

**ESTUDO METALÔMICO DO MERCÚRIO EM LEITE
MATERNO COLETADO DA POPULAÇÃO RIBEIRINHA DA
ÁREA DE INFLUÊNCIA DO AHE JIRAU - BACIA DO RIO
MADEIRA.**

FELIPE ANDRÉ DOS SANTOS

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Doutor no Programa de Pós-Graduação
em Biologia Geral e Aplicada, Área de
concentração Biomoléculas: Estrutura e Função

Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**ESTUDO METALÔMICO DO MERCÚRIO EM LEITE
MATERNO COLETADO DA POPULAÇÃO RIBEIRINHA DA
ÁREA DE INFLUÊNCIA DO AHE JIRAU - BACIA DO RIO
MADEIRA.**

FELIPE ANDRÉ DOS SANTOS

PROF. DR. PEDRO DE MAGALHÃES PADILHA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Doutor no Programa de Pós-Graduação
em Biologia Geral e Aplicada, Área de
concentração Biomoléculas: Estrutura e Função

Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Santos, Felipe.

Estudo metalômico do mercúrio em leite materno coletado da população ribeirinha da área de influência do AHE Jirau-bacia do rio Madeira / Felipe Santos. - Botucatu, 2013

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Pedro de Magalhães Padilha

Capes: 20801009

1. Leite humano. 2. Amamentação. 3. Mercúrio. 4. Metaloproteínas.

Palavras-chave: Leite materno; Mercúrio; Metaloproteínas; Rondonia.

AUXÍLIO FINANCEIRO:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)



Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)



Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (Capes)



O verdadeiro vencedor é aquele que mesmo nos momentos de dificuldades jamais desiste dos seus objetivos, sabendo que mais a frente a grande vitória chegará.

Marcos Souza

Dedico este trabalho a uma pessoa muito especial Manuel Pereira dos Santos,

Um Homem exemplo de superação e amor

Que você esteja em um lugar melhor!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Aos meus pais, Marilda e Ademir que me deram a vida e me ensinou a vivê-la com dignidade, que iluminaram meus caminhos obscuros com afeto e dedicação para que o trilhasse sem medo, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudesse realizar os meus. Pela longa espera, compreensão e conselhos durante essa fase. Não a palavras que consiga descrever o sentimento e agradecimento que tenho por vocês. Amamos muito vocês! Obrigado.

As minhas irmãs Lívia e Pâmela, obrigado por vocês existirem, vocês são parte da minha vida, simplesmente por dividirmos momentos de alegria, tristeza, ganhos e perdas. Vocês são uma jóia preciosa que jamais encontrarei em outro lugar e nem em outra pessoa. Vou guardar vocês sempre em meu coração. Pois eu nunca serie triste tendo vocês comigo, Obrigado... Não tenho nada que possa recompensar ter uma amizade tão linda assim... Apenas digo obrigado...

AGRADECIMENTO

Primeiramente a Deus, por sempre estar iluminando o meu caminho e tornando possível essa conquista.

A toda minha família, avós, tios, tias, primos por sempre acreditarem em mim e me darem força.

Aos colegas do laboratório: Cilene, José, Paula Lima, Paula Martin, Camila, Bruna, Mariana por toda ajuda.

Aos colegas do departamento, por toda ajuda administrativa e amizade.

A equipe da Venturo, pela ajuda em campo e todo suporte necessário em Porto Velho para a realização desse trabalho.

A Vanessa e Ednaldo pela preocupação e dedicação nas determinações de mercúrio no experimento.

Aos Professores Luis F. Zara, Gustavo R. Castro, Valber A. Pedrosa, pela amizade, ajuda e importantes conselhos para o aperfeiçoamento da tese, muito obrigado.

Ao Professor Julio Rocha, pela amizade, paciência (para os desabafos) e orientação pessoal.

Ao Professor Wilson Jardim, por toda ajuda pessoal e experimental de grande importância para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos GRANDES AMIGOS que se tornaram parte de minha família Welder (TT), Ricardo Zerlin, Fabio Fava, Murillo Longo, Renan Nascente, Jorge Portinho e Rafael Innocenti, valeu galera, honra enorme ter conhecido vocês.

Ao Professor Pedro Padilha por toda ajuda, orientação pessoal, profissional e paciência o que foram de grande importância para a realização deste trabalho.

Ao programa de pós-graduação BGA especialmente ao Davi, pela paciência e ajudas administrativas, ótimo profissional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio ao projeto financiado.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, a minha eterna gratidão..

Muito Obrigado.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS.

IV Congresso Iberoamericano de Química Analítica. Concón/CHL - 2010.

V Congresso Iberoamericano de Química Analítica. Montevideú/URU - 2012.

VII Congresso Argentino de Química Analítica – Mendoza/ARG - 2013.

XVIII Congresso Brasileiro de Toxicologia. Porto Alegre/BRA - 2013.

DISCIPLINAS CURSADAS.

Métodos teóricos e práticos de cristalização de proteínas – 3 créditos

Tópicos Especiais em Biologia Geral e Aplicada – 2 créditos

Metodologia e procedimento analítico utilizados no estudo de amostras de interesse ambiental – 10 créditos

Estratégias analíticas para estudos metalômicos de amostras biológicas – 5 créditos

ARTIGOS PUBLICADOS.

1. MORAES P. M., **SANTOS F. A.**, PADILHA C. C. F., VIEIRA J. C. S., CAVALIINI N., PADILHA P. GFAAS determination of mercury in muscle samples of fish from Amazonas, Brazil. Food Chemistry, v. 141, p. 2614-2617, 2013.

2. Fábio A. Silva, Bruna Cavecci, Welder A. Baldassini, **Felipe A. Santos**, Paula M. Lima, Paula Martin de Moraes, Pedro M. Padilha. Selenium fractionation from plasma, muscle and liver of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Food Measurement and Characterization, p. 100-106, 2013.

3. MORAES, P. M.; **SANTOS, F. A.**; PADILHA, C. C. F.; VIEIRA, J. C. S.; ZARA, L. F.; PADILHA PM. A Preliminary and Qualitative Metallomics Study of Mercury in the Muscle of Fish from Amazonas, Brazil. Biological Trace Element Research, v. 150, p. 195-199, 2012.

4. NEVES, R. C. F.; LIMA, P. M.; BALDASSINI, W. A.; **SANTOS, F. A.**; MORAES, P. M.; CASTRO, G. R.; PADILHA, P. M. Fracionamento de cobre em proteínas do plasma, músculo e fígado de tilápia do Nilo. Química Nova (Impresso), v. 35, p. 493-498, 2012.

5. SANTANA, A. R. ; FERREIRA, G. ; HEIRAS, B. M. ; **SANTOS, F. A.** ; CAETANO, L. ; PADILHA, P. M. ; MARTINES, M. A. V. ; OLIVEIRA, L. C. ; NEVES, R. C. F. ; CASTRO, G. R. . Zinc and lead content and availability in Brazilian soil contaminated with residue of a secondary Smelting Lead Recycling Plantad.. Gazi University Journal of Science, v. 25, p. 601-605, 2012.
6. **SANTOS, F. A.**, LIMA, P. M., NEVES, R.C. F., MORAES, P. M., PÉREZ C. A., SILVA M. A. O., ARRUDA M. A. Z., CASTRO, G. R., PADILHA, P. M. Metallomic study of plasma samples from Nile tilapia using SR-XRF and GFAAS after separation by 2D PAGE: Initial results. Microchimica Acta, v.173, 43-492011.
7. NEVES, R. C. F. ; MORAES, P. M. ; FERRARI, ; LIMA, P. M. ; **SANTOS, F. A.** ; CASTRO, G. R. ; PADILHA, C. C. F. . Levels of copper in Nile tilapia from Brazil. FOOD ADDIT CONTAM B, v. 4, p. 238-243, 2011.
8. CORBI, J. J. ; ZERLIN, R. A. ; **SANTOS, F. A.** ; SANTOS, A. ; FROEHLICH, C. G. ; STRIXINO, S. T. . Assessment of chromium contamination in the Monte Alegre stream: a case study. Brazilian Archives of Biology and Technology.. Brazilian Archives of Biology and Technology (Impresso), v. 53, p. 613-620, 2011.
9. **SANTOS, F. A.** ; NEVES, R. C. F. ; Lima, P. M. ; MORAES, P. M. ; Pérez, C. A. ; Castro, G. R. ; PADILHA PM ; PADILHA PM . Metalloproteomic study of manganese and zinc in plasma sample of nile tilapia (oreochromis niloticus) using D PAGE and SR XRF.. Activity Report (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron), v. 1, p. 4-7, 2010.
10. LIMA, P. M. ; NEVES, R. C. F. ; **SANTOS, F. A.** ; PEREZ, C. A. ; da Silva, M. A. O. ; ARRUDA, M. A. Z. ; CASTRO, G. R. ; PADILHA, P. M. . Analytical approach to the metallomic of Nile tilapia (Oreochromis niloticus) liver tissue by SRXRF and FAAS after 2D-PAGE separation: Preliminary results. Talanta (Oxford), v. 82, p. 1052-1056, 2010.
11. SALEH, M. A. D. ; NEVES, R. C. F. ; MORAES, P. M. ; LIMA, P. M. ; **SANTOS, F. A.** ; SILVA, F. A. ; PADILHA, P. M. . Iron determination by FAAS in fish feed and feces after ultrasound-assisted extraction.. Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety, v. 3, p. 1-6, 2009.
12. Moraes, Paula Martin ; MILANTONIO, R. B. ; CAGNANI, G. S. ; **SANTOS, F. A.** ; PADILHA, C. C. F. ; LIMA, P. M. ; PADILHA, P. M. . Analytical procedure based on slurry sampling for determining selenium in organic vegetable samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry. European Food Research & Technology, v. 229, p. 409-414, 2009.

13. Paula M.; LOUREIRO, V. R. ; PADILHA, P. M. ; NEVES, R. C. F. ; SALEH, M. A. D. ; **SANTOS, F. A.** ; SILVA, F. A. . Determinação de fósforo biodisponível em rações de peixes utilizando extração assistida por ultra-som e espectrofotometria no visível. *Química Nova*, v. 32, p. 923-927, 2009.
14. SANTOS, A. ; Oliveira, L. C. ; Botero, W. G. ; Mendonça, A. G. R. ; **SANTOS, F. A.** ; Rocha, J. C. . Distribuição e biodisponibilidade de cromo em solos contaminados por resíduos de couro. *Química Nova (Impresso)*, v. 32, p. 1693-1697, 2009.
15. SILVA, F. A. ; NEVES, R. C. F. ; **SANTOS, F. A.** ; LIMA, P. M. ; da Silva, M. A. O. ; PEREZ, C. A. ; PADILHA, P. M. ; ARRUDA, M. A. Z. . Evaluation of selenium in protein spots in plasma and muscle and liver tissue of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using SR-XRF after 2D-PAGE separation. *Activity Report (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron)*, v. 2008, p. 136-136, 2009.

LISTA DE ABREVIATURA

AAS – espectrometria de absorção atômica

CHAPS - Sulfato de 3-[(3-cloroaminopropil)-dimetilamônio]-1-propano

CVAAS – Espectrometria de absorção atômica por geração de vapor frio

CVAFS – Espectrometria de fluorescência atômica por geração de vapor frio

Da - dalton

DTT – 1,4-ditiotreitól

ESI – ionização por elctrospray

FAAS – espectrometria de absorção atômica com atomização por chama

FPLC – cromatografia líquida de desempenho rápido

HPLC – cromatografia líquida de alta performance

Hg - mercúrio

HgMe – metil mercúrio

IEF – focalização isoelétrica

IgA – imunoglobulina A

His - histidina

Kcal – quilocaloria

kDa – quilodalton

kV - quilovolt

LC-MS – espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida

m – massa

mA - miliampere

M – molar

mM - milimolar

MALDI – Ionização e dessorção a laser assistida por matriz

MALDI/TOF/MS – espectrometria de massas com ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador tempo-de-vôo

Mbar - milibar

MeCN - acetonitrila

MM – massa molar

Mm - milímetro

MS – espectrometria de massas

MS/MS – espectrometria de massas sequencial

m/z – razão massa/carga

MT – meta...

nano-LC/ESI/MS/MS – espectrômetro de massas com fonte ESI a acoplado a cromatografia líquida nano-capilar

pH – potencial hidrogeniônico

pI – ponto isoelétrico

SDS – dodecil-sulfato de sódio

SDS-PAGE – eletroforese denaturante em gel de poliacrilamida

TEMED – N,N',N,N'-tetrametiletlenodiamina

UPLC – cromatografia líquida de ultra performance

UV – ultravioleta

V - volt

Vh – volt-hora

2D-PAGE – eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida

%Vol – volume normalizado de um spot no gel

RESUMO

Neste trabalho, buscou-se identificar proteínas responsáveis pelo transporte de mercúrio em amostras de leite materno coletadas da população ribeirinha do rio Madeira. Para isso, inicialmente, foi obtido o proteoma das amostras de leite por eletroforese bidimensional (2D PAGE) após precipitação das proteínas em meio acetônico. Nos spots proteicos obtidos no processo de fracionamento das proteínas, nas amostras de cabelo e de leite das lactantes foram feitas determinações de mercúrio por espectrometria de absorção atômica de vapor frio (CVAAS) e espectrofotometria de fluorescência atômica de vapor frio (CVAFS). As determinações por CVAFS indicaram a presença de mercúrio em dois spots proteicos (spot 1, spot 2), os quais foram caracterizados por espectrometria de massas em sequência com ionização por electrospray (ESI MS MS) e por meio de busca no banco de dados *Uniprot*. A análise por ESI MS MS identificaram o spot 1 como sendo a proteína β caseína (pI = 5,52 e MM = 26,01 kDa) e o spot 2 como sendo a proteína Lisozima C (pI = 9,30 e MM = 16,50 kDa). Os resultados obtidos nas determinações de mercúrio nos spots 1 e 2 permitiram estabelecer relação estequiométrica de um átomo de mercúrio por quatro moléculas de β caseína e de um átomo de mercúrio por molécula de lisozima C. Com base nos dados obtidos é possível inferir, no caso da β caseína, que a ligação do mercúrio não é específica, tratando-se de uma proteína *metal-binding*, não configurando o mercúrio como um cofator metálico, o que não desqualifica a β caseína como possível biomarcadora de mercúrio. Em relação a Lisozima C, a presença de metionina (base mole) na sequência peptídica pode estabelecer ligações com íons metálicos com características de ácido mole, como o Hg^{2+} , configurando uma ligação mais estável desse íon com grupos sulfidrilas da Lisozima C e, caracterizando essa proteína como possível biomarcador de mercúrio.

ABSTRACT

In this study, we aimed to identify proteins responsible for the mercury transport in breast milk samples collected from the lactating of Madeira River region, Rondônia - Brazil. For this, we first obtained the proteome of milk samples by two-dimensional electrophoresis (2D PAGE) after proteins precipitation in acetone medium. In the protein spots obtained from proteins fractionation, in hair and milk samples of lactating mercury determinations were carried out by cold vapor atomic absorption spectrometry (CVAAS) and by cold vapor atomic fluorescence spectrophotometry (CVAFS). CVAFS determinations indicated the presence of mercury in two protein spots (spot 1, spot 2), which were characterized by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI MS MS) and by searching in the *Uniprot* database. The ESI MS MS analysis identified the spot 1 as the β casein protein (pI = 5.52 and MM = 26.01 kDa) and spot 2 as the lysozyme C protein (pI = 9.30 and MW = 16, 50 kDa). The results obtained in the mercury determinations in the spots 1 and 2 allowed to establish a stoichiometric ratio of one mercury atom per four molecules of β casein and one mercury atom per of lysozyme C molecule. Based on the obtained data it can be inferred, in the case of β casein, that mercury binding is not specific, treating yourself of a *metal-binding protein*, not configuring the mercury as a metal cofactor what does not disqualify the β casein as a possible mercury biomarker. Regarding lysozyme C, the presence of methionine (soft base) in the peptide sequence can establish links with metal ions with features of soft acid, such as Hg^{2+} , configuring a stable binding of this metal ion with sulfhydryl groups of lysozyme C and, characterizing this protein as a possible mercury biomarker.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Justificativa	1
1.2. Mercúrio	2
1.3. História do mercúrio	3
1.3.1. Mercúrio no rio Madeira	5
1.4. Ciclo hidrobiogeoquímico do mercúrio	6
1.5. Processo de metilação do mercúrio	7
1.6. Toxicidade do mercúrio	8
1.7. Toxicidade do mercúrio frente ao aleitamento materno	10
1.8. Metaloproteínas e proteínas ligadas a metais	11
2. OBJETIVOS	14
2.1. Objetivo Geral	14
2.2. Objetivos Específicos	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Área de estudo	15
3.2. Desenho amostral	16
3.3. Equipamentos e Acessórios	16
3.4. Reagentes e soluções	17
3.5. Descontaminação das vidrarias	20
3.6. Amostras	20
3.6.1. Critérios de elegibilidade	20
3.6.2. Coleta das amostras	21
3.6.3. Processamentos das amostras de cabelo	21
3.6.4. Processamentos das amostras de leite materno	22
3.6.5. Quantificação das amostras de cabelo	22
3.6.6. Processo de digestão das amostras de leite para quantificação de Hg total	23
3.7. Preparação das amostras para eletroforese	24
3.7.1 Precipitação e ressolubilização das proteínas para otimização do gel	24
3.8. Determinação da concentração das proteínas totais	24
3.9. Separações eletroforéticas	25

3.9.1. Separação em primeira dimensão	25
3.9.2. Separação em segunda dimensão	26
3.10. Tratamento de imagens	27
3.11. Processo de digestão dos spots proteicos para quantificação de Hg total	28
3.12. Quantificação das amostras de leite materno e spots proteicos	28
3.13. Caracterização das proteínas por espectrometria de massas (nano-LC/ESI/MS/MS)	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1. Validação do método de determinação de mercúrio total	32
4.2. Determinação de mercúrio total em amostras de cabelo	36
4.3. Determinação de mercúrio total em amostras de leite materno	38
4.4. Determinação de proteína total na solução de ressolubilização dos pellets proteicos das amostras de leite materno	39
4.5. Otimização das corridas eletroforéticas	42
4.5.1. Avaliação e comparação das imagens dos géis	45
4.6. Fracionamento das proteínas por 2D – PAGE da Lactante 16	55
4.7. Quantificação de mercúrio nos spots proteicos da amostra de leite	58
4.8. Caracterização das proteínas por espectrometria de massas	61
5. CONCLUSÃO	64
6. REFERÊNCIAS	65

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVAS

1.1. Justificativa

Os reservatórios utilizados para aproveitamento hidrelétrico desempenham papel importante no desenvolvimento social e econômico de muitos países. Hoje, quase a metade dos rios do mundo tem um reservatório e um terço dos países dependem de usinas hidrelétricas para produzir a maior parte da sua eletricidade. Atualmente, existem cerca de 45.000 grandes reservatórios em todo o globo, com os maiores potenciais hidrelétricos situados em grandes bacias como a do Amazonas, Congo e Mekong [1]. Só no Brasil existem mais de 500 hidrelétricas e isto representa apenas 24% do potencial hidroenergético estimado para o país. Entretanto, a construção de reservatórios pode facilitar o desenvolvimento e disseminação de doenças, até o momento não endêmico, devido a mudanças bruscas no ecossistema [2]. Além disso, a fragmentação social resultante de grandes reservatórios pode acarretar significantes efeitos adversos na saúde de comunidades locais.

