHMAN *et al.*, 2016), levando à formação de numerosos intermediários reativos, tais como superóxido e hidroxila, peróxido de hidrogênio e oxigênio singleto (ENGERS *et al.*, 2011).

Essa geração mitocondrial de espécies reativas pode causar danos aos componentes mitocondriais e celulares, provocando um sistema de degradação. O sistema de defesa antioxidante do organismo tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dessas espécies reativas. Esse sistema pode ser dividido em não enzimático (substâncias de origem endógena, como a glutathiona reduzida, ou dietética) e enzimático (catalase, glutathiona peroxidase e superóxido dismutase) (Figura 6) (BARBOSA *et al.*, 2010).

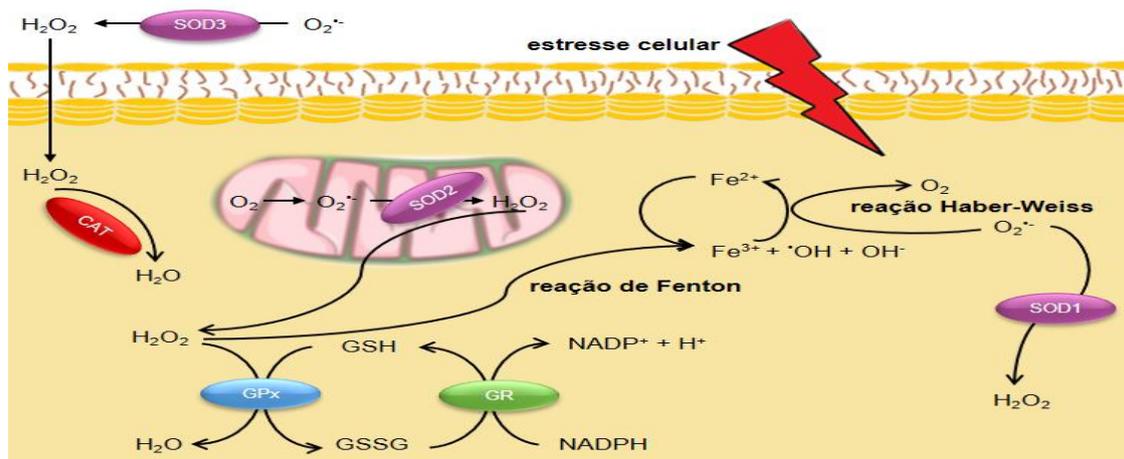


Figura 6. Formação de espécies reativas de oxigênio e o sistema antioxidante. GSH: glutatona reduzida, GSSG: glutatona oxidada, CAT: catalase, GPx: glutatona peroxidase, GR: glutatona redutase, SOD: superóxido dismutase. Adaptado de NAVARRO-YEPES *et al.* (2014).

A glutatona reduzida (GSH) é um tripeptídeo de baixo peso molecular, composto por glutamato, cisteína e glicina. Está presente na maioria das células e é o tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular. Sua capacidade redutora é determinada por este grupamento, presente na cisteína (MEISTER e ANDERSON, 1983; FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons Fe, participa da detoxificação de xenobióticos na biotransformação de fase II e na eliminação de produtos da peroxidação lipídica (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; BANERJEE, 2008).

As enzimas catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) agem com o mesmo propósito, o de impedir o acúmulo de peróxido de hidrogênio. Esta espécie reativa, por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss, mediante a participação dos metais Fe e Cu, respectivamente, resultam na geração do radical hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ) e hidroxila ( $\text{OH}^-$ ), contra os quais não há sistema de defesa. Este radical, instável e com alto potencial reativo, é o mais propício à produção de danos oxidativos (BARBOSA *et al.*, 2010).

A ação da GPx também depende da manutenção do ciclo redox da GSH, por meio do controle da relação entre GSH e oxidada (GSSG) por meio da glutatona redutase (GR) (BARBOSA *et al.*, 2010). Sob condições de excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema protetor, há um desequilíbrio entre

o consumo de GSH e a produção de GSSG. Assim, a magnitude do dano pode ser monitorada pela razão GSSG/GSH (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

A produção de espécies reativas de oxigênio em pequenas quantidades está envolvida em processos fisiológicos de sinalização e regulação, sendo essas benéficas para as células (ENGERS *et al.*, 2011). No entanto, em situações em que há um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante, é desencadeado um processo denominado estresse oxidativo (BARBOSA *et al.*, 2010).

Um dos maiores efeitos tóxicos dos metais é o estresse oxidativo. Eles aumentam a peroxidação lipídica e causam deficiências nos tecidos alterando a atividade de enzimas antioxidantes como a SOD, CAT e GPx (MARKIEWICZ-GÓRKA *et al.*, 2015; POPRAC *et al.*, 2017). Inclusive, as mudanças no balanço prooxidante-antioxidante nos tecidos durante exposição crônica a metais está envolvida no desenvolvimento de diversas condições patológicas, como câncer, doenças cardiovasculares, diabetes, aterosclerose, distúrbios neurológicos, inflamações crônicas, entre outras (JOMOVA e VALKO, 2011; MARKIEWICZ-GÓRKA *et al.*, 2015; LAN *et al.*, 2016).

## 2.5 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Espécies reativas de oxigênio (EROs) incluem ambos os radicais livres, como superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e radical hidroxila ( $\cdot OH$ ); não-livres, como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ); produtos da peroxidação lipídica (radicais peroxil e alcoxil) e produtos secundários, no caso, malondialdeído (MDA) e 4-hidroxialcanos; além do oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) (OLIVEIRA *et al.*, 2012; POLJSKAK *et al.*, 2013; POPRAC *et al.*, 2017).

O aumento da produção de EROs é decorrente de fatores endógenos (inflamação, aumento da concentração de  $O_2$ , escape mitocondrial) e exógenos (poluição ambiental, exercícios extremos, fumo, nutrição, inflamação crônica, estresse psicológico e emocional, entre outros) (POLJSKAK *et al.*, 2013).

A detecção e quantificação das EROs em amostras biológicas, tais como suspensões celulares, sangue ou tecidos, pode ser realizada por métodos indiretos, tais como observar alterações químicas causadas pelas espécies

reativas nas moléculas biológicas ou por quantificação direta de EROs (BERG *et al.*, 2014).

Um dos melhores métodos disponíveis para a quantificação das espécies nos tecidos é a ressonância paramagnética eletrônica (RPE). Com a nova geração de moléculas *spin probe* e a alta sensibilidade dos espectrômetros, tornou-se possível medir concentrações muito baixas de radicais e outras espécies paramagnéticas (BERG *et al.*, 2014).

RPE é uma técnica baseada na absorção de radiação eletromagnética por uma amostra paramagnética quando colocada em um campo magnético. Estas absorções ocorrem apenas em frequências bem definidas e combinações de campos magnéticos, que dependem do tipo de espécies paramagnéticas presentes e suas características (HAWKINS e DAVIES, 2014).

Usando a *spin probe* CMH (1-hidroxi-3-metóxicarbonil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina) é possível detectar várias espécies reativas, tais como: superóxido e radical peroxil. No entanto, o CMH não reage com o peróxido de hidrogênio (VELAYUTHAM *et al.*, 2011). Sendo assim, ao utilizar o CMH, a principal molécula detectada é o íon superóxido e não EROs em geral (BERG *et al.*, 2014).

A concentração de  $CM^\bullet$  formada, a *spin probe* aduto 3-metoxicarbonilproxil nitróxido, é proporcional à concentração de espécies oxidantes que reagem com o CMH (BERG *et al.*, 2014). O sinal gerado está representado na Figura 7.

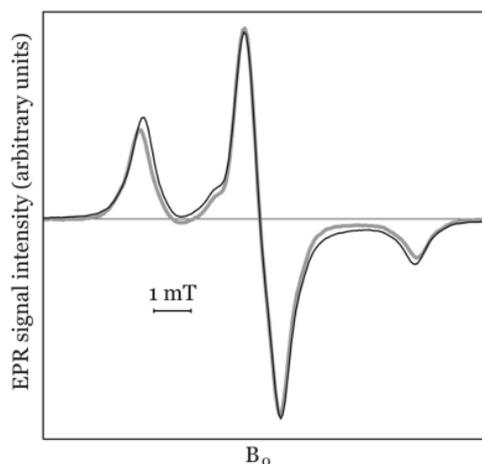


Figura 7. Espectro de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) para o  $CM^\bullet$  (linha escura) (BERG *et al.*, 2014).

## 2.6 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

A análise de indicadores bioquímicos séricos permite uma aferição sistêmica da interferência de um xenobiótico nas funções fisiológicas do organismo modelo (BLOOM e BRANDT, 2012).

O nível de ureia no plasma é afetado pela função renal, pelo conteúdo proteico da dieta e o teor do catabolismo proteico, pelo estado de hidratação e pela presença de sangramento intestinal. Apesar dessas limitações, o nível de ureia ainda atua como um índice preditivo da insuficiência renal (MOTTA, 2009). Uma vez que a ureia é sintetizada no fígado, a hepatopatia avançada frequentemente está associada com ureia plasmática reduzida (DUFOUR, 2008b).

A creatinina não é reutilizada no metabolismo corporal e assim, funciona somente como um produto dos resíduos de creatina. Ela se difunde do músculo para o plasma, de onde é removida inteiramente e em velocidade relativamente constante por filtração glomerular. A concentração de creatinina sérica é uma excelente medida para avaliar a função renal (DUFOUR, 2008b; MOTTA, 2009).

No hepatócito, as enzimas comumente medidas são encontradas em localizações específicas, sendo que o tipo de lesão hepática determina o padrão de alteração enzimática. As aminotransferases são enzimas encontradas no citoplasma, enquanto a  $\gamma$ -glutamil transferase ( $\gamma$ -GT), uma enzima canalicular (DUFOUR, 2008a).

A  $\gamma$ -GT está envolvida no transporte de aminoácidos e peptídeos através da membrana celular, na síntese proteica e na regulação dos níveis de glutatona tecidual. A liberação de  $\gamma$ -GT pelas células está, primariamente, relacionada com a liberação dos fragmentos de membrana; rins e intestino parecem contribuir pouco para a  $\gamma$ -GT total. O principal valor clínico da avaliação da  $\gamma$ -GT o estudo das desordens hepatobiliares. Aumentos dramáticos de  $\gamma$ -GT são indicativos característicos de hepatopatia (DUFOUR *et al.*, 2008; MOTTA, 2009).

As aminotransferases estão amplamente distribuídas nos tecidos. As reações catalisadas pelas aminotransferases exercem papéis centrais, tanto na síntese, como na degradação de aminoácidos. A enzima alanina aminotransferase (ALT), encontrada comumente no plasma e outros tecidos, está geralmente associada ao fígado, enquanto as atividades mais elevadas da

aspartato aminotransferase (AST) encontram-se no miocárdio, no fígado e no músculo esquelético, com pequenas quantidades nos rins, pâncreas, baço, cérebro, pulmões e eritrócitos. A causa mais importante de aumento de AST e ALT é a lesão ao hepatócito (DUFOUR *et al.*, 2008; MOTTA, 2009).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Avaliar a toxicidade induzida pela água do rio Doce, após rompimento da barragem Fundão da Samarco, em ratos tratados cronicamente por via oral.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

##### ESTUDO I

- Avaliar os efeitos tóxicos da água oriunda do rio Doce coletada próxima às cidades de Naque e Ipatinga-MG, e Regência-ES, após exposição de ratos *wistar* via oral;
- Determinar o bioacúmulo de metais no córtex, fígado e rim destes animais;
- Avaliar o sistema antioxidante através de biomarcadores do estresse oxidativo e da quantificação de EROs radicalares nestes tecidos;
- Verificar a função renal e hepática através de análises bioquímicas.

##### ESTUDO II

- Avaliar os efeitos tóxicos da água captada e tratada do rio Doce, coletadas nas cidades de Governador Valadares-MG e Colatina-ES, após exposição de ratos *wistar* via oral;
- Determinar o bioacúmulo de metais no córtex, fígado e rim destes animais;
- Avaliar o sistema antioxidante através de biomarcadores do estresse oxidativo e da quantificação de EROs radicalares nesses tecidos;
- Verificar a função renal e hepática através de análises bioquímicas.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 EQUIPAMENTOS

Os testes bioquímicos e biomarcadores do estresse oxidativo (GSH, GPx e CAT) foram quantificados em espectrofotômetro Hitachi, Tóquio (Japão) e utilizou-se centrífuga refrigerada SORVALL® ST 16R e caneta ultrassônica Sonics Vibra-Cell modelo VCX130 PB para o preparo de amostras. Os tecidos foram liofilizados em liofilizador da marca Labotec®, modelo 01.JLG. Para a quantificação de metais utilizou-se um espectrômetro de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) NexION 300D Perkin Elmer®, Norwalk, CT (EUA), sendo os parâmetros instrumentais operacionais especificados no ANEXO I. Para a quantificação de EROs utilizou-se espectrômetro paramagnético eletrônico Bruker EMX500.

### 4.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

Utilizou-se água deionizada de alta pureza (resistividade 18,2 M  $\Omega$ .cm) obtida pelo sistema Milli-Q (Millipore®) em todo o trabalho. Fosfato de potássio mono e dibásico, 5-5-ditio-bis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ácido tricloroacético (TCA), 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), dodecil sulfato de sódio (SDS), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), hidróxido de sódio (NaOH), glutathione reduzida (GSH), glutathione redutase (GR), Triton® X-100, azida sódica, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH), hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) foram comprados da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Tampão Krebs HEPES (KHB) (NOX-7.6, Noxygen, Alemanha), *spin probe* 1-hidroxi-3-metoxicarbonil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina (CMH) (NOX-2, Noxygen, Alemanha), deferoxamina (DF) (NOX-9, Noxygen, Alemanha), quelante de ferro e trihidrato de dietilditiocarbamato de sódio (DETC) (NOX-10, Noxygen, Alemanha), um quelante de cobre.

Ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) e todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

Todas as soluções e amostras foram armazenadas em frascos de polietileno após prévio tratamento para eliminação de contaminantes. Frascos de plástico foram mergulhados em solução contendo 10% v/v HNO<sub>3</sub> por 24 h e lavados com água Milli-Q.

#### 4.3 COLETA DAS AMOSTRAS DE ÁGUA E QUANTIFICAÇÃO DE METAIS

A coleta da água foi feita na superfície do rio Doce, usando galão plástico pela introdução direta na água do rio ou coletando diretamente da torneira, durante a Expedição do GIAIA realizada por pesquisadores da UFSCar e UnB/FCE em dezembro de 2015 e março de 2016. Em seguida, os frascos foram fechados e identificados. As amostras foram mantidas resfriadas em geladeira até a realização dos testes e tratamento dos animais.

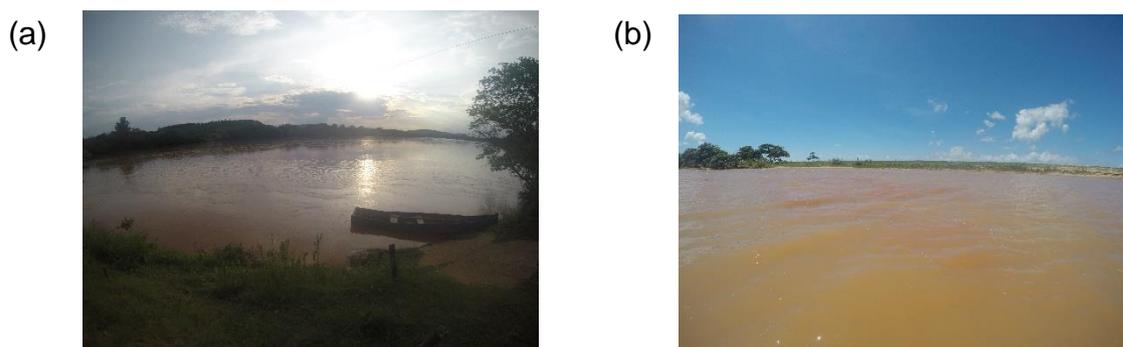


Figura 8. Ponto amostrado do rio Doce (a) entre as cidades de Naque e Ipatinga-MG e (b) próximo à foz, em Regência-ES. Fonte: autora.

A quantificação dos metais nas amostras de água foi feita no Serviço de Perícias e Análises Laboratoriais (SPAL), no Complexo da Polícia Civil do Distrito Federal.

