

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Possível inter-relação entre xenobióticos ambientais e efeitos sobre a saúde de
crianças expostas

SABRINA NUNES DO NASCIMENTO

Porto Alegre, 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Possível inter-relação entre xenobióticos ambientais e efeitos sobre a saúde de
crianças expostas

Dissertação apresentada por **Sabrina Nunes
do Nascimento** para obtenção do GRAU DE
MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Solange Cristina Garcia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e aprovada em 21.03.2014 pela Banca Examinadora constituída por:

Prof^a. Dr^a. Daiana Silva de Ávila

Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA)

Prof. Dr. Diogo André Pilger

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof^a. Dr^a. Flavia Valladão Thiesen

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)

CIP - Catalogação na Publicação

NUNES DO NASCIMENTO, SABRINA
Possível inter-relação entre xenobióticos ambientais e efeitos sobre a saúde de crianças expostas. / SABRINA NUNES DO NASCIMENTO. -- 2014.
100 f.

Orientador: Solange Cristina Garcia.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Crianças. 2. Metais. 3. Déficit cognitivo. 4. Enzima ALA-D. I. Garcia, Solange Cristina, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido sob a orientação da Prof^a. Dr. Solange Cristina Garcia no Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A pesquisa foi financiada pelo projeto FAURGS (Nº 3587). Sabrina Nunes do Nascimento recebeu bolsa de mestrado CAPES.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, pela saúde e por permitir que eu tenha pessoas maravilhosas ao meu redor.

À Professora Solange Garcia, pela confiança depositada em mim. Por sempre ter acreditado no meu potencial e pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, o qual eu considero uma família. Obrigada por ter me acompanhado nas viagens ao interior e por ter colaborado para que esse trabalho fosse realizado.

À família, por todo o apoio, amor e carinho. Aos meus pais, Cristina e José Luiz, pela minha vida e pelas oportunidades que sempre me proporcionaram. Agradeço especialmente à minha mãe, Cristina, por ser mais do que uma mãe, ser minha melhor amiga, por sempre me apoiar e aconselhar. Um agradecimento especial também à minha avó Eneida, com quem eu moro desde que vim para Porto Alegre para estudar. Obrigada por todo o amor e cuidado que sempre dedicou a mim.

Ao meu namorado, melhor amigo e colega de profissão, André, pelo amor, amizade e companheirismo. Obrigada por fazer parte de mais uma etapa importante da minha vida.

Aos meus amigos. Obrigada por todos os sorrisos e bons momentos compartilhados. Em especial, às minhas amigas de infância, de cursinho pré-vestibular e àqueles que conquistei na Faculdade de Farmácia da UFRGS. Saibam que minha vida não teria o mesmo valor sem a presença de vocês. Vocês estarão comigo por toda minha vida.

A todos os amigos e colegas do grupo LATOX. Obrigada pela amizade, pelos momentos de descontração e também de muito trabalho. Em especial às meninas que me acompanharam nas coletas no interior: Ane, Gabi, Marília, Mariele, Nati, Angela e Johanna.

Às colegas de LATOX, Dr^a Natália Brucker e Dr^a Angela Moro, pelas correções e considerações feitas para a melhoria desse trabalho.

Ao Centro de Referência em Saúde do Trabalhador (CEREST) da Região Centro do Estado (Santa Maria), em especial à Médica Rosa Maria Wolff e à Carla Haas pela parceria, por acreditarem no nosso trabalho e terem colaborado para que ele pudesse ter sido realizado.

Às Escolas Três de Maio e Sete de Setembro, do município de Agudo-RS, e à Escola Olavo Bilac de Santa Maria-RS, por terem aceitado fazer parte desse trabalho.

Às Professoras Jerusa Salles e Ana Cristina Dias e às suas alunas, em especial à Psicóloga Márcia Jaeger, pela colaboração nesse trabalho.

Aos Professores Daiana Ávila, Diogo Pilger e Flavia Thiesen por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta dissertação.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por me proporcionar a oportunidade de cursar a graduação e pós-graduação e por ser o meu segundo lar.

À CAPES pelo fomento através da concessão de bolsa.

RESUMO

Crianças são mais sensíveis aos efeitos adversos causados por contaminantes ambientais, tais como os metais, do que os adultos. Dentre esses efeitos adversos, estão os danos ao sistema nervoso central e inibição da enzima δ -aminolevulinato desidratase (ALA-D). Neste trabalho, as concentrações de alguns metais (Al, Pb, Cd, As, Hg, Cr, Mn e Fe) foram quantificadas em amostras de sangue total, soro e cabelo de crianças provenientes de uma área rural e de uma área urbana. Esses elementos também foram quantificados em amostras de água das residências das crianças. A função cognitiva foi avaliada através da aplicação do Teste Matrizes Progressivas Coloridas de Raven. A atividade da enzima ALA-D e o índice de reativação da enzima (ALA-RE) com DTT e com $ZnCl_2$ foram avaliados. As crianças da área rural demonstraram menor desempenho cognitivo no Teste de Raven do que as crianças da área urbana ($p < 0,001$). Níveis sanguíneos de Cr e Hg foram negativamente associados aos escores de QI ($p < 0,005$). Além disso, os escores de QI foram negativamente associados com os níveis de Mn e Fe no cabelo ($p < 0,01$). Adicionalmente, correlações de *Spearman* foram observadas entre: Mn no cabelo vs. Mn na água ($p < 0,001$); Fe no cabelo vs. Fe na água ($p < 0,05$) e Fe no sangue total vs. Fe na água ($p < 0,001$). A atividade da enzima ALA-D foi significativamente diminuída nas crianças da área rural em relação às crianças da área urbana ($p < 0,05$), bem como a ALA-RE com DTT e $ZnCl_2$ foi significativamente aumentada nas crianças da área rural em comparação com as crianças da área urbana ($p < 0,005$). Adicionalmente, a inibição da ALA-D foi correlacionada com os níveis sanguíneos de Cr ($p < 0,05$) e a ALA-RE com DTT foi associada com os níveis sanguíneos de Cr ($p < 0,001$) e Hg ($p < 0,001$). De forma semelhante, a ALA-RE com $ZnCl_2$ foi também correlacionada com níveis sanguíneos de Cr e Hg ($p < 0,05$). Neste estudo foi possível observar déficit na função cognitiva e inibição da ALA-D associados à exposição a alguns metais em crianças da área rural. Além disso, os resultados indicaram a água como uma provável fonte de contaminação a metais.

Palavras-chave: Metais; déficit cognitivo; inibição da ALA-D; crianças.

ABSTRACT

Possible inter-relation between environmental xenobiotics and effects on health of exposed children

Children are more sensitive to the adverse effects caused by environmental contaminants, such as metals, than adults. Among these adverse effects, there are the damage to nervous system central and inhibition of the enzyme δ -aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D). In this study, the concentrations of some metals (Al, Pb, Cd, As, Hg, Cr, Mn and Fe) were quantified in whole blood, serum and hair of children from rural and urban areas. These elements were measured on samples of drinking water from household's children. The cognitive function was evaluated by the Raven's Colored Progressive Matrices Test. The activity of the ALA-D and the rate of reactivation of the enzyme (ALA-RE) with DTT and $ZnCl_2$ were evaluated. Children from rural area had lower performance on the Raven's Test than children from urban area ($p < 0.001$). The Cr and Hg blood levels were negatively associated with percentile IQ scores ($p < 0.05$). Moreover, the IQ scores were negatively associated with Mn and Fe in hair ($p < 0.01$). Additionally, Spearman's correlations were found between: Mn in hair vs. Mn in drinking water ($p < 0.001$); Fe in hair vs. Fe in drinking water ($p < 0.05$) and Fe in whole blood vs. Fe in drinking water ($p < 0.001$). The activity of ALA-D was significantly decreased in children from rural area when compared with children from urban area ($p < 0.05$) and the ALA-RE with DTT and $ZnCl_2$ was significantly increased in children from rural area compared with children from urban area ($p < 0.005$). Additionally, the ALA-D inhibition was correlated with Cr in blood ($p < 0.05$) and ALA-RE with DTT was associated with blood levels of Cr and Hg ($p < 0.001$). Similarly, ALA-RE with $ZnCl_2$ was also correlated with blood levels of Cr and Hg ($p < 0.05$). In this study it was revealed cognitive deficit and ALA-D inhibition associated with exposure to some metals in children from a rural area. Moreover, the results indicated the drinking water as a possible source of contamination to metals.

Keywords: Metals; cognitive deficit; ALA-D-inhibition; children.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está estruturada na forma de encarte de publicações submetidas e/ou publicadas e dividida em seções da seguinte maneira: Introdução, Objetivos, Revisão da Literatura, Artigo presente no Capítulo I, Discussão, Conclusões, Referências Bibliográficas e Anexos.

A Introdução apresenta de uma forma geral o embasamento teórico no qual a proposta deste trabalho foi construída. Os Materiais e Métodos, Resultados e as Referências Bibliográficas pertinentes à publicação específica encontram-se no Capítulo I.

A seção Discussão contém uma interpretação geral dos resultados obtidos. A seção Conclusões aborda as conclusões gerais da dissertação.

A seção Referências Bibliográficas lista a bibliografia utilizada nas seções Introdução e Discussão.

A seção “Anexos” contém o comprovante de submissão do artigo e o modelo do termo de consentimento livre esclarecido.

LISTA DE ABREVIATURAS

Al	Alumínio
ALA-D	δ-Aminolevulinato desidratase
ALA-RE	Índice de reativação da enzima δ-Aminolevulinato desidratase
As	Arsênio
Cd	Cádmio
Cr	Cromo
DTT	Ditiotreitol
Fe	Ferro
Hg	Mercúrio
ICP-MS	Espectroscopia de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado
Mn	Manganês
OMS	Organização Mundial de Saúde
ZnCl₂	Cloreto de zinco

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	19
OBJETIVOS.....	23
Objetivo geral.....	25
Objetivos específicos.....	25
REVISÃO DA LITERATURA.....	27
1. Toxicologia ambiental e contaminantes ambientais.....	29
2. Metais.....	30
2.1. Alumínio.....	31
2.2. Arsênio.....	31
2.3. Chumbo.....	32
2.4. Cromo.....	33
2.5. Ferro.....	33
2.6. Manganês.....	34
2.7. Mercúrio.....	34
3. Monitorização ambiental e biomonitoramento.....	35
4. Biomarcadores de exposição a metais.....	36
5. Efeitos neurológicos dos metais sobre a saúde infantil.....	37
6. Efeitos dos metais sobre a atividade da ALA-D.....	38
CAPÍTULO I: ARTIGO.....	41
Cognitive deficits and ALA-D-inhibition in children exposed to multiple metals.....	42
DISCUSSÃO.....	77
CONCLUSÕES.....	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
ANEXOS.....	95
ANEXO I: Carta de Confirmação da Submissão do Artigo.....	96
ANEXO II: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	97
ANEXO III: Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).....	98

Nos últimos anos, o número de substâncias químicas pelas quais os seres humanos estão expostos tem aumentado drasticamente (Carpenter, Arcaro e Spink, 2002). Sabe-se que, especialmente, após a Segunda Guerra Mundial, milhares de novos compostos químicos sintéticos têm sido liberados no ambiente (Lloyd-Smith e Sheffield-Brotherton, 2008). Em vista disto, os humanos estão expostos a misturas de contaminantes ambientais e não apenas a compostos isolados (Carpenter, Arcaro e Spink, 2002; Henn, Coull e Wright, 2014). Embora muitas dessas substâncias possam causar efeitos tóxicos independentes, em muitos casos, duas ou mais substâncias podem interagir causando efeitos adversos sinérgicos sobre os sistemas biológicos (Carpenter, Arcaro e Spink, 2002).