O desenvolvimento do complexo hidrelétrico do rio Madeira, tem despertado discussões científicas sobre os possíveis processos de remobilização e biodisponibilidade das espécies de mercúrio em reservatório na região Amazônica. Estudos em diversos reservatórios brasileiros têm demonstrado que o mercúrio associado ao material particulado em suspensão, sedimentos e plâncton, apresenta-se especialmente na forma inorgânica. A forma inorgânica ocorre principalmente no início (montante) dos reservatórios e, há um gradiente crescente da forma orgânica ao longo do tempo atingindo maiores valores nas áreas mais profundas, próximas à barragem. A poluição e contaminação causada pelo mercúrio na bacia do rio Madeira configura um dos principais problemas sócio-ambientais da Amazônia, podendo, neste aspecto, ser entendida como uma região que agrega características de um laboratório natural, cujo estudo poderá ser uma referência para toda região. A contaminação pelo mercúrio, que marcou a Amazônia na década de 80 até meados de 90, volta a ser cenário de discussão devido aos passivos ambientais deixados pela atividade de garimpagem de ouro e pelo potencial de contaminação que estes passivos representam para a sociedade [3].

Na Amazônia os altos teores de mercúrio encontrados em solo, sedimentos, peixes e humanos, foram atribuídos inicialmente à atividade de garimpo de ouro. Entretanto, estudos recentes mostraram que as concentrações de mercúrio encontradas

durante a corrida do ouro são semelhantes às encontradas atualmente. O fato é que, independentemente da fonte de contaminação, estudos relacionados à elucidação dos mecanismos de toxicidade do mercúrio, são de fundamental importância para o desenvolvimento sócio-ambiental da região amazônica [3-5].

Considerando o exposto, a investigação de biomarcadores relacionados com a expressão de metaloproteínas associadas ao mercúrio poderá indicar previamente possíveis riscos de contaminação população ribeirinha. Nesse contexto, a metalômica, área científica proposta recentemente, integra estudos analíticos e bioquímicos de elevada complexidade, contemplando o sequenciamento e a caracterização de proteínas associadas a metais. Esta nova área do conhecimento científico tem contribuído na elucidação dos aspectos fisiológicos e funcionais das metaloproteínas responsáveis pelo transporte de íons metálicos nos organismos vivos [6,7]. Estudos metaloproteômicos de elementos potencialmente tóxicos, como o mercúrio, em animais e em seres humanos, até o momento, ainda não foram explorados. A elucidação de um bioindicador de toxicidade de mercúrio utilizando a metalômica está associada às metaloproteínas transportadoras de mercúrio que possam apresentar aumento ou diminuição de expressão frente às alterações das características limnológicas e disponibilidades das espécies de mercúrio no ambiente, fornecendo informações relevantes em relação ao transporte de mercúrio na biota e nos seres humanos.

1.2. Mercúrio (Hg)

O mercúrio é um metal líquido (na sua forma elementar), branco prateado, inodoro e de fácil volatilização, pode ser encontrado em sua forma elementar (Hg^0), iônica (Hg^{+1} ou Hg^{+2}) ou ainda como organometálico (metil ou dimetilmercúrio) [8].

Considerado xenobiótico, ou seja, sua ausência não causa nenhuma anormalidade conhecida e não participa de nenhuma atividade indispensável ao pleno funcionamento orgânico. Sua presença é, por outro lado, considerada danosa aos fenômenos químicos e bioquímicos que suportam a vida [9].

As características físico-químicas do mercúrio podem melhor o descrever, conforme apresentado na Tabela 01.

Tabela 1 – Características físico-químicas do mercúrio [10].

PROPRIEDADE	VALOR	PROPRIEDADE	VALOR
1. Classificação Periódica	Grupo II B	11. Condutibilidade Térmica	0,0196 cal/cm ² /cm/°C/s (20°)
2. Número Atômico	80	12. Potencial de Oxidação	Hg Hg ⁺² + 2e ⁻ -0,788 V
3. Massa Atômica	200,59	13. No de Valência	1, 2
4. Isótopos Naturais	196, 198, 199, 200, 201, 202, 204	14. Equivalente Eletroquímico	3,7420 g/A.H
5. Densidade	13,546g/cm ³ (20°)	15. Raio Iônico	(Hg ⁺²) 1,10 Å
6. Ponto de Fusão	-38,87°C	16. Potencial de Elétron de Valência	26,18
7. Ponto de Ebulição	356,58°C	17. Elétrons de Valência	6s ²
8. Calor Latente de Fusão	2,8cal/g	18. Forma Cristalina	Romboédrica
9. Calor Específico	0,03325cal/g/°C (20°)	19. Secção Nuclear de Choque	360 barns
10. Potencial de Ionização	10,43 eV	20. Pressão de Vapor	261,7°C

Uma das características desse elemento que também é responsável pela contaminação ambiental, principalmente no garimpo, é que dissolve facilmente o ouro, a prata, o chumbo e os metais alcalinos, formando ligas relativamente consistentes (amalgamas) [11].

1.3. História do mercúrio

A denominação mercúrio decorre de uma homenagem ao deus Mercúrio que conforme a mitologia romana é o mensageiro dos deuses, filho de Júpiter e Maia. A palavra mercurial é geralmente usada para se referir a algo ou alguém errático, volátil ou instável, derivado da rapidez dos voos de Mercúrio de um lugar a outro [12].

Os romanos o chamavam de hidrargiro, derivado do termo Hydrargyrum em latim, que significa prata líquida (hidro = elemento de composição que indica água e árgyros = prata) dando origem a sigla Hg na tabela periódica dos elementos químicos [12,13].

O mercúrio raramente é encontrado como elemento livre na natureza. As fontes mais importantes são as do minério cinábrio (HgS), encontrado em rochas próximas de

atividades vulcânicas recentes, em veios ou fraturas minerais e em áreas próximas de fontes de águas termais. A maior mina de mercúrio estava situada em Almadén, na Espanha, que extraiu esse minério desde 400 d.C. até 2003 [14].

As primeiras pesquisas com esse elemento foram realizadas na antiguidade por Aristóteles no séc. IV a.C. Relatos históricos dizem que as primeiras aplicações práticas foram realizadas pelos romanos. A extração de ouro por amalgamação já era prática comum e a maior parte do mercúrio consumido pelos romanos destinava-se à produção de pigmento *vermilion* altamente valorizado [14,15].

No século XVIII usava-se especialmente no tratamento de sífilis (pequenas quantidades eram eficazes, mas grandes eram fatais). A frase “Uma noite com Vénus seguido de uma vida com Mercúrio” retratava bem os efeitos tóxicos do mercúrio no tratamento da sífilis, dentre os quais a acrodinia (manifestações de dor e eritema nas palmas das mãos e solas dos pés), irritabilidade, insônia, anorexia, diaforese, fotofobia e erupção cutânea [16].

Antigamente na Inglaterra recorria-se ao mercúrio para o processo de confecção de alguns chapéus, não sendo possível evitar a inalação desses vapores os trabalhadores frequentemente eram intoxicados, causando problemas neurológicos, incluindo desordem na fala e visão distorcida. Não era incomum os chapeleiros aparentarem-se perturbados e mentalmente confusos, muitos morriam cedo como resultado desta grave intoxicação, dando assim origem ao personagem “Chapeleiro Maluco” do livro Alice no País das Maravilhas, escrito por Lewis Carrol [17].

Um dos casos mais famosos de contaminação por mercúrio ocorreu na Baía de Minamata - Japão, em 1950. A companhia Chisso Fertilizer descartava metilmercúrio, um subproduto do processo de produção de acetaldeído, nas águas da baía levando à contaminação de peixes posteriormente consumidos pela população local [18]. Outros registros aconteceram em 1960 no Iraque quando sementes para plantio, tratadas com produtos mercuriais (sais), foram usadas como alimentos, na década 70 um “creme de beleza” comercializado no México, foi o causador de múltiplos casos de intoxicação por mercúrio na fronteira com EUA e o mais recente dos casos em 1997 com a pesquisadora Karen Wetterhan, quando gotas de metil mercúrio penetraram em sua luva de córtex levando-a a morte [14].

As fontes antropogênicas de mercúrio são mais diversificadas do que as naturais [19], como queima de combustíveis fósseis, indústrias de cloro-soda, equipamentos eletrônicos, fabricação de tintas, são consideradas as maiores consumidoras de

mercúrio, perfazendo 55% do total consumido. Alguns compostos de mercúrio têm sido utilizados na agricultura, principalmente como fungicidas. Embora o uso industrial do mercúrio tenha sofrido reduções, recentemente, devido a controle mais efetivo, altas concentrações ainda estão presentes nos compartimentos, solo, sedimento associados às aplicações industriais deste metal [20].

1.3.1. Mercúrio no rio Madeira

O Brasil tem um longo histórico de atividade de ouro, desde o período da colonização, sabe-se que desde 1980 200.000 mil toneladas desse metal foram despejadas no meio ambiente pelos garimpos. Estima-se em 100 a 130 toneladas por ano o montante de mercúrio introduzido na Amazônia nos últimos anos pela atividade garimpeira, sendo 40% lançado diretamente nos rios e 60% disperso na atmosfera através da queima e fundição do amálgama ouro e mercúrio [21,22].

Em Rondônia, a atividade de mineração de ouro teve início no século XVIII, precisamente em 1739, após a descoberta de ouro de aluvião no Rio Corumbiara (afluente do Rio Guaporé) por um grupo de garimpeiros [21].

Na Bacia do rio Madeira a corrida do ouro iniciou-se em 1975 com atividades não mecanizadas nas margens durante a estação seca, devido a grande quantidade de ouro encontrada, rapidamente introduziu-se dragas e balsas capazes de atingirem grandes profundidades por todo o rio (Figura 1) [21].



Figura 1 – Drega em funcionamento no rio Madeira

Durante a década de 80 quando o governo delimitou um setor de Porto Velho até Guajará Mirim chamado de “Reserva Garimpeira do rio Madeira”, a atividade garimpeira atingiu seu máximo, tornando-se a segunda região mais importante produtora de ouro de garimpo na Amazônia, com uma produção anual de ouro de 9,4 toneladas por ano, o que resultou aproximadamente uma emissão anual de mercúrio de 12 toneladas por ano [22].

Embora a atividade garimpeira na bacia do rio Madeira tenha decrescido significativamente no território brasileiro, no boliviano esta atividade tem apresentado um crescimento substancial, sendo responsável pela contribuição de 0,3 a 0,5 toneladas de mercúrio por ano para ambiente [22].

1.4. Ciclo hidrobiogeoquímico do mercúrio

O interesse no entendimento do ciclo hidrobiogeoquímico do mercúrio na Região Amazônia acontece devido à elevada toxicidade do metilmercúrio (HgMe) para os seres humanos e outros animais devido ao acúmulo na biota e biomagnificação na cadeia alimentar. O conhecimento do processo de organificação do mercúrio no ambiente é necessário para compreender o impacto potencial desse elemento sobre os seres humanos, bem como avaliar a qualidade de vida das populações. O ciclo biogeoquímico do mercúrio é caracterizado pelas várias rotas que este composto pode seguir no ambiente, tendo destaque a liberação do solo e da água para a atmosfera e seu transporte nesta, seguido da deposição atmosférica das espécies de mercúrio para a água e solo (Figura 2). Quando em contato com solo ou sedimentos, pode ocorrer sorção do mercúrio na forma insolúvel seguida de metilação/desmetilação. O ciclo é completado pelas rotas de precipitação, bioconversão em formas voláteis ou solúveis, reintegração deste na atmosfera ou bioacumulação na cadeia alimentar [23].

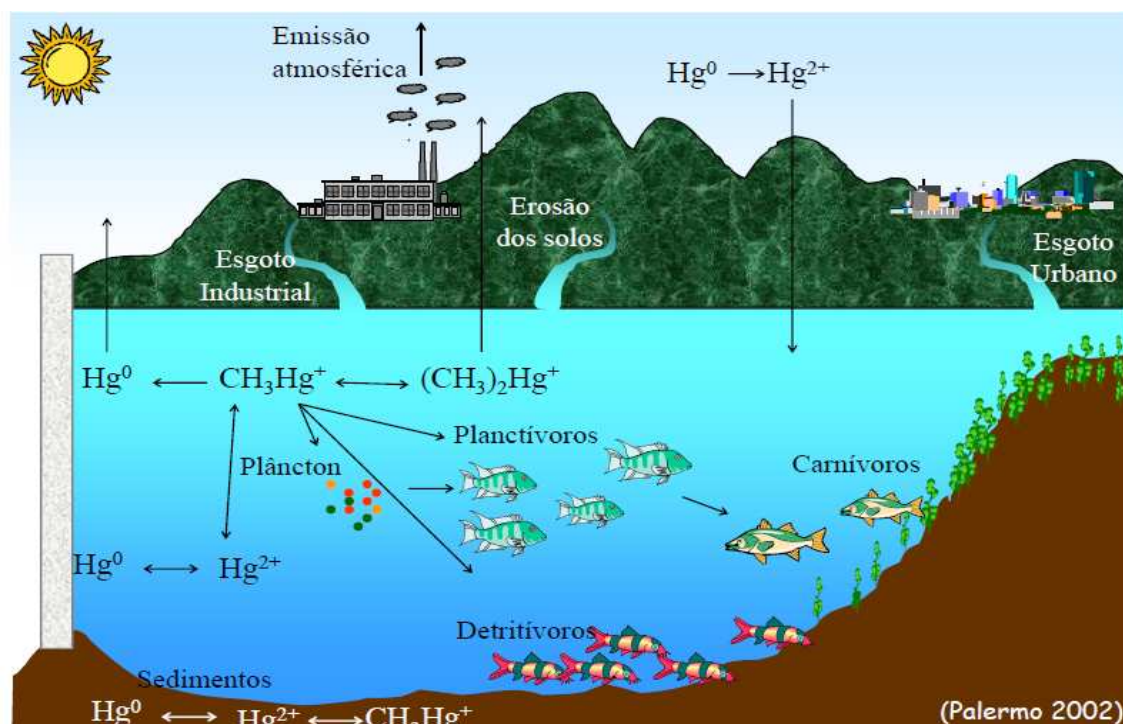


Figura 2 – Ciclo biogeoquímico do mercúrio.

A distribuição do mercúrio nos sedimentos está relacionada com o conteúdo de carbono orgânico, argila, ferro, fósforo, potencial redox e enxofre, dentre outros. Os agentes orgânicos complexantes solúveis em água, tais como ácidos húmicos e fúlvicos, podem quelar a espécie metálica lábil na água e os humatos e fúvatos do metal precipitam-se diretamente da solução para o sedimento. Os solos possuem uma elevada capacidade de reter e armazenar mercúrio, devido ao forte acoplamento deste com o carbono presente. Os solos argilosos apresentam aparentemente uma elevada capacidade de reter mercúrio, podendo acumulá-lo por muitos anos [24].

1.5. Processo de metilação do mercúrio

O processo de metilação do mercúrio tem merecido especial atenção em reservatórios naturais e artificiais devido à elevada toxicidade e bioacumulação desta forma orgânica na biota. A metilação ocorre preferencialmente em ambientes aquáticos com baixa concentração de oxigênio, pH ácido e com disponibilidade de matéria orgânica lábil, em áreas de remanso, lagos marginais e reservatórios artificiais devido à formação de microambientes críticos. Nestes ambientes o mercúrio inorgânico pode ser convertido em mercúrio orgânico (metilmercúrio e dimetilmercúrio) pela ação de

microorganismos (bactérias metanogênicas), particularmente nos sedimentos, que funcionam como reatores, maximizando o processo de metilação do mercúrio ou solubilizando outras substâncias tóxicas [25,26].

A biotransformação do mercúrio inorgânico em metilmercúrio representa um sério risco ambiental visto que ele se acumula na cadeia trófica por um fenômeno chamado biomagnificação, isto é, a concentração do metal aumenta à medida que ele avança nos níveis tróficos. Portanto, por ter a capacidade de permanecer por longos períodos nos tecidos dos organismos, este elemento poderá ser encontrado nos peixes predadores da extremidade da cadeia em concentrações elevadas, culminando, finalmente, no regime alimentar dos humanos [23].

Dois ciclos afetam o transporte e a distribuição do mercúrio: global, que envolve a circulação atmosférica do mercúrio elementar (Hg^0) provenientes de fontes na crosta terrestre para os oceanos; local, que depende da metilação do mercúrio inorgânico (Hg^{2+}) proveniente principalmente de fontes antrópicas. Dentre as diversas espécies químicas existentes do mercúrio, podemos destacar como as mais importantes: o mercúrio elementar, também denominado mercúrio metálico (Hg^0); o mercúrio iônico em suas duas formas oxidadas: íon mercurioso (Hg^+) e íon mercúrico (Hg^{2+}); e as espécies metiladas: o metilmercúrio (CH_3Hg^+) e o dimetilmercúrio [$(CH_3)_2Hg$]. A especiação do mercúrio em ambientes aquáticos é influenciada pela interação com a biota e complexos orgânicos e inorgânicos presentes na coluna d'água e sedimentos [23,27].