Para a determinação das concentrações dos metais prata (<sup>107</sup>Ag), arsênio (<sup>75</sup>As), bário (<sup>138</sup>Ba), berílio (<sup>9</sup>Be), cádmio (<sup>111</sup>Cd), cromo (<sup>52</sup>Cr), cobre (<sup>63</sup>Cu), ferro (<sup>56</sup>Fe), manganês (<sup>55</sup>Mn), níquel (<sup>60</sup>Ni), chumbo (<sup>208</sup>Pb), antimônio (<sup>121</sup>Sb), selênio (<sup>82</sup>Se), vanádio (<sup>51</sup>V) e zinco (<sup>66</sup>Zn) nas amostras de água, utilizou-se espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS). Argônio com pureza de 99,999% foi utilizado para a geração do plasma, como gás de nebulização e auxiliar. Houve a necessidade de diluição da água em HNO<sub>3</sub> 2% 1:10 (v/v) e foi feito em triplicata.

Foi realizado um *screening* para verificar quais os possíveis metais que estariam em concentrações alteradas de acordo com as legislações vigentes CONAMA 357/2005 para água do rio (NI e RE) e Portaria 2914/2011 para água de abastecimento (GV e CA).

#### 4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para compor o estudo I, as amostras de água do rio foram coletadas entre as cidades de Naque e Ipatinga-MG por ser a região com maior concentração de metais potencialmente tóxicos segundo Relatório Preliminar do GIAIA (GIAIA, 2016) e Regência-ES por ser uma região com população ribeirinha dependente exclusivamente do rio como fonte de água e com relevante atividade turística, por estar em região litorânea.

Para o estudo II, foram coletadas amostras de água de abastecimento das cidades com maior população, Governador Valadares-MG e Colatina-ES diretamente da torneira de residências.

#### 4.5 ANIMAIS

Antes da execução, o projeto foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Católica de Brasília, com aprovação sob o número 003/16 (ANEXO II).

Foram utilizados ratos *wistar* machos, da espécie *Rattus norvegicus*, recém desmamados, com cerca de 60g, divididos em 5 grupos de 5 animais (n=25), sendo pesados semanalmente. A divisão dos grupos de tratamento foi delimitada através da água administrada aos animais (Figura 9), sendo:

**Grupo C:** controle, que recebeu água de abastecimento do biotério;

**Grupo NI:** recebeu água coletada do rio próximo às cidades de Naque e Ipatinga-MG;

**Grupo RE:** recebeu água coletada do rio próximo à foz, em Regência-ES;

**Grupo GV:** recebeu água encanada de Governador Valadares-MG e

**Grupo CA:** recebeu água encanada de Colatina-ES.

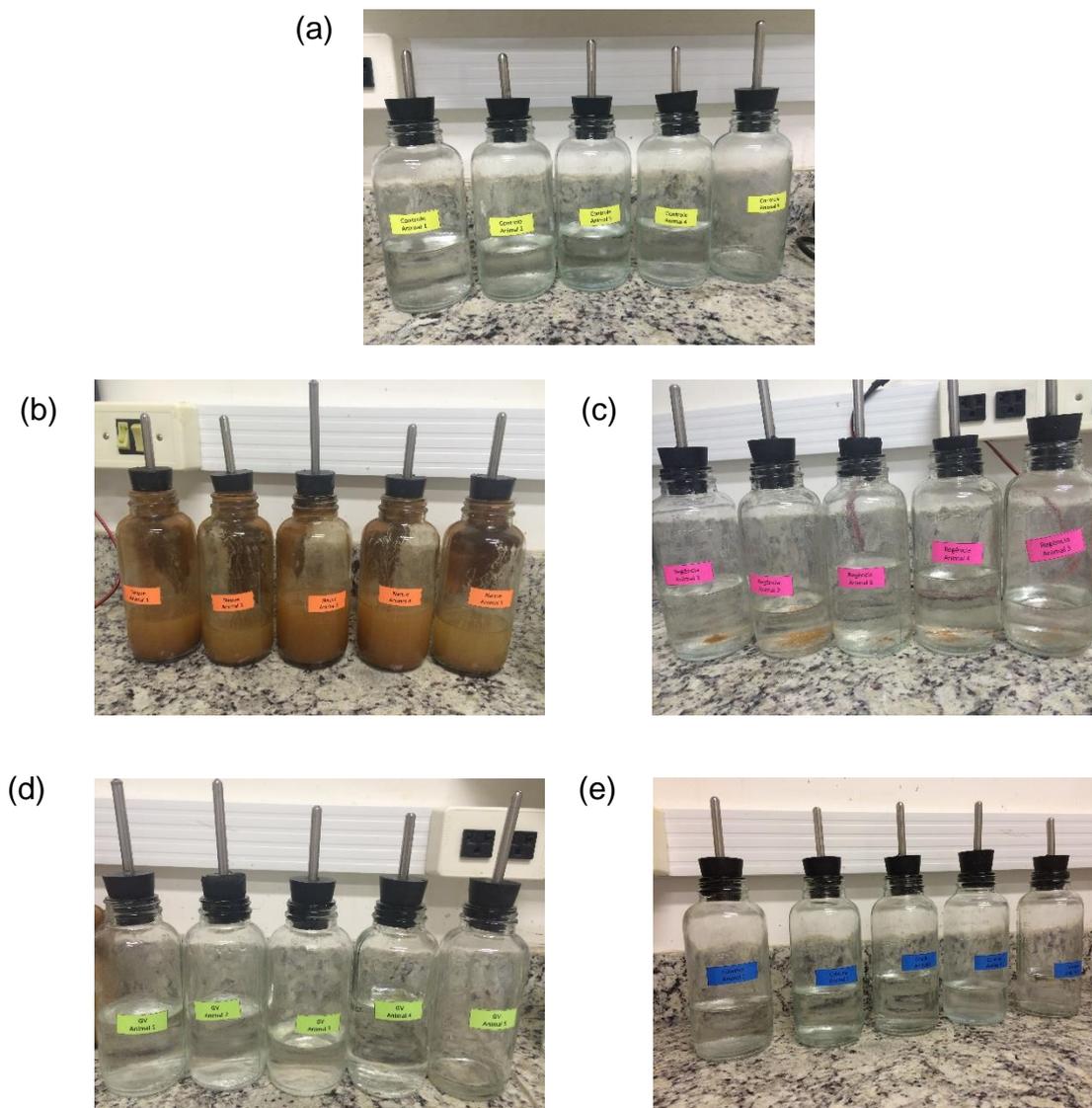


Figura 9. Água administrada aos animais, sendo (a) Grupo C - controle, (b) Grupo NI - Naque/Ipatinga, (c) Grupo RE - Regência, (d) Grupo GV - Governador Valadares e (e) Grupo CA - Colatina. Fonte: autora.

Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Processos Básicos e Psicologia da Universidade Católica de Brasília e alocados individualmente em gaiolas. A temperatura da sala foi mantida controlada em torno de  $22 \pm 2$  °C, umidade relativa do ar de 55%, ciclo de 12h claro/escuro e sistemas de troca de ar. Os animais receberam as rações e as respectivas águas *ad libitum*.

Todos animais foram tratados e observados por um período de 95 dias, correspondente a uma exposição crônica para estudo toxicológico (EATON e GILBERT, 2009).

#### 4.6 EUTANÁSIA E COLETA DOS TECIDOS

Ao final do período de tratamento descrito anteriormente, os animais foram pesados e anestesiados com cloridrato de xilazina ( $10 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) e cloridrato de quetamina ( $75 \text{ mg.kg}^{-1}$ ). Em seguida, a cavidade peritoneal e a torácica foram expostas. A veia cava caudal foi puncionada com agulha heparinizada para coleta de sangue. Neste momento ocorreu a eutanásia dos animais por exsanguinação.

Foram aliqüotados sangue em tubos de coleta com anticoagulante para a quantificação de hemoglobina, determinação do GSH sérico e enzimas antioxidantes. O sangue, após centrifugação, aliqüotado em tubo sem anticoagulante, foi destinado para as análises bioquímicas.

Posteriormente, os animais foram decapitados, utilizando-se a guilhotina e o encéfalo foi imediatamente dissecado. Além disso, amostras de rim e fígado foram coletadas para estudos de bioacúmulo, sistema antioxidante e quantificação de EROs.

Após coletadas, todas as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para manutenção das enzimas antioxidantes e espécies reativas de oxigênio. Posteriormente, as amostras foram armazenadas em freezer  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  até realização das análises.

O resumo do esquema metodológico está representado na Figura 10.

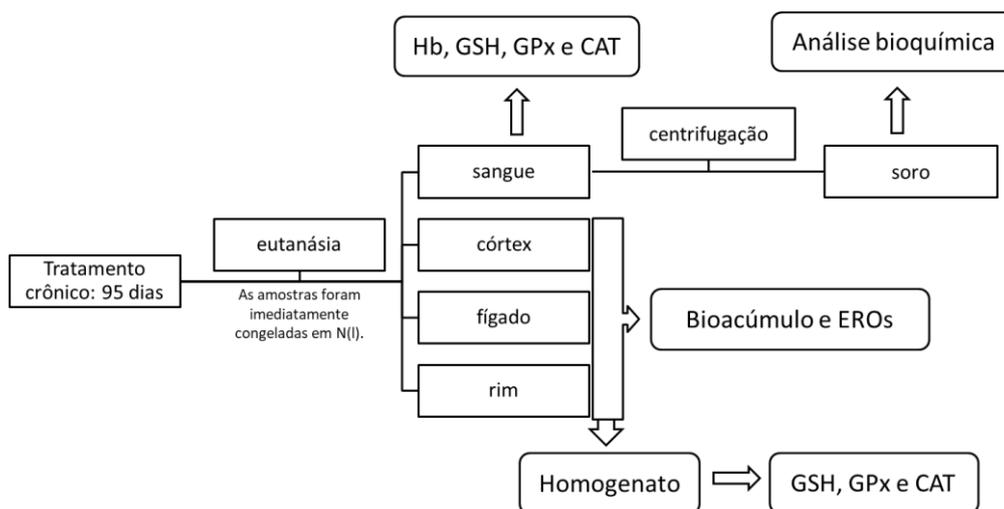


Figura 10. Esquema metodológico.

#### 4.7 AVALIAÇÃO DO BIOACÚMULO DE METAIS NOS TECIDOS

As análises de quantificação dos metais nos tecidos foram feitas no Serviço de Perícias e Análises Laboratoriais (SPAL), no Complexo da Polícia Civil do Distrito Federal.

Para a determinação das concentrações dos metais alumínio ( $^{27}\text{Al}$ ), arsênio ( $^{75}\text{As}$ ), cádmio ( $^{111}\text{Cd}$ ), cromo ( $\text{Cr}^{52}$ ), cobre ( $^{63}\text{Cu}$ ), ferro ( $^{57}\text{Fe}$ ), manganês ( $^{55}\text{Mn}$ ), chumbo ( $^{208}\text{Pb}$ ), selênio ( $^{82}\text{Se}$ ) e zinco ( $^{64}\text{Zn}$ ) nos tecidos, utilizou-se ICP-MS.

Cerca de 75 mg do tecido foram pesados e transferidos para um tubo cônico e 1 mL de TMAH 50% (v/v) foi adicionado às amostras, que permaneceram 48h à temperatura ambiente. Em seguida, completou-se o volume para 10 mL com diluente contendo 0,01% de Triton® X-100 e 1% de  $\text{HNO}_3$  (v/v). Metodologia adaptada de BATISTA *et al.* (2009). Posteriormente, filtrou-se com membrana de 0,22  $\mu\text{M}$ .

Material de Referência Certificado de cabelo foi analisado previamente às análises das amostras em estudo, para controle dos resultados obtidos e para verificar a exatidão dos resultados. Praticamente todos os valores encontrados estavam em conformidade com os valores certificados.

O cabelo (Reference Material IAEA-085 do International Atomic Energy Agency) tem valor certificado para Fe de  $79,30 \text{ mg.kg}^{-1}$ , Zn de  $163,00 \text{ mg.kg}^{-1}$ , Cu de  $16,80 \text{ mg.kg}^{-1}$ , Mn de  $8,80 \text{ mg.kg}^{-1}$  e Se de  $1,07 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Encontrou-se  $54,07 \pm 1,04$ ,  $167,17 \pm 0,07$ ,  $6,24 \pm 0,03$ ,  $7,94 \pm 0,00$  e  $1,55 \pm 0,16 \text{ mg.kg}^{-1}$  para cada elemento químico, respectivamente.

#### 4.8 DETERMINAÇÃO DA HEMOGLOBINA

Realizou-se o teste de hemoglobina para efeito de normalização dos parâmetros de estresse oxidativo. As análises foram feitas em sangue total por reação colorimétrica de ponto final, utilizando kit comercial da Labtest®.

O Fe (II) do grupo heme da hemoglobina, oxihemoglobina e carboxihemoglobina é oxidado ao estado férrico pelo ferricianeto formando

hemiglobina, que se combina com o cianeto ionizado para produzir cianeto de hemiglobina, o qual é medido em 540 nm.

#### 4.9 SISTEMA ANTIOXIDANTE

As análises foram feitas no Laboratório de Pesquisas Toxicológicas – LAPETOX da Universidade de Sorocaba.

Foram avaliados alguns biomarcadores de efeito relacionados ao estresse oxidativo em sangue total, plasma, córtex, fígado e rim dos animais tratados. Estes biomarcadores foram: GSH e enzimas antioxidantes (GPx e CAT).

##### 4.9.1 Homogenato dos tecidos

Pesou-se aproximadamente 250 mg de tecido em tubo falcon e adicionou-se 5 mL de KCl 1,15% em cada amostra. Com a caneta ultrassônica com potência de 35%, fez-se 2 a 3 ciclos de 30 seg. O homogenato obtido foi armazenado em microtubo e congelado em *freezer* -80 °C até análises para avaliação do sistema antioxidante nos tecidos.

##### 4.9.2 Determinação de GSH

As análises de GSH foram realizadas em sangue total por espectrofotometria UV-VIS, baseado no método de Ellman (1959) (ELLMAN, 1959). O sangue foi hemolisado com Triton X-100 a 10% e precipitado com ácido tricloroacético (TCA) a 30%. As amostras foram centrifugadas por 10 min, a 5000 rpm e 4°C. Em 900 µL de tampão, adicionou-se 50 µL do sobrenadante e 50 µL de DTNB 10 mM. Já para as amostras de tecido, em 900 µL de tampão, adicionou-se 250 µL de sobrenadante do homogenato (que foi precipitado com TCA 30% e centrifugado) e 100 µL de DTNB 10 mM.

A leitura das amostras foi feita em 412 nm. Para o cálculo da concentração foi utilizado uma curva de calibração com concentrações pré-definidas de GSH (0,005; 0,01; 0,025; 0,05 e 0,1 mM). Os resultados foram expressos em mM no caso das análises do sangue e em mM.g<sup>-1</sup> tecido para as análises de cérebro, fígado e rim.

#### 4.9.3 Atividade da GPx

A atividade da enzima GPx foi avaliada por espectrofotometria UV/VIS (PAGLIA e VALENTINE, 1967.). O método se baseia na oxidação do NADPH a 25°C, indicando o decaimento da atividade da enzima, monitorado a 340 nm por 2 min. Através da medida do decaimento da absorbância do NADPH é possível determinar a atividade enzimática, já que esta é proporcional ao consumo de NADPH.

O sangue foi diluído 40x em tampão fosfato de potássio com EDTA, pH 7,0. Em seguida, 20 µL da amostra diluída foi acrescentada em 880 µL de uma solução contendo GSH, GR, NADPH, azida sódica e 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os resultados foram expressos em nmol NADPH.min<sup>-1</sup>.mL<sup>-1</sup>.

Para as amostras de cérebro, fígado e rim, em 800 µL de solução contendo GSH, GR, NADPH, azida sódica, adicionou-se 20 µL de homogenato e 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os resultados foram expressos em µmol NADPH.min<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup> tecido.

#### 4.9.4 Atividade da CAT

A atividade da enzima catalase foi avaliada por espectrofotometria UV/VIS utilizando método de Aebi (AEBI, 1984). O método baseia-se na decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela catalase ao longo do tempo, monitorado a 240 nm, por 3 min.