Nos países em desenvolvimento, principalmente, os seres humanos podem estar expostos a níveis elevados de alguns contaminantes ambientais, tais como agrotóxicos, metais, entre outros resíduos perigosos (Domínguez-Cortinas *et al.*, 2013). Os metais estão entre os principais agentes tóxicos detectados no ambiente quando se trata de exposição humana a substâncias químicas ambientais (Migliore e Coppedè, 2009). Os agrotóxicos constituem uma das principais fontes antropogênicas de metais no ambiente (Tavares e Carvalho, 1992). Esses metais podem contaminar a água, comprometendo a qualidade para o consumo humano e, conseqüentemente, trazer riscos para a saúde das populações expostas (Krishna e Mohan, 2013).

As crianças representam um grupo especial quando se trata de exposição ambiental a agentes químicos em áreas contaminadas (Domínguez-Cortinas *et al.*, 2013). Isso porque, quando comparadas aos adultos, as crianças são mais vulneráveis aos efeitos tóxicos causados pelos contaminantes ambientais, principalmente devido à sua imaturidade física, cognitiva e fisiológica (Lloyd-Smith e Sheffield-Brotherton, 2008; Domínguez-Cortinas *et al.*, 2013). A exposição infantil em fases críticas do desenvolvimento pode trazer graves conseqüências irreversíveis em longo prazo para a saúde (Lloyd-Smith e Sheffield-Brotherton, 2008).

Os metais representam preocupação particular para a saúde das crianças devido à probabilidade relativamente elevada de exposição, uma vez que estão amplamente distribuídos no ambiente, podendo causar efeitos adversos neurológicos e sobre o desenvolvimento infantil (Henn, Coull e Wright, 2014). Além

disso, a exposição a metais raramente ocorre de forma isolada (Kordas *et al.*, 2010). A exposição a múltiplos metais é associada a efeitos adversos sobre o desenvolvimento neurológico (Kim *et al.*, 2013). Sendo assim, estudos avaliando exposições a múltiplos metais são importantes uma vez que a fonte de exposição, em muitos casos, pode ser a mesma (Rhonda Folio, Hennigan e Errera, 1982).

Além dos danos neurológicos, a toxicidade induzida pelos metais pode causar danos ao DNA, danos renais, distúrbios sobre a biossíntese do grupo heme da hemoglobina, entre outros (Landrigan, 1982; Goyer e Clarkson, 1996; Méndez-Gómez *et al.*, 2008; Reyes *et al.*, 2013).

Diante disso, percebe-se a necessidade de se investigar os efeitos adversos provocados pela exposição a contaminantes ambientais, especialmente os metais, sobre a saúde de crianças, principalmente por ser um grupo sensível à toxicidade dessas substâncias. Além disso, é importante se estudar os efeitos da exposição a múltiplos metais nesse grupo, uma vez que existem poucos estudos com este enfoque. Também, a avaliação da presença desses xenobióticos em amostras de água de consumo humano se faz necessária, já que pode possibilitar a investigação de uma possível fonte de exposição. Dessa forma, o presente trabalho realizou a quantificação de alguns metais em amostras biológicas (sangue e cabelo) de crianças da área rural e da área urbana da região central do RS, bem como realizou a avaliação de alguns biomarcadores de exposição a esses xenobióticos e avaliação da função cognitiva. A quantificação dos metais na água de consumo humano também foi realizada.

Objetivo geral

- ✓ Avaliar a possível relação entre a exposição a metais e déficit cognitivo em crianças residentes na área rural da região central do Rio Grande do Sul (RS).

Objetivos específicos

- ✓ Avaliação neuropsicológica, através da aplicação de teste cognitivo (Teste Matrizes Progressivas Coloridas de Raven) em crianças da área rural e área urbana;
- ✓ Quantificar metais tóxicos e elementos essenciais em amostras de sangue e cabelo, bem como quantificar metais em amostras de água das residências das crianças, utilizando espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) como metodologia;
- ✓ Realizar uma comparação dos níveis de metais em amostras biológicas entre crianças da área rural e da área urbana do centro do Estado;
- ✓ Investigar a possível associação entre a exposição infantil a metais e inibição da enzima ALA-D;
- ✓ Investigar a possível associação entre a exposição infantil a metais e a avaliação neuropsicológica.

1. Toxicologia Ambiental e Contaminantes Ambientais

A Toxicologia Ambiental é uma das grandes áreas da Toxicologia. Essa área estuda os efeitos tóxicos de contaminantes ambientais presentes no ar, água e solo, sobre os organismos vivos (OGA, 2008). Segundo um dos princípios da Toxicologia Ambiental, tanto os agentes tóxicos de fontes antropogênicas, como os de origem natural podem causar dano aos organismos, inclusive à saúde humana. As fontes naturais estão relacionadas a fenômenos da natureza, como atividade vulcânica, incêndios florestais não causados pelo homem, entre outros. Por outro lado, as fontes antropogênicas são decorrentes da atividade humana e incluem as fontes industriais, esgoto, lixo doméstico e os agrotóxicos utilizados na agricultura (OGA, 2008).

Os metais são produtos químicos amplamente distribuídos no ambiente, podendo ser encontrados naturalmente, além de poderem ser derivados de fontes antropogênicas, entre elas, os produtos agrícolas (Wang e Fowler, 2008; Kordas *et al.*, 2010). Alguns metais tóxicos, como o mercúrio e o arsênio, fazem parte da composição dos agrotóxicos (Rhonda Folio, Hennigan e Errera, 1982; ATSDR, 1999; ATSDR, 2007). Os agrotóxicos são produtos químicos extensivamente utilizados na agricultura para controlar pestes e insetos que atacam as plantações (Khan *et al.*, 2013). Embora beneficiem amplamente a vida humana através do controle de doenças, estão entre os principais contaminantes ambientais nos dias de hoje (Mostafalou e Abdollahi, 2013). O Brasil é um grande consumidor de agrotóxicos, sendo considerado um dos maiores consumidores mundiais (Benedetti *et al.*, 2013). Estudos têm demonstrado que esses produtos químicos têm a capacidade de causar efeitos adversos à saúde humana e contaminar o ambiente ao mesmo tempo (Khan *et al.*, 2013).

Além disso, acredita-se que, geralmente, a exposição ambiental a metais ocorre a uma mistura desses xenobióticos, e não apenas a metais isolados, os quais podem agir no mesmo alvo através de efeitos sinérgicos (Wang e Fowler, 2008; Kordas *et al.*, 2010).

2. Metais

Uma vez que são substâncias onipresentes no ambiente, a exposição humana a metais torna-se inevitável, independente da segurança com que são usados em processos industriais ou produtos de consumo (De Casarett e Doull, 2012). Ao contrário de outras substâncias tóxicas, os metais não são produzidos nem destruídos pelo homem. Porém, a sua utilização pelos humanos influencia o potencial tóxico para gerar efeitos adversos sobre a saúde de, pelo menos, duas maneiras: (i) transporte ambiental para o ar, água, solo e alimentos, através de contribuições antropogênicas; (ii) alteração da forma química ou especiação de um elemento (Goyer e Clarkson, 1996; De Casarett e Doull, 2012). Portanto, a indestrutibilidade adicionada à bioacumulação dos metais contribui para o aumento da preocupação relacionada aos efeitos tóxicos provocados por esses xenobióticos (De Casarett e Doull, 2012). A exposição ambiental a metais ocorre a partir de diversas fontes, sendo a água e os alimentos as fontes mais comuns de exposição (Bárány *et al.*, 2002a; Dongarrà *et al.*, 2011). A toxicologia dos metais está brevemente resumida na Figura 1.

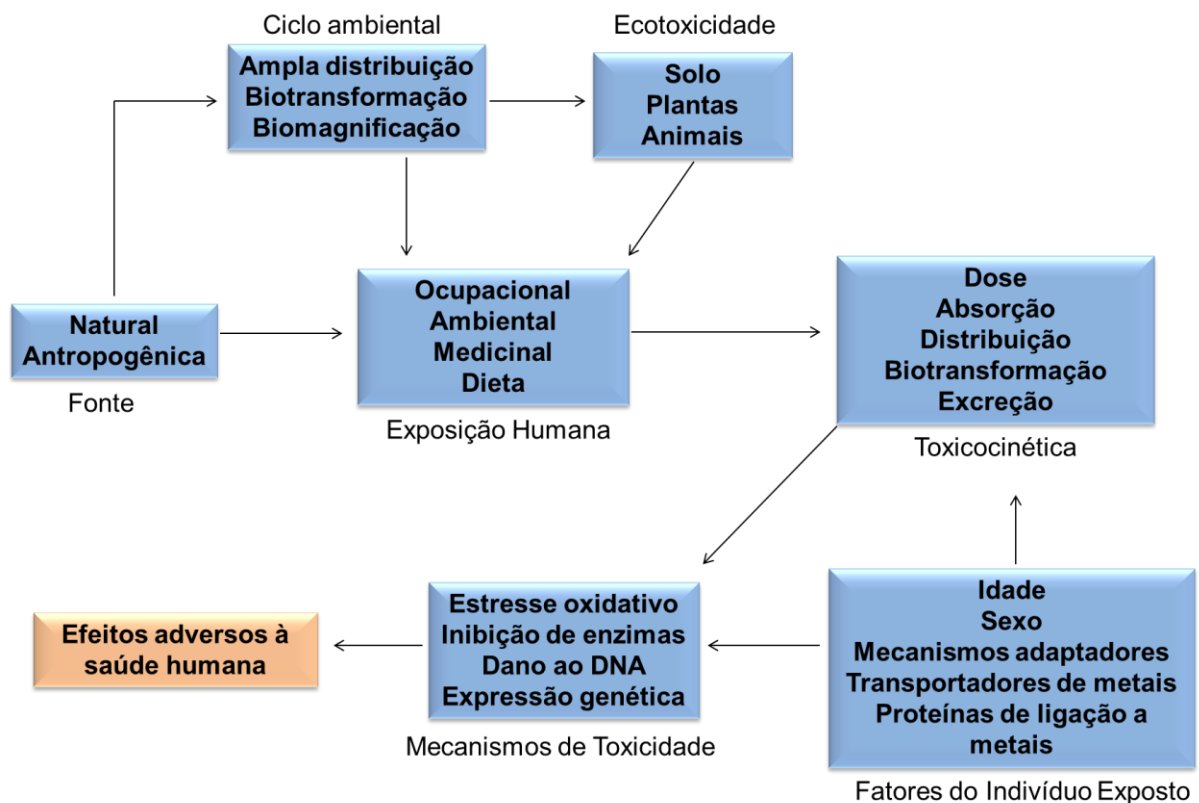


Figura 1. Toxicologia dos metais (Modificado de De Casarett e Doull, 2012).