1.6. Toxicidade do mercúrio

O processo de biotransformação do mercúrio inorgânico em metilmercúrio nos ambientes aquáticos é bem conhecido, o que torna viável a exposição e intoxicação humana pelo consumo de peixes contaminados. A contaminação mercurial ocorre desde a década de 70 na Bacia Amazônica, acelerada por várias técnicas de extração de ouro utilizando amalgamação com mercúrio. Como exemplo, temos a pesquisa realizada na região do rio Tapajós, onde o peixe é a principal fonte de alimentação diária e os níveis de metilmercúrio encontrados em raiz de cabelo, variaram de alguns $\mu g/g$ até mais de 65 $\mu g/g$, sendo que os primeiros sinais clínicos e sintomas de contaminação mercurial ocorrem em 50 $\mu g/g$ [22].

O mercúrio sob forma líquida é muito pouco absorvido pelo trato gastrointestinal. Portanto, ele não é considerado nocivo se ingerido. Por outro lado, seus

vapores quando inalados, podem facilmente atravessar a membrana alveolar até atingir a circulação sanguínea [28]. No sangue, fígado e rins, o mercúrio é oxidado à forma divalente (mercúrio iônico) pelo complexo chamado “hidrogênio peróxido catalase”. Este tipo de mercúrio representa a maior fonte de intoxicação verificada em laboratórios industriais e de pesquisa. Esta forma é também liberada pela boca de pacientes que possuem amálgamas dentários preparados com mercúrio, o que pode resultar em uma intoxicação dependendo da quantidade presente de amálgamas. Além disto, dentistas e pessoas ligadas à odontologia podem também se contaminar quando o amálgama de mercúrio é preparado sem proteção adequada. [29,30].

Dentre os compostos de mercúrio orgânico, o metilmercúrio é o mais tóxico, muito mais que a forma metálica, e é responsável pelos danos mais importantes à saúde observados em humanos. Isto se deve, provavelmente, à sua lenta eliminação. No cérebro e rins, esta eliminação leva um tempo considerável (até mesmo alguns anos). Vários estudos têm demonstrado os efeitos neurotóxicos do metilmercúrio em populações expostas a este contaminante. O sistema nervoso central é o alvo principal do metilmercúrio, onde afeta, principalmente, áreas específicas do cérebro, como cerebelo e lobos temporais. A intoxicação por metilmercúrio se caracteriza por ataxia (perda da coordenação dos movimentos voluntários), a disartria (problemas nas articulações das palavras), a parestesia (perda da sensibilidade nas extremidades das mãos e pés e em torno da boca), visão de túnel (constricção do campo visual) e perda da audição. Os primeiros sintomas afetam geralmente a região perianal e aparecem alguns dias após a exposição. Uma contaminação severa pode causar cegueira, coma e morte. O período médio de latência varia frequentemente, de 16 a 38 dias [31].

O mercúrio é reconhecidamente um agente teratogênico. A forma orgânica do mercúrio é transferida da mãe para a placenta e transportado para o feto, no entanto, o mercúrio inorgânico tem uma menor capacidade de atravessar a barreira placentária, sendo encontrado em maior quantidade no líquido amniótico. Estes compostos de mercúrio, principalmente os orgânicos, causam sérios danos ao feto em desenvolvimento, principalmente em nível neurológico. O mercúrio inorgânico é também transportado pelo leite materno. [32,33].

1.7. Toxicidade do mercúrio frente ao aleitamento materno

A dieta da mãe tem influência significativa na concentração de mercúrio no leite materno. Estudos têm mostrado altos níveis de mercúrio no leite materno de mães que se alimentam de grandes quantidades de peixe. Os níveis de mercúrio no leite materno são cerca de um terço do nível de mercúrio no sangue da mãe. A quantidade de mercúrio que atinge o leite depende da forma de mercúrio: compostos inorgânicos de mercúrio são transferidos com certa facilidade para o leite materno, mas são pouco absorvidos pelo bebê; já os compostos orgânicos de mercúrio, apenas pequenas quantidades são transferidas para o leite materno, no entanto, mesmo em pequenas quantidades são absorvidos pelo bebê [34-36].

Como o mercúrio não acumula no leite materno, a exposição pré-natal é provavelmente mais importante que a exposição ao mercúrio de lactação, na maioria dos casos. Estudos feitos com lactantes que utilizaram peixes como principal fonte nas suas dietas alimentares, demonstraram que após dois meses de lactação, o mercúrio encontrado no leite foi principalmente o metilmercúrio. Foi observado, que crianças amamentadas durante seis meses, tiveram crescimento inferior quando comparadas a outras crianças, não contaminadas, com mesma faixa etária. As crianças contaminadas apresentaram concentrações de mercúrio significativamente maior no cabelo após 12 meses de idade. A relação entre decréscimo no desenvolvimento inicial dessas crianças e altos níveis de mercúrio no cabelo do bebê, portanto, parece estar associada com amamentação, porque nenhuma outra fonte de contaminação foi detectada [37-39].

A contaminação do mercúrio via placenta e leite materno é importante forma de contaminação de crianças. Nestas, a exposição ao mercúrio causa maior preocupação, visto que o recém nascidos tem alta permeabilidade dos sistemas gastrintestinal e tegumentar, tornando os riscos aos neurotóxicos muito maiores, mesmo com um mínimo de exposição. Além disso, a atividade tóxica pode ser prolongada em função da imaturidade dos sistemas de detoxificação [40].

Os efeitos deletérios do mercúrio na criança estão relacionados ao desenvolvimento neuropsicomotor. Tem sido sugerido que crianças expostas ao mercúrio *in utero* podem apresentar atraso no crescimento e desenvolvimento [41-43]. No entanto, é uma questão de fato, que a formação e o desenvolvimento do SNC durante a gravidez e na lactação podem ser afetados por várias causas, que vão da nutrição materna para a exposição de substâncias neurotóxicas. Sendo assim, de

fundamental importância o desenvolvimento de estudos que contribuam de forma mais robusta na elucidação dos mecanismos que envolvem a contaminação por mercúrio das populações ribeirinhas da Amazônia brasileira.

1.8. Metaloproteínas e proteínas ligadas a metais

As metaloproteínas e às proteínas ligadas a íons metálicos representam grande porção do número total de proteínas. Estima-se que aproximadamente 40% de todas as proteínas e enzimas requerem a presença de íon metálico para realizar atividade biológica [7,45]. Esses íons são responsáveis por muitos processos metabólicos, como conversão de energia na fotossíntese e respiração, expressão e regulação gênica, além de processos catalíticos, como ligação a substrato e ativação do mesmo, transporte e armazenamento [7].

As metaloproteínas são consideradas diferentes das proteínas ligadas a metais. As metaloproteínas constituem um grupo de proteínas que contêm um cofator metálico incorporado por meio de ligações específicas, caracterizando-se pela alta afinidade da interação metal-proteína. Já as proteínas ligadas a metais constituem um grupo de proteínas onde os íons metálicos são incorporados por ligações não-específicas, caracterizando-se pela baixa afinidade da ligação metal-proteína, com isso essa ligação pode ser facilmente quebrada [7,44].

Outro grupo de metaloproteínas, são as metalotioneínas (MTs), que constituem uma classe de proteínas citosólicas de baixo peso molecular (inferior a 10 kDa) e sua estrutura molecular é composta de uma única cadeia de aminoácidos dos quais 20 são cisteínas, que representam em torno de 30% do total de aminoácidos. Livre de aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos, a estrutura da MT possui dois domínios que consistem, em geral, de um cluster com três sítios e outro com quatro sítios nos quais átomos de metais podem se ligar (Figura 3) [46]. A abundância de ligantes 'tiol' dos resíduos de cisteína presentes na estrutura da MT confere a essa proteína uma alta afinidade por íons metálicos, principalmente do grupo IIB, no caso, zinco, cádmio e mercúrio. Essa característica particular que faz das MTs proteínas de grande interesse sob o ponto de vista bioquímico, mais especificamente relacionado com a detoxificação de metais [47].

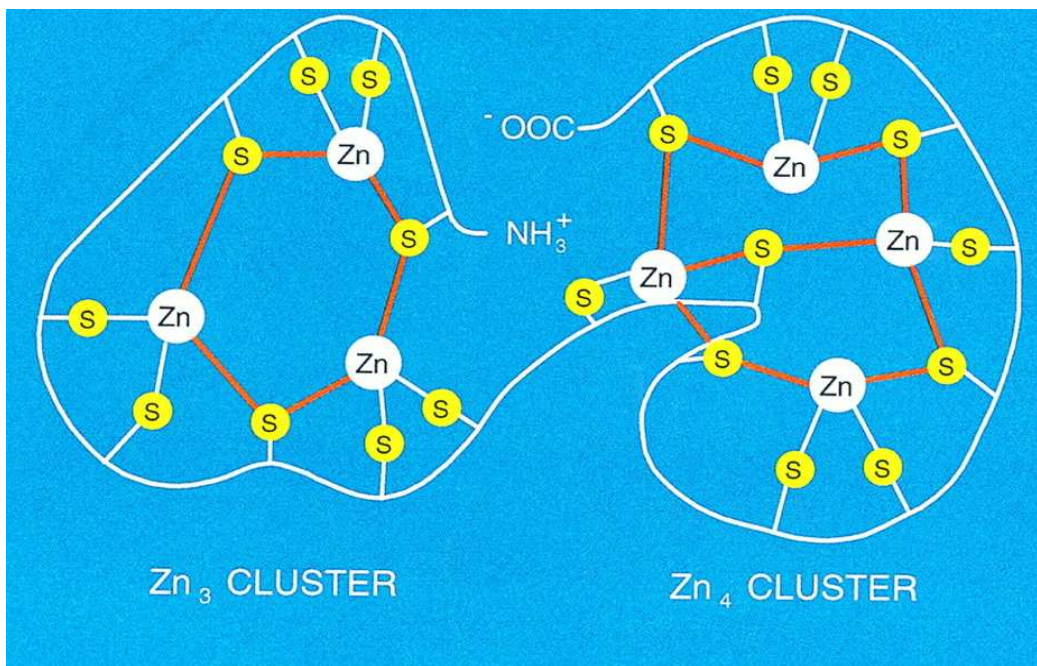


Figura 3 – Sítios para ligação com metais presentes na metalotioneína. Os círculos denotam íons metálicos divalentes (Ex. Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+}) [47].

As metalotioneínas são encontradas em todos os filos animais, algumas plantas, fungos e cianobactérias. A produção das metalotioneínas ocorre com a finalidade de proteger o organismo da ação dos metais tóxicos ou metais essenciais em excesso, que se tornam tóxicos. O estudo das proteínas de baixa massa molar é de grande importância, no ponto de vista ambiental, para a avaliação da qualidade de ambientes terrestres e aquáticos, tendo em vista que a acumulação de metais potencialmente tóxicos pela biota pode ser usada como indicador de contaminação ambiental. Além disso, no ponto de vista tecnológico, considerando que algumas plantas e algas são organismos resistentes que hiper-acumulam metais potencialmente tóxicos, podem também ser usadas com a finalidade de remediação de áreas contaminadas por esses metais, como solos e águas. Além disso, na área médica, a produção de metalotioneínas pelo organismo é uma ferramenta para o desenvolvimento de tratamento de doenças usando metais como componentes de fármacos [48].

Uma das grandes vantagens do uso de metalotioneínas como bioindicadores é o fato da produção destas ser um indicador precoce de exposição a metais, respondendo bem antes que seja possível mensurar um efeito fisiológico no organismo como a alteração na taxa de crescimento ou diminuição da capacidade reprodutiva (Figura 4) [47-50].

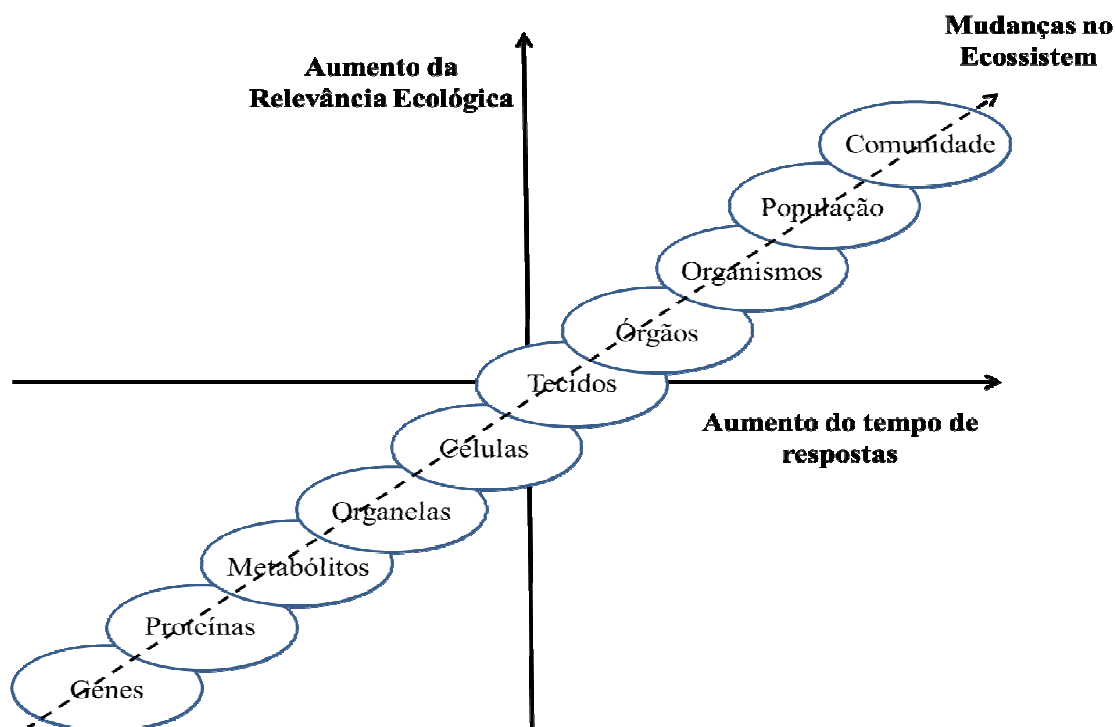


Figura – 4. Relação entre relevância ecológica, escala de tempo de resposta e o estudo em diferentes níveis de organização biológica após exposição a um fator estressante. As metalotioneínas encontram-se no nível das proteínas [47].

Além da detoxificação de metais, as metalotioneínas estão relacionadas ao combate dos radicais livres. Os radicais livres são moléculas que tem um número ímpar de elétrons em seu último nível energético, o que os torna bastante reativos. Esses radicais reagem com proteínas, gorduras ou mesmo o DNA para abstração de um elétron. Cada molécula que perde um elétron precisa “deslocar” o elétron de alguma outra molécula. Esse processo evolui em progressão e é chamado de “cascata oxidativa”. Já a carga total de radicais livres é chamada de “estresse oxidativo”. As substâncias que fornecem o elétron que está faltando, devolvendo a situação à normalidade são os “antioxidantes”. O estresse oxidativo é regulado por uma combinação de fatores hereditários, do ambiente e do estilo de vida. Os radicais livres causam lesões tanto nas células como nos genes. Muitos consideram que o acúmulo dessas lesões ao longo da vida favorece a manifestação de doenças relacionadas ao envelhecimento [47-50].

Uma das respostas bioquímicas mais estudadas em células animais quando expostas à metais potencialmente tóxicos é a indução na produção de metalotioneínas, principalmente em células do fígado e do rim. Em muitas espécies, por exemplo,

moluscos, peixes e crustáceos, a indução à síntese das MTs por íons metálicos foi demonstrada sugerindo o potencial uso de concentrações de MTs em organismos como biomarcadores de exposição à metais. Essas diversas aplicações das MTs requer estudos aprofundados relacionados com a produção dessas proteínas pelos diversos organismos vivos [51-54].

Atualmente na química analítica, inúmeras metodologias são empregadas na investigação das MTs. Dentre as técnicas mais usadas estão a eletroforese, a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (HPLC-ICP-MS) e a espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS). A técnica de eletroforese bidimensional (2D-PAGE) permite excelente separação de proteínas e peptídeos para posterior mapeamento das espécies metálicas nos spots proteicos através da espectrometria atômica (FAAS, GFAAS, ICP OES) e a caracterização dessas proteínas e peptídeos por ESI-MS [55-58].

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigação de metaloproteínas bioindicadoras de toxicidade de mercúrio aplicáveis a vigilância ambiental e saúde humana nas áreas de influência direta e indireta do aproveitamento hidrelétrico Jirau, de forma a contribuir com a estimativa da magnitude de exposição total ou parcial ao mercúrio.

2.2. Objetivos Específicos

O trabalho teve como objetivos:

- a) Desenvolver e validar métodos analíticos visando o fracionamento/separação de proteínas por eletroforese 2D-PAGE de amostras leite materno da população ribeirinha do AHE Jirau - Rio Madeira;
- b) Mapear por Espectrofotometria de Fluorescência Atômica de Vapor Frio (CVAFS) os spots proteicos com presença de mercúrio;
- c) Otimizar procedimentos de extração de mercúrio dos spots para quantificação por Espectrometria de absorção atômica por geração de vapor frio e/ou Espectrometria de fluorescência atômica por geração de vapor frio (CVAAS/CVAFS);

d) Caracterizar as proteínas presentes nos spots onde foram detectados/quantificados presença de mercúrio por Espectrometria de Massas (nano-LC/ESI/MS/MS)

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Área de estudo

A bacia Amazônica apresenta elevado nível basal de mercúrio natural, o qual nos corpos aquáticos poderá ser transformado, assimilado pela biota, adsorvido no material particulado suspenso ou de fundo, ou ser transferido para a atmosfera. A metilação do mercúrio, processo este que tem merecido especial atenção em reservatórios naturais e artificiais devido a elevada toxicidade e bioacumulação na biota, ocorre preferencialmente quando o substrato (Hg^{2+}) está disponível, disponibilidade de luz, disponibilidade de matéria orgânica [59,60], além de pH e condições redox (PE) otimizadas. Portanto, o ciclo biogeoquímico do mercúrio é determinado principalmente pelas características físicas e químicas da água, bem como pela hidrodinâmica do corpo aquático.

As águas do rio Madeira são classificadas de águas brancas (originárias na região Andina e pré-Andina) e caracterizadas pela grande quantidade de partículas dissolvidas (nutrientes e sais minerais) e em suspensão, baixa concentração de matéria orgânica e meio próxima a neutralidade. A flutuação média anual da água do rio varia na faixa de 10,8 -12,4 metros, carrega de 50-68 mg/L de sais dissolvidos e 15-359 mg/L de material sólido em suspensão [61,62].