Para tanto, uma alíquota de 20 µL do sangue diluído 591x em tampão fosfato de potássio (50 mM; pH 7,0) foi misturada a 1910 µL do mesmo tampão e 70 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dando início à reação. Uma constante de variação ( $\kappa$ ), relacionada com a hemoglobina (Hb), serviu para expressar os valores da atividade no sangue ( $\kappa$ .g<sup>-1</sup> Hb.min<sup>-1</sup>).

Na análise dos tecidos, 20 µL do homogenato foi colocado em 1,910 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM e 70 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dando início à reação. Os resultados foram expressos em  $\kappa$ .min<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup> tecido.

#### 4.10 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS)

O preparo de amostras foi realizado no Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília. Já as medidas foram realizadas no laboratório de Ressonância Paramagnética Eletrônica no Núcleo de Física Aplicada da Universidade de Brasília.

Os tecidos de córtex, fígado e rim foram lavados com 300  $\mu\text{L}$  de tampão KHB por três vezes. Após a lavagem, adicionou-se a cada tecido, 700  $\mu\text{L}$  de solução contendo CMH 200  $\mu\text{M}$  e heparina sódica 50  $\text{UI}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Incubou-se sob agitação a 37  $^{\circ}\text{C}$  por 1h. Finalizada a incubação, colocou-se 450  $\mu\text{L}$  do sobrenadante em seringa de 1 mL e congelou-se imediatamente em  $\text{N}_2$  (l). As amostras foram mantidas em *freezer* -80  $^{\circ}\text{C}$  até a leitura.

Os tecidos foram secos em *speed vac* e pesados posteriormente.

Para a curva de calibração das medidas de EROs, foram preparadas amostras da solução mãe de 10 mM do padrão 3-carboxi-proxilo (CP•) preparado em KHB e diluído a concentrações de 0, 5, 10, 50 e 100  $\mu\text{M}$ . Exatamente 450  $\mu\text{L}$  das amostras de calibração foram transferidas de seringas de 1 mL e congeladas instantaneamente em  $\text{N}_2$  (l).

As amostras congeladas foram transferidas das seringas para *dewer* repleto com nitrogênio líquido.

As medidas de RPE foram realizadas em um espectrômetro utilizando a banda X (9,35 GHz), potência 2mW e campo de modulação de 200 Gauss, constante de tempo de 10 ms, tempo de varredura de 600G e 5 varreduras adicionais em conjunto, para cada medição.

Todas as medidas de RPE foram realizadas à temperatura de nitrogênio líquido.

#### 4.11 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA

Os testes foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Brasília, campus Ceilândia.

As análises foram feitas em soro, utilizando kits comerciais. Para avaliação da função renal, foram feitas ureia e creatina. Para prova de função hepática, foram feitas as determinação de  $\gamma$ -glutamyl transferase ( $\gamma$ -GT), alanina

aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). Os testes seguiram as especificações do fabricante, conforme metodologias descritas abaixo.

#### **4.11.1 Determinação de ureia**

A ureia é hidrolisada à amônia pela urease. A amônia reage com 2-cetoglutarato e NADH em reação catalisada pela glutamato desidrogenase, promovendo a oxidação do NADH em NAD. A consequente redução da absorbância medida a 340 nm é proporcional à concentração de ureia.

Para isso, misturou-se 10 µL da amostra em 1000 µL do monorreagente e incubou-se por, aproximadamente, 60 s a 25-30 °C. Então, procedeu-se a leitura da absorbância A1 e após exatos 60 s, leu-se a absorbância A2.

#### **4.11.2 Determinação de creatinina**

A creatinina forma um complexo colorido laranja-avermelhado em uma solução de picrato alcalina. A diferença na absorbância em tempos fixos durante a conversão é proporcional à concentração de creatinina na amostra.

Então, misturou-se 50 µL da amostra em 1000 µL do monorreagente. Leu-se a absorbância A1 após 60 s e a A2 após exatos 120 s.

#### **4.11.3 Determinação de $\gamma$ -GT**

A  $\gamma$ -glutamil transferase catalisa a transferência do radical glutamil do substrato para a glicilglicina formando  $\gamma$ -glutamilglicilglicina e 5-amino-2-nitrobenzato. A velocidade de formação deste produto em 405 nm é proporcional à atividade da enzima.

Adicionou-se 50 µL da amostra em 1 mL do reagente de trabalho (monoreagente) em cubeta a 37 °C com intervalo de 1 min. Fez-se a leitura inicial e após 1, 2 e 3 min.

#### **4.11.4 Determinação de ALT**

A ALT catalisa a transferência do grupamento amino da alanina para  $\alpha$ -cetoglutarato, levando à formação de piruvato e glutamato. O piruvato em

presença de LDH reage com o NADH, reduzindo-se a lactato e o NADH oxida-se a  $\text{NAD}^+$ . A velocidade de oxidação é proporcional à atividade da ALT na amostra.

Adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  da amostra em 1 mL do reagente de trabalho (monoreagente) em cubeta a 37 °C com intervalo de 1 min. Fez-se a leitura inicial e após 1, 2 e 3 min.

#### 4.11.5 Determinação de AST

A AST catalisa a transferência de grupos amina do aspartato para  $\alpha$ -cetoglutarato, levando à formação de glutamato e oxalacetato. O oxalacetato em presença do MDH reage com o NADH, reduzindo-se a malato e o NADH oxida-se a  $\text{NAD}^+$ . A velocidade de oxidação é proporcional à atividade da AST na amostra.

Adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  da amostra em 1 mL do reagente de trabalho (monoreagente) em cubeta a 37 °C com intervalo de 1 min. Fez-se a leitura inicial e após 1, 2 e 3 min.

#### 4.12 ANÁLISE DOS DADOS

A análise gráfica foi realizada por meio do *box plot*, que capta importantes aspectos de um conjunto de dados através do resumo de medidas de quartis, mínimos e máximos.

Testes estatísticos foram realizados de acordo com a distribuição dos dados, à partir da avaliação da simetria. Para dados com distribuição normal, realizou-se o teste ANOVA e o teste *post hoc* de Tukey. Para distribuição não normal, aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis e o *post hoc* Dunn's. Para ambos os testes, o nível de significância adotado foi de 0,05.

Os gráficos foram feitos com auxílio do programa GraphPad Prism® 6 e os resultados avaliados pelo STATISTICA.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ESTUDO I:

A concentração de metais nas águas do rio foi bastante variada, conforme exposto na Tabela 1. Alguns elementos não puderam ser detectados em determinadas amostras, pois ficaram abaixo do limite de detecção do método utilizado.

Tabela 1 - Concentração de metais na água administrada aos grupos expostos à água do rio Doce e controle.

	C	NI	RE	CONAMA 357/2005
Elemento ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	VMP <sup>&amp;</sup>
Ag	1,15 $\pm$ 0,66 <sup>a</sup>	1,33 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>	1,04 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>	10,00
As	<7.10 <sup>-6</sup>	<7.10 <sup>-6</sup>	3,67 $\pm$ 0,21	10,00
Ba	3,16 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	25,12 $\pm$ 1,16 <sup>b</sup>	32,25 $\pm$ 0,96 <sup>c</sup>	700,00
Be	0,05 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,09 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,11 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	40,00
Cd	0,04 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,08 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,08 $\pm$ 0,0 <sup>b</sup>	1,00
Cr	0,32 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	0,88 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	1,93 $\pm$ 0,39 <sup>b</sup>	50,00
Cu	208,20 $\pm$ 3,73 <sup>a</sup>	0,86 $\pm$ 0,22 <sup>b</sup>	11,67 $\pm$ 0,30 <sup>c</sup>	#
Fe	287 $\pm$ 21,14 <sup>a</sup>	588,20 $\pm$ 77,14 <sup>b</sup>	701,30 $\pm$ 85,10 <sup>b</sup>	#
Mn	0,52 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	155,82 $\pm$ 38,42 <sup>b</sup>	30,33 $\pm$ 8,51 <sup>a</sup>	100,00
Ni	<1,7.10 <sup>-5</sup>	<1,7.10 <sup>-5</sup>	<1,7.10 <sup>-5</sup>	25,00
Pb	1,63 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	1,19 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup>	0,43 $\pm$ 0,15 <sup>b</sup>	10,00
Sb	0,08 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,17 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	2,15 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>	-
Se	<1,45.10 <sup>-4</sup>	<1,45.10 <sup>-4</sup>	10,29 $\pm$ 0,48	10,00
V	0,60 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	1,23 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>	11,36 $\pm$ 0,72 <sup>b</sup>	100,00
Zn	97,82 $\pm$ 6,69 <sup>a</sup>	1,10 $\pm$ 1,03 <sup>b</sup>	5,77 $\pm$ 0,54 <sup>b</sup>	180,00

VMP=valor máximo permitido; C=controle; NI=Naque/Ipatinga; RE=Regência.

<sup>&</sup>Os VMP foram convertidos para  $\mu\text{g.L}^{-1}$  para melhor visualização dos dados.

<sup>#</sup>Valores na CONAMA 357/2005 apenas para Cu (9,00  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) e Fe (300,00  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) dissolvidos.

Usou-se ANOVA, com *post hoc* Tukey.

Médias com letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente. Letras diferentes são estatisticamente diferentes dos outros grupos ( $p < 0,05$ ).

Segundo o último laudo da composição da lama de rejeito das barragens Germano e Fundão, do ano de 2014, a lama é composta basicamente por óxido

de ferro e sílica (IBAMA, 2015). Entretanto, COSTA (2001.) relata que, as associações minerais presentes nos depósitos explorados, tanto do Au como do Fe, são ricas em metais traço, os quais apresentam alto potencial tóxico. O autor informa ainda que as principais alterações que podem ser esperadas, em relação às barragens de rejeito são: a turbidez, devido ao grande volume de sólidos em suspensão; parâmetros físico-químicos como pH e condutividade elétrica, sais solúveis, alcalinidade, óleo, graxa e reagentes orgânicos; e, a depender do minério e estéreis envolvidos, pode haver também alteração nas concentrações dos metais Cd, Ni, Cr, Co, Hg, V, Zn, As, Pb, Cu e Li.

De acordo com a resolução Conama 357/2005 (BRASIL, 2005), o Mn, na água do grupo NI, está acima do valor máximo permitido na legislação. O Fe encontrado é total, não sendo possível comparar com a legislação, pois ela estabelece o limite preconizado para Fe dissolvido. O mesmo se aplica para o Cu.

Entretanto, estudo de Moraes (2017) verificou concentrações de Fe dissolvido duas vezes acima do permitido ( $650,00 \mu\text{g.L}^{-1} \pm 110,00 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) em abril de 2016 em um ponto do rio próximo à cidade de Ipatinga-MG. Já para o Cu dissolvido, ficou em conformidade com o valor permitido na legislação.

A água do grupo NI continha maiores concentrações de Ba, Be, Cd, Fe e Mn em relação ao controle, sendo este elemento cerca de 300 vezes mais concentrado. As concentrações dos elementos Cu e Zn foram menores quando comparados ao grupo controle.

Quanto à água do grupo RE, o Se foi o único metal em que, de acordo com a resolução Conama 357/2005 (BRASIL, 2005), está no limite preconizado na legislação, enquanto os demais estão abaixo. Encontrou-se maior concentração de As, Ba, Be, Cd, Cr, Fe, Mn, Sb, Se e V em relação ao grupo controle. Para os elementos Cu, Pb e Zn, na água do grupo RE as concentrações foram menores que o controle.

Os elementos Cu e Zn estão em maiores concentrações no grupo controle devido esta água ser tratada. Porém, estão de acordo com a Portaria 2914/2011 (BRASIL, 2011). Na água de torneira, as concentrações desses metais podem ser elevadas devido à composição de tubos e válvulas serem de Cu e ocorrer a dissolução do Zn das tubulações (ELLINGSEN *et al.*, 2007; SANDSTEAD e AU, 2007; CETESB, 2009).

A massa corporal dos animais foi mensurada semanalmente durante os 95 dias de tratamento. Não foi observado diminuição da massa corporal em nenhum dos grupos, conforme Figura 11. Entretanto no estudo de Reddy e colaboradores (2015), ratos expostos por 28 dias à água contaminada com altas concentrações de diversos metais, como Zn ( $2,73 \text{ mg.L}^{-1}$ ), Pb ( $5,41 \text{ mg.L}^{-1}$ ), Ba ( $0,16 \text{ mg.L}^{-1}$ ), Mn ( $0,32 \text{ mg.L}^{-1}$ ), Ni ( $0,46 \text{ mg.L}^{-1}$ ), Cr ( $0,48 \text{ mg.L}^{-1}$ ), Cu ( $0,67 \text{ mg.L}^{-1}$ ), Sb ( $0,001 \text{ mg.L}^{-1}$ ), Co ( $0,005 \text{ mg.L}^{-1}$ ), Ag ( $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ ), Cd ( $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ ), As ( $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ ), Mo ( $0,03 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e Sn ( $0,06 \text{ mg.L}^{-1}$ ), apresentaram diminuição da massa corporal. Aqueles animais submetidos a baixas doses (mesma água diluída 100x) não apresentaram diminuição.

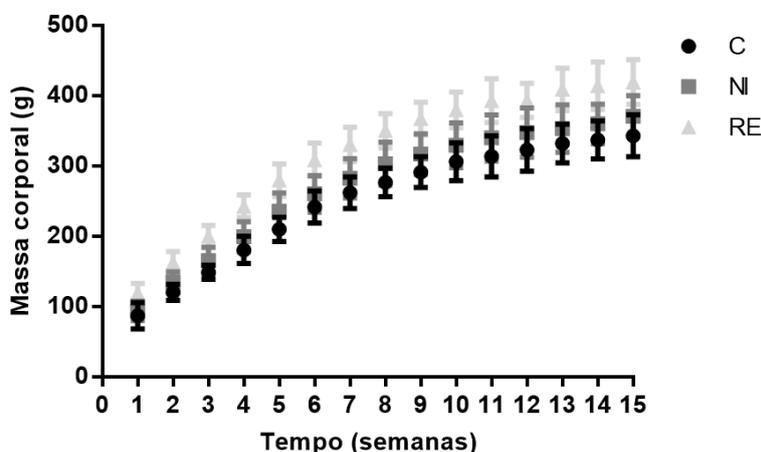


Figura 11. Evolução da massa corporal dos ratos expostos à água do rio Doce e o grupo controle ao longo do tratamento. C=controle; NI=Naque/Ipatinga; RE=Regência. As barras verticais indicam o desvio padrão dos dados.

Jadhav e colaboradores (2007) observaram que a exposição às misturas de baixas doses de oito metais contaminantes de água, incluindo Pb, Hg, As e Cd, diminuiu a massa corporal e o consumo de água. Os autores concluíram que a saúde geral dos ratos foi afetada pela alteração da integridade funcional e estrutural do cérebro, fígado e rins, os quais tiveram aumento nas suas respectivas massas.

Neste estudo, verificou-se que não houve diferença entre os grupos no consumo de água pela massa corporal (Figura 12), apesar do aspecto da água entre os grupos ser bastante diferente.

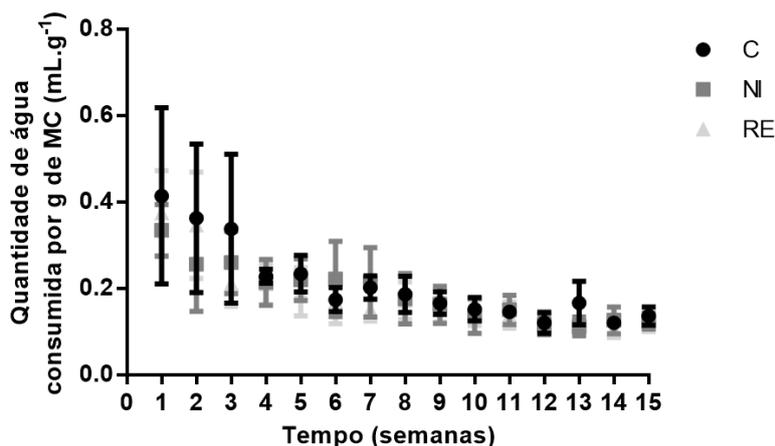


Figura 12. Relação entre a quantidade de água consumida e a massa corporal do respectivo animal ao longo do tempo de tratamento. C=controle; NI=Naque/Ipatinga; RE=Regência. As barras verticais indicam o desvio padrão dos dados.

No que diz respeito à hemoglobina (Tabela 2), o grupo NI teve concentração aumentada em relação ao controle.