Diversos efeitos adversos relacionados à exposição ambiental a metais tóxicos como o alumínio (Al), arsênio (As), chumbo (Pb), cromo (Cr) e mercúrio (Hg), têm sido relatados na literatura. Dentre eles, destacam-se a neurotoxicidade e a genotoxicidade induzida por esses xenobióticos (Grandjean *et al.*, 1999; Bouchard *et al.*, 2007; Méndez-Gómez *et al.*, 2008; Kordas *et al.*, 2010; Ciesielski *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2013).

Além disso, alguns metais considerados essenciais para as funções vitais podem induzir toxicidade quando presentes em altas concentrações no organismo, como o manganês (Mn) e o ferro (Fe) (Lee, Andersen e Kaur, 2006; Menezes-Filho *et al.*, 2009).

2.1. Alumínio

Alumínio (Al) é um dos metais mais abundantes na crosta terrestre (Goyer e Clarkson, 1996; WHO, 1996). A água e os alimentos, como frutas, vegetais e carne, além de alimentos e bebidas industrialmente processados, constituem as principais fontes de exposição ao Al na população em geral. Outras fontes para a população incluem os utensílios de cozinha, desodorantes, antiácidos, etc (Abu-Tawel *et al.* 2012). Além disso, esse metal pode ser encontrado na atmosfera sendo proveniente da erosão natural do solo, atividades agrícolas e de mineração (WHO, 1998).

O Al não é um metal essencial para o ser humano, sendo que a principal preocupação se refere a potencial toxicidade associada à exposição excessiva (WHO, 1996). Além disso, é pobremente absorvido através da via oral e pela inalação, sendo que aproximadamente 0,1 % do Al ingerido pela dieta é absorvido pelo organismo. No plasma, 80 a 90 % circula ligado à transferrina e a urina é a principal rota de excreção do metal do organismo (Goyer e Clarkson, 1996; WHO, 1998).

Os principais órgãos afetados pela toxicidade do Al são os pulmões, os ossos e o sistema nervoso central (Goyer e Clarkson, 1996). A neurotoxicidade associada à exposição ao Al é bem relatada em estudos com animais de experimentação, sendo relacionada a disfunções das funções cognitiva e motora, além de anormalidades comportamentais (De Casarett e Doull, 2012).

2.2. Arsênio

O arsênio (As) é classificado com metaloide, uma vez que possui propriedades intermediárias entre metais e não metais. É amplamente distribuído na natureza na forma de diversos compostos, sendo os mais prevalentes as formas inorgânicas trivalente e pentavalente. Além das formas inorgânicas, existem as formas orgânicas, que podem ocorrer na forma metilada como consequência da biometilação de organismos no solo, água fresca e água do mar (Goyer e Clarkson, 1996; ATSDR, 2007).

Cerca de 80 a 90 % do As inorgânico ingerido é absorvido pelo trato gastrointestinal (TGI), distribuindo-se rapidamente no organismo ligado à porção globina da hemoglobina, podendo acumular-se em unhas e cabelo (Goyer e Clarkson, 1996).

Exposição ao As pode ocorrer através do solo, água, alimentos e ar. Crianças expostas ao As podem apresentar os mesmos efeitos adversos que os adultos, tais como irritação das mucosas intestinal e estomacal, problemas dérmicos, além de redução na função nervosa. Existem evidências de que exposição em longo prazo ao As inorgânico em crianças pode levar à diminuição em escores de quociente de inteligência (QI) (ATSDR, 2007).

2.3. Chumbo

O chumbo (Pb) é um metal ubíquo no ambiente, presente naturalmente ou proveniente de atividades industriais. É um metal sabidamente tóxico, levando a danos a diversos órgãos e sistemas, como ao trato gastrointestinal, aos rins, aos sistemas cardiovascular, reprodutivo e hematológico e, principalmente, a efeitos adversos sobre o sistema nervoso central (Goyer e Clarkson, 1996).

A absorção de Pb pelo TGI é de 10 %, enquanto que em crianças essa absorção é de 40 %. Por causa disso, e por se tratarem de um grupo especialmente sensível aos efeitos tóxicos da exposição a metais, existe uma crescente preocupação em relação à exposição de crianças ao Pb (Goyer e Clarkson, 1996).

Baixos níveis de Pb podem ser encontrados no solo, água e alimentos. O Centro para Controle de Prevenção de Doenças americano (CDC) estabelece que

níveis sanguíneos de Pb em crianças não devem exceder 10 µg/dL (Bijoor, Sudha e Venkatesh, 2012). No entanto, recentemente, aumentaram os dados na literatura evidenciando que crianças com concentrações sanguíneas de Pb < 10 µg/dL apresentam redução no desenvolvimento cognitivo, incluindo déficits de QI e baixa performance acadêmica (Liu *et al.*, 2013; Vigeh *et al.*, 2014). Em relação aos efeitos do Pb sobre o sistema hematológico, acredita-se que a inibição da enzima δ-aminolevulinato desidratase (ALA-D) seja o mais sensível, podendo levar, por exemplo, ao desenvolvimento de anemia (Goyer e Clarkson, 1996).

2.4. Cromo

O cromo (Cr) existe na natureza em duas formas químicas, a trivalente (Cr³⁺) e a hexavalente (Cr⁶⁺), sendo a última associada aos efeitos nocivos causados pela exposição ao metal. O Cr⁶⁺ é considerado extremamente tóxico aos sistemas biológicos, enquanto o Cr³⁺ é considerado um elemento essencial para o bom funcionamento do organismo humano. O Cr pode ser lançado no ambiente a partir da queima do gás natural, óleo e carvão (Goyer e Clarkson, 1996; ATSDR, 2012).

O Cr⁶⁺ é classificado como um importante carcinogênico humano pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC). Acredita-se que os efeitos adversos atribuídos à exposição em adultos são os mesmos em crianças, sendo que ainda não se sabe se as crianças são mais sensíveis do que os adultos aos efeitos causados pelo Cr (ASTDR, 2012).

2.5. Ferro

A deficiência de ferro (Fe) é um grave problema em crianças, uma vez que leva ao desenvolvimento de anemia. Essa deficiência está, principalmente, relacionada à dieta inadequada, especialmente em países em desenvolvimento (Low *et al.*, 2013).

Pouco se sabe quais efeitos adversos relacionados ao excesso de Fe no organismo podem estar relacionados à saúde infantil. Um estudo recente demonstrou que a suplementação com esse elemento na infância pode levar a danos cognitivos no futuro (Lozoff *et al.*, 2012). Por outro lado, existem evidências

de efeitos benéficos resultantes da suplementação com Fe para a função cognitiva infantil (Low *et al.*, 2013).

2.6. Manganês

Manganês (Mn) é um elemento essencial que ocorre naturalmente na natureza. É considerado essencial, pois é um constituinte de diversas enzimas importantes do organismo. Manganês existe nas formas orgânica e inorgânica, sendo que a forma inorgânica pode estar presente na indústria química, indústria têxtil e de couro e na composição de fertilizantes (ATSDR, 2012; WHO, 1996).

A absorção pelo TGI é de cerca de 5 %, após é transportado pelo plasma ligado a proteínas, sendo distribuído por todo o organismo. No organismo, Mn apresenta a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica podendo se acumular no cérebro (Goyer e Clarkson, 1996). O aumento de Mn no cérebro pode causar injúria neuronal, podendo resultar na diminuição no número de neurônios dopaminérgicos (Dorman *et al.*, 2006). Elevadas concentrações de Mn no cabelo de crianças têm sido relacionadas a desordens cognitivas (Kordas *et al.*, 2010; Riojas-Rodríguez *et al.*, 2010).

2.7. Mercúrio

Mercúrio (Hg) é um metal sabidamente tóxico, existindo em diversas formas químicas no ambiente com diferentes perfis toxicológicos (Grotto *et al.*, 2010). O mercúrio metálico é encontrado na natureza na forma líquida em temperatura ambiente. O vapor de mercúrio (Hg⁰) é mais perigoso do que a forma líquida. Se inalado, o vapor difunde pelos pulmões, sendo distribuído para a corrente sanguínea, atravessando a barreira hematoencefálica, levando a danos neurológicos (De Casarett e Doull, 2012).

No ambiente, ocorre a metilação do Hg formando as formas metiladas do metal, sendo o metilmercúrio a mais tóxica e mais importante quando se trata de exposição humana. Isto porque, a exposição ao metilmercúrio pode ocorrer através da dieta com consumo de peixes, uma vez que esses animais bioacumulam o mercúrio através da cadeia alimentar (De Casarett e Doull, 2012). Além disso,

formas orgânicas do Hg são usadas como pesticidas em produtos agrícolas (ATSDR, 1999). Estudos têm evidenciado déficits no neurodesenvolvimento e em funções neuropsicológicas em crianças e adultos relacionados à exposição ao Hg através da dieta (Grotto *et al.*, 2010). Em um estudo com crianças brasileiras da região da Amazônia, foram evidenciados decréscimos na performance em testes neuropsicológicos associados ao consumo de dieta rica com metilmercúrio (Grandjean *et al.*, 1999).

3. Monitorização ambiental e biomonitoramento

A exposição humana a contaminantes ambientais pode ser mensurada através da quantificação dos xenobióticos em amostras de ar, água e solo, denominada monitorização ambiental (Kuno, Roquetti e Gouveia, 2010). A determinação dos agentes presentes no ambiente permite avaliar o risco à saúde, comparando-se os resultados obtidos com referências apropriadas (OGA, 2008).

A contaminação da água de consumo humano traz riscos à saúde. Em países em desenvolvimento, há uma grande preocupação quanto ao escoamento de produtos agrícolas para as fontes de água (Krishna e Mohan, 2013). Além disso, diversos estudos têm correlacionado concentrações elevadas de metais na água com altas concentrações em amostras biológicas e com danos neurológicos, especialmente em crianças (Kazi *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2012).