O acompanhamento das concentrações de mercúrio na bacia hidrográfica do rio Madeira é um assunto que atraiu as atenções de muitos pesquisadores nos últimos anos. Sendo a bacia superior a segunda mais importante região produtora de ouro de garimpo na Amazônia durante os anos 70 até meados dos anos 90. Esta atividade teve seu ápice durante a década de 80, quando da liberação da Reserva Garimpeira do Rio Madeira [63].

Em resumo, o mercúrio de origem natural e/ou antrópica, ao entrar nos ecossistemas aquáticos é envolvido em ciclos biogeoquímicos mediados por microrganismos, onde serão transformados quimicamente, bioacumulando e biomagnificando na cadeia trófica. Sendo assim, os peixes predadores podem acumular

altos níveis de mercúrio e funcionar como veículos desta forma química para seus consumidores, como répteis, aves e os seres humanos.

3.2. Desenho amostral

As abordagens nas lactantes ribeirinhas foram realizadas em 3 etapas, a primeira no mês de março de 2011, a segunda no mês de maio de 2011 e terceira em junho de 2012. Envolveu um total de 6 comunidades ribeirinhas (Figura 5) ao longo da bacia superior do rio Madeira na área de influencia reservatório de UHE de Jirau (Jaci Paraná, Palmeiral, Mutum-Paraná, Abuña, Araras e Fortaleza do Abunã).

Antes de coletar o leite, foram realizadas amostragem de cabelo para avaliar os teores de mercúrio das lactantes, a coleta do leite só foi efetuada em mulheres que apresentaram concentração de mercúrio, nas amostras de cabelos analisadas, relevantes para o estudo. Nas comunidades visitadas foram encontradas 18 lactantes na faixa etária de 17 a 35 anos aptas a participarem do estudo, sendo uma de Mutum Paraná, dez de Fortaleza do Abunã, uma de Palmeiral e seis de Abuña.



Figura 5 – Localização da área de estudo evidenciando o desenho amostral.

3.3. Equipamentos e Acessórios

Os seguintes equipamentos e acessórios foram utilizados para o desenvolvimento do trabalho:

- Agitador por efeito Vórtex, marca Thermolyne, modelo M-37600 (Dubuque, EUA);
- Balança analítica, marca Mettler, modelo AE200 (Bedford, EUA);
- Balança analítica, marca Mettler, modelo AE100 (Bedford, EUA);
- Banho Maria, marca UNIQUE, modelo USC 1800 (Indaiatuba, Brasil);
- Cubas para eletroforese do tipo SDS-PAGE, marca GE (Uppsala, Suécia);
- Espectrômetro de Absorção Atômica (CVAAS) SMS 100 Mercury Analyzer (PerkinElmer, Inc., Shelton, CT)
- Espectrofotômetro UV/Visível, marca ThermoSpectronic, modelo Genesys 6, (Rochester, EUA);
- Mesa Agitadora, marca Tecnal, modelo TE - 140 (Piracicaba, Brasil);
- Sistema de purificação PURELAB ultra, marca ELGA, modelo Ultraionic (USA);
- Sistema para eletroforese 2D-PAGE, marca GE Healthcare, modelo Ettan™ Daltsix (Uppsala, Suécia);
- Sistema para focalização isoeétrica, marca Amersham Biosciences, modelo EPS1001 (Uppsala, Suécia);
- Centrífuga refrigerada, marca Hettich Zentrifugen, modelo Universal 320/320R (Newport Pagnell, Reino Unido);
- Espectrofotômetro de fluorescência atômica Brooks Rand modelo III
- Tubo de quartzo: (aprox. 10 cm de largura e 7 mm de diâmetro) utilizado na confecção das colunas de amostragem;
- Areia recoberta com película de ouro: Utilizadas na montagem das colunas de amostragem do mercúrio gasoso.
- Vidrarias convencionalmente utilizada em laboratório de Química Analítica.

3.4. Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de pureza analítica, sendo as soluções preparadas todas com água deionizada, obtida por um sistema de purificação ELGA. Os frascos plásticos, vidrarias e demais utensílios utilizados foram descontaminados por

meio de imersão em ácido nítrico ou ácido clorídrico 10% (v/v) por 12h. Após este procedimento o material foi lavado com água ultra pura e seco à temperatura ambiente. Os seguintes reagentes/soluções foram utilizados para o desenvolvimento desta etapa do trabalho:

- Acetona P.A., C_3H_6O , MM = 58,08 g mol⁻¹ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);
- Ácido Acético Glacial, $C_2H_4O_2$, MM = 60,05 g mol⁻¹ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);
- Ácido Clorídrico, HCl, MM = 36,46 g mol⁻¹ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);
- Ácido Etilenodiaminotetracético dipotássico (K_2EDTA), $C_{10}H_{14}O_8N_2K_2 \cdot 2H_2O$, MM = 404,46 g mol⁻¹ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);
- Ácido Fosfórico 85%, H_3PO_4 , MM = 98,00 g mol⁻¹ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);
- Ácido Nítrico, HNO_3 , MM = 63,01 g mol⁻¹ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);
- Acrilamida, C_3H_5NO , MM = 71,08 g mol⁻¹ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Agarose grau Biologia Molecular (BioAgency, São Paulo, Brasil);
- Albumina de Soro Bovino (GE Healthcare UK);
- Azul de Bromofenol, $C_{19}H_9Br_4NaO_5S$, MM = 691,94 g mol⁻¹ (Bioagency, São Paulo, Brasil);
- Azul de Coomassie G-250, $C_{47}H_{50}N_3NaO_7S_2$, MM = 854,03 g mol⁻¹ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);
- Benzocaína, $C_9H_{11}NO_2$, MM = 165,19 g mol⁻¹ (Synth, Diadema, Brasil);
- Ditioneitol (DTT), $C_4H_{10}O_2S_2$, MM = 154,24 g mol⁻¹ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), $C_{12}H_{25}NaO_4S$, MM = 288,28 g mol⁻¹ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Etanol, C_2H_6O , MM = 46,07 g mol⁻¹ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);
- Fitas para focalização isoeétrica com anfólitos imobilizados de pH 3 a 10 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Fitas para focalização isoeétrica com anfólitos imobilizados de pH 4 a 7 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Glicerol 87%, $C_3H_8O_3$, MM = 92,09 g mol⁻¹ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);

- Iodoacetamida, C_2H_4INO , $MM = 184,96 \text{ g mol}^{-1}$ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Metanol, CH_4O , $MM = 32,04 \text{ g mol}^{-1}$ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);
- N, N'-metilenobisacrilamida, $C_7H_{10}N_2O_2$, $MM = 154,17 \text{ g mol}^{-1}$ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- N, N', N, N'-tetrametilenodiamina (TEMED), $C_6H_{16}N_2$, $MM = 116,20 \text{ g mol}^{-1}$ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);
- Óleo Mineral (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Padrão Protéico de Massa Molar (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Persulfato de Amônio, $N_2H_8S_2O_8$, $MM = 228,20 \text{ g mol}^{-1}$ (Mallinckrodt, Paris, França);
- Sulfato de Amônio, $H_8N_2O_4S$, $MM = 132,14 \text{ g mol}^{-1}$ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);
- Sulfonato de 3-[3-cloroamidopropil-dimetilamonio]-1-propano (CHAPS), $C_{32}H_{58}N_2O_7S$, $MM = 614,88 \text{ g mol}^{-1}$ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);
- Tiouréia, CH_4N_2S , $MM = 76,12 \text{ g mol}^{-1}$ (GE Healthcare, UK);
- Tris-hidroximetil amino metano, $C_4H_{11}O_3N$, $MM = 121,14 \text{ g mol}^{-1}$ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Uréia, CH_4N_2O , $MM = 60,06 \text{ g mol}^{-1}$ (BioAgency, São Paulo, Brasil).
- Cloreto de Bromo: solução preparada a partir de KBr e $KBrO_4$ (Alpha-Aesar) e HCl de acordo com EPA 1999, utilizado na oxidação do mercúrio durante o processo de quantificação do Hg total;
- Cloreto Estanoso (Mallinckrodt), utilizado na redução do mercúrio no processo de quantificação do Hg total;
- Cloridrato de Hidroxilamina (Mallinckrodt), utilizado na decomposição do cloreto de bromo durante o processo de quantificação do Hg total;
- Ácido sulfúrico (Mallinckrodt), utilizado na mineralização dos spots proteicos;
- Peróxido de Hidrogênio (Mallinckrodt), utilizado na mineralização dos spots proteicos.

3.5. Descontaminação das vidrarias

A limpeza de toda a vidraria utilizada foi feita com vapor de ácido nítrico concentrado, segundo método proposto por Tschöpeç *et alii* (1980) [64]. O procedimento consiste em colocar a vidraria com o fundo para cima em um suporte de vidro acoplado dentro de um béquer de 5,0 litros contendo cerca de 300 mL de ácido nítrico concentrado e tampado com vidro de relógio (Figura 6). O béquer é colocado em chapa de aquecimento e deixado em refluxo por, no mínimo, duas horas. Em seguida, os frascos são enxaguados com água deionizada.



Figura 6 – Sistema de limpeza de vidraria utilizada na quantificação de mercúrio.

3.6. Amostras

3.6.1. Critérios de elegibilidade

Os critérios de inclusão que foram utilizados para definir as lactantes constituintes do estudo: i) morar na comunidade por pelo menos 12 meses; ii) ter o peixe como importante fonte de proteína animal; iii) ter cabelo suficiente para coleta. São critérios de exclusão: i) estar amamentando a mais de vinte e quatro meses; ii); ter tingido os cabelos no período de amamentação iii) Ser contraria a participar do estudo.

3.6.2. Coleta das amostras

Antes de qualquer coleta, todas as lactantes que concordaram em participar deste estudo foram submetidas a uma breve entrevista para verificação do aceite da coleta de amostra biológica (leite e cabelo). Para a avaliação dos níveis de exposição por via alimentar ao mercúrio foram coletadas amostras de cabelo segundo protocolos internacionais. As amostras de cabelos foram coletadas da região da nuca, com tesoura de aço e por pessoal previamente treinado (Figura 7), e em seguida as amostras foram acondicionadas em sacos de polietileno. As amostras foram armazenadas a temperatura ambiente em local limpo e seco. O leite foi coletado por expressão manual em frascos de vidros lavados com ácido nítrico a 10% em seguida com água deionizada. As amostras de leite foram devidamente identificados e armazenados em gelo seco até serem transportadas aos laboratórios do IB/UNESP.



Figura 7 – Coleta de amostras de cabelo das lactantes ribeirinhas

3.6.3. Processamentos das amostras de cabelo

As amostras de cabelos foram cortadas em pedaços de aproximadamente 5 mm, com o auxílio de uma tesoura. A seguir, foi utilizado o procedimento de lavagem, conforme a descrição:

- montou-se um funil com papel de filtro sobre um erlenmeyer;
- colocou-se a amostra em um béquer;

- adicionou-se acetona p.a. na quantidade aproximada do dobro do volume de amostra e agitou-se com o auxílio de uma bagueta de vidro;
- esperou-se a amostra decantar e descartou-se a acetona sobrenadante
- adicionou-se água destilada (na mesma quantidade de acetona) ao béquer e agitou-se por 10 minutos;
- esperou-se, novamente, a amostra decantar, e desprezou-se o sobrenadante;
- repetiu-se o procedimento com água destilada por mais duas vezes;
- adicionou-se novamente acetona, agitando-se por 10 minutos e descartou-se o sobrenadante, após a amostra decantar;
- com o auxílio de "jatos" de acetona, transferiu-se a amostra de cabelo para o papel de filtro posicionado no funil e aguardou-se até a filtração total da amostra;
- transferiu-se o papel de filtro para um local limpo e aguardou-se até a secagem completa do papel de filtro e da amostra;
- transferiu-se a amostra para recipientes limpos e descontaminados onde pode ficar por tempo indeterminado.

3.6.4. Processamentos das amostras de leite materno

Após o recebimento das amostras de leite materno no laboratório do IB/UNESP, as amostras foram armazenadas à temperatura de -70°C até o início do processo analítico. As amostras para o procedimentos analíticos foram tratadas com n-hexano para remoção da fração lipídica. Em seguida, as misturas imiscíveis foram centrifugadas em ultracentrífuga refrigerada (BioAgency), para separação da fração orgânica (fração lipídica) da fração protéica. Na fração protéica obtido foi feita a quantificação dos teores proteicos, quantificação de mercúrio total e posteriormente as corridas eletroforéticas nas amostras que apresentavam teor de mercúrio relevante [65,66].

3.6.5. Quantificação das amostras de cabelo

A quantificação de mercúrio total em amostras de cabelo foi feita utilizando-se um analisador automático para a determinação de mercúrio por decomposição térmica e amalgamação em coluna de ouro, SMS 100 da Perkin Elmer, ilustrado na Figura 8.

Após a lavagem do cabelo, o mesmo é inserido em "barquinhas" de níquel, onde a massa é registrada pelo equipamento. A "barquinha" é inserida automaticamente no

sistema de análise de mercúrio. O processo envolve a combustão (decomposição) da amostra em altas temperaturas com oxigênio. Os gases são transportados para um tubo catalítico aquecido que remove halogênios, óxidos de nitrogênio e óxidos de enxofre. O mercúrio elementar (Hg^0) restante da combustão é levado para o tubo de amalgamação contendo areia de ouro, onde fica retido. O tubo de amalgamação é então aquecido e libera o mercúrio gasoso que é transportado com o auxílio de um gás de arraste para o espectrômetro de absorção atômica (CVAAS). O sinal transiente é medido em série por uma célula de alta sensibilidade seguida de uma célula de baixa sensibilidade.

Após o final da análise, nas “barquinhas” que saem do equipamento não resta nenhum resíduo do cabelo analisado [67].



Figura 8 – Espectrômetro de Absorção Atômica - SMS 100 da Perkin Elmer

3.6.6. Processo de digestão das amostras de leite para quantificação de Hg total

Após descongelamento até temperatura ambiente, imediatamente antes do processo de decomposição, alíquotas 0,5 mL das amostras de leite foram transferidas para béquer de 250 mL de forma alta, adicionou-se lentamente e sob agitação 3,0 mL de solução de peróxido de hidrogênio 30% (v/v) e deixou-se em repouso por 12 horas. Posteriormente adicionou-se 1,0 e 4,0 mL de soluções concentradas de HNO_3 e de H_2SO_4 , respectivamente. Fecharam-se os béqueres com filme plástico e fizeram-se pequenos orifícios no filme para garantir refluxo e saída de vapores durante o aquecimento em chapas por 2 horas a 60°C . Após resfriar a temperatura ambiente,

lentamente e sob leve agitação foi adicionado 15,0 mL de solução de KMnO_4 6% (m/v) e deixou-se em repouso durante 12 horas. Após esse tempo de repouso, adicionou-se 5,0 mL de solução de cloridrato de hidroxilamina ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$) 30% (m/v) (para reduzir o excesso de permanganato), transferindo-se quantitativamente as amostras para balões volumétricos de 50,0 mL e completaram-se os volumes com água ultra-pura obtida em sistema Elka.

3.7. Preparação das amostras para eletroforese

3.7.1 Precipitação e ressolubilização das proteínas para otimização do gel

Para quantificação do teor proteico nas amostras, fez-se necessário realizar um procedimento prévio de precipitação das proteínas. A precipitação das proteínas contidas nos extratos proteicos de leite materno, foi feita adicionando-se solução gelada de acetona 80% (v/v) na proporção de 1:4 (amostra:acetona) e etanol absoluto (v/v) na proporção de 1:4 (amostra:etanol). Essa precipitação foi conduzida durante 3 horas a $-20\text{ }^\circ\text{C}$, garantindo assim que a precipitação ocorresse de maneira quantitativa. Em seguida o precipitado proteico foi centrifugado a 10000 rpm em ultracentrífuga refrigerada (BioAgency) por 10 min e o sobrenadante foi retirado. Esse precipitado proteico foi lavado mais duas vezes com a mesma solução utilizada para a precipitação (acetona ou etanol).

Após estes procedimentos parte dos precipitados proteicos foi ressolubilizado em solução de NaOH a $0,50\text{ mol L}^{-1}$, para quantificação do teor total de proteínas, e outra parte dos precipitados foi ressolubilizado em tampão contendo uréia a 7 mol L^{-1} , tiouréia a 2 mol L^{-1} , CHAPS a 2% (m/v), anfólitos de pH 3 a 10 ou 4 a 7 a 0,5% (v/v), azul de bromofenol a 0,002% e 2,8 mg de DTT, para ser utilizada nas corridas eletroforéticas [68].

3.8. Determinação da concentração das proteínas totais

A concentração de proteínas totais na amostra de leite materno foi determinada de acordo com o método do Biureto, empregando albumina de soro bovino como padrão [69].

Foi construída uma curva analítica com concentrações de 5 a 50 g L⁻¹ a partir de solução padrão estoque de albumina bovina 100 g L⁻¹. Para leitura das amostras, os precipitados protéicos foram ressolubilizados em 500 µL de NaOH 0,50 mol L⁻¹. Em cubetas de plástico foram adicionados 50 µL de padrão/amostra e 2,5 mL do reagente do Biureto. A mistura padrão ou amostra com o reagente foi mantida a 32 °C em banho Maria (Marconi) durante 10 min. Após o tempo de reação, as leituras de absorbância foram medidas a 545 nm, usando espectrofotômetro UV/Visível.

A determinação de proteínas totais na amostra estudada permite calcular o volume exato de extrato protéico necessário para aplicar uma massa de aproximadamente 250 µg de proteína em cada amostragem na primeira etapa da eletroforese bi-dimensional.

3.9. Separações eletroforéticas

Antes do início das separações eletroforéticas os extratos proteicos de leite materno, foi aplicado em fitas para focalização isoeétrica de 13 cm, que continham um gel pré-fabricado com anfólitos imobilizados de pH 4 a 7 e pH 3 a 10. Essas fitas foram colocadas em um aparato, sobre o qual permaneceu por um período de 12h, a temperatura ambiente, para serem hidratadas com o extrato proteico. Nestas fitas foram aplicadas uma massa de aproximadamente 250 µg de proteína da amostra. Além do extrato proteico foram adicionados também cerca de 900 µL de óleo mineral sobre essas fitas. Após este período a fita hidratada foi levada ao sistema para focalização isoeétrica (Amersham Biosciences) para corrida em primeira dimensão da eletroforese bi-dimensional [70,71].