Tabela 2 - Resultados da quantificação de hemoglobina dos grupos expostos à água do rio Doce e controle.

GRUPOS	Hb (mg/dL)
<b>C</b>	16,36 ± 3,56 <sup>a</sup>
<b>NI</b>	22,40 ± 1,62 <sup>b</sup>
<b>RE</b>	20,39 ± 1,83 <sup>a,b</sup>

C=controle; NI=Naque/Ipatinga; RE=Regência.

Os dados estão expressos em média ± desvio padrão.

Teste estatístico ANOVA, com *post hoc* Tukey.

Médias com letras iguais não diferem estatisticamente. Letras diferentes são estatisticamente diferentes dos outros grupos ( $p < 0,05$ ).

A explicação plausível para esta alteração é que, sob condições de excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema antioxidante, há o consumo de GSH e produção de GSSG. O excesso de GSSG resulta em ambiente mais oxidante, que favorece a formação de pontes dissulfeto (-SS-) nas proteínas portadoras de grupamento tiol (-SH). As pontes dissulfeto oxidam estas proteínas, com prejuízo de suas funções. Esta oxidação é reversível às custas da ação de compostos antioxidantes, como a GSH (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

A membrana do eritrócito contém grande número de grupos -SH, e os agentes oxidantes podem converter estes grupos tióis (R-SH) em componentes

dissulfeto (R-SSG), levando à desnaturação das proteínas da membrana. Neste processo, pode ocorrer lesão intracelular, com oxidação da hemoglobina à metahemoglobina. Inclusive, o componente lipídico da membrana do glóbulo vermelho também está sujeito à peroxidação, induzindo o estresse oxidativo intracelular (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

A associação dos diversos efeitos ocasionados podem promover a lesão da membrana do glóbulo vermelho. Se a eficiência do sistema antioxidante for superada pela magnitude destes fenômenos, ocorrerá o estresse oxidativo, que culminará em hemólise (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Sugere-se que a água a que os animais do grupo NI foram expostos favoreceu o consumo de GSH e aumento de GSSG no sangue, desnaturando as proteínas de membrana dos eritrócitos, desencadeando lesão intracelular e, finalmente, culminando na hemólise. Por isso, a alta concentração de hemoglobina neste grupo.

No que diz respeito ao sistema antioxidante, notou-se no sangue diminuição significativa da GPx nos animais do grupo NI em relação ao controle e forte tendência do grupo RE em relação ao controle ( $p=0,056$ ) (Figura 13). A ação da GPx depende da manutenção do ciclo redox da GSH, que apesar de não ter sido observada diferença significativa desta no sangue, houve alteração da hemoglobina, que indica um possível desequilíbrio no sistema antioxidante.

Quanto à catalase, houve aumento significativo do grupo RE em relação ao grupo NI e tendência em relação ao controle ( $p=0,07$ ) (Figura 13). Provavelmente, houve maior produção de peróxido de hidrogênio nesses animais.

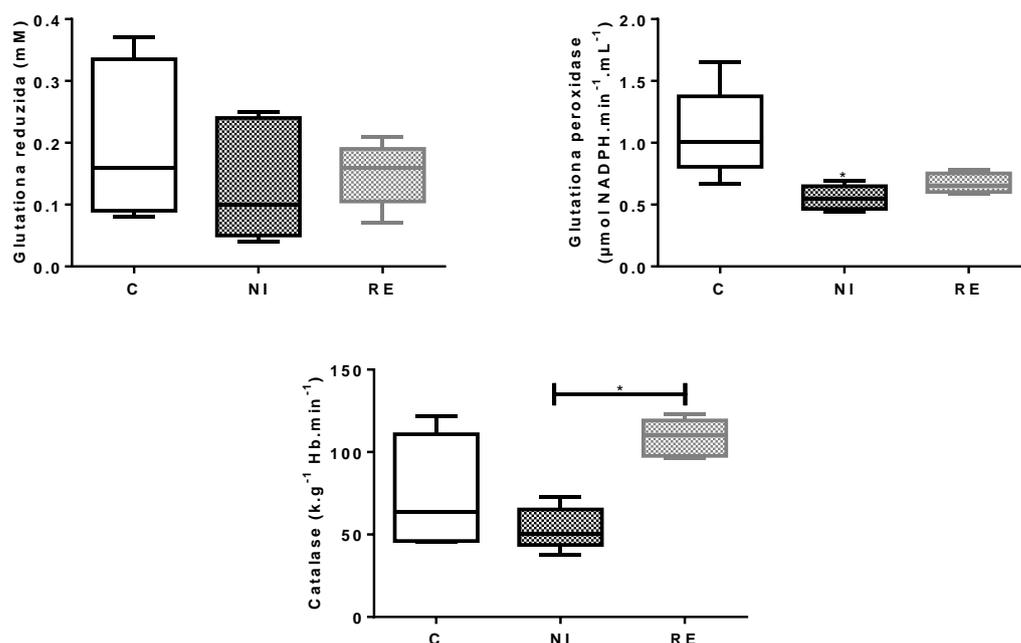


Figura 13. Avaliação do estresse oxidativo no sangue dos animais expostos à água do rio e controle. C=controle; NI=Naque/Ipatinga; RE=Regência. Teste estatístico ANOVA, com *post hoc* Tukey, exceto para CAT que foi Kruskal-Wallis, com *post hoc* Dunn's. \* $p < 0,05$ .

No entanto, a detecção de alteração nos biomarcadores do estresse oxidativo no sangue não significa necessariamente que são devido ao estresse oxidativo de órgão ou tecido específico (POLJSK *et al.*, 2013).

Apesar das inúmeras diferenças na concentração de metais na água, não houve diferença significativa no bioacúmulo destes no córtex, conforme Tabela 3.

Tabela 3 - Bioacúmulo de metais no córtex dos grupos expostos à água do rio Doce e controle.

	C	NI	RE
Elementos ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ )	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP
Al	1632 $\pm$ 843,3	1425 $\pm$ 952,7	1103 $\pm$ 420,1
As	4,6 $\pm$ 2,0	5,3 $\pm$ 2,0	3,8 $\pm$ 1,1
Cd <sup>#</sup>	22,4 $\pm$ 10,1	185,9 $\pm$ 81,6	96,1 $\pm$ 69,6
Cr	122,9 $\pm$ 55,4	134,7 $\pm$ 57,5	101,6 $\pm$ 32,1
Cu	6,8 $\pm$ 4,3	10,5 $\pm$ 4,8	7,0 $\pm$ 2,9
Fe	266,0 $\pm$ 104,9	242,5 $\pm$ 120,4	218,1 $\pm$ 143,2

Continua

Elementos ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Conclusão		
	C	NI	RE
	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP
Mn	11,7 $\pm$ 4,3	10,3 $\pm$ 3,7	8,6 $\pm$ 5,9
Pb	1,5 $\pm$ 1,0	7,8 $\pm$ 7,2	5,8 $\pm$ 4,2
Se	4,0 $\pm$ 1,3	5,5 $\pm$ 1,8	4,0 $\pm$ 1,2
Zn	159,7 $\pm$ 123,3	123,8 $\pm$ 22,6	76,4 $\pm$ 50,0

C=controle; NI=Naque/Ipatinga; RE=Regência.

#Concentração em  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ .

Teste estatístico Kruskal-Wallis com *post hoc* Dunn's.

Cobbina e colaboradores (2015) observaram que baixas doses de metais potencialmente tóxicos (Pb, As e Cd) administrados individualmente interagem com metais essenciais (Mg, Ca, Zn, Fe, Cu) no cérebro de camundongos. Sendo que, a exposição durante 90 dias ao Pb e Cd promoveram aumento de 38,9% e diminuição de 33,2% do Fe no cérebro, respectivamente, ambos em relação ao controle.

O Fe e Mn são regulados dentro do sistema nervoso central por influxo via transferrina e receptores de transferrina, bem como pelo DMT1, transportador inespecífico, que em menor grau, também transporta Zn, Cu, Co, Cd e Ni. Portanto, o excesso de Mn pode levar à deficiência de Fe e vice-versa. Outros metais também são alterados com este excesso (GARCIA *et al.*, 2006). Embora metais essenciais em suas doses certas são vitais para a sobrevivência e crescimento de organismos, eles têm a capacidade de participar do ciclo redox, especialmente quando em excesso (PRATVIEL, 2012).

Com relação aos marcadores de estresse oxidativo no cérebro, encontrou-se inibição da enzima antioxidante GPx em relação ao controle, nos dois grupos de animais expostos, NI e RE (Figura 14), semelhante ao ocorrido no sangue total.

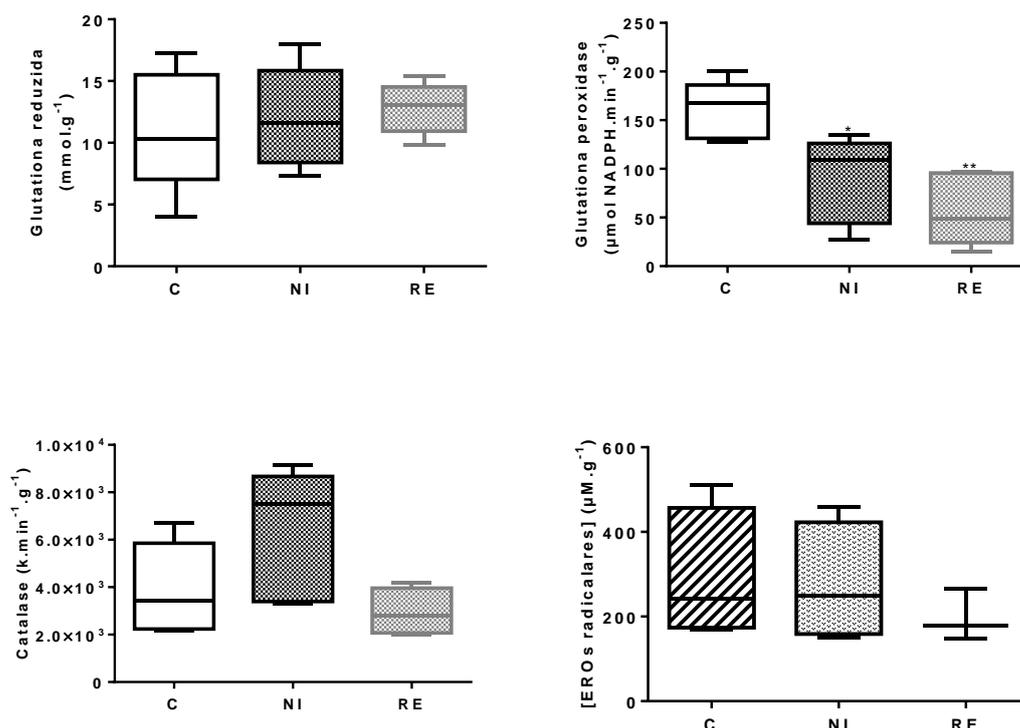


Figura 14. Avaliação do estresse oxidativo e da concentração de EROs no córtex dos animais expostos à água do rio e controle. C=controle; NI=Naque/Ipatinga; RE=Regência. Teste estatístico ANOVA, com *post hoc* Tukey, exceto para [EROs radiculares] que foi Kruskal-Wallis, com *post hoc* Dunn's. \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ .

No córtex não foi encontrada diferença significativa entre os grupos nos outros marcadores de estresse oxidativo analisados.

No que diz respeito ao fígado, é um órgão que realiza funções vitais relacionadas à imunidade, digestão, metabolismo e armazenamento de nutrientes. Durante o estudo de Cobbina e colaboradores (2015), exposição a baixas doses de metais tóxicos não alteraram os níveis de metais essenciais no fígado de camundongos.

Neste estudo, no fígado, o bioacúmulo de Al e Mn foi significativamente menor no grupo RE, quando comparados ao grupo controle (Tabela 4), apesar da concentração de Mn na água do controle ser estatisticamente bem menor, como exposto na Tabela 1. Sugere-se que, a afinidade do Mn pelos transportadores tivesse aumentada, e assim o Mn conseguiu ser metabolizado e excretado.

O Mn é removido do sangue pelo fígado, no qual é conjugado na bile e excretado pelo intestino, através das fezes. Os lisossomos do fígado tem importante papel no ciclo intra-hepático e influencia a excreção biliar com a absorção de Mn (LUCCHINI *et al.*, 2015).

Além da absorção aumentada, a sobrecarga sistêmica de Mn pode derivar de diminuição da excreção biliar por insuficiência hepática, o que não ocorreu no neste estudo (LUCCHINI *et al.*, 2015).

Tabela 4 - Bioacúmulo de metais no fígado dos grupos expostos à água do rio Doce e controle.

	C	NI	RE
Elementos ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP
Al	187,6 $\pm$ 16,6	155,6 $\pm$ 8,3	151,1 $\pm$ 20,5*
As	1,8 $\pm$ 0,4	1,6 $\pm$ 0,2	1,8 $\pm$ 0,4
Cd <sup>#</sup>	4,5 $\pm$ 0,3	4,5 $\pm$ 0,4	4,2 $\pm$ 0,8
Cr	20,8 $\pm$ 1,5	18,7 $\pm$ 0,6	18,6 $\pm$ 1,8
Cu	6,2 $\pm$ 2,4	5,0 $\pm$ 2,4	4,4 $\pm$ 1,4
Fe	442,9 $\pm$ 69,9	316,8 $\pm$ 34,8	352,0 $\pm$ 79,5
Mn	12,5 $\pm$ 1,2	10,6 $\pm$ 0,8	9,9 $\pm$ 0,8*
Pb	0,2 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,0
Se	7,2 $\pm$ 0,6	6,2 $\pm$ 0,4	6,3 $\pm$ 0,5
Zn	94,9 $\pm$ 14,5	87,2 $\pm$ 10,0	85,9 $\pm$ 7,4

C=controle; NI=Naque/Ipatinga; RE=Regência.

<sup>#</sup>Concentração em  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ .

Usou-se Kruskal-Wallis com *post hoc* Dunn's.

\*Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle.

No intuito de manter a homeostase dos metais pelo organismo, esses elementos químicos são excretados na bile por uma série de processos parcialmente conhecidos que incluem (a) captação pela membrana sinusoidal por difusão facilitada ou endocitose mediada por receptor; (b) acúmulo de proteínas ligantes ou lisossomos; e (c) secreção para os canalículos via lisossomos, evento acoplado à glutathione ou a um transportador específico na membrana canalicular. A excreção biliar é importante na homeostase de metais, em especial, cobre, manganês, cádmio selênio, ouro, prata e arsênio (JAESCHKE, 2012). Pode ser uma explicação do quão eficiente foi este processo nos animais do grupo RE.

Apesar da CAT e da GPx terem a função de catalisar o peróxido de hidrogênio, em geral, a taxa de produção de  $H_2O_2$  é equilibrada principalmente pela GPx. Porém, em níveis aumentados de peróxido de hidrogênio, a CAT torna-se mais proeminente na decomposição desta espécie reativa (BERGLUND *et al.*, 2007).

Sugere-se, no presente estudo, uma grande produção de  $H_2O_2$  no fígado dos animais do grupo RE, uma vez que a atividade da CAT encontrou-se aumentada (Figura 15), assim como no sangue total.

O Mn e o Al no fígado dos animais tiveram significativamente menores concentrações quando comparados ao grupo controle. Lebda e colaboradores (2012), submeteram ratos à injeção diária com cloreto de manganês ( $6 \text{ mg.kg}^{-1}$ , i.p.) e observaram diminuição da atividade da CAT no fígado. Esparza e colaboradores (2003), encontraram que animais submetidos ao Al ( $5 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ) por dois meses via intraperitoneal, tiveram maior atividade da enzima CAT em todos os tecidos analisados, inclusive no fígado.