Já o monitoramento biológico, também conhecido como “biomonitorização humana”, consiste na quantificação dos contaminantes ambientais e/ou de seus metabólitos em amostras biológicas da população exposta com o intuito de avaliar a exposição e o risco à saúde comparando-se os resultados obtidos com referências apropriadas (OGA, 2008; Kuno, Roquetti e Gouveia, 2010). Entre os principais fatores que provocaram o avanço do monitoramento biológico nos últimos anos, está o aumento no interesse das atividades de prevenção, como a principal maneira de se limitar as patologias relacionadas ao ambiente (Pivetta *et al.*, 2001).

O monitoramento ambiental combinado ao biomonitoramento fornece uma relação direta entre a exposição e possíveis efeitos adversos à saúde. Tal medida é obtida através dos “marcadores biológicos” ou “biomarcadores”, que refletem as alterações moleculares e celulares que ocorrem em um organismo. Os

biomarcadores de exposição e de efeito são os mais utilizados (Kuno, Roquetti e Gouveia, 2010).

4. Biomarcadores de exposição a metais

As concentrações de metais em amostras biológicas como sangue, urina e cabelo, constituem biomarcadores de exposição utilizados largamente quando se trata de exposição ambiental ou ocupacional a metais (Rodrigues *et al.*, 2008; De Casarett e Doull, 2012). No entanto, a escolha da matriz biológica depende de diversos fatores, tais como a toxicocinética, o procedimento de coleta, considerando a conveniência e se a coleta é invasiva ou não invasiva. Sendo assim, a seleção apropriada da amostra e a quantificação dos biomarcadores constituem critérios de extrema importância na prevenção de patologias e tomada de medidas frente à exposição a metais (Rodrigues *et al.*, 2008).

A amostra de escolha para biomonitoramento da exposição ambiental ou ocupacional a metais é o sangue total, principalmente para alguns metais como Pb, Hg e Cd, uma vez que estão ligados às células vermelhas (Bárány *et al.*, 2002b). Já no plasma, os metais estão ligados a proteínas (Ingvara Bergdahl *et al.*, 1997). O plasma ou soro não são amostras adequadas, pois os metais estão presentes em concentrações maiores no sangue total, sendo mais facilmente detectados nessa matriz através das técnicas convencionais (Bárány *et al.*, 2002b). No entanto, as concentrações no plasma/soro representam interesse, pois refletem a fração de metais que está em transporte para os tecidos (Ingvara Bergdahl *et al.*, 1997).

O cabelo constitui uma matriz importante para determinação das concentrações de metais em estudos de exposição ambiental uma vez que é uma amostra não invasiva (Kordas *et al.*, 2010). Além disso, permite que elementos traços possam ser determinados por uma variedade de técnicas analíticas, devido às maiores concentrações encontradas, quando comparado com tecidos ou outros fluidos corporais (Carneiro *et al.*, 2002). Adicionalmente, é uma amostra fácil de coletar e transportar, além de refletir uma exposição crônica devido ao acúmulo dos metais na queratina do cabelo (Rhonda Folio, Hennigan e Errera, 1982; Carneiro *et al.*, 2002; Kordas *et al.*, 2010; Serdar *et al.*, 2012).

5. Efeitos neurológicos dos metais sobre a saúde infantil

Os fatores ambientais contribuem com uma parcela significativa sobre os determinantes para a saúde infantil (Mello-Da-Silva e Fruchtengarten, 2005). Tendo em vista que as crianças têm muitos anos de vida pela frente, as repercussões decorrentes da exposição ambiental a xenobióticos na infância poderão ocorrer após anos, com efeitos em longo prazo, como o desenvolvimento de asma, desordens sexuais e endócrinas e câncer (Landrigan *et al.*, 1998). Em curto prazo, podem ser observados danos neurológicos, incluindo dificuldades de aprendizagem e outros distúrbios cognitivos e comportamentais (Mello-Da-Silva e Fruchtengarten, 2005).

As crianças representam um grupo especial em relação à vulnerabilidade aos efeitos tóxicos dos contaminantes ambientais. Quando comparadas aos adultos, as crianças apresentam algumas particularidades que as tornam mais susceptíveis aos efeitos adversos dos xenobióticos ambientais: (i) respiram mais ar, comem e bebem mais por peso corporal; (ii) os sistemas (nervoso, endócrino, reprodutivo, imune e respiratório) são imaturos e mais sensíveis a danos irreversíveis; (iii) possuem o hábito de brincar e se locomover próximo ao solo e colocar objetos na boca; (iv) possuem sistema de detoxificação imaturo (Lloyd-Smith e Sheffield-Brotherton, 2008; Landrigan e Goldman, 2011).

Os metais representam preocupação para a saúde infantil, sendo que a exposição pode ocorrer através do ar, água e solo (Kordas *et al.*, 2010). O primeiro relato na literatura relacionando metais a distúrbios neurológicos foi um estudo que demonstrou que a exposição de crianças ao Pb levou a decréscimos de QI e a uma série de desordens comportamentais relacionadas à atenção (Needleman *et al.*, 1979). A partir de então, diversos estudos têm comprovado a neurotoxicidade do Pb em crianças (Ahamed *et al.*, 2008; Bijoor, Sudha e Venkatesh, 2012; Caravanos *et al.*, 2013).

Estudo recente demonstrou que a exposição ao Al durante a gravidez e a lactação, pode afetar o desenvolvimento do feto e trazer consequências negativas ao desenvolvimento cerebral no período perinatal (Abu-Taweel, Ajarem e Ahmad, 2012). Adicionalmente, Mn e As têm sido relacionados a disfunções neuropsicológicas em crianças (Wright *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2013). O Cr é outro metal tóxico amplamente estudado em relação aos potenciais efeitos adversos

à saúde das crianças, sendo que altos níveis sanguíneos desse metal foram associados a implicações no crescimento físico e desenvolvimento infantil (Xu *et al.*, 2013). Neurotoxicidade também tem sido relacionada aos níveis de Hg em crianças expostas (Grandjean *et al.*, 1999).

Além disso, atualmente, acredita-se que os efeitos adversos à saúde das crianças podem ser potencializados através da exposição a múltiplos metais presentes no ambiente (Carpenter, Arcaro e Spink, 2002; Kordas *et al.*, 2010). A co-exposição a metais tóxicos está relacionada com déficit cognitivo, prejudicando o desenvolvimento normal e a aprendizagem de crianças (Kordas *et al.*, 2010).

6. Efeitos dos metais sobre a atividade da ALA-D

δ-Aminolevulinato desidratase (ALA-D) é uma enzima envolvida na condensação de duas moléculas de ácido δ-aminolevulínico (ALA) para formar o porfobilinogênio (PBG), composto monopirrólico envolvido na biossíntese do grupo heme da hemoglobina (Figura 2). (Lombardi, Peri e Verrengia Guerrero, 2010; Rocha *et al.*, 2012). Nas células, compostos monopirrólicos, como o PBG, são precursores para a síntese de compostos tetrapirrólicos, tais como o grupo heme da hemoglobina e a clorofila, essenciais para o metabolismo aeróbico e fixação de carbono. Dessa forma, substâncias tóxicas que inibam ou interfiram na síntese desses compostos tetrapirrólicos podem trazer graves consequências para o metabolismo celular (Rocha *et al.*, 2012).

A ALA-D é uma metaloenzima, que requer grupamentos tiólicos (-SH) reduzidos para a sua atividade (Grotto *et al.*, 2010). Esses grupamentos estão envolvidos na coordenação de íons essenciais de zinco (Zn^{+2}), sendo que a remoção de zinco por elementos quelantes pode acelerar a auto oxidação da enzima (Rocha *et al.*, 2012). Além disso, a ALA-D é altamente sensível a compostos pró-oxidantes, os quais agem nos seus grupamentos -SH, levando à diminuição da sua atividade (Baierle *et al.*, 2010). Por causa disso, ALA-D tem sido sugerida como um biomarcador para o estresse oxidativo (Valentini *et al.*, 2007). O acúmulo do substrato ALA gerado a partir da inibição da enzima também tem sido associado à indução de eventos pró-oxidantes, através da geração de radicais livres a partir de sua auto-oxidação (Valentini *et al.*, 2007; Ahamed *et al.*, 2008). Portanto, agentes

que oxidam os grupamentos –SH, metais com alta afinidade por esses grupamentos ou que competem com o sítio do Zn^{+2} podem provocar a inibição da ALA-D (Rocha *et al.*, 2012).

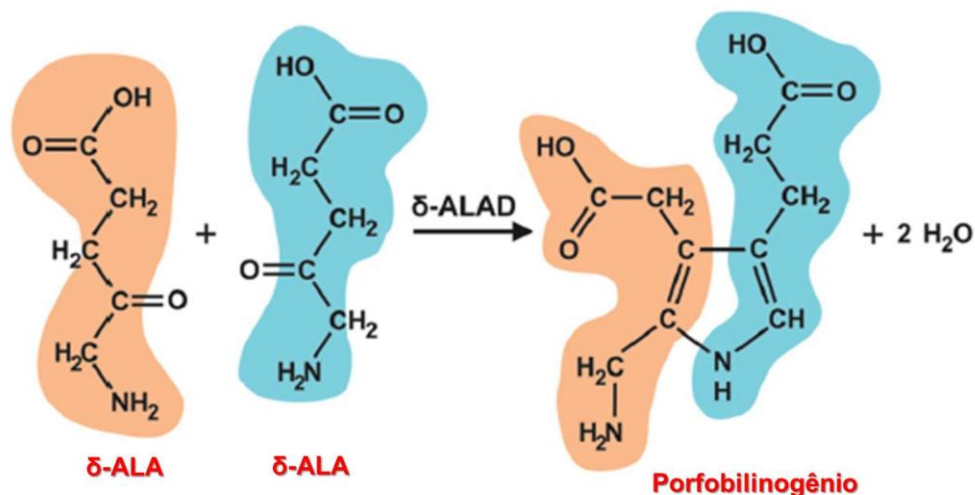


Figura 2. Síntese de porfobilinogênio (PBG) a partir de duas moléculas de δ-aminolevulínico (ALA). δ-Aminolevulinato desidratase (ALA-D) é a enzima responsável pela condensação das moléculas de ALA para formação do PBG (Modificado de Rocha *et al.*, 2012).