3.9.1. Separação em primeira dimensão

Após a etapa de hidratação das fitas com o extratos proteicos, a primeira dimensão do processo eletroforético foi realizada em sistema para focalização isoeétrica (Amersham Biosciences), seguindo o programa descrito na Tabela 2.

Tabela 2: Programa utilizado na separação eletroforética em primeira dimensão (IEF).

Etapa	Tensão (V)	Acúmulo (Vh)
1	500	500
2	1000	800
3	10000	11300
4	10000	3000

O programa de separação em primeira dimensão durou em média 4,5 h. Após o término da focalização isoeletrica, as fitas com as proteínas separadas em função do ponto isoeletrico (pI) foram equilibradas em duas etapas. Na primeira etapa foram usados 10 mL de solução contendo uréia 6 mol L⁻¹, SDS 2 % (m/v), glicerol 30% (v/v), Tris-HCl 50 mmol L⁻¹, azul de bromofenol 0,002% (m/v) e DTT 2% (m/v). Esta etapa denominada redução tem a finalidade de manter as proteínas em suas formas reduzidas. Na segunda etapa foi utilizada uma solução de composição similar porém substituindo-se o DTT por iodoacetamida 2,5% (m/v). Esta etapa é denominada alquilação e sua finalidade é alquilar os grupos tióis das proteínas, prevenindo que elas sejam reoxidadas durante o processo eletroforético [69]. Cada uma destas etapas durou 15 min e foi realizada sob leve agitação em mesa agitadora (Quimis).

3.9.2. Separação em segunda dimensão

Após a etapa de equilíbrio das fitas foi realizada a segunda dimensão do processo eletroforético (SDS-PAGE). A fita foi aplicada em um gel de poliacrilamida 10% e 12,5%, previamente preparado em placa de vidro de 180 x 160 x 1,5 mm. Os géis de poliacrilamida foram preparados a partir das seguintes soluções: Acrilamida, N, N'-metilenobisacrilamida, Tris-hidroximetil amino metano, Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), N,N',N,N'-tetrametilenodiamina (TEMED), Ácido Clorídrico (HCl) e Persulfato de Amônio. Foi colocado sobre o gel de poliacrilamida, ao lado da fita, um pedaço de papel de filtro, ao qual foi aplicado 7 µL de padrão de massa molar contendo as proteínas β-fosforilase (97,0 kDa), albumina (66,0 kDa), ovoalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α-lactoalbumina (14,4 kDa). A fita e o papel de filtro foram vedados com uma solução quente de agarose 0,5% (m/v), de modo a garantir o contato destes com o gel de poliacrilamida. Em seguida a

corrida eletroforética em segunda dimensão foi efetuada em sistema para eletroforese 2D-PAGE (GE Healthcare), em duas etapas, conforme descritas na Tabela 3.

Tabela 3 – Programa utilizado na separação eletroforética em segunda dimensão (SDS-PAGE).

	Etapas	
	1	2
Tensão (V)	90	250
Corrente Elétrica (mA)	25	25
Potência (W)	100	100
Tempo (h)	0,5	5

Após o período de corrida, de aproximadamente 5,5 h, as proteínas foram reveladas empregando-se o corante Coomassie colidal, que consiste em uma solução de sulfato de amônio 8% (m/v), ácido fosfórico 1,6% (v/v), azul de coomassie G-250 0,08% (m/v) e metanol 25% (v/v). Antes de serem coradas as proteínas foram fixadas, durante 1h, empregando-se uma solução contendo ácido acético 10% (v/v) e etanol 40% (v/v). O corante ficou em contato com o gel durante 72 h e depois foi removido por sucessivas lavagens com água deionizada. Os géis obtidos foram, por fim, escaneados em Scanner (GE Healthcare).

3.10. Tratamento de imagens

Os parâmetros escolhidos para a obtenção das imagens dos géis foram: resolução – 300 dpi, zoom 100% e depth (regula o nível de cinza do pixel) – 12 ou 16 bits por pixel, os quais foram selecionados a partir das recomendações do fabricante [72]. As imagens capturadas foram gravadas no formato *.tif, e em seguida, importadas para tratamento das mesmas no programa ImageMaster 2D Platinum 7.0.

O tratamento das imagens foi sempre realizado para os géis de leite materno obtidos de um mesmo processo de separação eletroforética.

Iniciou-se pelo ajuste de contraste da imagem do gel de forma a melhorar a visualização pelo analista. Depois, realizou-se a seleção de uma pequena região do gel, a qual continha spots de expressão intermediária. Os parâmetros para a detecção, smooth (fixa o número de vezes que o programa homogeneiza a região selecionada antes de seguir a detecção) – 5, saliency (medida que baseia-se na curvatura do spot,

filtra spots reais) – 39 e área (elimina regiões menores que as indicadas) – 48. Em seguida, estendeu-se estes parâmetros para todo o gel por meio de uma ferramenta do programa para a detecção automática.

A equivalência entre os spots dos três géis (matching) foi realizada pela definição manual de 04 landmarks (Spots claramente definido e indicados nos dois géis). Nesta etapa de matching o gel com maior número de spots foi selecionado como sendo o gel padrão para se realizar a comparação entre os três géis. Neste processo não foi preciso fazer ajuste manual dos spots, pois os géis apresentaram uma boa correlação (matching >70%).

Por fim, os spots dos géis foram comparados quanto a sua distribuição, volume, intensidade relativa, pIs e MM.

3.11. Processo de digestão dos spots proteicos para quantificação de Hg total

As amostras dos spots proteicos obtidos nas corridas eletroforéticas foram mineralizadas utilizando-se o procedimento já descrito na literatura [73] com as modificações descritas a seguir: quatro spots proteicos obtidos nas réplicas das corridas eletroforéticas foram retirados do gel com o auxílio de uma ponteira de pipeta e transferidos para balões de Kjeldahl de 25 mL (para efeito de simplificação denominaremos de balões de digestão). Para cada balão de digestão foram transferidas alíquotas de 3 mL de ácido sulfúrico concentrado e 1 mL de peróxido de hidrogênio 30% (m/m). O conjunto de balões de digestão foi colocado em banho de ultrassom da UNIQUE à temperatura de 30°C e 135 Watts de potência, até completa mineralização das amostras (extrato transparente). Em seguida os extratos ácidos obtidos foram transferidos para balões volumétricos de 5 mL completando-se os volumes com água ultrapura.

3.12. Quantificação das amostras de leite materno e spots proteicos

As quantificações de mercúrio total nas amostras leite e dos spots foram feitas por espectrofotometria de fluorescência atômica de vapor frio (CVAFS), utilizando-se equipamento da Brooks Rand Modelo III (Figura 9). Foi utilizado argônio como gás de arraste e o comprimento de onda de 254,0 nm. Essa técnica apresenta limite de detecção de 1,0 pg mL⁻¹.

Alíquotas de 100 mL das amostras digeridas conforme procedimentos descrito em 2.6.6 e 2.11 foram transferidas para um frasco borbulhador e SnCl_2 foi adicionado para a redução do Hg^{2+} a Hg^0 . O Hg^0 é arrastado pelo gás (argônio) e amalgamado em uma coluna de ouro, que em seguida foi a 450 °C para a liberação do mercúrio amalgamado para uma segunda coluna (analítica). Esta coluna foi também aquecida a 450 °C e o Hg^0 liberado foi carregado até o detector do equipamento por uma corrente de argônio previamente purificado em coluna preenchida com areia de ouro. Embora as espécies HgCl_2 , CH_3HgCl e CH_3HgCH_3 possam estar presentes no ar e ser também facilmente amalgamáveis, o espectrômetro de fluorescência atômica detecta somente o Hg^0 [74].

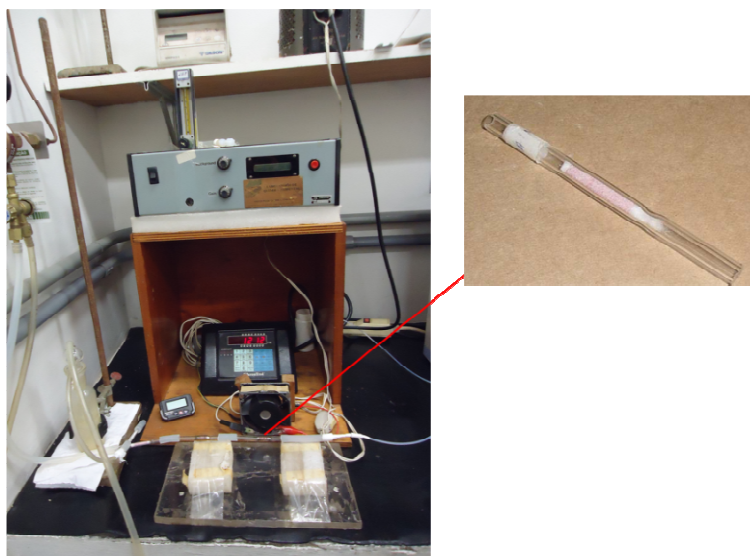


Figura 9 – Espectrofotômetro de Fluorescência Atômica (Brooks Rand Modelo III) com a coluna de ouro.

3.13. Caracterização das proteínas por espectrometria de massas (nano-LC/ESI/MS/MS)

Inicialmente, os spots de proteínas a serem caracterizados por espectrometria de massas foram recortados do gel de poliacrilamida e cada um deles foi colocado em um pocinho de uma placa, denominada Zip Plate (Millipore), na qual foi feita a digestão tríplica. A digestão tríplica foi feita com o uso de um kit específico (*In-Gel DigestZP Kit*) que, além de digerir a proteína, purifica os peptídeos obtidos.

As análises dos peptídeos presentes nos digestos proteicos por LC-MS foram realizadas em um cromatógrafo Waters nanoAcquity UPLC acoplado a um espectrômetro Waters Synapt HDMS, equipado com fonte de nanoESI. Tipicamente, 2 a 5 µL de amostra aquosa foram injetados pelo auto-injetor do sistema UPLC e direcionados a uma pré-coluna (Waters Symmetry C18, 20mm × 180µm d.i., partículas de 5µm), onde foram dessalinizadas por 3 min com fluxo de 5,0 µL/min de 97:3 H₂O/MeCN com 0,1% ácido fórmico v/v, sendo então transferidas para a coluna analítica (Waters BEH130 C18, 100mm × 100µm i.d., partículas de 1,7µm) e eluídas com com fluxo de 1,0 µL/min de acordo com a Tabela 4.

Tabela 4 – Gradiente linear aplicado na eluição das proteínas

Tempo (min)	% A (H ₂ O com 0,1% ácido fórmico (v/v))	%B (MeCN com 0,1% ácido fórmico (v/v))
0	97	3
5	85	15
10	65	35
22	40	60
26	3	97
28	97	3
30	97	3

A detecção dos peptídeos foi realizada de forma *online* pelo espectrômetro de massas, configurado para operar em modo de aquisição dependente de dados (DDA), contendo uma função de MS (*fullscan* de m/z 200 a 2000), três funções de MS/MS e uma função de padrão externo de calibração (*lockmass*). Como demais parâmetros do espectrômetro de massas estão voltagem do capilar 3,0 kV, voltagem do cone 30 V, temperatura da fonte 100°C, fluxo do gás de nanoESI 0,5 L/h, energias de colisão das celas *Trap* e *Transfer* respectivamente em 6 e 4 eV, detector em 1700 V. Os espectros de MS (*fullscan*) e MS/MS (espectro de íons fragmentos por dissociação induzida por colisão) foram adquiridos a uma taxa de 1 espectro s⁻¹. Previamente às análises, o instrumento foi calibrado com oligômeros de ácido fosfórico (solução de H₃PO₄ 0,05% v/v em H₂O/MeCN 50:50) de m/z 90 a 1960. Argônio a uma pressão de 9,7.10⁻³ mbar foi utilizado como gás de colisão

As corridas de LC-MS foram processadas pelo software ProteinLynx Global Server v.2.2. (Waters) e analisadas por busca em banco de dados empregando-se o sistema MASCOT v.2.2. (Matrix Science Ltd). Como parâmetros da busca foram selecionados digestão com tripsina com até 1 sítio de clivagem ignorado, oxidação em resíduos de metionina como modificação variável e tolerância de massa de peptídeos e fragmentos ambos em $\pm 0,5$ Da. As buscas foram feitas no banco de dados NCBI nr.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Limite de detecção (LD)

O limite de detecção do método (LD) é definido como a concentração mínima de um analito medida e declarada com 95% ou 99% de confiança quanto a concentração do deste é maior que zero. O LD é determinado por meio de análise completa de uma dada matriz contendo o analito [75].

O LD dos métodos utilizados na determinação de mercúrio total nas amostras de leite, cabelo e spots foram feitas em 7 repetições e calculados pela expressão:

$$LD = 0 + t.s$$

onde: “t” é a abcissa da distribuição de Student, dependente do tamanho da amostra e do grau de confiança e, “s” = desvio padrão dos brancos da amostra, com adição da menor concentração aceitável do analito. Observando que a menor concentração aceitável é aquela tida como a concentração mais baixa para a qual um grau aceitável de incerteza pode ser alcançado.

Limite de quantificação (LQ)

O Limite de Quantificação (LQ) definido como a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão. Pode ser considerado como sendo a concentração do analito correspondente ao valor da média do branco mais 5, 6 ou 10 desvios-padrão [75].

O LQ dos métodos utilizados na determinação de mercúrio total nas amostras de leite, cabelo e spots foram feitas em 7 repetições e calculados pela expressão:

$$LQ = X + 10s,$$

onde: “X” = média dos valores dos brancos “s” = desvio padrão dos brancos.

4.1. Validação do método de determinação de mercúrio total

As determinações de mercúrio total nas amostras de cabelo foram feitas utilizando-se a técnica de decomposição térmica e amalgamação em coluna de ouro seguida de absorção atômica empregando analisador de mercúrio Perkin Elmer SMS 100. A curva analítica obtida está ilustrada na Figura 10 com a respectiva equação da reta e coeficiente de correlação linear (R^2).

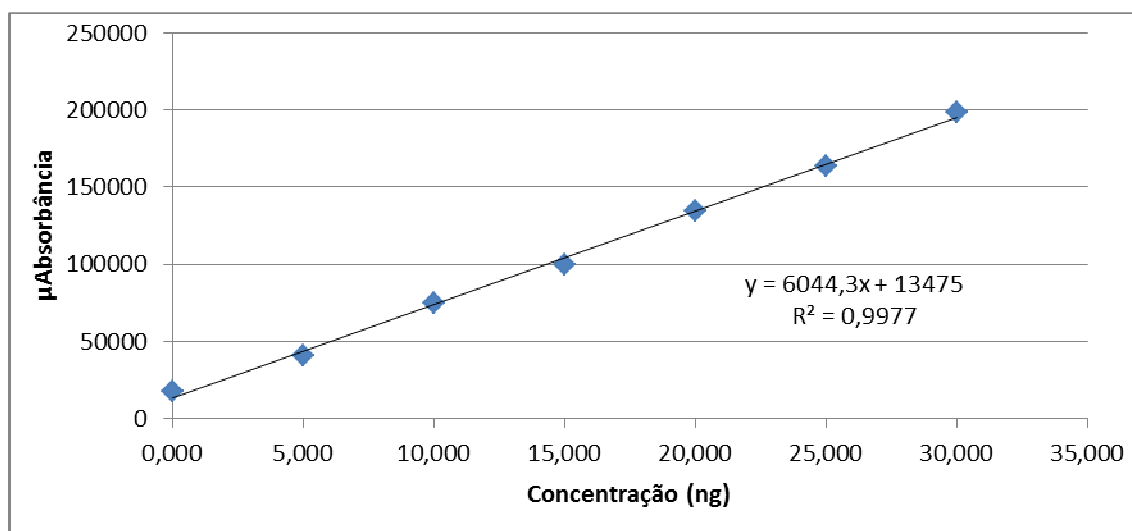


Figura 10 – Curva analítica utilizada nas determinações de mercúrio total nas amostras de cabelo.

Os respectivos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) do método, calculados com base na norma técnica DOQ-CGCRE-008 do INMETRO [75] foram 0,83 e 2,65 ng de mercúrio, respectivamente. O método foi validado por adição e recuperação de padrão, considerando-se a indisponibilidade de padrão certificado para essa amostra, os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Resultados obtidos nos experimentos de adição e recuperação de padrão nas amostras de cabelo.

	[Hg] (ng L ⁻¹)	Recuperação (%)
Branco	0,00	
Branco	0,00	
Branco	0,00	
	0,00	
5 ng L⁻¹	4,78	97,9
5 ng L⁻¹	5,14	98,8
5 ng L⁻¹	4,82	98,1
Média	4,91 ± 0,20	98,3
15ng L⁻¹	15,49	101,3
15 ng L⁻¹	14,53	100,8
15 ng L⁻¹	15,44	101,0
Média	15,15 ± 0,54	101,0
25 ng L⁻¹	25,87	103,4
25 ng L⁻¹	25,88	103,3
25 ng L⁻¹	25,64	102,9
Média	25,80 ± 0,17	103,2

Observando-se os resultados da Tabela 5, nota-se que as porcentagens de recuperação obtidas nas três diferentes concentrações de mercúrio (5, 15 e 25 ng) adicionadas no branco das amostras de cabelo apresentam-se na faixa de 98,00 a 103,20 %, com RSD médio menor que 3% o que pode ser considerado uma boa recuperação. Esses resultados comprovam que o método proposto apresenta boa exatidão e precisão.

As determinações de mercúrio nas amostras de leite e spots proteicos foram feitas por espectrofotometria de fluorescência atômica de vapor frio (CVAFS), utilizando-se equipamento da Brooks Rand Modelo III. A curva analítica obtida esta ilustrada na Figura 11 com a respectiva equação da reta e coeficiente de correlação linear (R^2).