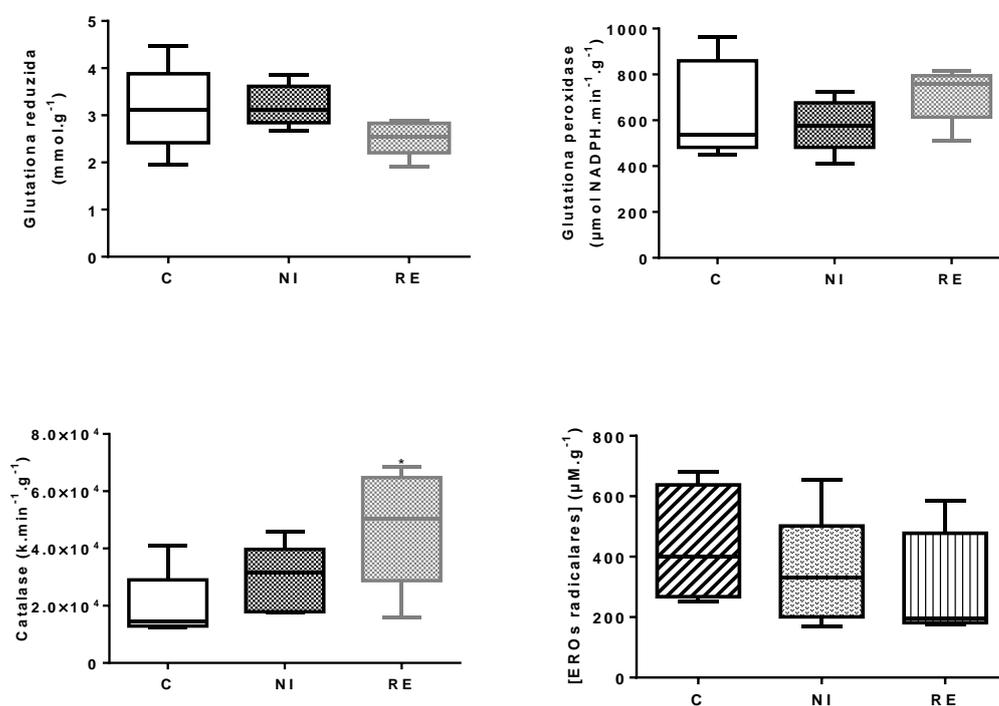


Figura 15. Avaliação do estresse oxidativo e da concentração de EROs no fígado dos animais expostos à água do rio Doce e controle. C=controle; NI=Naque/Ipatinga; RE=Regência. Teste estatístico Kruskal-Wallis, com *post hoc* Dunn's. \* $p < 0,05$ .

A exposição aos metais tóxicos Pb, As e Cd em baixas doses, geralmente, não diminuem os níveis de metais essenciais nos rins. No entanto, estudo demonstrou que o As e o Cd reduziram o Mg, Ca e Fe após 60 dias de exposição (COBBINA *et al.*, 2015).

Os animais do grupo RE apresentaram bioacúmulo de Pb no rim estatisticamente maior em relação ao grupo controle, mesmo as concentrações de Pb na água do controle estando significativamente maior (Tabela 5).

Tabela 5 - Bioacúmulo de metais no rim dos grupos expostos à água do rio Doce e controle.

	C	NI	RE
Elementos ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP
Al	155,1 $\pm$ 48,3	172,5 $\pm$ 37,2	223,2 $\pm$ 26,8
As	1,9 $\pm$ 0,8	1,6 $\pm$ 0,6	2,3 $\pm$ 0,4
Cd <sup>#</sup>	10,1 $\pm$ 4,7	9,1 $\pm$ 5,2	12,8 $\pm$ 4,6
Cr	20,0 $\pm$ 5,3	22,5 $\pm$ 5,6	26,4 $\pm$ 3,3
Cu	34,8 $\pm$ 21,3	40,9 $\pm$ 18,1	43,1 $\pm$ 14,6
Fe	185,3 $\pm$ 78,9	165,3 $\pm$ 68,0	263,1 $\pm$ 72,4
Mn	1,8 $\pm$ 0,9	2,2 $\pm$ 1,0	3,4 $\pm$ 0,8
Pb	0,3 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1*
Se	9,9 $\pm$ 4,1	9,6 $\pm$ 4,5	11,4 $\pm$ 3,0
Zn	65,1 $\pm$ 30,3	64,4 $\pm$ 26,8	70,8 $\pm$ 19,1

C=controle; NI=Naque/Ipatinga; RE=Regência.

<sup>#</sup>Concentração em  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ .

Usou-se Kruskal-Wallis com *post hoc* Dunn's.

\*Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle.

Uma vez absorvido, o Pb se distribui entre o sangue, os tecidos moles (rins, medula óssea, fígado e cérebro) e os tecidos mineralizados (ossos e dentes) (ATSDR, 1992). Nos rins, a nefrotoxicidade do chumbo afeta a síntese renal das enzimas contendo heme, tais como a hidroxilase envolvida no metabolismo da vitamina D, causando efeitos tóxicos nos ossos (JAESCHKE, 2012).

A quantidade dos diversos metais na água e o tempo ao qual os grupos foram expostos não causaram alterações nas enzimas antioxidantes no rim dos animais (Figura 16). Como os animais foram avaliados somente no término do experimento, pode ter ocorrido alguma perturbação oxidativa no início da

exposição, na tentativa de minimizar os danos causados, como em qualquer intoxicação aguda por metais, mas ao longo do tratamento crônico a atividade das enzimas antioxidantes pode ter sido regularizada.

Já no rim, houve uma forte tendência na diminuição da concentração de EROs ( $p=0,056$ ) do grupo NI em relação ao grupo controle apesar de não ter ocorrido alteração na GSH e nas enzimas antioxidantes.

O RPE consegue identificar apenas os radicais livres, especialmente o superóxido, sendo que as enzimas analisadas neste estudo reduzem o peróxido de hidrogênio, que é uma espécie reativa, em radical hidroxila e água (ABDEL-RAHMAN *et al.*, 2016).

Então, é de se esperar que a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) caso tivesse sido avaliada, estivesse elevada ao longo do tratamento, para minimizar os efeitos deletérios desta espécie reativa.

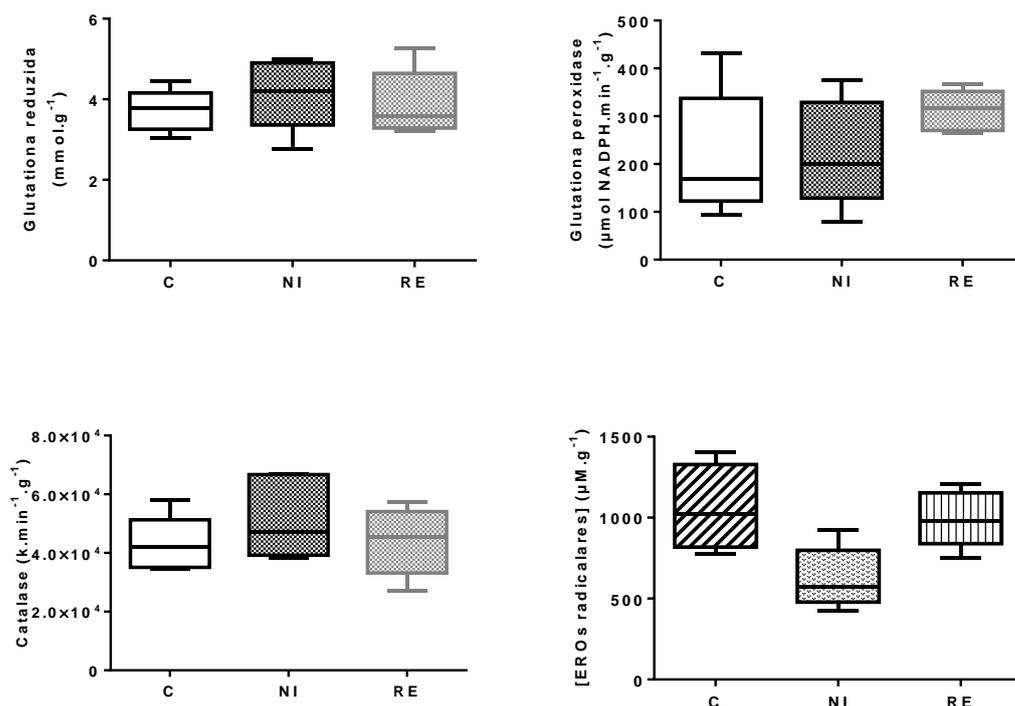


Figura 16. Avaliação do estresse oxidativo e da concentração de EROs no rim dos animais expostos à água do rio e controle. C=controle; NI=Naque/Ipatinga; RE=Regência. Teste estatístico Kruskal-Wallis, com *post hoc* Dunn's.

A partir das alterações em alguns parâmetros do estresse oxidativo, verificou-se as funções renais e hepáticas (Tabela 6) e não foi encontrada

nenhuma diferença significativa entre os grupos em nenhum dos parâmetros bioquímicos avaliados.

Tabela 6 - Resultados dos parâmetros bioquímicos ureia, creatinina,  $\gamma$ -GT, ALT e AST nos ratos tratados com água do rio Doce e controle.

GRUPOS	UREIA (mg/dL)	CREATININA (mg/dL)	$\gamma$ -GT (U/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)
<b>C</b>	4,20 $\pm$ 2,15 <sup>a</sup>	0,50 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	1,63 $\pm$ 1,45 <sup>a</sup>	30,83 $\pm$ 10,62 <sup>a</sup>	51,14 $\pm$ 12,15 <sup>a</sup>
<b>NI</b>	5,81 $\pm$ 3,46 <sup>a</sup>	0,25 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup>	7,65 $\pm$ 5,14 <sup>a</sup>	38,78 $\pm$ 22,99 <sup>a</sup>	51,22 $\pm$ 5,98 <sup>a</sup>
<b>RE</b>	6,54 $\pm$ 5,38 <sup>a</sup>	0,44 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup>	4,83 $\pm$ 4,40 <sup>a</sup>	25,36 $\pm$ 16,53 <sup>a</sup>	51,64 $\pm$ 12,95 <sup>a</sup>

C=controle; NI=Naque/Ipatinga; RE=Regência.

Os dados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

Para o parâmetro ureia, usou-se ANOVA. Para os demais Kruskal-Wallis.

a = médias com letras iguais não diferem estatisticamente.

Além disso, mesmo que a presença de metais não esteja vinculada diretamente ao rompimento da barragem, a vazão e o volume de rejeito lançado revolveu e colocou em suspensão os sedimentos do fundo dos cursos d'água afetados, que além de ser uma região mineradora, também já foi marcada pela forte presença de garimpo de Au (IBAMA, 2015).

Os resultados encontrados neste estudo estão resumidos no Quadro 1.

Quadro 1 – Resultados encontrados no Estudo I.

Parâmetro	NI	RE
<b>Metais na água acima do VMP pelo CONAMA 357/2005</b>	Mn	Se (no limite)
<b>Hemoglobina</b>	Maior que o controle	Nenhuma alteração
<b>Sangue</b>	Diminuição de GPx em relação ao controle	Aumento da CAT em relação ao NI
<b>Córtex</b>	Diminuição de GPx em relação ao controle	Diminuição de GPx em relação ao controle
<b>Fígado</b>	Nenhuma alteração	Menor bioacúmulo de Al e Mn, apesar da água ter maior concentração de Mn em relação ao controle; Aumento da CAT
<b>Rim</b>	Tendência de diminuição de EROs	Maior bioacúmulo de Pb em relação ao controle, apesar da água estar com menor [Pb]
<b>Parâmetros bioquímicos</b>	Nenhuma alteração	Nenhuma alteração

VMP = valor máximo permitido.

Apesar dos resultados apresentados demonstrarem algumas alterações nos ratos frente aos danos causados pelo acidente, é importante lembrar que:

Os impactos ambientais não se limitam aos danos diretos, devendo ser considerado que o meio ambiente é um sistema complexo, no qual diversas variáveis se inter-relacionam, especialmente no contexto de uma bacia hidrográfica, sendo que as medidas de reparação dos danos, tangíveis e intangíveis, quando viáveis, terão execução a médio e longo prazo, compreendendo neste caso pelo menos dez anos (IBAMA, 2015).

## 5.2 ESTUDO II

Encontrou-se algumas diferenças significativas quanto à concentração de metais nas águas de abastecimento, conforme apresentado na Tabela 7. Alguns elementos ficaram abaixo do limite de detecção, como por exemplo, o As.

Tabela 7 - Concentração de metais na água dos grupos expostos à água de abastecimento e controle.

Elemento ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	C	GV	CA	Portaria 2914/2011
	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	VMP <sup>&amp;</sup>
Ag	1,15 $\pm$ 0,66 <sup>a</sup>	0,59 $\pm$ 0,66 <sup>a,b</sup>	0,49 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	-
As	<7.10 <sup>-6</sup>	<7.10 <sup>-6</sup>	<7.10 <sup>-6</sup>	10,00
Ba	3,16 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	40,16 $\pm$ 0,14 <sup>b</sup>	143,80 $\pm$ 0,42 <sup>c</sup>	700,00
Be	0,05 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,11 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,09 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	-
Cd	0,04 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,13 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,07 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	5,00
Cr	0,32 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	0,73 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>	0,90 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	50,00
Cu	208,20 $\pm$ 3,73 <sup>a</sup>	1,67 $\pm$ 3,73 <sup>b</sup>	0,89 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	2.000,00
Fe	287,10 $\pm$ 21,24 <sup>a</sup>	546,40 $\pm$ 21,24 <sup>b</sup>	301,60 $\pm$ 14,00 <sup>a</sup>	300,00
Mn	0,52 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	41,31 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	<2.10 <sup>-6</sup>	100,00
Ni	<1,7.10 <sup>-5</sup>	0,58 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	0,32 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	70,00
Pb	1,63 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	14,45 $\pm$ 0,26 <sup>b</sup>	<4.10 <sup>-6</sup>	10,00
Sb	0,08 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,42 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	0,25 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup>	5,00
Se	<1,45.10 <sup>-4</sup>	<1,45.10 <sup>-4</sup>	1,12 $\pm$ 0,06	10,00

**Continua**

Elemento ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )				Conclusão
	C	GV	CA	Portaria 2914/2011 VMP <sup>&amp;</sup>
V	0,60 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,95 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	1,35 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup>	-
Zn	97,82 $\pm$ 6,69 <sup>a</sup>	314,93 $\pm$ 6,69 <sup>b</sup>	33,16 $\pm$ 0,27 <sup>c</sup>	5.000,00

VMP=valor máximo permitido; C=controle; GV=Governador Valadares; CA=Colatina.

<sup>&</sup>Os VMP foram convertidos para  $\mu\text{g.L}^{-1}$  para melhor visualização dos dados.

Usou-se ANOVA, com *post hoc* Tukey.

Médias com letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente. Letras diferentes são estatisticamente diferentes dos outros grupos ( $p < 0,05$ ).

A água de Governador Valadares apresentou maior concentração dos elementos químicos Ba, Be, Cd, Cr, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn em relação a água do controle. Apenas a concentração de Cu foi menor em relação ao controle.

Quanto à água de abastecimento de Colatina, esta teve concentrações menores do que a água do controle para os elementos Ag, Cu, Pb e Zn. Os elementos Ba, Cr e Ni apresentaram concentrações maiores.

O padrão de potabilidade da água é expresso pela Portaria nº 2.914/2011, a qual estabelece normas, responsabilidade e procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano, dispondo, dentre outros parâmetros, sobre os valores máximo permitidos (VMP) de elementos químicos presentes na água potável (BRASIL, 2011).

De acordo com a Portaria 2914/2011, a concentração de Fe e Pb na água de Governador Valadares é maior que o valor máximo permitido (BRASIL, 2011). Ambos metais estão presentes em alguns sistemas de encanamento doméstico (WHO, 2011) e o Fe também pode ser usado como agente coagulante em ETA (WHO, 2003).

A toxicidade por Pb resulta da mimetização molecular de outros metais divalentes. O Pb passa a ocupar o lugar do Zn ou do Ca em várias proteínas importantes. Devido seu tamanho e afinidade elétrica, ele altera a estrutura da proteína e pode ativar ou inibir temporariamente a função da mesma (BYRNS e PENNING, 2012).

O Pb se distribui pelos tecidos moles, particularmente rins e fígado. Embora seja um intoxicante inespecífico, os sistemas mais sensíveis são o nervoso, hematológico, cardiovascular e renal (BYRNS e PENNING, 2012).

A exposição humana a metais, metaloides e seus compostos frequentemente ocorrem como misturas e, portanto, é importante considerar a ação conjunta dos elementos no que diz respeito aos mecanismos de ação e avaliação de risco. A ação conjunta dos elementos pode induzir efeitos aditivos, como sinergismo/potencialização, ou antagonistas, se manifestando como toxicidade celular direta (necrose ou apoptose) ou carcinogenicidade (BYRNS e PENNING, 2012; ANDRADE *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2014).