Sabe-se que alguns metais, tais como Al, Pb e Hg, possuem alta afinidade pelos grupamentos tiólicos da ALA-D (Valentini *et al.*, 2007; Rocha *et al.*, 2012). Dentre os efeitos hematológicos da exposição ao Pb, o mais sensível é a inibição da enzima ALA-D. A diminuição na atividade da ALA-D e conseqüente aumento na produção do ALA, correlacionam com aumento nas concentrações sanguíneas de Pb e excreção urinária de ALA. Portanto, representam indícios bioquímicos de exposição ao Pb (Goyer e Clarkson, 1996). Atualmente, a quantificação sanguínea da atividade da ALA-D tem sido considerada um importante biomarcador clínico para exposição ao Pb (Rocha *et al.*, 2012). A anemia é um dos principais sinais decorrentes da inibição da ALA-D, uma vez que metais como o Pb interferem com a síntese do grupo heme da hemoglobina (Goyer e Clarkson, 1996). Um estudo demonstrou que crianças que apresentavam anemia aplástica, tinham níveis sanguíneos de Pb significativamente elevados quando comparadas a um grupo controle (Ahamed *et al.*, 2011). Adicionalmente, existem evidências de que o substrato ALA é neurotóxico, portanto, a inibição da ALA-D pode estar relacionada a efeitos neurológicos (Krieg Jr *et al.*, 2009). Ahamed *et al.* (2008) demonstrou que a atividade da ALA-D foi significativamente menor em crianças com desordens

neurológicas, como paralisia cerebral, convulsões e encefalopatias, e com concentrações sanguíneas de Pb superiores do que em crianças sem essas desordens.

Metais como o Pb, Hg e Cd, também podem influenciar a síntese de clorofila em plantas, por se tratar de um grupo tetrapirrólico como o grupo heme. Um estudo com uma espécie de planta demonstrou que o tratamento com Cr levou ao aumento nos níveis de ALA e consequente diminuição na quantidade de clorofila, pela inibição da ALA-D causada pelo metal (Vajpayee *et al.*, 2000). No entanto, não existem evidências na literatura comprovando o envolvimento do Cr com a inibição da enzima ALA-D em humanos.

Além disso, em estudos com humanos, tem-se utilizado o parâmetro índice de reativação da enzima ALA-D (ALA-RE), que avalia a relação da inibição da ALA-D por agentes oxidantes (Grotto *et al.*, 2010). Alguns agentes, tais como o ditioneitol (DTT) e $ZnCl_2$, podem ser utilizados em reações *in vitro* para prevenir e/ou reverter a atividade inibida da ALA-D, representando a ALA-RE em % de reativação da enzima (Valentini *et al.*, 2007). O DTT é um agente redutor que possui a capacidade de reverter e/ou prevenir a inibição da ALA-D por agentes oxidantes (Valentini *et al.*, 2007). Em um estudo com expostos cronicamente à forma orgânica do Hg através da dieta, o metilmercúrio, Grotto *et al.* (2010) encontraram associação entre níveis aumentados de Hg no sangue e ALA-RE, indicando o envolvimento do metal na inibição da ALA-D via estresse oxidativo, devido à afinidade que possui com os grupamentos tiólicos. Por outro lado, o $ZnCl_2$ é utilizado em reações *in vitro* para proteger ou restaurar a atividade inibida da ALA-D, quando essa inibição está relacionada ao deslocamento do zinco do sítio ativo da enzima devido à oxidação dos grupamentos tiólicos (Brüning *et al.*, 2009).

CAPÍTULO I (ARTIGO):

Cognitive deficits and ALA-D-inhibition in children exposed to multiple metals

Submetido para publicação na revista *Environmental Research*

Crianças são mais sensíveis aos efeitos adversos causados por contaminantes ambientais, tais como os metais, do que os adultos. Dentre esses efeitos adversos, estão os danos ao sistema nervoso central e inibição da enzima δ-aminolevulinato desidratase (ALA-D). Neste trabalho, as concentrações de alguns metais (Al, Pb, Cd, As, Hg, Cr, Mn e Fe) foram quantificadas em amostras de sangue total, soro e cabelo de crianças provenientes de uma área rural e de uma área urbana. Esses elementos também foram quantificados em amostras de água das residências das crianças. A função cognitiva foi avaliada através da aplicação do Teste Matrizes Progressivas Coloridas de Raven. A atividade da enzima ALA-D e o índice de reativação da enzima (ALA-RE) com DTT e com $ZnCl_2$ foram avaliados.

As crianças crescem e se desenvolvem rapidamente, sendo que o seu desenvolvimento pode ser facilmente afetado por substâncias químicas ambientais. Além disso, uma vez que são mais sensíveis aos efeitos adversos dos contaminantes ambientais, existe uma crescente preocupação em relação à exposição infantil a esses xenobióticos (Landrigan *et al.*, 1998).

Os metais estão amplamente distribuídos no ambiente e a exposição infantil a esses xenobióticos ocorre através da inalação, ingestão e absorção. A exposição pode ocorrer através do ar, solo, alimentos e água e, potenciais efeitos sinérgicos da co-exposição a diversos metais sobre a saúde das crianças têm sido estudados (Kordas *et al.*, 2010). As fontes de exposição a múltiplos metais podem variar dependendo da área de exposição (Bárány *et al.*, 2002c). Crianças residentes em área rural podem estar expostas a metais derivados de agrotóxicos, ou até mesmo derivados de emissões geradas pelas maquinarias utilizadas na agricultura (Rhonda Folio, Hennigan e Errera, 1982). Por outro lado, crianças residentes em área urbana podem estar expostas a metais gerados por outras fontes, tais como emissões de veículos e poluição industrial (Rhonda Folio, Hennigan e Errera, 1982; Shi *et al.*, 2011).

Este estudo realizou a quantificação de metais em amostras biológicas de crianças de uma área rural e de uma área urbana. Também, foram quantificados os níveis de metais em amostras de água das residências das crianças, para investigar uma possível fonte de contaminação.

Além disso, o Teste Matrizes Progressivas Coloridas de Raven foi aplicado para avaliar a capacidade intelectual das crianças. Esse é um teste não verbal, cujos resultados são expressos como escores de percentis de QI (Angelini, 1999). Neste estudo, as crianças da área rural apresentaram um menor desempenho no teste em relação às crianças da área urbana, com escores de QI estatisticamente diminuídos no primeiro grupo ($p < 0,001$).

Um dos mais importantes resultados encontrados nesse estudo foram os níveis de Mn elevados nos cabelos das crianças da área rural em relação às crianças da área urbana. Além disso, os níveis de Mn no cabelo foram negativamente correlacionados com o desempenho no teste de Raven ($p < 0,01$). Sabe-se que, o manganês pode se acumular em regiões cerebrais específicas, levando à injúria neuronal, principalmente redução do número de neurônios

dopaminérgicos (Dorman *et al.*, 2006). Nossos resultados foram similares a estudos recentes, cujos altos níveis de Mn no cabelo de crianças também foram inversamente correlacionados com o baixo desempenho em avaliações cognitivas (Riojas-Rodríguez *et al.*, 2010; Carvalho *et al.*, 2013). Adicionalmente, os níveis de Mn no cabelo foram positivamente correlacionados com os níveis do metal encontrados nas amostras de água, refletindo que essa pode ser uma provável fonte de exposição. Estudos prévios demonstraram associação entre níveis aumentados de Mn no cabelo e água e déficits cognitivos em crianças expostas (Bouchard *et al.*, 2007; 2011).

O Mancozeb é um importante agrotóxico amplamente utilizado em atividades agrícolas, como o cultivo de tabaco, sendo o manganês um dos seus principais constituintes (Kimura *et al.*, 2005; Brody *et al.*, 2013; Mora *et al.*, 2014). A presença de Mn em águas contaminadas pode refletir os resíduos de mancozeb lançados a partir de práticas agrícolas (Mora *et al.*, 2014). Portanto, nossos resultados reforçam o potencial efeito adverso sobre o sistema nervoso central gerado pela exposição a concentrações elevadas de Mn em crianças, especialmente através da água, em crianças residentes em área rural.

Correlações negativas também foram observadas entre os níveis de Fe no cabelo das crianças e o desempenho das crianças no teste de Raven ($p < 0,01$). Ainda existem controvérsias quanto aos potenciais efeitos da suplementação com ferro na infância (Lozoff *et al.*, 2012; Low *et al.*, 2013). Porém, sabe-se que, quando presente em altas concentrações, esse elemento pode acumular-se no cérebro, além de estar relacionado com o desencadeamento de doenças neurodegenerativas (Schroeder, Figueiredo e De Lima, 2013). Os níveis de Fe no cabelo também foram correlacionados positivamente com os níveis de Fe na água, sugerindo esta como uma provável fonte de exposição.

O mercúrio também é um metal sabidamente neurotóxico e seus níveis sanguíneos correlacionaram negativamente com os escores de QI das crianças ($p < 0,05$). Esse metal foi utilizado em misturas de agrotóxicos no passado. Sendo assim, solos onde esses tipos de xenobióticos foram utilizados podem estar contaminados (ATSDR, 1999). O solo contaminado pode colocar em risco a saúde das crianças, uma vez que se torna uma fonte de exposição.

Quanto ao Cr, correlação negativa foi também observada entre os níveis sanguíneos do metal e os escores de QI das crianças ($p < 0,05$). Sabe-se que o sistema nervoso central é um dos principais alvos da toxicidade induzida pelo cromo (ATSDR, 2012). Além disso, nossos resultados demonstraram que os níveis de Cr nas amostras de água das residências das crianças da área rural foram significativamente elevados em comparação com os níveis do metal nas residências das crianças da área urbana ($p < 0,05$), sugerindo a água como uma provável fonte de exposição ao cromo na área rural.

Adicionalmente, a atividade da enzima ALA-D foi investigada neste estudo, uma vez que se sabe que alguns metais, como o Pb e Al, tem a capacidade de inibir a atividade dessa enzima, através da ligação a seus grupos tiólicos ($-SH$) (Valentini *et al.*, 2007). Os resultados desse estudo demonstraram que as crianças da área rural apresentaram a atividade da enzima ALA-D inibida em relação às crianças da área urbana. Paralelamente, essa inibição foi correlacionada com altos níveis sanguíneos de Cr ($p < 0,05$). Apesar de diversos relatos na literatura sobre a inibição da ALA-D por metais tóxicos, esse foi o primeiro relato de inibição da enzima pelo Cr. A inibição da ALA-D pode levar à anemia, uma vez que a enzima está envolvida na rota biossintética do grupo heme da hemoglobina (Goyer e Clarkson, 1996; Valentini *et al.*, 2007).