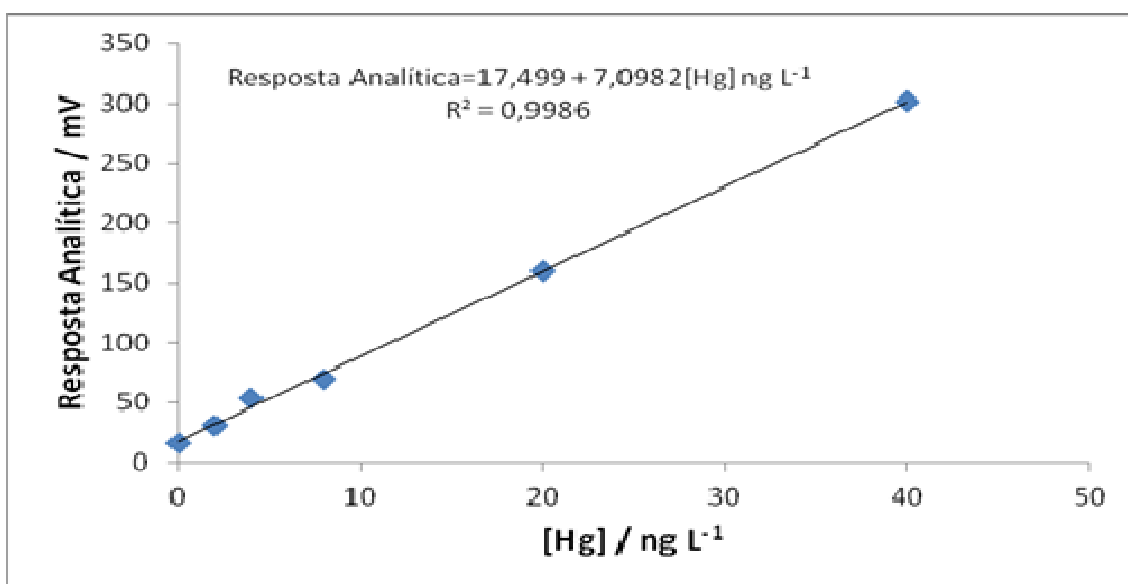


Figura 11 – Curva analítica utilizada nas determinações de mercúrio total nas amostras de leite e nos spots proteicos.

Os respectivos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) do método, calculados com base na norma técnica DOQ-CGCRE-008 do INMETRO [75] foram: 0,34 e 1,08 ng L⁻¹ respectivamente, para as amostras de leite e 0,31 e 0,99 ng L⁻¹ respectivamente, para os spots proteicos. O método foi validado por adição e recuperação de padrão, considerando-se a indisponibilidade de padrão certificado para essas amostras. Os resultados obtidos estão ilustrados nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6 – Resultados obtidos nos experimentos de adição e recuperação de padrão nas amostras de leite

	Resposta Analítica / mV	[Hg] (ng L⁻¹)	Recuperação (%)
Branco	29,39	1,68	
Branco	27,55	1,42	
Branco	28,02	1,48	
		1,53±0,11	
2 ng L⁻¹	39,91	3,16	74,00
2 ng L⁻¹	44,29	3,77	117,50
2 ng L⁻¹	42,65	3,54	103,00
Média		3,49±0,31	98,20±18
8 ng L⁻¹	85,37	9,56	98,50
8 ng L⁻¹	77,81	8,50	88,50
8 ng L⁻¹	81,93	9,08	95,00
Média		9,05±0,43	94,00±4
20 ng L⁻¹	175,20	22,22	102,70
20 ng L⁻¹	167,41	21,12	98,50
20 ng L⁻¹	179,14	22,77	106,45
Média		22,04±0,68	103,00±3

Analisando-se os resultados descritos na Tabela 6, observa-se que as porcentagens de recuperação obtidas nas três diferentes concentrações de mercúrio (2, 8 e 20 ng L⁻¹) adicionadas no branco das amostras de leite apresentam-se na faixa de 94,00 a 103 %. O RSD médio apresentou-se menor que 10% o que pode ser considerado uma boa recuperação. Esses resultados comprovam que o método proposto apresenta boa exatidão e precisão.

Tabela 7 – Resultados obtidos nos experimentos de adição e recuperação de padrão nos spots proteicos.

	Resposta Analítica / mV	[Hg] ng L⁻¹	Recuperação (%)
Branco	18,52	< 1,08	-
Branco	20,04	< 1,08	-
Branco	17,71	< 1,08	-
		0,00	-
2 ng L⁻¹	32,33	2,09	104,50
2 ng L⁻¹	32,48	2,11	105,50
2 ng L⁻¹	31,41	1,96	98,00
Média		2,05±0,06	102,70±3
8 ng L⁻¹	73,43	7,88	98,50
8 ng L⁻¹	75,21	8,13	101,60
8 ng L⁻¹	72,94	7,81	97,60
Média		7,94±0,14	99,20±2
20 ng L⁻¹	153,57	19,17	95,90
20 ng L⁻¹	169,26	21,38	106,90
20 ng L⁻¹	151,87	18,93	94,70
Média		19,83±1,10	99,20±5

Os resultados obtidos na Tabela 7 apresentam porcentagens de recuperação, considerando as três diferentes concentrações de mercúrio adicionadas no branco das amostras, na faixa de 99 a 103 %, com RSD médio menor e/ou igual a 5%, caracterizando uma boa recuperação e comprovando que o método proposto apresenta boa exatidão e precisão.

4.2. Determinação de mercúrio total em amostras de cabelo

A determinação da concentração de mercúrio total foi feita nas amostras de cabelo das lactantes por decomposição térmica e amalgamação em coluna de ouro conforme descrito anteriormente. Essas determinações foram feitas para confirmar a presença de mercúrio nas lactantes que concordaram em ceder amostras de leite para o presente estudo. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Identificação e resultados das concentrações de mercúrio total obtido nas amostras de cabelo das lactantes da população ribeirinha da região do alto Rio Madeira-RO.

Lactante	Comunidade	Mês de amamentação	Idade	Concentração (mg kg⁻¹)	Período da coleta
1	Fortaleza do Abunã	Segundo	23	6,40	Março de 2011
2	Fortaleza do Abunã	Primeiro	17	5,60	
3	Fortaleza do Abunã	Decimo nono	17	1,80	
4	Mutum – Paraná	Primeiro	26	0,80	
5	Palmeiral	Vigésimo	34	6,70	
6	Abunã	Décimo segundo	23	2,70	Junho de 2012
7	Abunã	Nono	31	1,20	
8	Abunã	Primeiro	19	1,80	
9	Abunã	Décimo quinto	27	1,34	
10	Abunã	Primeiro	35	2,22	
11	Abunã	-	17	1,60	
12	Fortaleza do Abunã	Segundo	21	0,57	
13	Fortaleza do Abunã	Sexto	33	6,72	
14	Fortaleza do Abunã	Quarto	19	0,99	
15	Fortaleza do Abunã	Primeiro	25	4,90	
16	Fortaleza do Abunã	Décimo quarto	18	9,90	
17	Fortaleza do Abunã	Sexto mês	21	4,34	
18	Fortaleza do Abunã	Quarto	20	0,78	

De forma geral, observa-se que os resultados das concentrações obtidos de mercúrio, nas amostras de cabelo das lactantes estão dentro do padrão de referência da OMS ($< 6,0 \text{ mg kg}^{-1}$), com exceção das amostras 1, 5, 13 e 16 que apresentaram valores acima do referido padrão [73].

4.3. Determinação de mercúrio total em amostras de leite materno

As concentrações de mercúrio total nas amostras de leite materno foram determinadas pela técnica de fluorescência atômica, como descrito anteriormente. Os valores obtidos variaram entre 4,56 e 104,11 $\mu\text{g L}^{-1}$, conforme os dados apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Concentrações de mercúrio total em amostras de leite materno das lactantes da região do alto Rio Madeira-RO. Primeira e segunda abordagem.

Comunidade	Amostras	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Faixa ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Fortaleza do Abunã	1	59,31	4,56 – 104,11
	2	11,38	
	3	69,87	
	12	4,56	
	13	103,19	
	14	6,86	
	15	98,51	
	16	104,11	
	17	-	
Abunã	6	81,58	48,44 – 88,39
	7	56,40	
	8	48,44	
	9	74,14	
	10	88,39	
	11	76,48	
Mutum Paraná	4	*	*
Palmeiral	5	-	-

* Amostra utilizada para otimização dos géis para corridas eletroforéticas.
 - Não obteve volume suficiente para as determinações

Observa-se que os resultados das concentrações de mercúrio nas amostras de leite materno analisadas, 13 e 16, são as que apresentaram maiores valores, 103,19 e 104,11 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente. Ambas da mesma comunidade, Fortaleza do Abunã.

Com base nesses resultados, o fracionamento de proteínas por 2D-PAGE e a determinação de mercúrio nos spots proteicos obtidos no processo de fracionamento

foram feitos somente para amostra de leite da Lactante 16, que apresentou a maior concentração de mercúrio total no leite ($104,11 \mu\text{g L}^{-1}$) e no cabelo ($9,90 \text{ mg kg}^{-1}$) e para otimização do gel utilizou-se amostra de leite da Lactante 4, a qual obteve-se um maior volume de amostra (10 mL).

4.4. Determinação de proteína total na solução de ressolubilização dos pellets proteicos das amostras de leite materno

O teor de proteína total na solução de ressolubilização dos *pellets* da amostra de leite da Lactante 4 (para otimização das corridas eletroforéticas) e da Lactante 16 (onde obteve as maiores concentrações de mercúrio total no cabelo e leite materno) foi avaliado com o intuito de determinar a melhor massa proteica a ser aplicada nas corridas eletroforéticas. Essas determinações foram feitas utilizando-se o método do Biureto que se baseia na reação cobre(II) complexado com íons tartarato e os grupos peptídicos das proteínas em meio alcalino, formando um complexo quadrado planar que absorve com poucas interferências em 540 nm [69]. A curva analítica, com valores de 5 a 50 g L^{-1} , obtida para as determinações de proteína total nos *pellets* das amostras de leite materno está apresentada na Figura 12.

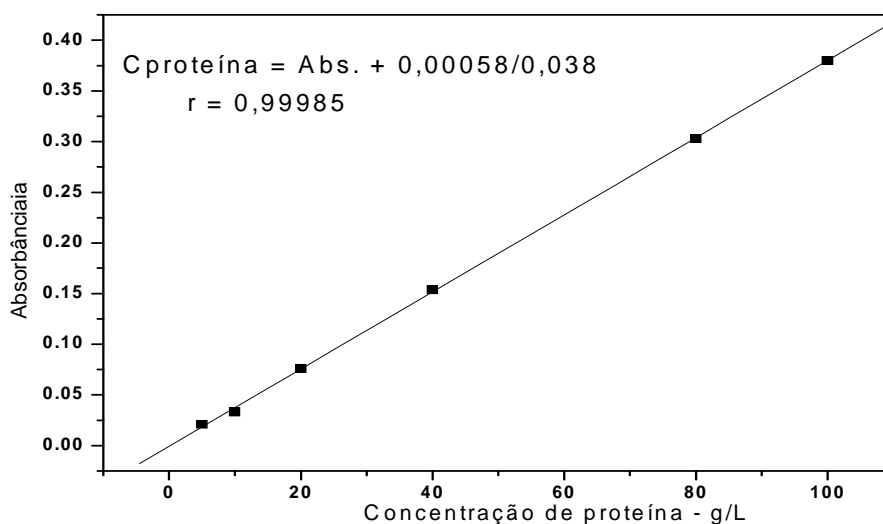


Figura 12 – Curva analítica obtida para determinação de proteína total dos *pellets* proteicos das amostras de leite das Lactantes 4 e 16.

A obtenção da curva analítica possibilitou o cálculo os seguintes parâmetros analíticos importantes na validação do método de determinação de proteína total na solução de ressolubilização dos *pellets* das amostras de leite das Lactantes 4 e 16 [76]:

Limite de detecção (LOD)

Corresponde à concentração mínima da solução de um analito, que pode ser diferenciada de zero e que produz um sinal de absorção igual a três vezes o desvio padrão (s.d.) de 10 ou mais medidas do sinal observado para o branco da amostra.

O LOD do método de biureto utilizado na determinação de proteína total na solução de ressolubilização dos *pellets* das amostras de leite das Lactantes 4 e 16 foram calculados pela expressão:

$$\text{LOD} = \frac{3 \times \text{s.d.}}{b}$$

onde: “s.d.” corresponde ao desvio padrão das medidas do branco da amostra (solução 0,50 mol L⁻¹ de NaOH/Reativo de biureto) e “b” ao coeficiente angular (*slope*) da curva analítica.

Limite de quantificação (LOQ)

Corresponde ao menor valor quantificável da concentração de um analito em solução, que produz um sinal de absorção com desvio padrão relativo (r.s.d.) de 10%, o qual pode ser calculado multiplicando-se por 10 o desvio padrão (s.d.) de 10 ou mais medidas do sinal observado para o branco da amostra. Recomenda-se que, tanto o LOQ quanto o LOD, sejam calculados utilizando-se os parâmetros da curva analítica, que é estatisticamente mais confiável.

O LOQ do método de biureto utilizado na determinação de proteína total na solução de ressolubilização dos *pellets* das amostras de leite das Lactantes 4 e 16 foram calculados pela expressão:

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times \text{s.d.}}{b}$$

onde: “s.d.” corresponde ao desvio padrão das medidas do branco da amostra (solução 0,50 mol L⁻¹ de NaOH/Reativo de biureto) e “b” ao coeficiente angular (*slope*) da curva analítica.

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), calculados considerando o desvio padrão de 10 leituras obtidas em relação ao branco das soluções padrão e da inclinação da curva analítica (LOD = 3σ/slope e LOQ = 10σ/slope), foram respectivamente 0,024±0,00055 e 0,79±0,023 g L⁻¹ de proteína total. O método do biureto foi validado por meio da determinação de proteína total em solução padrão certificado Bovine Serum Albumim – NIST 927D, que apresenta o valor certificado de 70,10±0,74 g/L de proteína total. As determinações da concentração de proteína total no padrão certificado foram feitas em triplicata e utilizando o mesmo procedimento feito em relação a solução de ressolubilização dos *pellets* da amostra de leite da Lactante 16.

O valor da concentração de proteína total obtida para o padrão NIST 927D foi 69,96±0,71 g/L, que está em conformidade com o valor certificado (70,10±0,74 g/L), comprovando assim a exatidão e precisão do método do biureto utilizado nas determinações de proteína total.

Com base no resultado da concentração de proteína total presente total na solução de ressolubilização dos *pellets* das amostras de leite das Lactantes 4 e 16, foi possível calcular o volume de solução proteica a ser aplicada nas fitas na etapa de hidratação anterior à focalização isoeletrica (separação das proteínas em 1D), com objetivo de ter uma massa de proteína de 250 µg, que possibilitou a melhor separação das proteínas por 2D-PAGE utilizando-se gel de poliacrilamimida de 10 e 12% (m/v) nas Lactante 4 e de 12% (m/v) na Lactante 16.

O resultado dessa determinação indicou que a solução de ressolubilização dos *pellets* da amostra de leite da Lactante 4 foram (g L⁻¹): Precipitado acetônico – 12,30±0,25; Precipitado etanólico – 7,30±0,13 e da Lactante 16 com precipitado acetônico – 15,33 ± 0,44 g L⁻¹. Com base nesses resultados, foi possível calcular os volumes das soluções de ressolubilização dos *pellets* proteicos a ser adicionado nas fitas na etapa de hidratação anterior à focalização isoeletrica (separação das proteínas em 1D) a fim de se ter uma massa de proteína de 250 µg, considerando que o comprimento da fita utilizada na etapa de IEF foi de 13 cm [65]. As diferenças de concentração observadas em relação aos dois precipitados da Lactante 4 (acetônico/etanólico) serão

discutidos em relação à obtenção de géis com maior número de spots proteicos e/ou maior expressão dos spots no item 4.5.

4.5. Otimização das corridas eletroforéticas

Os experimentos de otimização das corridas eletroforéticas por 2D-PAGE nessa etapa do trabalho foram feitos com duas repetições utilizando a amostra de leite da Lactante 04, que foi a lactante que forneceu maior volume de amostras, cerca de 10 mL. As demais lactantes o volume médio coletado foi de 5 mL. As corridas por 2D PAGE foram feitas considerando-se precipitações das proteínas com etanol e/ou acetona e com diferentes tratamentos com hexano para remoção da fração lipídica (1 mL amostra/ 1mL de hexona; 500 μ L amostra/1,5 mL de hexano). Os géis obtidos nas corridas eletroforéticas utilizando-se essas condições experimentais foram escaneados e são apresentados nas Figuras 13 a 16.

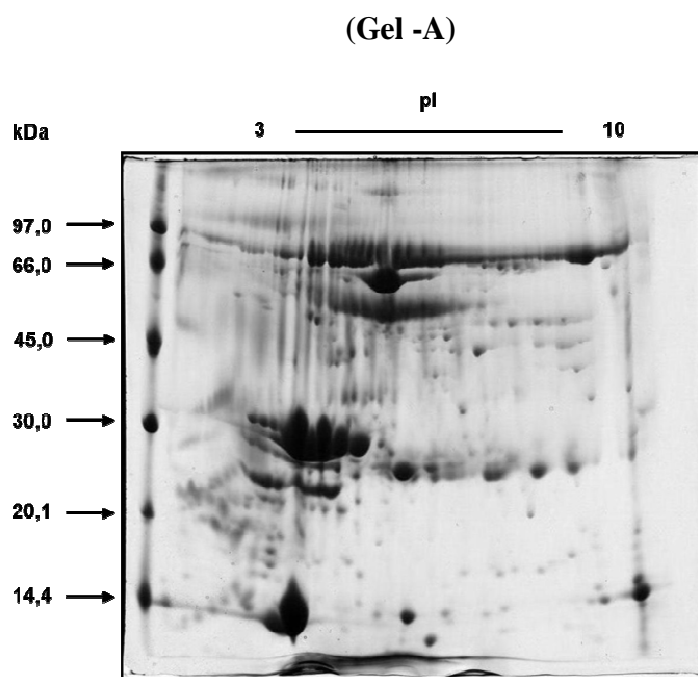


Figura 13. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra da lactante 04. Condições experimentais: Concentração do gel 12%, Gradiente de pH 3-10 ; Extração lípídica:1 mL de amostra:1 mL de hexano; Precipitação das proteínas: 250 μ L de amostra: 1 mL de acetona 80% (v/v).