Os animais expostos à água tratada do rio Doce tiveram a evolução da massa corporal conforme esperado (Figura 17). Não foi observado diminuição da massa dos animais tratados e controle.

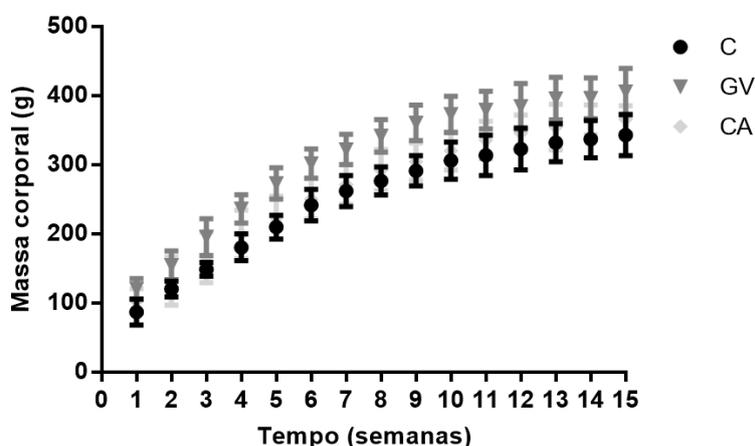


Figura 17. Evolução da massa corporal dos ratos expostos à água de abastecimento e o grupo controle ao longo do tratamento. C=controle; GV=Governador Valadares; CA=Colatina. As barras verticais indicam o desvio padrão dos dados.

Outros estudos avaliando ratos machos expostos, via água de beber, à mistura de baixas doses de metais potencialmente tóxicos, também não apresentaram diferença significativa na massa corporal e no consumo de água em relação ao grupo controle (ZHU *et al.*, 2014; MARKIEWICZ-GÓRKA *et al.*, 2015). O mesmo foi encontrado no estudo de Cobbina e colaboradores (2015), em que ratos expostos a baixas doses de metais individualmente (Pb 0,01 mg.L<sup>-1</sup>; Hg 0,001 mg.L<sup>-1</sup>; Cd 0,005 mg.L<sup>-1</sup>; As 0,01 mg.L<sup>-1</sup>) na água potável por 120 dias não apresentaram sinais físicos como resultado de toxicidade.

Não houve diferença significativa entre os grupos no consumo de água pela massa corporal dos animais, conforme Figura 18.

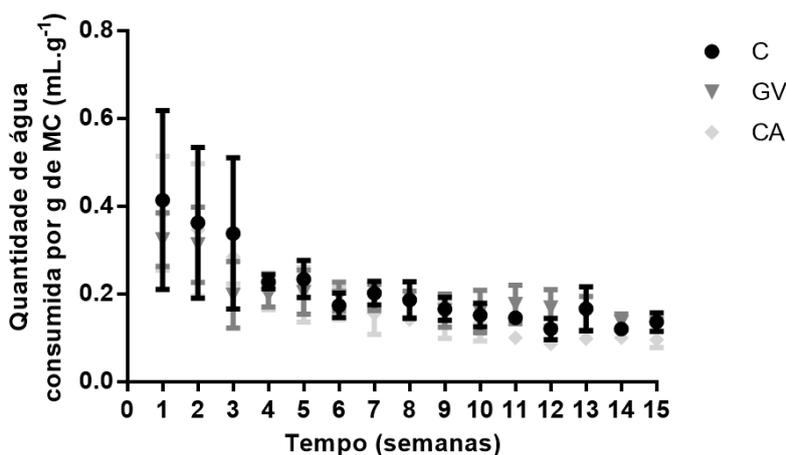


Figura 18. Consumo de água por massa corporal de animal durante o tratamento com água de abastecimento e grupo controle. C=controle; GV=Governador Valadares; CA=Colatina. As barras verticais indicam o desvio padrão dos dados.

No que diz respeito à hemoglobina, não foi encontrada nenhuma diferença entre os grupos (Tabela 8).

A intoxicação crônica com Pb está associada à anemia, que parece resultar da redução da vida das hemácias e por inibição de várias enzimas envolvidas na síntese do heme, que são observados mesmo com níveis muito baixos de Pb (BYRNS e PENNING, 2012). Ratos expostos ao Pb em baixas doses, via oral, induziu anemia acelerando o sequestro esplênico de hemácias (JANG *et al.*, 2011; FIHRI *et al.*, 2016).

Mesmo a água de Governador Valadares estar acima do limite estabelecido para este metal, o efeito não foi observado.

Tabela 8 - Resultados da quantificação de hemoglobina dos grupos expostos à água de abastecimento e controle.

GRUPOS	Hb (mg/dL)
C	16,36 ± 3,56 <sup>a</sup>
GV	17,39 ± 2,34 <sup>a</sup>
CA	17,86 ± 2,29 <sup>a</sup>

C=controle; GV=Governador Valadares; CA=Colatina.

Resultados expressos em média ± desvio padrão.

Teste estatístico ANOVA, com *post hoc* Tukey.

a, b = médias com letras iguais não diferem estatisticamente. Letras diferentes são estatisticamente diferentes dos outros grupos ( $p < 0,05$ ).

Os marcadores de estresse oxidativo em sangue estão apresentados na Figura 19. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os três grupos,

nas enzimas antioxidantes. Porém, a concentração de GSH foi significativamente maior no grupo CA do que no controle.

A GSH pode formar complexos com uma variedade de metais, incluindo Hg, Pb, As, Au, Ag, Zn e Cu. A sulfidril livre é o principal local de coordenação para ligação de metal, mas há interações favoráveis adicionais, que pode ser feito com outros grupos funcionais dentro do tripeptídeo. A GSH auxilia no armazenamento e transporte de metais e como cofator em reações redox envolvendo metais (BANERJEE, 2008).

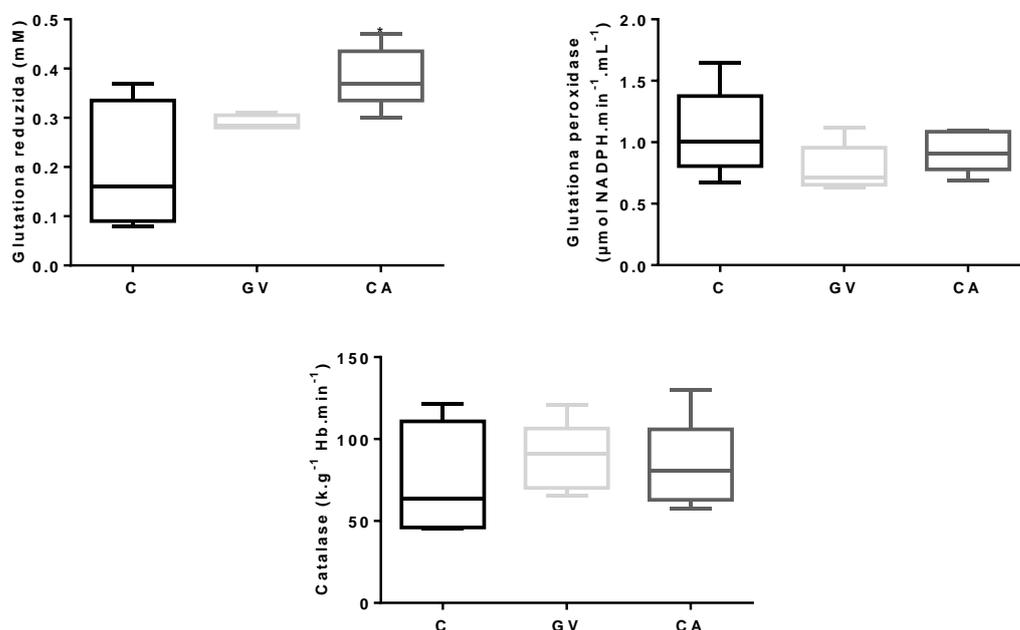


Figura 19. Avaliação do estresse oxidativo no sangue dos animais expostos à água de abastecimento e controle. C=controle; GV=Governador Valadares; CA=Colatina. Teste estatístico Kruskal-Wallis, com *post hoc* Dunn's. \* $p < 0,05$ .

Os resultados para o bioacúmulo dos metais no córtex estão apresentados na Tabela 9. Foi possível observar que, houve menor concentração de Fe e uma tendência de menor concentração de Mn ( $p=0,077$ ) no grupo CA comparado ao grupo controle.

Tabela 9 - Bioacúmulo de metais no córtex dos grupos expostos à água de abastecimento e controle.

	<b>C</b>	<b>GV</b>	<b>CA</b>
<b>Elementos (<math>\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}</math>)</b>	<b>Média <math>\pm</math> DP</b>	<b>Média <math>\pm</math> DP</b>	<b>Média <math>\pm</math> DP</b>
Al	1632 $\pm$ 843,3	1760 $\pm$ 934,7	831,1 $\pm$ 215,7
As	4,6 $\pm$ 2,0	7,0 $\pm$ 2,7	2,7 $\pm$ 0,2
Cd <sup>#</sup>	22,4 $\pm$ 10,6	41,4 $\pm$ 24,4	2,8 $\pm$ 1,1
Cr	122,9 $\pm$ 55,4	193,0 $\pm$ 77,0	74,1 $\pm$ 7,9
Cu	6,8 $\pm$ 4,3	18,7 $\pm$ 11,0	6,5 $\pm$ 2,9
Fe	266,0 $\pm$ 104,9	253,8 $\pm$ 138,5	106,7 $\pm$ 20,5*
Mn	11,7 $\pm$ 4,3	11,9 $\pm$ 3,9	4,6 $\pm$ 0,5
Pb	1,5 $\pm$ 1,0	2,7 $\pm$ 2,4	0,4 $\pm$ 0,1
Se	4,0 $\pm$ 1,3	9,0 $\pm$ 3,4	3,3 $\pm$ 0,3
Zn	159,7 $\pm$ 123,3	130,1 $\pm$ 33,0	66,4 $\pm$ 3,9

C=controle; GV=Governador Valadares; CA=Colatina.

<sup>#</sup>Concentração em  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ .

Usou-se Kruskal-Wallis com *post hoc* Dunn's.

\*Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).

Com relação aos marcadores de estresse oxidativo no córtex (Figura 20), houve diminuição significativa na atividade da GPx no grupo CA ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle e, apesar de não ter diferença significativa, houve forte tendência nos animais do grupo GV ( $p = 0,078$ ) em relação ao grupo controle. Para a atividade da CAT, concentração de GSH e [EROs radicalares] não foi observada diferença estatística.

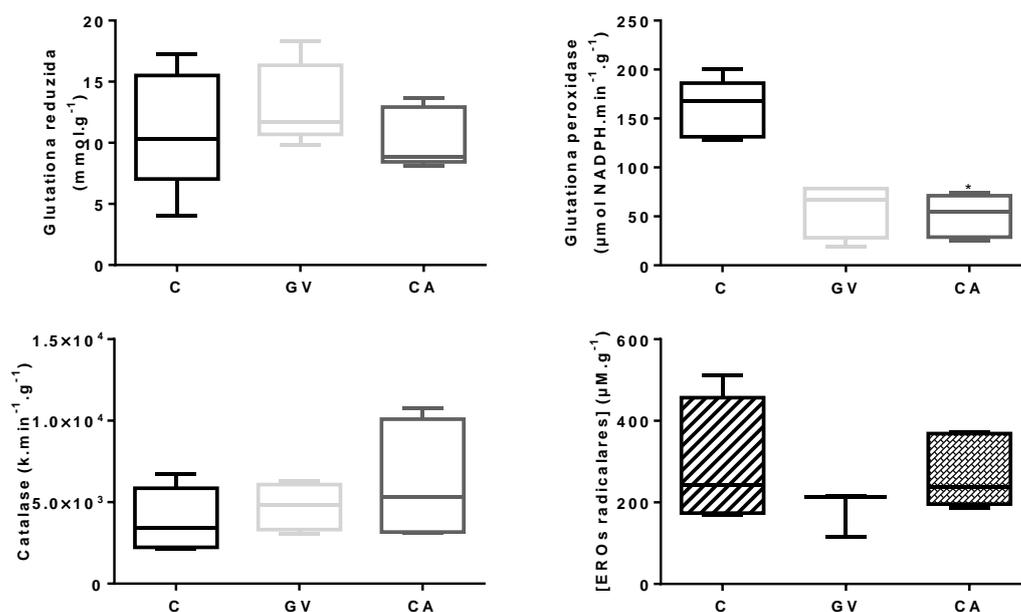


Figura 20. Avaliação do estresse oxidativo e da concentração de EROs no córtex dos animais expostos à água de abastecimento e controle. C=controle; GV=Governador Valadares; CA=Colatina. Teste estatístico Kruskal-Wallis, com *post hoc* Dunn's, exceto para CAT que foi ANOVA, com *post hoc* Tukey. \* $p < 0,05$ .

Quanto ao bioacúmulo dos metais no fígado (Tabela 10), as concentrações Fe e Mn apresentaram-se significativamente menores nos animais do grupo CA quando comparados ao controle. A baixa concentração de Mn na água de abastecimento de Colatina impossibilitou sua quantificação. Entretanto, permitiu verificar a diferença de bioacúmulo em relação ao grupo controle.

Nos animais do grupo GV, as concentrações de Se e Zn estavam significativamente menores quando comparados ao grupo controle (Tabela 10).

Tabela 10 - Bioacúmulo de metais no fígado dos grupos expostos à água de abastecimento e controle.

	C	GV	CA
Elementos ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP
Al	187,6 $\pm$ 16,6	174,9 $\pm$ 13,4	166,9 $\pm$ 4,9
As	1,8 $\pm$ 0,4	1,7 $\pm$ 0,1	1,7 $\pm$ 0,1
Cd <sup>#</sup>	4,5 $\pm$ 0,3	4,8 $\pm$ 0,8	5,5 $\pm$ 0,4
Cr	20,8 $\pm$ 1,5	20,9 $\pm$ 0,7	19,2 $\pm$ 0,2

Continua

Elementos ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Conclusão		
	C	GV	CA
	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP
Cu	6,2 $\pm$ 2,4	6,9 $\pm$ 3,2	3,7 $\pm$ 0,6
Fe	442,9 $\pm$ 69,9	310,4 $\pm$ 42,5	293,9 $\pm$ 25,3*
Mn	12,5 $\pm$ 1,2	8,8 $\pm$ 1,3	7,8 $\pm$ 1,7**
Pb	0,2 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1
Se	7,2 $\pm$ 0,6	6,1 $\pm$ 0,3*	6,4 $\pm$ 0,4
Zn	94,9 $\pm$ 14,5	73,1 $\pm$ 11,0*	90,5 $\pm$ 5,3

C=controle; GV=Governador Valadares; CA=Colatina.

#Concentração em  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ .

Usou-se Kruskal-Wallis com *post hoc* Dunn's.

\*Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ( $p<0,05$ ).

\*\*Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ( $p<0,01$ ).

Com relação aos marcadores de estresse oxidativo no fígado ( Figura 21), houve aumento significativo na atividade da CAT dos animais expostos à água de abastecimento de Colatina em relação ao grupo controle. Como dito anteriormente, o aumento da atividade desta enzima está diretamente relacionada com o aumento da concentração de peróxido de hidrogênio.

O  $\text{H}_2\text{O}_2$  é gerado *in vivo* pela dismutação do ânion superóxido por enzimas oxidases ou pela  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos. As mitocôndrias são importantes fontes de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e, a presença deste ânion pode causar sérios danos, pois as mitocôndrias são ricas em SOD que converte o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio. Então, ele é parcialmente eliminado pelas enzimas catalase, GPx e peroxidases, mas como tem baixa eficiência, grande parte do peróxido de hidrogênio é liberado para a célula (BARREIROS e DAVID, 2006).

Para os demais marcadores de estresse oxidativo, não foi observada nenhuma diferença estatística.