Além disso, o índice de reativação da ALA-D (ALA-RE) foi avaliado nesse estudo utilizando o DTT, um potente agente redutor. Os resultados demonstraram que as crianças da área rural apresentaram um aumento na reativação da enzima, em comparação com as crianças da zona urbana, suportando a hipótese de que a inibição da ALA-D está relacionada à oxidação dos grupos tiólicos da enzima. A ALA-RE também foi avaliada utilizando-se o $ZnCl_2$. Uma vez que a ALA-D é uma metaloenzima, tem sido reportado que a oxidação dos seus grupamentos tiólicos leva à liberação do zinco (Brüning *et al.*, 2009). De fato, nossos resultados demonstraram que a ALA-RE com $ZnCl_2$ foi aumentada nas crianças da área rural em relação às crianças da área urbana ($p < 0,05$). Também, os níveis sanguíneos de Cr e Hg foram correlacionados positivamente com a ALA-RE com DTT e $ZnCl_2$ ($p < 0,05$), refletindo o possível envolvimento desses metais na inibição da enzima. Resultados similares foram demonstrado em um estudo de Grotto *et al.* (2010), onde

os níveis sanguíneos de Hg em uma população exposta ao metal através da dieta foram correlacionados com a ALA-RE utilizando o DTT.

Este estudo teve algumas limitações. Primeiramente, o número de amostras de sangue total não foi o mesmo que o número de amostras de soro, uma vez que algumas coletas de soro foram difíceis. Além disso, alguns meninos da área rural tinham o cabelo muito curto, o que inviabilizou a coleta dessa amostra biológica, diminuindo o número de amostras de cabelo no grupo de crianças da área rural. Adicionalmente, a falta de valores de referências para concentrações de metais em amostras de crianças foi um dos principais fatores limitantes. Dessa forma, foram utilizados os valores de referência preconizados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 1996). Para amostras de cabelo, foram utilizados valores de referência estabelecidos para a população brasileira em um estudo utilizando ICP-MS como metodologia (Miekelay *et al.*, 1998).

CONCLUSÕES

- ✓ Este estudo demonstra que tanto crianças da área rural quanto crianças da área urbana estão expostas a múltiplos metais, avaliados nesse estudo em diferentes amostras biológicas.
- ✓ A água pode ser sugerida como uma importante fonte de exposição a esses xenobióticos.
- ✓ Este estudo demonstrou que é importante investigar as fontes de exposição a metais e tomar medidas preventivas para eliminar ou minimizar os riscos dos efeitos adversos relacionados à exposição excessiva a múltiplos metais em crianças.
- ✓ Alguns efeitos adversos da exposição infantil a metais foram demonstrados nesse estudo, tais como a déficit cognitivo e inibição da enzima ALA-D associados a alguns desses elementos, especialmente Mn, Fe, Cr e Hg, especialmente em crianças da área rural.
- ✓ Mais estudos são necessários investigando diferentes áreas de contaminação ambiental a metais, identificando prováveis fontes de exposição, especialmente estudos envolvendo crianças, por se tratarem de um grupo especialmente sensível à toxicidade desses xenobióticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-TAWEEL, G. M.; AJAREM, J. S.; AHMAD, M. Neurobehavioral toxic effects of perinatal oral exposure to aluminum on the developmental motor reflexes, learning, memory and brain neurotransmitters of mice offspring. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 101, n. 1, p. 49-56, 2012. ISSN 0091-3057.

AHAMED, M. et al. Oxidative stress and neurological disorders in relation to blood lead levels in children. **Redox Report**, v. 13, n. 3, p. 117-122, 2008. ISSN 1351-0002.

ANGELINI, A. et al. **Manual Matrizes Progressivas Coloridas de Raven: escala especial**. São Paulo, 1999.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological profile for arsenic. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. 2007. Disponível em <<http://www.atsdr.cdc.gov>>.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological profile for chromium. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. 2012. Disponível em <<http://www.atsdr.cdc.gov>>.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological profile for manganese. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. 2012. Disponível em <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp151.pdf>>.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological profile for mercury. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. 1999. Disponível em <<http://www.atsdr.cdc.gov>>.

BAIERLE, M. et al. Possíveis efeitos do cobre sanguíneo sobre parâmetros hematológicos em idosos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 6, p. 463-470, 2010.

BÁRÁNY, E. et al. Trace elements in blood and serum of Swedish adolescents: relation to gender, age, residential area, and socioeconomic status. **Environmental research**, v. 89, n. 1, p. 72-84, 2002a. ISSN 0013-9351.

BÁRÁNY, E. et al. Trace element levels in whole blood and serum from Swedish adolescents. **Science of the total environment**, v. 286, n. 1, p. 129-141, 2002b. ISSN 0048-9697.

BÁRÁNY, E. et al. Relationships between trace element concentrations in human blood and serum. **Toxicology letters**, v. 134, n. 1, p. 177-184, 2002c. ISSN 0378-4274.

BARTON, H. Predicted intake of trace elements and minerals via household drinking water by 6-year-old children from Krakow, Poland. Part 3: Aluminium. **Food additives and contaminants**, v. 25, n. 5, p. 588-603, 2008. ISSN 1944-0049.

BENEDETTI, D. et al. Genetic damage in soybean workers exposed to pesticides: evaluation with the comet and buccal micronucleus cytome assays. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 752, n. 1, p. 28-33, 2013. ISSN 1383-5718.

BIJLOOR, A. R.; SUDHA, S.; VENKATESH, T. Neurochemical and neurobehavioral effects of low lead exposure on the developing brain. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 27, n. 2, p. 147-151, 2012. ISSN 0970-1915.

BOUCHARD, M. et al. Hair manganese and hyperactive behaviors: pilot study of school-age children exposed through tap water. **Environmental Health Perspectives**, v. 115, n. 1, p. 122, 2007.

BOUCHARD, M.F. et al. Intellectual impairment in school-age children exposed to manganese from drinking water. **Environmental Health Perspectives**, v. 119, p. 138-143, 2011.

BRODY, A.H. et al. Mancozeb-induced behavioral deficits precede structural neural degeneration. **Neurotoxicology**, v. 34, p. 74-81, 2013.

BRÜNING, C. A. et al. Disubstituted diaryl diselenides inhibit δ -ALA-D and Na⁺, K⁺-ATPase activities in rat brain homogenates in vitro. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 332, n. 1-2, p. 17-24, 2009. ISSN 0300-8177.

CAO, S. et al. Health risks from the exposure of children to As, Se, Pb and other heavy metals near the largest coking plant in China. **Science of The Total Environment**, v. 472, p. 1001-1009, 2014. ISSN 0048-9697.

CARAVANOS, J. et al. The burden of disease from pediatric lead exposure at hazardous waste sites in 7 Asian countries. **Environmental research**, v. 120, p. 119-125, 2013. ISSN 0013-9351.

CARNEIRO, M. et al. Intervalos de referência para elementos menores e traço em cabelo humano para a população da cidade do Rio de Janeiro-Brasil. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 37-45, 2002. ISSN 0100-4042.

CARPENTER, D. O.; ARCARO, K.; SPINK, D. C. Understanding the human health effects of chemical mixtures. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n. Suppl 1, p. 25, 2002.

CARVALHO, C. F. et al. Elevated airborne manganese and low executive function in school-aged children in Brazil. **Neurotoxicology**, 2013. ISSN 0161-813X.

CIESIELSKI, T. et al. Associations between cadmium exposure and neurocognitive test scores in a cross-sectional study of US adults. **Environmental Health**, v. 12, n. 1, p. 13, 2013. ISSN 1476-069X.

COELHO, P. et al. Genotoxic effect of exposure to metal (loid) s. A molecular epidemiology survey of populations living and working in Panasqueira mine area, Portugal. **Environment international**, v. 60, p. 163-170, 2013. ISSN 0160-4120.

DE CASARETT E DOULL. **Fundamentos em Toxicologia**, Segunda edição, Editora AMGH Ltda. Porto Alegre, 2012.

DOMÍNGUEZ-CORTINAS, G. et al. Exposure to chemical mixtures in Mexican children: high-risk scenarios. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 1, p. 351-357, 2013. ISSN 0944-1344.

DONGARRÀ, G. et al. Concentration and reference interval of trace elements in human hair from students living in Palermo, Sicily (Italy). **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 32, n. 1, p. 27-34, 2011. ISSN 1382-6689.

DORMAN, D.C. et al. Application of pharmacokinetic data to the risk assessment of inhaled manganese. **Neurotoxicology**, v. 27, p. 752-764, 2006.

FELIX, J. F. et al. Health in children: A conceptual framework for use in healthy ageing research. **Maturitas**, v. 77, n. 1, p. 47-51, 2014. ISSN 0378-5122.

GAMIÑO-GUTIÉRREZ, S. P. et al. Arsenic and lead contamination in urban soils of Villa de la Paz (Mexico) affected by historical mine wastes and its effect on children's health studied by micronucleated exfoliated cells assay. **Environmental geochemistry and health**, v. 35, n. 1, p. 37-51, 2013. ISSN 0269-4042.

GODSCHALK, R. W.; KLEINJANS, J. Characterization of the exposure–disease continuum in neonates of mothers exposed to carcinogens during pregnancy. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 102, n. 2, p. 109-117, 2008. ISSN 1742-7843.

GOYER, R. A.; CLARKSON, T. W. Toxic effects of metals. **Casarett & Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons, Fifth Edition, Klaassen, CD [Ed]. McGraw-Hill Health Professions Division, ISBN**, v. 71054766, 1996.

GRANDJEAN, P. et al. Methylmercury neurotoxicity in Amazonian children downstream from gold mining. **Environmental Health Perspectives**, v. 107, n. 7, p. 587, 1999.

GROTTO, D. et al. Mercury exposure and oxidative stress in communities of the Brazilian Amazon. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 806–811, 2010.

HENN, B. C.; COULL, B. A.; WRIGHT, R. O. CURRENT OPINION Chemical mixtures and children's health. **Curr Opin Pediatr**, v. 26, p. 000-000, 2014.

INGVARA BERGDAHL, M. et al. Lead concentrations in human plasma, urine and whole blood. **Scand J Work Environ Health**, v. 23, n. 5, p. 359-363, 1997.

JADHAV, S.; SARKAR, S.; TRIPATHI, H. Cytogenetic effects of a mixture of selected metals following subchronic exposure through drinking water in male rats. **Indian journal of experimental biology**, v. 44, n. 12, p. 997, 2006. ISSN 0019-5189.

JIN, Y. et al. Health effects in children aged 3–6 years induced by environmental lead exposure. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 63, n. 2, p. 313-317, 2006. ISSN 0147-6513.

KATIĆ, J.; FUČIĆ, A.; GAMULIN, M. Prenatal, early life, and childhood exposure to genotoxicants in the living environment. **Arhiv za higijenu rada i toksikologiju**, v. 61, n. 4, p. 455-463, 2010. ISSN 0004-1254.

KAZI, T. G. et al. Determination of arsenic in scalp hair of children and its correlation with drinking water in exposed areas of Sindh Pakistan. **Biological trace element research**, v. 143, n. 1, p. 153-162, 2011. ISSN 0163-4984.