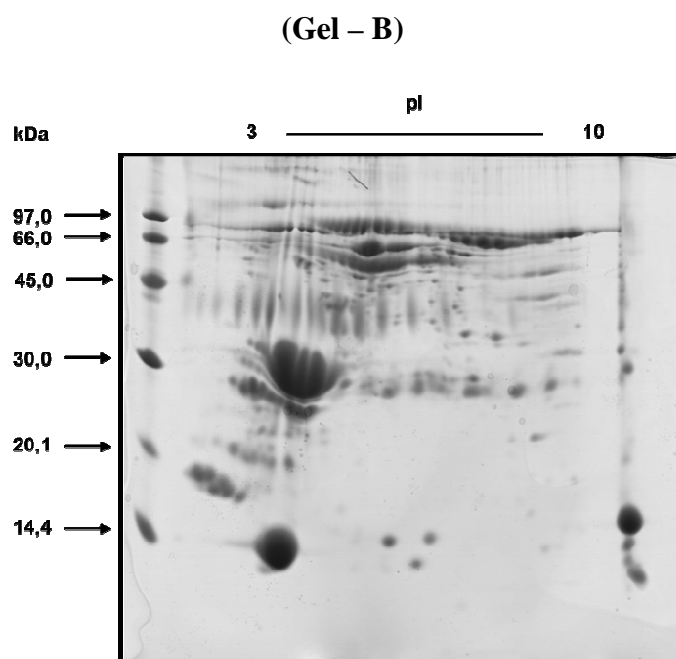


Figura 14. Gel obtido na corrida eletroforética da amostras da lactante 04. Condições experimentais: Concentração do gel 12%, Gradiente de pH 3-10 ; Extração lípídica:500 μ L de amostra:1 mL de hexano; Precipitação das proteínas: 250 μ L de amostra:1 mL de acetona 80% (v/v).

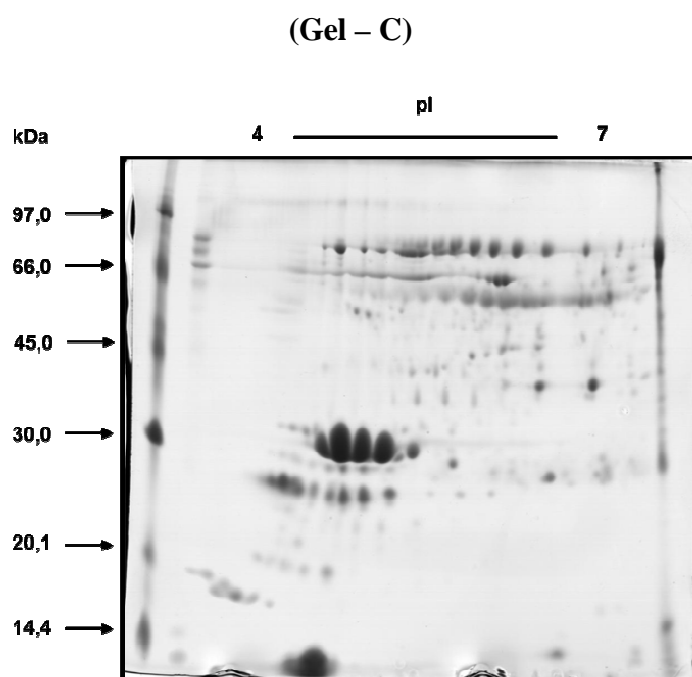


Figura 15. Gel obtido na corrida eletroforética da amostras da lactante 04. Condições experimentais: Concentração do gel 10%, Gradiente de pH 4-7; Extração lípídica:500 μ L de amostra:1 mL de hexano; Precipitação das proteínas: 250 μ L de amostra:1 mL de acetona 80% (v/v).

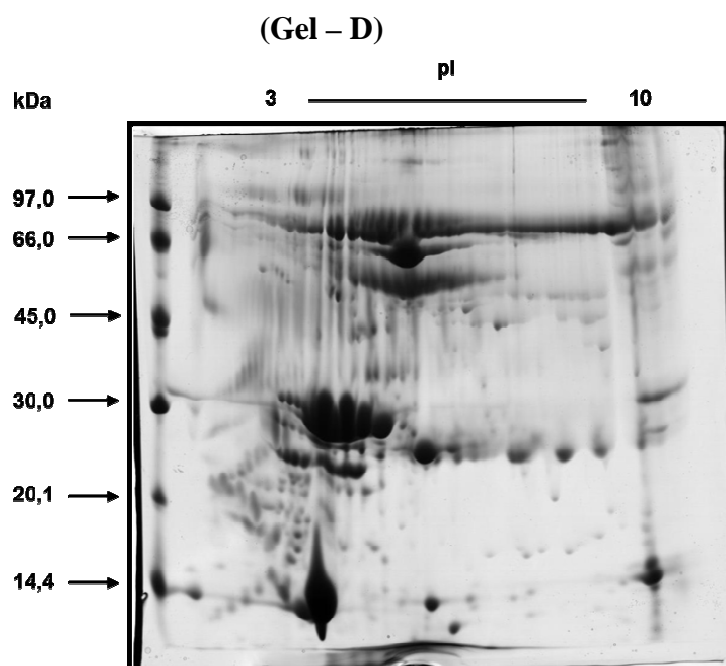


Figura 16. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra da lactante 04. Condições experimentais: Concentração do gel 12%, Gradiente de pH 3-10 ; Extração lípídica: 1 mL de amostra: 1 mL de hexano; Precipitação das proteínas: 250 μ L de amostra: 1 mL de etanol absoluto.

As imagens dos géis apresentados nas Figuras 13-16 foram analisados utilizando-se programa ImageMaster 2D Platinum 7.0. O resultado das análises de correlação entre as repetições dos géis, bem como a contagem de spots dos mesmos, são apresentados nas Tabelas 10.

Tabela 10. Resultados obtidos da análise de correlação entre as repetições dos géis da amostra de leite da lactante 04.

Gel	Número de Spots Média \pm Desvio Padrão	Correlação Média Entre os Géis – (%)
A	381 \pm 11	76 \pm 2
B	323 \pm 2	82 \pm 1
C	151 \pm 19	80 \pm 10
D	394 \pm 2	71 \pm 2

Conforme mostram as Figuras 13 e 16, os géis obtidos nas corridas eletroforéticas utilizando-se diferentes condições de extração lipídica, concentração do

gel, gradiente de pH e de precipitação das proteínas, de forma geral apresentaram boa resolução, o que demonstra que a separação de proteínas foi eficiente. Observa-se que os géis apresentam uma grande diversidade de spots proteicos, alguns com maior intensidade, e mais concentrados na região com pI entre 4 e 7 e massa molar em torno de 20-70 kDa. A análise de correlação entre os géis demonstrou que 76%, 82%, 80% e 71% dos spots proteicos estavam presentes nas duas repetições do gel A (Extração lípídica: 1 mL de amostra: 1 mL de hexano, gel B (Extração lípídica: 500 µL de amostra: 1 mL de hexano), gel C (Concentração do gel 10%, gradiente de pH: 4 -7), e gel D (Precipitação das proteínas: 250 µL de amostra: 1 mL de etanol absoluto), respectivamente. O número médio de spots encontrados nas repetições dos quatro géis (381, 323, 214 e 394) - apresentaram desvio padrão menor que 10% (com exceção do gel C, que apresentou desvio padrão de 10), o que é considerado muito bom no fracionamento de proteínas por 2D-PAGE [74,77]. Em relação ao gradiente de pH, analisando-se a Figura 15, observa-se que ocorreu uma melhor separação no gradiente de 4 a 7 no conjunto de proteínas de massa molar de 25 – 35 kD e de 60 – 97 kD, comprovando assim, que se deve trabalhar com dois gradientes de pH no fracionamento das proteínas das amostras objeto de estudo. Comparando-se os resultados obtidos na precipitação das proteínas com etanol absoluto com os resultados utilizando-se acetona a 80% (v/v), pode-se inferir que os dois agentes precipitantes são equivalentes. Mesmo considerando que a precipitação com acetona 80% (v/v), a concentração de proteína total é maior (Precipitado acetônico – 12,30±0,25; Precipitado etanólico – 7,30±0,13), a análise de correlação entre as repetições desses géis (gel A e gel D), demonstrou que o números de spots proteicos estão bem próximos, ou seja, a diversidade de spots proteicos é bem semelhante nos dois procedimentos de precipitação das proteínas.

4.5.1. Avaliação e comparação das imagens dos géis

A comparação das imagens entre os pares de géis feita considerando-se o processo de *matching*, que consiste em identificar quais spots são equivalentes entre estes pares. Para isso foi indicado manualmente 4 spots (landmarks) em cada um dos pares de géis no processamento do *matching*. Após esse procedimento, o programa faz a comparação entre o par de géis considerando os demais spots, identificando assim os spots que são equivalentes. As Figuras 17 - 20 ilustram o processo de comparação dos géis (*matching*) utilizando-se o programa ImageMaster 2D Platinum 7.0.

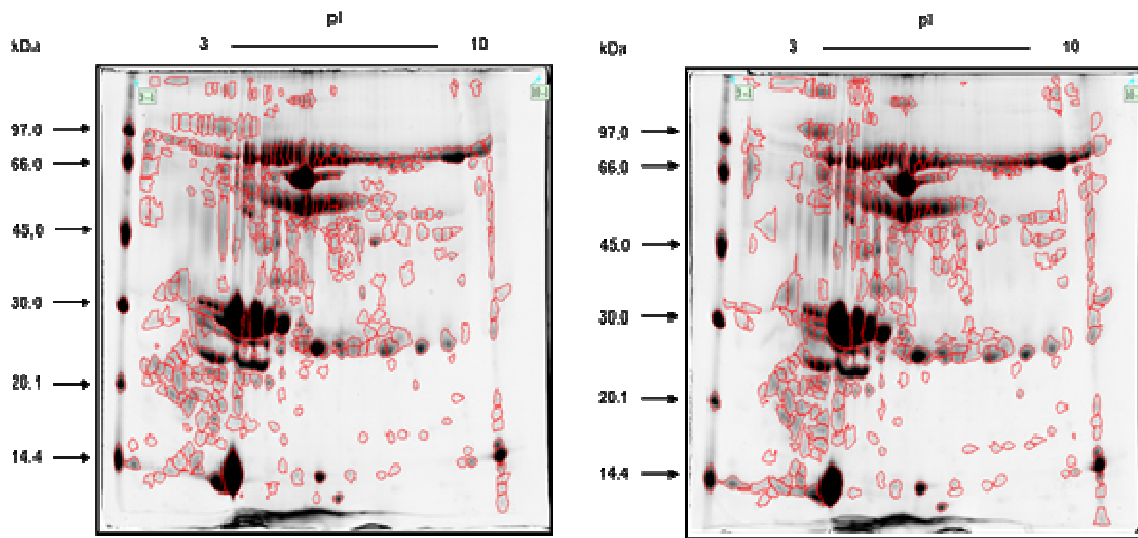


Figura 17. Sobreposições das imagens dos pares do gel A para obtenção do *matching* (comparação dos géis). Programa ImageMaster 2D Platinum 7.0.

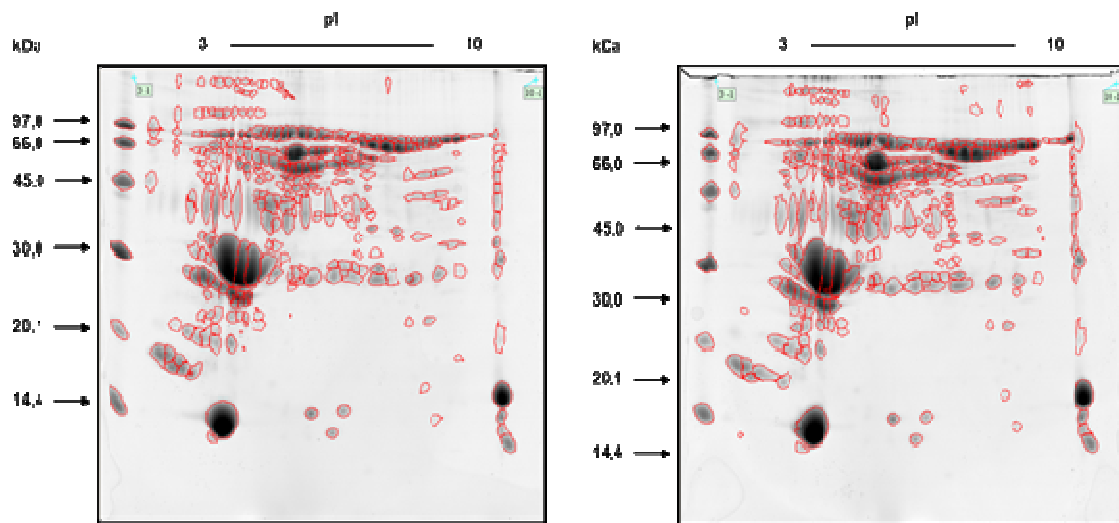


Figura 18. Sobreposições das imagens dos pares do gel B para obtenção do *matching* (comparação dos géis). Programa ImageMaster 2D Platinum 7.0.

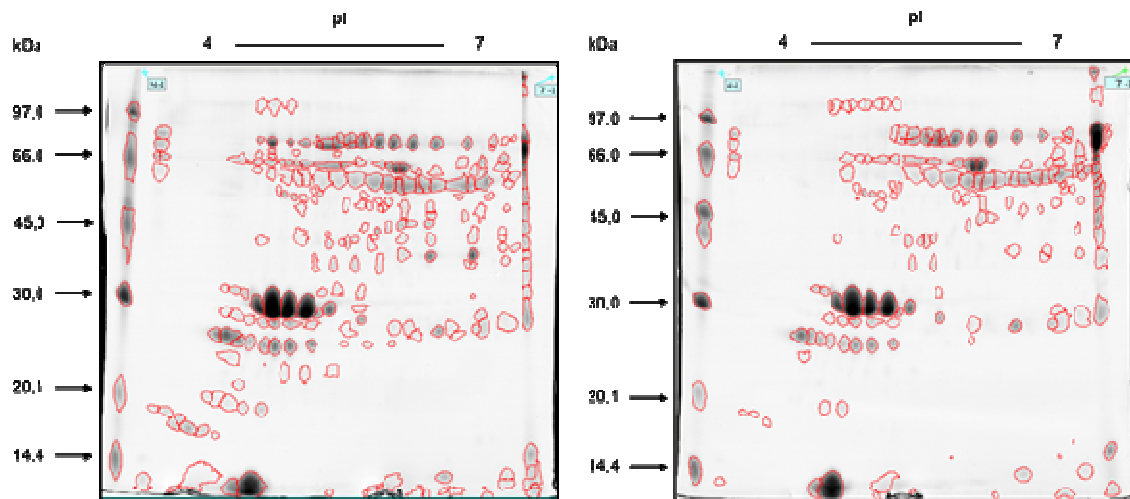


Figura 19. Sobreposições das imagens dos pares do gel C para obtenção do *matching* (comparação dos géis). Programa ImageMaster 2D Platinum 7.0.

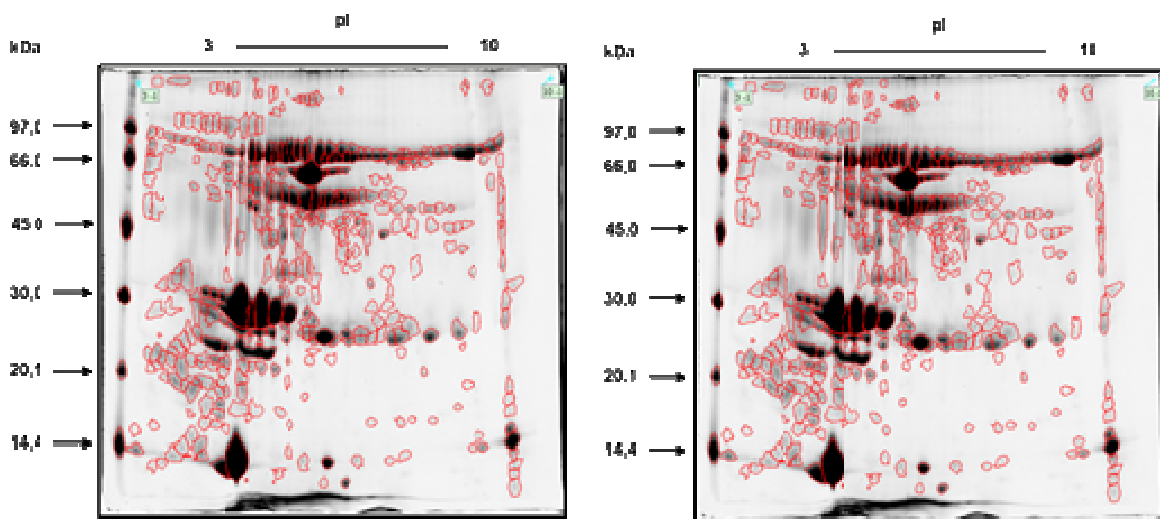


Figura 20. Sobreposições das imagens dos pares do gel D para obtenção do *matching* (comparação dos géis). Programa ImageMaster 2D Platinum 7.0.

As regiões demarcadas em vermelho nas Figuras 17–20 correspondem à forma e localização dos spots no par dos géis 1-4 com maior número de spots (master gel). O resultado desse processo de tratamento das imagens permitiu obter a correlação entre os pares de géis apresentadas na Tabela 10. No estudo das imagens dos géis, também foi feito a correlação entre os spots dos pares de géis considerando o volume normalizado - %V (Figuras 21 - 24), permitindo assim, a avaliação de uma possível correlação de expressão entre as proteínas dos spots proteicos analisados.

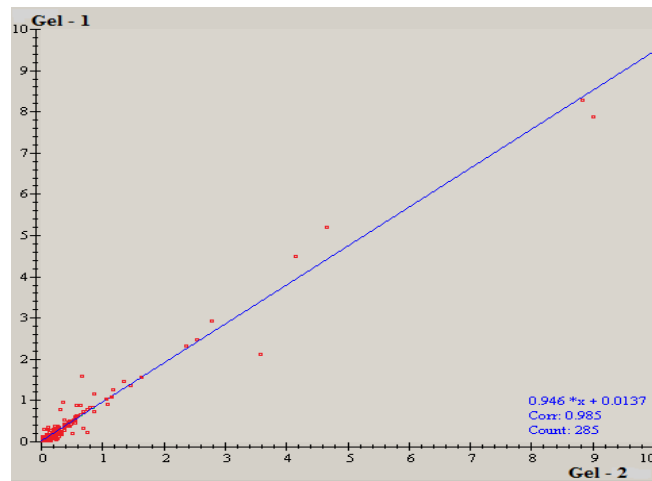


Figura 21. Correlação entre o volume normalizado (%V) dos spots dos pares do gel A (Gel 1; Gel 2 – repetições do gel A).