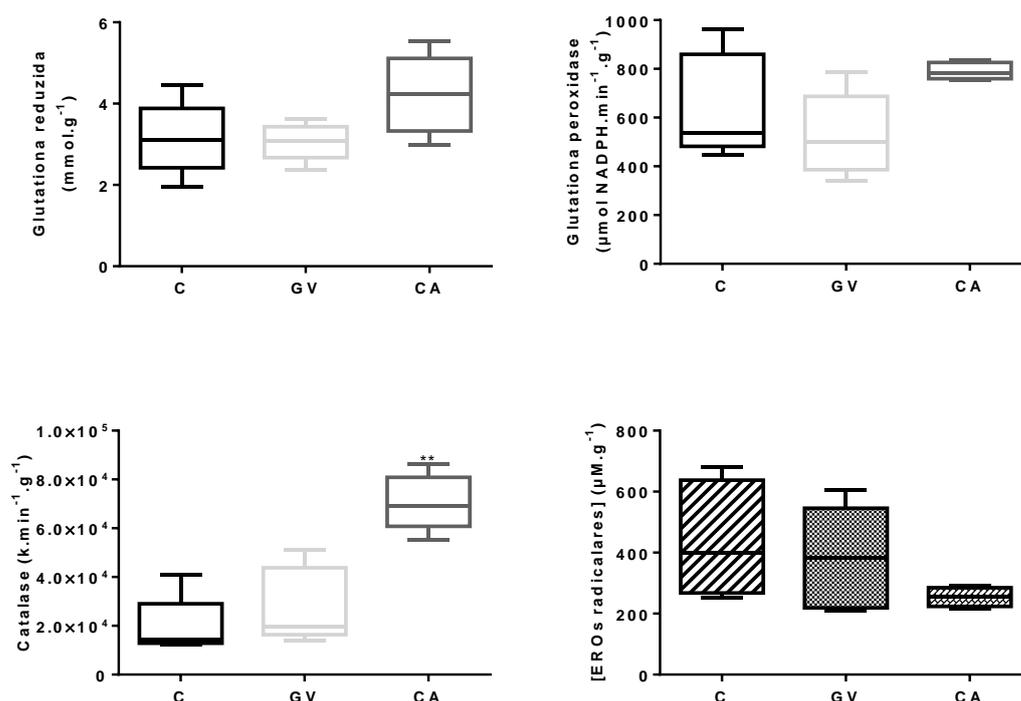


Figura 21. Avaliação do estresse oxidativo e da concentração de EROs no fígado dos animais expostos à água de abastecimento e controle. C=controle; GV=Governador Valadares; CA=Colatina. Teste estatístico ANOVA, com post hoc Tukey para GSH e [EROs radicalares], e para GPx e CAT foi Kruskal-Wallis, com post hoc Dunn's. \*\*p<0,01.

Nos resultados de bioacúmulo de metais no rim, apresentados na Tabela 11, não se observou nenhuma diferença entre os animais expostos às diferentes águas de abastecimento. Apesar de ter sido encontrado diferenças no bioacúmulo no fígado, a excreção foi satisfatória.

Tabela 11 - Bioacúmulo de metais no rim dos grupos expostos à água de abastecimento e controle.

	C	GV	CA
<b>Elementos (µg.g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Média ± DP</b>	<b>Média ± DP</b>	<b>Média ± DP</b>
Al	155,1±48,3	154,7±45,6	201,6±49,9
As	1,9±0,8	1,9±0,5	2,1±0,8
Cd <sup>#</sup>	10,1±4,7	9,1±4,4	9,4±4,3
Cr	20,0±5,3	20,7±3,5	25,1±4,7
Cu	34,8±21,3	24,2±8,8	23,8±8,6
Fe	185,3±78,9	148,9±53,7	210,2±90,0
Mn	1,8±0,9	3,5±0,8	3,5±0,8

Continua

Elementos ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Conclusão		
	C	GV	CA
Pb	$0,3\pm 0,1$	$0,1\pm 0,0$	$0,2\pm 0,1$
Se	$9,9\pm 4,1$	$8,6\pm 1,2$	$9,7\pm 3,6$
Zn	$65,1\pm 30,3$	$40,2\pm 11,8$	$48,8\pm 21,2$

C=controle; GV=Governador Valadares; CA=Colatina.

#Concentração em  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ .

Usou-se Kruskal-Wallis com *post hoc* Dunn's.

Em relação aos marcadores de estresse oxidativo no rim (

Figura 22), os animais tratados com a água de Colatina apresentaram concentração de EROs menores (apesar de não significativo, com forte tendência,  $p=0,055$ ) comparados ao controle. Para os demais marcadores, não foi observada nenhuma diferença entre os grupos.

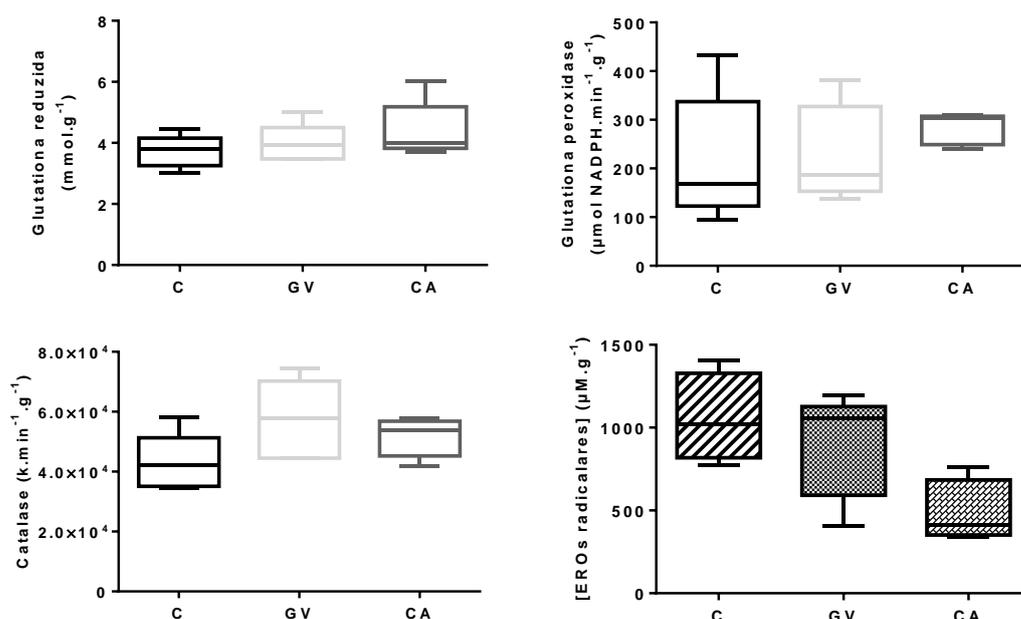


Figura 22. Avaliação do estresse oxidativo e da concentração de EROs no rim dos animais expostos à água de abastecimento e controle. C=controle; GV=Governador Valadares; CA=Colatina. Teste estatístico Kruskal-Wallis, com *post hoc* Dunn's.

Os marcadores bioquímicos também foram avaliados no Estudo II e estão apresentados na Tabela 12. Apesar das alterações encontradas na avaliação dos biomarcadores de estresse oxidativo, não foi encontrada nenhuma diferença significativa nos parâmetros bioquímicos, ou seja, as funções hepática e renal

desses animais, apesar da água com concentrações de metais alterados, manteve-se dentro da normalidade.

Tabela 12 - Resultados dos parâmetros bioquímicos ureia, creatinina,  $\gamma$ -GT, ALT e AST nos ratos tratados com água de abastecimento e controle.

GRUPOS	UREIA (mg/dL)	CREATININA (mg/dL)	$\gamma$ -GT (U/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)
<b>C</b>	4,20 $\pm$ 2,15 <sup>a</sup>	0,50 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	1,63 $\pm$ 1,45 <sup>a</sup>	30,83 $\pm$ 10,62 <sup>a</sup>	51,14 $\pm$ 12,15 <sup>a</sup>
<b>GV</b>	3,32 $\pm$ 1,74 <sup>a</sup>	0,45 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>	2,68 $\pm$ 0,40 <sup>a</sup>	31,93 $\pm$ 11,05 <sup>a</sup>	32,67 $\pm$ 5,12 <sup>a</sup>
<b>CA</b>	3,35 $\pm$ 1,79 <sup>a</sup>	0,55 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	4,35 $\pm$ 2,83 <sup>a</sup>	43,84 $\pm$ 12,14 <sup>a</sup>	52,02 $\pm$ 16,99 <sup>a</sup>

C=controle; GV=Governador Valadares; CA=Colatina.

Os dados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

Para os parâmetros ureia e ALT, usou-se ANOVA. Para os demais Kruskal-Wallis.

a = médias com letras iguais não diferem estatisticamente.

Os resultados do Estudo II estão resumidos no quadro 2.

Quadro 2 – Resultados encontrados no Estudo II.

Parâmetro	GV	CA
<b>Metais na água acima do VMP pela Portaria 2914/2011</b>	Fe e Pb	Nenhum
<b>Hemoglobina</b>	Nenhuma alteração	Nenhuma alteração
<b>Sangue</b>	Nenhuma alteração	Maior concentração de GSH em relação ao controle
<b>Córtex</b>	Tendência em diminuição da atividade da GPx	Menor bioacúmulo de Fe e tendência de menor concentração de Mn; Diminuição da atividade de GPx
<b>Fígado</b>	Menor bioacúmulo de Se e Zn	Menor bioacúmulo de Fe e Mn; Aumento da CAT
<b>Rim</b>	-	Tendência em diminuição de EROs radicalares
<b>Parâmetros bioquímicos</b>	Nenhuma alteração	Nenhuma alteração

VMP = valor máximo permitido

A toxicidade dos metais é de extrema preocupação porque eles não se degradam facilmente no meio ambiente, bioacumulam, biomagnificam e podem causar efeitos deletérios, tais como carcinogênese, mutações e problemas neurológicos (HALLIWELL, 1987; VALKO *et al.*, 2006; VALKO *et al.*, 2007; KORTENKAMP, 2008).

Como não houve restrição alimentar e/ou hídrica, todos os animais finalizaram com o peso esperado para um macho adulto, que é de 350 a 500 g (NEVES *et al.*, 2013). A tendência conhecida na evolução ponderal de ratos *wistar* é de que haja um ganho constante de peso que, inicialmente, se mostra positivamente acelerado, mas que, no decorrer dos dias, diminui gradativamente tendendo a uma relativa estabilidade assintótica (TOMANARI *et al.*, 2003).

Não foram observadas diferenças entre o consumo de água pelos grupos nos dois estudos, o que significa não ter ocorrido rejeição da água pelos animais. E, além disso, a média de consumo de água de um rato adulto, pesando cerca de 300 g é de 10 mL para cada 100 g de massa corpórea por dia, apesar de ser aceitável assumir que o consumo pode variar (TOMANARI *et al.*, 2003).

No ambiente, os organismos estão expostos a xenobióticos múltiplos, como metais e substâncias orgânicas. Embora existam efeitos variados na saúde associados à exposição de metais individuais, a informação sobre a toxicidade e mecanismos para uma exposição à mistura de metais, especialmente em doses bastante baixas, ainda é pequena. Negligencia-se, de certa forma, o efeito potencial das misturas de metais (WU *et al.*, 2016).

Estas exposições podem, às vezes, ser prejudiciais para o organismo, mesmo que os metais estejam em concentrações inferiores à concentração de efeito não observável (sigla, do inglês, NOEC) (KORTENKAMP, 2008).

No entanto, os efeitos toxicológicos da co-exposição a múltiplos metais são muito complicados e dependem da composição dos metais, das doses e da via de administração, da duração da exposição e dos alvos específicos dos metais (ZHU *et al.*, 2014). Além disso, os efeitos, especialmente dos metais potencialmente tóxicos, são testados com base em exposições agudas ou subcrônicas que não refletem o risco real (MARKIEWICZ-GÓRKA *et al.*, 2015).

Os metais, ao entrar no organismo, podem ser absorvidos ou eliminados por transportadores. No entanto, nestes transportadores podem ocorrer interações competitivas entre os metais livres e os íons principais, como  $\text{Ca}^{2+}$ ,

Mg<sup>2+</sup> e Na<sup>+</sup>. Sendo assim, há redução na taxa de ingestão dos metais na mistura, afetando a absorção e toxicidade deles (WU *et al.*, 2016).

A essência da transformação biológica em organismos é manter a homeostase bioquímica. Após esta transformação, as propriedades dos tóxicos mudam, como sua persistência, distribuição, bioacumulação e excreção (WU *et al.*, 2016).

Os efeitos tóxicos dos metais quando em misturas, especialmente em doses baixas e crônicas (prováveis no ambiente) podem induzir, interagir ou inibir respostas e vias metabólicas (MARKIEWICZ-GÓRKA *et al.*, 2015). Estes estão associados à bioativação ou desintoxicação. Na bioativação, os tóxicos são transformados em espécies mais nocivas, enquanto a desintoxicação está associada à redução da toxicidade. Em mamíferos, a transformação biológica de muitos tóxicos ocorre no fígado e nos músculos (WU *et al.*, 2016).

Os metais podem afetar vários órgãos e, portanto, pode ocorrer de mais de um metal atacar um dado órgão-alvo ao mesmo tempo (Tabela 13). Por isso, existe a necessidade de considerar a avaliação da toxicidade conjunta de misturas de metais (NORDBERG *et al.*, 2007).

Tabela 13 – Potenciais efeitos na saúde humana causados por alguns metais encontrados em fluidos biológicos. Adaptado de NORDBERG *et al.* (2007).

	Câncer	Reprodução	Disordens imunes	Disfunção renal	Disfunção hepática	Disordens neurotóxicas
Al						x
As	x	x	x	x	x	x
Ba				x		
Be			x			
Cd	x	x		x		
Cr	x			x	x	
Co			x			
Cu			x	x	x	
Pb		x	x	x		x
Mn						x
Hg		x	x	x		x
Ni	x		x			
Ag			x			
U				x		

O perfil bioquímico do soro é um importante índice que reflete as principais funções orgânicas. O fígado e o rim são os principais órgãos utilizados para o metabolismo e excreção de metais e, portanto, são mais facilmente danificados.

Entretanto, as baixas concentrações de metais do presente estudo não foram suficientes para causarem desregulação na função renal e hepática.

Em relação ao bioacúmulo de metais nos órgãos, ambos os estudos encontraram que o fígado foi o órgão que teve maior concentração de metais, seguido do rim e cérebro, corroborando os achados de REDDY *et al.* (2015).

A produção de EROs em todos os tecidos foi estatisticamente semelhante em todos os grupos, apesar da concentração de metais na água a qual foram expostos ser bastante divergente.

A ressonância paramagnética eletrônica é uma ferramenta altamente específica e poderosa para a detecção de radicais e alguns íons metálicos em sistemas biológicos, sendo recomendada para a detecção e identificação de radicais em sistemas biológicos. No entanto, é uma técnica que tem suas deficiências e limitações. Além disso, a sensibilidade dos RPE modernos permite a detecção de pequenas impurezas em reagentes e armadilhas de rotação (HAWKINS e DAVIES, 2014).

A manipulação de amostras de tecido (corte, moagem, homogeneização e liofilização) deve ser evitada se possível, pois são todos conhecidos para introduzir artefatos que são difíceis de controlar (HAWKINS e DAVIES, 2014).

## 6 CONCLUSÃO

O presente estudo comprovou que, mesmo a água do rio Doce e a água captada e tratada para abastecimento público terem baixas concentrações de metais, elas são capazes de provocar alterações no organismo através do bioacúmulo e perturbação na homeostase do sistema antioxidante nos tecidos analisados, confirmando que o estresse oxidativo é um mecanismo comum da mistura de metais.

Os animais submetidos ao estudo crônico foram capazes de responder às ações deletérias que vinham ocorrendo ao longo do tratamento, mas nem todos conseguiram voltar para o seu limiar satisfatório.

A GPx, principalmente no córtex, foi bastante prejudicada provavelmente por ser inibida por alguns metais ou não conseguir se regenerar e manter o ciclo. A catalase apresentou-se aumentada no fígado de alguns grupos provavelmente devido à grande concentração de peróxido de hidrogênio, que não é quantificado pelo RPE.

Monitoramentos periódicos na região afetada pelo rompimento da barragem Fundão são indispensáveis, independentemente do aumento da concentração de metais ter sido provocado por este motivo. Além disso, estudos com misturas de xenobióticos são importantes para entender melhor como baixas doses de metais interagem nos tecidos e seus efeitos biológicos.

Atualmente, há muito a ser aprendido sobre a ação conjunta de elementos químicos tóxicos e essenciais, e esta é claramente uma área crítica de pesquisa. Precisa-se proteger a saúde pública, inclusive da região afetada com o desastre.

## 7 REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN, E. A. et al. Physiological and pathophysiological reactive oxygen species as probed by EPR spectroscopy: the underutilized research window on muscle ageing. **J Physiol**, v. 594, n. 16, p. 4591-613, 2016.