KHAN, D. A. et al. Pesticide exposure and endocrine dysfunction in the cotton crop agricultural workers of southern Punjab, Pakistan. **Asia-Pacific Journal of Public Health**, v. 25, n. 2, p. 181-191, 2013. ISSN 1010-5395.

KHAN, K. et al. Manganese exposure from drinking water and children's academic achievement. **Neurotoxicology**, v. 33, n. 1, p. 91-97, 2012. ISSN 0161-813X.

KIM, Y. et al. Prenatal lead and cadmium co-exposure and infant neurodevelopment at 6 months of age: the Mothers and Children's Environmental Health (MOCEH) study. **Neurotoxicology**, v. 35, p. 15-22, Mar 2013. ISSN 1872-9711 (Electronic) 0161-813X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23220728>>.

KIMURA, K. et al. Effects of pesticides on the peripheral and central nervous system in tobacco farmers in Malaysia: studies on peripheral nerve conduction, brain-evoked potentials and computerized posturography. **Industrial Health**, v. 43, n. 2, p. 285-294, 2005.

KORDAS, K. et al. Prevalence and predictors of exposure to multiple metals in preschool children from Montevideo, Uruguay. **Science of the total environment**, v. 408, n. 20, p. 4488-4494, 2010. ISSN 0048-9697.

KRIEG JR, E. F. et al. Lead and cognitive function in *ALAD* genotypes in the third National Health and Nutrition Examination Survey. **Neurotoxicology and teratology**, v. 31, n. 6, p. 364-371, 2009. ISSN 0892-0362.

KRISHNA, A. K.; MOHAN, K. R. Risk assessment of heavy metals and their source distribution in waters of a contaminated industrial site. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-17, 2013. ISSN 0944-1344.

KUNO, R.; ROQUETTI, M. H.; GOUVEIA, N. Conceitos e derivação de valores de referência para biomonitorização humana de contaminantes. **Rev Panam Salud Publica**, v. 27, n. 1, p. 75, 2010.

LANDRIGAN, P. J. Occupational and community exposures to toxic metals: lead, cadmium, mercury and arsenic. **Western Journal of Medicine**, v. 137, n. 6, p. 531, 1982.

LANDRIGAN, P. J. et al. Children's health and the environment: a new agenda for prevention research. **Environmental Health Perspectives**, v. 106, n. Suppl 3, p. 787, 1998.

LANDRIGAN, P. J.; GOLDMAN, L. R. Protecting children from pesticides and other toxic chemicals. **Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology**, v. 21, n. 2, p. 119-120, 2011. ISSN 1559-0631.

LEE, D. W.; ANDERSEN, J. K.; KAUR, D. Iron dysregulation and neurodegeneration: the molecular connection. **Molecular Interventions**, v. 6, n. 2, p. 89, 2006. ISSN 1534-0384.

LI, Z. et al. A review of soil heavy metal pollution from mines in China: Pollution and health risk assessment. **Science of The Total Environment**, v. 468, p. 843-853, 2014. ISSN 0048-9697.

LIU, J. et al. Environmental toxicity and poor cognitive outcomes in children and adults. **National Environmental Health Association**, v. 76, n. 6, p. 130-138, 2013.

LLOYD-SMITH, M.; SHEFFIELD-BROTHERTON, B. Children's environmental health: Intergenerational equity in action—A civil society perspective. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1140, n. 1, p. 190-200, 2008. ISSN 1749-6632.

LOMBARDI, P. E.; PERI, S. I.; VERRENGIA GUERRERO, N. R. ALA-D and ALA-D reactivated as biomarkers of lead contamination in the fish *Prochilodus lineatus*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 73, n. 7, p. 1704-1711, 2010. ISSN 0147-6513.

LOW, M. et al. Effects of daily iron supplementation in primary-school-aged children: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Canadian Medical Association Journal**, v. 185, n. 17, p. E791-E802, 2013. ISSN 0820-3946.

LOZOFF, B. et al. Iron-fortified vs low-iron infant formula: developmental outcome at 10 years. **Archives of pediatrics & adolescent medicine**, v. 166, n. 3, p. 208-215, 2012. ISSN 1072-4710.

MASSEY, A. R.; STEELE, J. E. Lead in drinking water: sampling in primary schools and preschools in south central Kansas. **Journal of environmental health**, v. 74, n. 7, 2012. ISSN 0022-0892.

MELLO-DA-SILVA, C. A.; FRUCHTENGARTEN, L. Riscos químicos ambientais à saúde da criança. **J Pediatr (Rio J)**, v. 81, n. s5, 2005.

MÉNDEZ-GÓMEZ, J. et al. Genotoxic effects of environmental exposure to arsenic and lead on children in region Lagunera, Mexico. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1140, n. 1, p. 358-367, 2008. ISSN 1749-6632.

MENEZES-FILHO, J. A. et al. High levels of hair manganese in children living in the vicinity of a ferro-manganese alloy production plant. **Neurotoxicology**, v. 30, n. 6, p. 1207-1213, 2009. ISSN 0161-813X.

MIEKELAY, N. et al. How reliable are human hair reference intervals for trace elements? **Science of the Total Environment**, v. 218, p. 9-17, 1998.

MIGLIORE, L.; COPPEDÈ, F. Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 674, n. 1, p. 73-84, 2009. ISSN 1383-5718.

MORA, A.M. et al. Blood and hair manganese concentrations in pregnant women from the infants' environmental health study (ISA) in Costa Rica. **Environmental Science Technology**, v. 48, n. 6, p. 3467-3476, 2014.

MOSTAFALOU, S.; ABDOLLAHI, M. Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms, and perspectives. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 268, n. 2, p. 157-177, 2013. ISSN 0041-008X.

NEEDLEMAN, H. L. et al. Deficits in psychologic and classroom performance of children with elevated dentine lead levels. **New England journal of medicine**, v. 300, n. 13, p. 689-695, 1979. ISSN 0028-4793.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**, Terceira edição, Editora Atheneu. São Paulo, 2008.

PIVETTA, F. et al. Monitoramento biológico: conceitos e aplicações em saúde pública Biological monitoring: concepts and applications in public health. **Cad. Saúde Pública**, v. 17, n. 3, p. 545-554, 2001.

REYES, J. L. et al. Tight junction proteins and oxidative stress in heavy metals-induced nephrotoxicity. **BioMed research international**, v. 2013, 2013. ISSN 2314-6133.

RHONDA FOLIO, M.; HENNIGAN, C.; ERRERA, J. A comparison of five toxic metals among rural and urban children. **Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological**, v. 29, n. 4, p. 261-269, 1982. ISSN 0143-1471.

RIOJAS-RODRÍGUEZ, H. et al. Intellectual function in Mexican children living in a mining area and environmentally exposed to manganese. **Environmental health perspectives**, v. 118, n. 10, p. 1465, 2010.

ROCHA, J.B.T. et al. Aminolevulinatase dehidrataza (δ -ALA-D) kao marker proteina kod intoksikacije metalima i drugim pro-oksidativnim situacijama. **Toxicology Research**, v. 1, p. 85-102, 2012.

RODRIGUES, A. et al. δ -Aminolevulinatase aktivnost u mladih i odraslih pacova izloženih olovo acetatu. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 57, n. 1, p. 47-53, 1996. ISSN 0007-4861.

RODRIGUES, J. L. et al. Evaluacija upotrebe ljudske kose za biomonitoring deficiencije esencijalnih elemenata i izloženosti toksičnim elementima. **Science of the total environment**, v. 405, n. 1, p. 370-376, 2008. ISSN 0048-9697.

RODRÍGUEZ-BARRANCO, M. et al. Veza izloženosti arseničnom, kadmijem i manganzom s neurodevelopmentom i ponašajnim poremećajima u djeci: sistematski pregled i meta-analiza. **Science of the Total Environment**, v. 454, p. 562-577, 2013. ISSN 0048-9697.

SCHROEDER, N.; FIGUEIREDO, L. S.; DE LIMA, M. N. M. Uloga akumulacije željeza u mozgu u kognitivnim poremećajima: dokaz iz životinjskih modela i ljudskih studija. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 34, n. 4, p. 797-812, 2013. ISSN 1387-2877.

SERDAR, M. A. et al. Veza između pušačkog statusa članova obitelji i koncentracija toksičnih tragova elemenata u kosi djece. **Biological trace element research**, v. 148, n. 1, p. 11-17, 2012. ISSN 0163-4984.

SHI, G. et al. Komparativna studija o zdravstvenom riziku potencijalno toksičnih metala u urbanoj i suburbanjnoj prašini u najgušće naseljenoj gradskoj općini u Kini. **Atmospheric Environment**, v. 45, n. 3, p. 764-771, 2011. ISSN 1352-2310.

TAVARES, T. M.; CARVALHO, F. M. Avaliação de exposição de populações humanas a metais pesados no ambiente: exemplos do Recôncavo Baiano. **Química nova**, v. 15, n. 2, p. 147-154, 1992.

VAJPAYEE, P. et al. Akumulacija kromija (VI) smanjuje biosintezu klorofila, aktivnost nitrata reduktaze i sadržaj proteina u *Nymphaea alba* L. **Chemosphere**, v. 41, n. 7, p. 1075-1082, 2000. ISSN 0045-6535.

VALENTINI, J. et al. Aktivnost δ -aminolevulinatase dehidrataze u eritrocitima i oksidativni stres u hemodijalizi. **Clinical biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 591-594, 2007. ISSN 0009-9120.

VIGEH, M. et al. Niska razina prenatalnog olova u krvi negativno utječe na rano djetinje mentalno razvijanje. **Journal of Child Neurology**, DOI: 10.1177/0883073813516999, 2014.

WANG, G.; FOWLER, B. A. Uloga biomarkera u evaluiranju interakcija između mješavine olova, kadmija i arsena. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 233, n. 1, p. 92-99, 2008. ISSN 0041-008X.

WASSERMAN, G. A. et al. Arsenic and manganese exposure and children's intellectual function. **Neurotoxicology**, v. 32, n. 4, p. 450-457, 2011. ISSN 0161-813X.

WHO. Trace elements in human nutrition and health, **World Health Organization**, Geneva, 1996.

WHO. Guidelines for drinking-water quality. **World Health Organization**, Geneva, 1998.

WOODS, J. S. et al. Modification of neurobehavioral effects of mercury by genetic polymorphisms of metallothionein in children. **Neurotoxicology and teratology**, v. 39, p. 36-44, 2013. ISSN 0892-0362.

WRIGHT, R. O. et al. Neuropsychological correlates of hair arsenic, manganese, and cadmium levels in school-age children residing near a hazardous waste site. **Neurotoxicology**, v. 27, n. 2, p. 210-216, 2006. ISSN 0161-813X.

XU, X. et al. Chromium exposure among children from an electronic waste recycling town of China. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-8, 2013. ISSN 0944-1344.

YOUSEF, S. et al. Learning disorder and blood concentration of heavy metals in the United Arab Emirates. **Asian journal of psychiatry**, v. 6, n. 5, p. 394-400, 2013. ISSN 1876-2018.

ANEXO I

Carta de Confirmação da Submissão do Artigo

De: "ER (ELS)" <er@elsevier.com>
Data: 13/06/2014 10:13
Assunto: Environmental Research Submission: Manuscript Number Assigned
Para: <solange.garcia@ufrgs.br>
Cc:

Ms. No.: ER-14-582

Title: Cognitive deficits and ALA-D-inhibition in children exposed to multiple metals.

Corresponding Author: Prof. Solange Cristina Garcia

Authors: Sabrina Nascimento; Anelise Barth; Gabriela Goethel; Marília Baierle; Mariele Charão; Natália Brucker; Angela Moro; Guilherme Bubols; Johanna Sobreira; Elisa Sauer; Rafael Rocha; Adriana Gioda; Ana Cristina Dias; Jerusa Salles;

Dear Prof. Garcia,

Your submission, referenced above, has been assigned the following manuscript number: ER-14-582

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author:

<http://ees.elsevier.com/er/>

Your username is: solange.garcia@ufrgs.br

For guidelines on how to track your manuscript in EES please go the following address: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/p/7923/a_id/89

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/er/automail_query.asp.

Thank you for submitting your work to Environmental Research.

Kind regards,

Administrative Support Agent
Administrative Support Agent [23-Mar-11]
Environmental Research
er@elsevier.com

ANEXO II

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Meu (minha) filho (a), data de nascimento/....../....., sexo, R.G:....., foi convidado(a) pela profa. Dra. Solange Cristina Garcia a fazer parte de um trabalho científico intitulado “**ESTUDO DA POSSÍVEL INTER-RELAÇÃO ENTRE A EXPOSIÇÃO INFANTIL A DIFERENTES XENOBIÓTICOS AMBIENTAIS DO CULTIVO DO TABACO E EFEITOS SOBRE O DÉFICIT COGNITIVO**”. Neste trabalho serão realizados exames que não costumam ser feitos nos laboratórios de análises clínicas, com o objetivo de avaliar os níveis (medir) dos metais pesados e elementos essenciais, substâncias antioxidantes (substâncias capazes de impedir a ação dos radicais livres, que podem causar doenças). Além dos indicadores biológicos de exposição aos agrotóxicos, metais pesados e outras substâncias químicas presentes no ambiente da cultura do tabaco. Serão necessárias amostras de urina (50mL) e sangue (10mL), coletadas pela manhã (primeira urina da manhã). Além destes exames serão realizadas avaliações neuropsicológicas por um profissional qualificado, questionários sobre hábitos de vida, uso de medicamentos e o estado de saúde das crianças. Isto será necessário para a realização de um trabalho de pesquisa de mestrado, onde serão avaliados os níveis de algumas substâncias tóxicas envolvidas no cultivo do tabaco e a relação com dificuldades de aprendizagem e distúrbios cognitivos em crianças já que não existem muitos estudos na literatura. Fui esclarecido que a participação do meu (minha) filho (a) é de livre e espontânea vontade e que caso aceite, será realizada uma coleta de 10 mL de sangue venoso, com o mínimo de risco já conhecido para esta técnica sem custo para o doador, além de uma amostra de 50 mL de urina e da mucosa bucal. Estou ciente de que receberei os resultados dos exames do meu (minha) filho (a) sem custo, mas não receberei nenhuma outra forma de pagamento e que meu (minha) filho (a) poderá desistir de fazer parte do trabalho a qualquer momento, sem qualquer tipo de constrangimento, restrições ou conseqüências.

Eu terei garantia de não identificação do meu (minha) filha e de caráter confidencial dos resultados. Terei garantia de acesso, em qualquer etapa da pesquisa, aos profissionais responsáveis pela mesma para esclarecimento de eventuais dúvidas acerca de procedimentos, riscos, benefícios, etc, contactando a professora Dra. Solange Cristina Garcia.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas por mim, descrevendo o estudo.

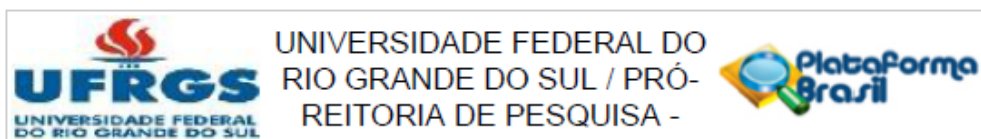
Concordo, voluntariamente, com a participação do meu (minha) filho (a) neste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer hora, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Data: ___/___/___

Assinatura do responsável pela criança

Assinatura do responsável pela pesquisa

ANEXO III



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DA POSSÍVEL INTER-RELAÇÃO ENTRE A EXPOSIÇÃO INFANTIL A DIFERENTES XENOBIÓTICOS AMBIENTAIS DO CULTIVO DO TABACO E EFEITOS SOBRE O DÉFICIT COGNITIVO

Pesquisador: Solange Cristina Garcia

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 11340912.4.0000.5347

Instituição Proponente: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Patrocinador Principal: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 296.467

Data da Relatoria: 06/06/2013

Apresentação do Projeto:

O projeto tem condições de ser aprovado, pois foram atendidas a maioria das pendências apontadas no último parecer. Sugere-se entretanto que no termo de consentimento seja melhor explicitada a questão dos riscos associados à pesquisa. Como já foi colocado anteriormente, os riscos não se resumem à coleta de sangue. Para que fique claro: a coleta de urina, por exemplo, pode causar constrangimento ao sujeito de pesquisa. Também sugere-se que os telefones do CEP-UFRGS e da pesquisadora responsável não sejam colocados no rodapé do termo - pode ser inserida uma frase do tipo "Em caso de dúvida, você pode entrar em contato com o CEP-UFRGS por meio do telefone....., ou com a pesquisa responsável por meio do telefone..."

Objetivo da Pesquisa:

O projeto tem condições de ser aprovado, pois foram atendidas a maioria das pendências apontadas no último parecer. Sugere-se entretanto que no termo de consentimento seja melhor explicitada a questão dos riscos associados à pesquisa. Como já foi colocado anteriormente, os riscos não se resumem à coleta de sangue. Para que fique claro: a coleta de urina, por exemplo, pode causar constrangimento ao sujeito de pesquisa. Também sugere-se que os telefones do CEP-UFRGS e da pesquisadora responsável não sejam colocados no rodapé do termo - pode ser inserida uma frase do tipo "Em caso de dúvida, você pode entrar em contato com o CEP-UFRGS por

meio do telefone....., ou com a pesquisa responsável por meio do telefone..."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O projeto tem condições de ser aprovado, pois foram atendidas a maioria das pendências apontadas no último parecer. Sugere-se entretanto que no termo de consentimento seja melhor explicitada a questão dos riscos associados à pesquisa. Como já foi colocado anteriormente, os riscos não se resumem à coleta de sangue. Para que fique claro: a coleta de urina, por exemplo, pode causar constrangimento ao sujeito de pesquisa. Também sugere-se que os telefones do CEP-UFRGS e da pesquisadora responsável não sejam colocados no rodapé do termo - pode ser inserida uma frase do tipo "Em caso de dúvida, você pode entrar em contato com o CEP-UFRGS por meio do telefone....., ou com a pesquisa responsável por meio do telefone..."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto tem condições de ser aprovado, pois foram atendidas a maioria das pendências apontadas no último parecer. Sugere-se entretanto que no termo de consentimento seja melhor explicitada a questão dos riscos associados à pesquisa. Como já foi colocado anteriormente, os riscos não se resumem à coleta de sangue. Para que fique claro: a coleta de urina, por exemplo, pode causar constrangimento ao sujeito de pesquisa. Também sugere-se que os telefones do CEP-UFRGS e da pesquisadora responsável não sejam colocados no rodapé do termo - pode ser inserida uma frase do tipo "Em caso de dúvida, você pode entrar em contato com o CEP-UFRGS por meio do telefone....., ou com a pesquisa responsável por meio do telefone..."

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto tem condições de ser aprovado, pois foram atendidas a maioria das pendências apontadas no último parecer. Sugere-se entretanto que no termo de consentimento seja melhor explicitada a questão dos riscos associados à pesquisa. Como já foi colocado anteriormente, os riscos não se resumem à coleta de sangue. Para que fique claro: a coleta de urina, por exemplo, pode causar constrangimento ao sujeito de pesquisa. Também sugere-se que os telefones do CEP-UFRGS e da pesquisadora responsável não sejam colocados no rodapé do termo - pode ser inserida uma frase do tipo "Em caso de dúvida, você pode entrar em contato com o CEP-UFRGS por meio do telefone....., ou com a pesquisa responsável por meio do telefone..."

Recomendações:

O projeto tem condições de ser aprovado, pois foram atendidas a maioria das pendências apontadas no último parecer. Sugere-se entretanto que no termo de consentimento seja melhor explicitada a questão dos riscos associados à pesquisa. Como já foi colocado anteriormente, os

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - 2º andar do Prédio da Reitoria - Campus Centro			
Bairro: Farroupilha		CEP: 90.040-060	
UF: RS	Município: PORTO ALEGRE		
Telefone: (51)3308-3738	Fax: (51)3308-4085	E-mail: etica@propeq.ufrgs.br	

Continuação do Parecer: 296.467

riscos não se resumem à coleta de sangue. Para que fique claro: a coleta de urina, por exemplo, pode causar constrangimento ao sujeito de pesquisa. Também sugere-se que os telefones do CEP-UFRGS e da pesquisadora responsável não sejam colocados no rodapé do termo - pode ser inserida uma frase do tipo "Em caso de dúvida, você pode entrar em contato com o CEP-UFRGS por meio do telefone....., ou com a pesquisa responsável por meio do telefone..."

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto tem condições de ser aprovado, pois foram atendidas a maioria das pendências apontadas no último parecer. Sugere-se entretanto que no termo de consentimento seja melhor explicitada a questão dos riscos associados à pesquisa. Como já foi colocado anteriormente, os riscos não se resumem à coleta de sangue. Para que fique claro: a coleta de urina, por exemplo, pode causar constrangimento ao sujeito de pesquisa. Também sugere-se que os telefones do CEP-UFRGS e da pesquisadora responsável não sejam colocados no rodapé do termo - pode ser inserida uma frase do tipo "Em caso de dúvida, você pode entrar em contato com o CEP-UFRGS por meio do telefone....., ou com a pesquisa responsável por meio do telefone..."

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Encaminhe-se.

PORTO ALEGRE, 07 de Junho de 2013

Assinador por:
José Artur Bogo Chies
(Coordenador)