ACHARYYA, N. et al. Arsenic-induced antioxidant depletion, oxidative DNA breakage and tissue damages are prevented by the combined action of folate and vitamin B12. **Biological Trace Element Research**, v. 168, n. 1, p. 122-32, 2015.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-6, 1984.

ALIAGA, M. E. et al. Redox-implications associated with the formation of complexes between copper ions and reduced or oxidized glutathione. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 154, p. 78–88, 2016.

ANA. **Encarte especial sobre a bacia do rio Doce: rompimento da barragem em Mariana/MG**. Brasília: 50 p. 2016a.

\_\_\_\_\_. **Relatório Técnico – Análise preliminar sobre a qualidade d'água e seus reflexos sobre os usos da água**. Brasília: 24 p. 2016b.

ANDRADE, V. et al. Arsenic and manganese alter lead deposition in the rat. **Biological Trace Element Research**, v. 158, p. 384–91, 2014.

ATSDR. **Case studies in environmental medicine – lead toxicity**. SERVICES, U. D. O. H. A. H. Atlanta: Agency for Toxic Substances and Disease Registry 1992.

BANERJEE, R. **Redox biochemistry**. Wiley, 2008.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-23, 2006.

BATISTA, B. L. et al. Determination of trace elements in biological samples by inductively coupled plasma mass spectrometry with tetramethylammonium

hydroxide solubilization at room temperature. **Analytica Chimica Acta**, v. 646, p. 23–9, 2009.

BERG, K. et al. A high precision method for quantitative measurements of reactive oxygen species in frozen biopsies. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 2014.

BERGLUND, Å. M. M. et al. Oxidative stress in pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*) nestlings from metal contaminated environments in northern Sweden. **Environmental Research**, v. 105, n. 3, p. 330–9, 2007.

BLOOM, J. C.; BRANDT, J. T. Respostas tóxicas do sangue. In: KLAASSEN, C. D. e WATKINS, J. B. (Ed.). **Fundamentos de toxicologia de Casarett e Doull** Porto Alegre - RS: AMGC Editora, 2012. p.149-62.

BRASIL. **Resolução Conama nº 357, de 17 de março de 2005**. Brasília, 2005.

\_\_\_\_\_. **Portaria do Ministério da Saúde nº 2914, de 12 de dezembro de 2011**. Brasília, 2011.

BYRNS, M. C.; PENNING, T. M. Toxicologia ambiental: carcinógenos e metais pesados. In: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A., et al (Ed.). **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. Porto Alegre: AMGH, 2012. cap. 67, p.1853-77. ISBN 978-85-8055-116-7.

CBHDOCE. **Plano Integrado de Recursos Hídricos da Bacia Hidrográfica do rio Doce e planos de ações para as unidades de planejamento e gestão de recursos hídricos no âmbito da bacia do rio Doce**. 2010.

CETESB. **Qualidade das águas interiores no estado de São Paulo**. AMBIENTE, S. D. M.: Companhia Ambiental do Estado de São Paulo: 44 p. 2009.

COBBINA, S. J. et al. Interaction of four low dose toxic metals with essential metals in brain, liver and kidneys of mice on sub-chronic exposure. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 39, n. 1, p. 280-91, Jan 2015.

COELHO, A. L. N. Bacia hidrográfica do rio Doce (MG/ES) - uma análise socioambiental integrada. **GEOGRAFARES**, n. 7, 2009.

COSTA, A. T. **Geoquímica das águas e dos sedimentos da bacia do Rio Gualaxo do Norte, Leste-Sudeste do quadrilátero ferrífero (MG): Estudo de uma área afetada por atividades de extração mineral**. Programa de Pós Graduação em Evolução Crustal e Recursos Naturais. 2001.

DUFOUR, R. Avaliação da função e da lesão hepática. In: HENRY, J. B. (Ed.). **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. Manole, 2008a. cap. 14, p.307-26.

\_\_\_\_\_. Avaliação da função renal, água, eletrólitos, equilíbrio ácido-base e gases sanguíneos. In: HENRY, J. B. (Ed.). **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 20. Manole, 2008b. cap. 9, p.185-208.

DUFOUR, R.; LOTT, J. A.; HENRY, J. B. Enzimologia clínica. In: HENRY, J. B. (Ed.). **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. Manole, 2008. cap. 15, p.327-54.

EATON, D. L.; GILBERT, S. G. Princípios de toxicologia. In: KLAASSEN, C. D. e WATKINS III, J. B. (Ed.). **Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull**. Porto Alegre: AMGH, 2009. cap. 2, p.5-19.

ELLINGSEN, D. G.; HORN, N.; AASETH, J. Copper. In: NORDBERG, G. F.; FOWLER, B. A., *et al* (Ed.). **Handbook on the toxicology of metals**. 3. Londres: Elsevier, 2007. cap. 26, p.529-46. ISBN 978-0-12-369413-3.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, p. 70-7, 1959.

ENGENHARIA, E. **Produto 8 – Relatório final do plano municipal de saneamento básico – Município Mariana**. 2014.

ENGERS, V. K.; BEHLING, C. S.; FRIZZO, M. N. A influencia do estresse oxidativo no processo de envelhecimento celular. **Revista Contexto & Saúde**, v. 10, n. 20, 2011.

ERIKSON, K. M. et al. Manganese exposure and induced oxidative stress in the rat brain. **Science of the Total Environment**, v. 334, 2004.

ESPARZA, J. L. et al. Aluminum-induced pro-oxidant effects in rats: protective role of exogenous melatonin. **Journal of pineal research**, v. 35, n. 1, p. 32-9, 2003.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-8, 1997.

FIHRI, A. F. et al. Protective effect of morocco carob honey against lead-induced anemia and hepato-renal toxicity. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 1, p. 115-22, 2016.

GARCIA, S. J. et al. A manganese-enhanced diet alters brain metals and transporters in the developing rat. **Toxicological sciences**, v. 92, n. 2, p. 516–25, 2006.

GIAIA. Relatório parcial - Expedição rio Doce. [http://giaia.eco.br/wp-content/uploads/2016/03/GIAIA\\_relatorioParcial\\_mar2016.pdf](http://giaia.eco.br/wp-content/uploads/2016/03/GIAIA_relatorioParcial_mar2016.pdf), 2016. Acesso em: 14 de maio de 2017.

GRANDJEAN, P.; HERZ, K. T. Trace elements as paradigms of developmental neurotoxicants: lead, methylmercury and arsenic. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 31, p. 130-4, 2015.

GRANDJEAN, P.; LANDRIGAN, P. J. Neurobehavioural effects of developmental toxicity. **The Lancet Neurology**, v. 13, n. 3, p. 330-8, 2014.

GUIDI, R. One of Brazil's worst environmental crimes brings into question whether the country's environmental policies are influenced by large mining companies. <http://news.mongabay.com/2015/12/one-of-brazils-worst-environmental-crimes-questions-whether-the-countrys-environmental-policies-are-influenced-by-large-mining-companies/>, 2015. Acesso em: 03 de fev de 2017.

HALLIWELL, B. Free radicals and metal ions in health and disease. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 46, n. 01, p. 13-26, 1987.

HAWKINS, C. L.; DAVIES, M. J. Detection and characterisation of radicals in biological materials using EPR methodology. **Biochim Biophys Acta**, v. 1840, n. 2, p. 708-21, Feb 2014.

IBAMA. **Laudo Técnico Preliminar - Impactos ambientais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais**. 2015.

IGAM. **Encarte especial sobre a qualidade das águas do rio Doce após 1 ano do rompimento de barragem de Fundão – 2015-2016**. 2016.

JADHAV, S. H. et al. Effects of subchronic exposure via drinking water to a mixture of eight water-contaminating metals: a biochemical and histopathological study in male rats. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 53, p. 667-77, 2007.

JAESCHKE, H. Toxicidade hepática pela exposição a xenobióticos. In: KLAASSEN, C. D. e WATKINS III, J. B. (Ed.). **Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doul**. 2. Porto Alegre: AMGH, 2012. cap. 13, p.179-91.

JANG, W. H. et al. Low level of lead can induce phosphatidylserine exposure and erythrophagocytosis: a new mechanism underlying lead-associated anemia. **Toxicological sciences**, v. 122, n. 1, p. 177-84, 2011.

JOMOVA, K.; VALKO, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. **Toxicology**, v. 283, n. 2-3, p. 65-87, May 10 2011.

KORTENKAMP, A. Low dose mixture effects of endocrine disrupters: implications for risk assessment and epidemiology. **International Journal of Andrology**, v. 31, p. 233–40, 2008.

KRISHNA, S. et al. Brain deposition and neurotoxicity of manganese in adult mice exposed via the drinking water. **Arch Toxicol**, v. 88, n. 1, p. 47-64, Jan 2014.

LAN, A. P. et al. The neurotoxicity of iron, copper and cobalt in Parkinson's disease through ROS-mediated mechanisms. **Biometals**, v. 29, n. 4, p. 665-78, 2016.

LEBDA, M. A.; EL-NEWESHY, M. S.; EL-SAYED, Y. S. Neurohepatic toxicity of subacute manganese chloride exposure and potential chemoprotective effects of lycopene. **Neurotoxicology**, v. 33, n. 1, p. 98-104, 2012.

LENHARO, M. Barragem em MG era classificada como de risco baixo, diz DNPM. <http://g1.globo.com/minas-gerais/noticia/2015/11/barragem-rompida-em-mg-tinha-era-considerada-de-risco-baixo-diz-dnpm.html>, 2015. Acesso em: 03 de fev 2017.

LUCCHINI, R. G. et al. Manganese. In: NORDBERG, G. F.; FOWLER, B. A., et al (Ed.). **Handbook on the Toxicology of Metals** 4, v.II, 2015. cap. 45, p.975-1011.

MARKIEWICZ-GÓRKA, I. et al. Effects of chronic exposure to lead, cadmium, and manganese mixtures on oxidative stress in rat liver and heart. **Arh Hig Rada Toksikol**, v. 66, p. 51-62, 2015.

MATOS, R. **A tragédia do rio Doce – a lama, o povo e a água. Relatório da Expedição ao rio Doce**. 2016.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annual review of biochemistry**, v. 52, 1983.

MERCADANTE, C. J. et al. The effect of high dose oral manganese exposure on copper, iron and zinc levels in rats. **Biometals**, v. 29, n. 3, p. 417-22, Jun 2016.

MORAIS, D. A. **Monitoramento dos níveis de metais totais e dissolvidos na água e no sedimento da Bacia Hidrográfica do Rio Doce pós-rompimento da Barragem de Fundão-MG**. 2017. 68 Monografia (Graduação). Farmácia, Universidade de Brasília, Brasília.

MOTTA, V. **Bioquímica clínica para o laboratório – princípios e interpretações**. Rio de Janeiro: MedBook, 2009.

NASCIMENTO, E. S.; ESTEBAN, C. Análise de contaminantes em alimentos. In: MOREAU, R. L. M. e SIQUEIRA, M. E. P. B. (Ed.). **Toxicologia analítica**. 2. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. cap. 12, p.108-14.

NAVARRO-YEPES, J. et al. Oxidative stress, redox signaling, and autophagy: cell death versus survival. **Antioxid Redox Signal**, v. 21, n. 1, p. 66-85, Jul 01 2014.

NEVES, A. C. et al. Neglect of ecosystems services by mining, and the worst environmental disaster in Brazil. **Natureza & Conservação**, v. 14, n. 1, p. 24-7, 2016.

NEVES, S. M. P.; FILHO, J. M.; MENEZES, E. W. D. **Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP**. São Paulo: FCF-IQ/USP: 216 p. 2013.

NORDBERG, G. F. et al. Interactions in metal toxicology. In: NORDBERG, G. F.; FOWLER, B. A., et al (Ed.). **Handbook on the toxicology of metals**. 3. Londres: Elsevier, 2007. cap. 7, p.117-45.

OLIVEIRA, D. M.; FERREIRA LIMA, R. M.; EL-BACHA, R. S. Brain rust: recent discoveries on the role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Nutr Neurosci**, v. 15, n. 3, p. 94-102, May 2012.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Study on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxide. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 70 p. 158-69, 1967.

PASSAGLI, M. F.; PAULA, W. X. Tóxicos metálicos. In: PASSAGLI, M. F. (Ed.). **Toxicologia forense: teoria e prática**. 4. Campinas: Millennium, 2013.

POLJSAK, B.; SUPUT, D.; MILISAV, I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2013, 2013.

POPRAC, P. et al. Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. **Trends Pharmacol Sci**, v. 38, n. 7, p. 592-607, 2017.

PRATVIEL, G. Oxidative DNA damage mediated by transition metal ions and their complexes. Interplay between metal ions and nucleic acids. **Springer**, p. 201–16, 2012.

REDDY, U. A. et al. Biomarkers of oxidative stress in rat for assessing toxicological effects of heavy metal pollution in river water. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 17, p. 13453–63, 2015.

REHMAN, K. et al. Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences. **Journal of cellular biochemistry**, 2017.

SANDSTEAD, H. H.; AU, W. Zinc. In: NORDBERG, G. F.; FOWLER, B. A., *et al* (Ed.). **Handbook on the toxicology of metals**. 3. Londres: Elsevier, 2007. cap. 47, p.925-47.

SASTRE, J.; PALLARDÓ, F. V.; VIÑA, J. The role of mitochondrial oxidative stress in aging. **Free Radic Biol Med**, v. 35, n. 1, 2003.

TAKEDA, A. Manganese action in brain function. **Brain Research Reviews**, v. 41, p. 79–87, 2003.

TOMANARI, G. Y.; PINE, A. D. S.; SILVA, M. T. A. Ratos wistar sob regimes rotineiros de restrição hídrica e alimentar. **Revista Brasileira de Terapia Comportamental e Cognitiva**, v. 5, n. 1, p. 57-1, 2003.

VAKIFAHMETOGLU-NORBERG, H.; OUCHIDA, A. T.; NORBERG, E. The role of mitochondria in metabolism and cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 482, p. 426-31, 2017.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M. T. D. Metals, toxicity and oxidative stress. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 1161-208, 2005.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem Biol Interact**, v. 160, n. 1, p. 1-40, Mar 10 2006.

VELAYUTHAM, M.; HEMANN, C.; ZWEIER, J. L. Removal of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and generation of superoxide radical: role of cytochrome c and NADH. **Free Radic Biol Med**, v. 51, n. 1, p. 160-70, 2011.

WHO. Iron in drinking-water: background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality. Geneva, 2003.

\_\_\_\_\_. Lead in drinking-water: background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality. Geneva, 2011.

WU, X. et al. A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 23, p. 8244–59, 2016.

ZHU, H. et al. Biochemical and histopathological effects of subchronic oral exposure of rats to a mixture of five toxic elements. **Food and Chemical Toxicology**, v. 71, p. 166–75, 2014.

**ANEXO I**

## Parâmetros instrumentais de operação do ICP-MS.

---

Modelo e marca	<i>PerkinElmer</i> NexION 300D
Potência do plasma (W)	1600
Vazão do gás do plasma (L.min <sup>-1</sup> )	18
Vazão do gás auxiliar (L.min <sup>-1</sup> )	1,2
Vazão de nebulização (L.min <sup>-1</sup> )	0,9
Injetor	WE023948
Câmara de nebulização	Cyclonic spray
Processamento do sinal	Média
Tempo de integração (s)	1
Vazão de introdução da amostra (mL.min <sup>-1</sup> )	0,33
Replicatas	3

---

## ANEXO II



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação da neurotoxicidade da água do Rio Doce após rompimento da barragem Fundão em ratos tratados cronicamente**”, registrada com o nº **003/16**, sob a responsabilidade de Vívian da Silva Santos - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UCB) da Universidade Católica de Brasília, em reunião de 19 / 04 / 2016.

<b>Finalidade</b>	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
<b>Vigência da autorização</b>	12 de dezembro de 2017.
<b>Espécie / linhagem/ raça</b>	<i>Rattus Norvegicus/ Wistar</i>
<b>Nº de Animais</b>	20
<b>Peso / Idade</b>	60g / 21 Dias
<b>Sexo</b>	Macho
<b>Origem</b>	Biotério do Laboratório de Processos Básicos em Psicologia (UCB)

Prof.<sup>a</sup> Dra. Juliana L. de Carvalho  
 Coordenadora da Comissão de Ética  
 no Uso de Animais / UCB  
 Universidade Católica de Brasília

Brasília, 06 de Maio de 2016.