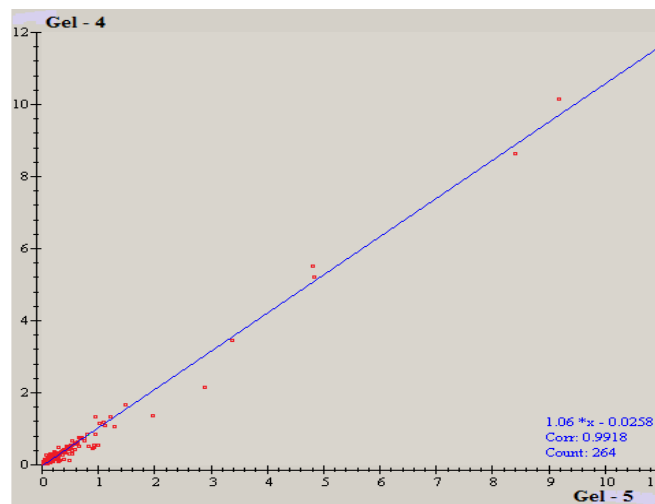


Figura 22. Correlação entre o volume normalizado (%V) dos spots dos pares do gel B (Gel 4; Gel 5 – repetições do gel B).

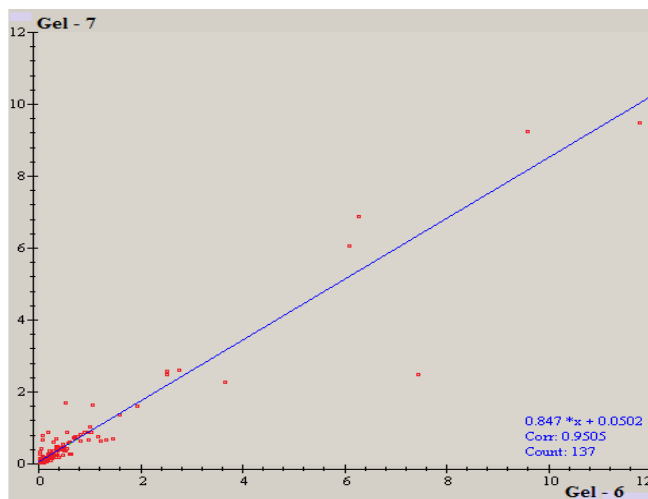


Figura 23. Correlação entre o volume normalizado (%V) dos spots dos pares do gel C (Gel 6; Gel 7 – repetições do gel C).

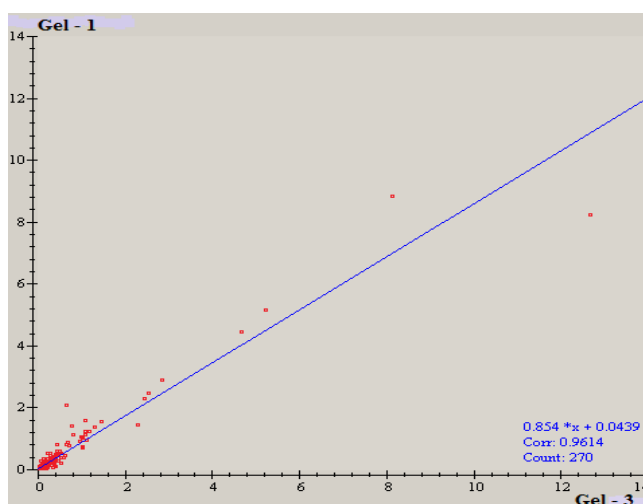
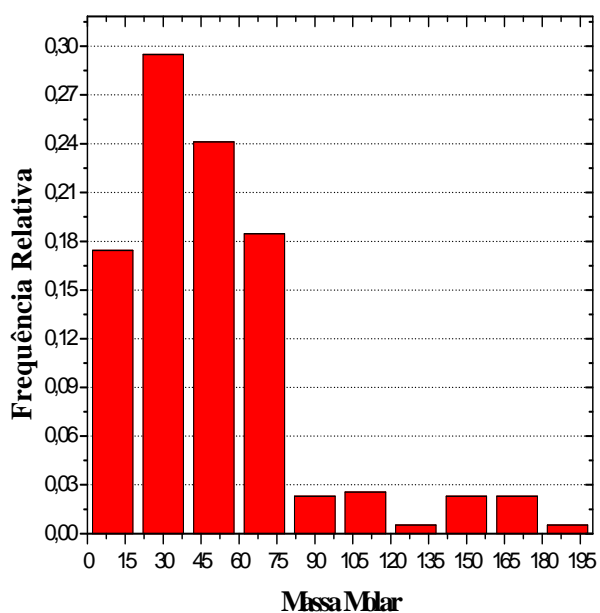


Figura 24. Correlação entre o volume normalizado (%V) dos spots dos pares do gel D (Gel 1; Gel 3 – repetições do Gel D).

Nas Figuras 21 – 24 cada ponto dos gráficos representa a relação entre o volume normalizado dos spots correlacionados durante o processo de *matching*. Analisando-se essas Figuras, pode-se observar uma razoável correlação ($R > 0,90$) entre os spots dos pares de géis considerando a %V [68]. No caso, considerando cada gráfico, quanto mais próximo o ponto estiver da reta, menor será a diferença de %V entre os spots equivalentes. Observa-se assim, que poucos spots estão distantes da reta (razão $> 1,8$), ou seja, pode-se inferir os spots equivalentes nos pares de géis analisados, apresentam uma boa correlação entre suas expressões.

Considerando ainda o estudo das imagens dos géis obtidos nas corridas eletroforéticas, foi feito um estudo de avaliação da distribuição dos spots nos géis. Esse estudo foi feito por meio de histogramas, que relacionam a frequência com que os spots aparecem nos géis (considerando cada repetição) em função de seu ponto isoelétrico (pI) e massa molar (MM) experimental. Os histogramas obtidos são mostrados nas Figuras 25 – 28.

(Gel 1)



(Gel 2)

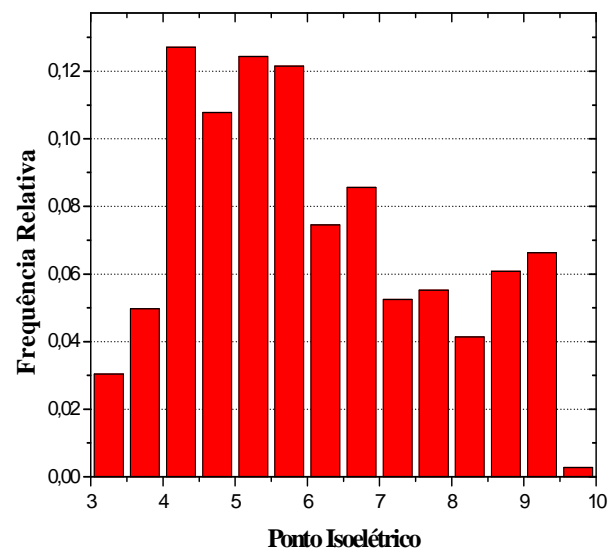
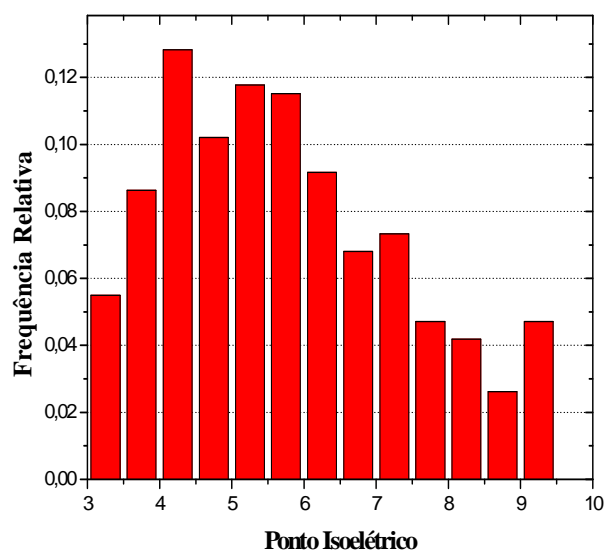
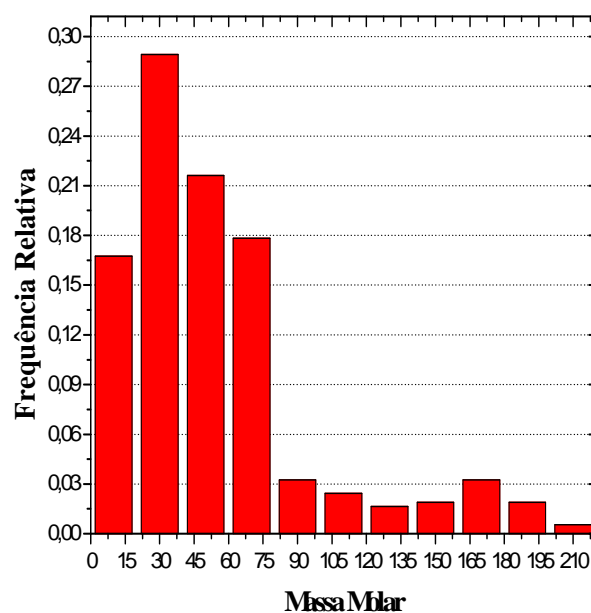
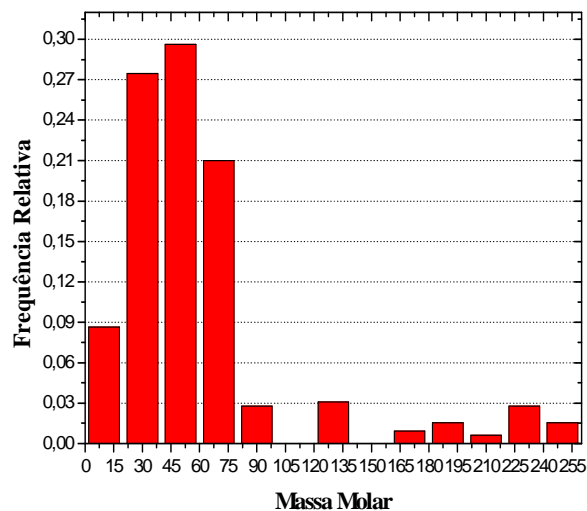


Figura 25. Histograma de distribuição dos spots proteicos entre as repetições do gel A (Gel 1; Gel 2 – repetições do gel A).

(Gel 4)



(Gel 5)

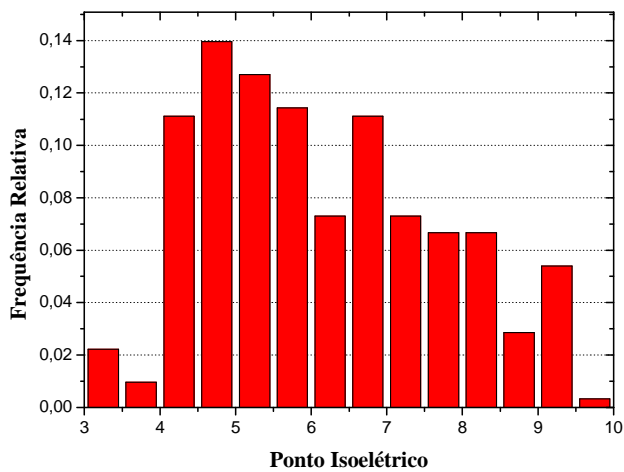
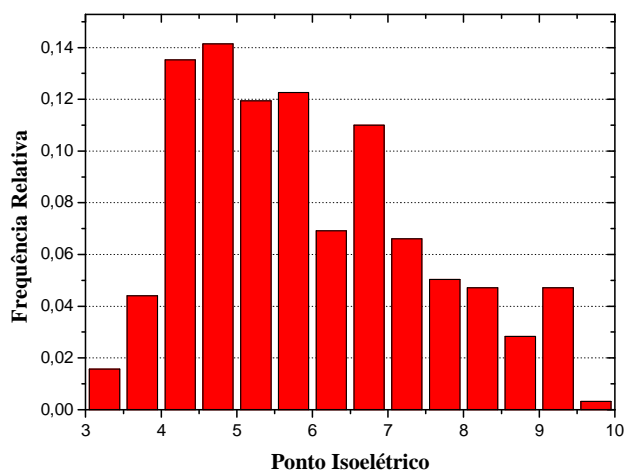
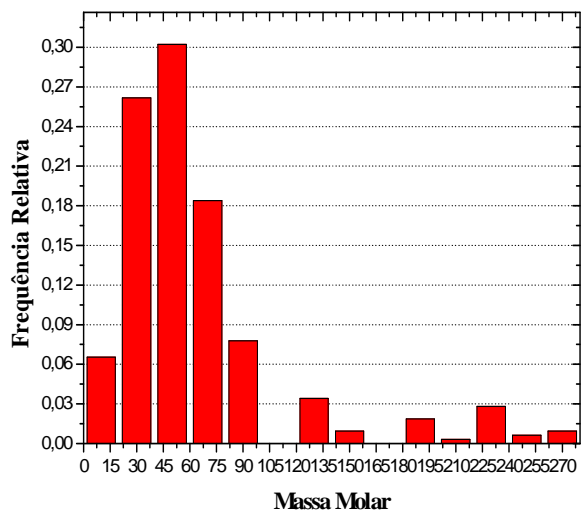
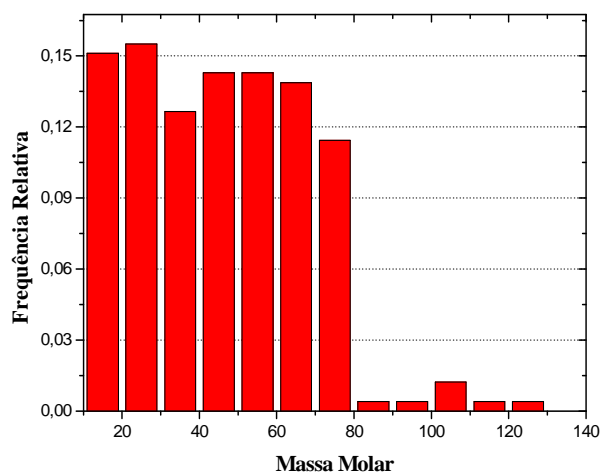


Figura 26. Histograma de distribuição dos spots proteicos entre as repetições do gel B (Gel 4; Gel 5 – repetições do gel B).

(Gel 6)



(Gel 7)

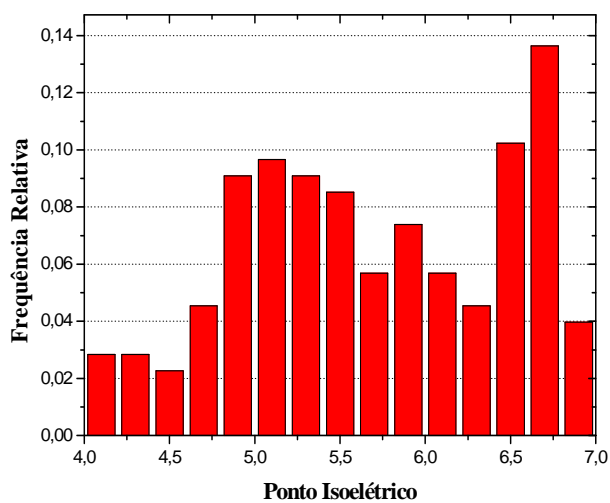
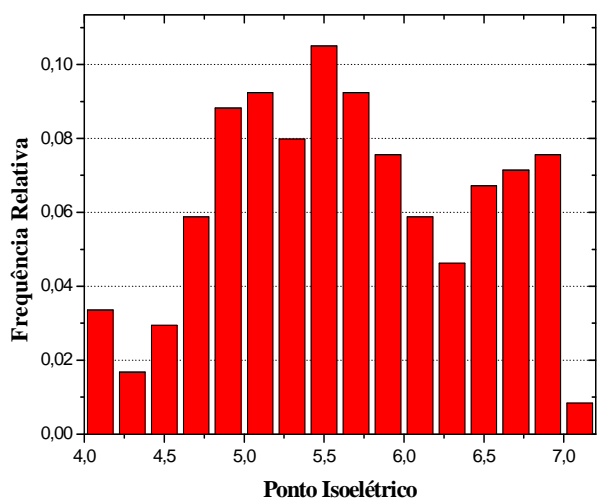
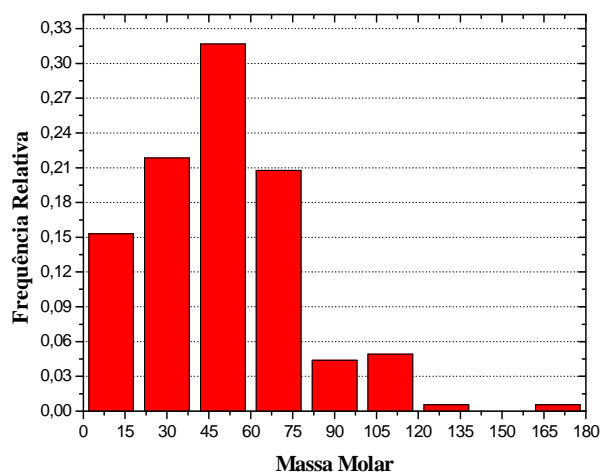


Figura 27. Histograma de distribuição dos spots proteicos entre as repetições do gel C (Gel 6; Gel 7 – repetições do gel C).

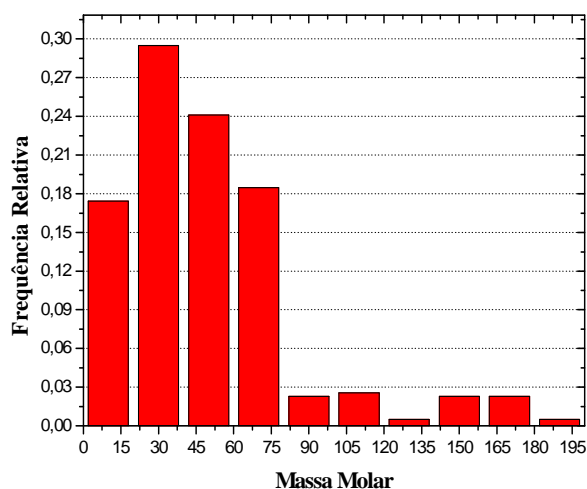
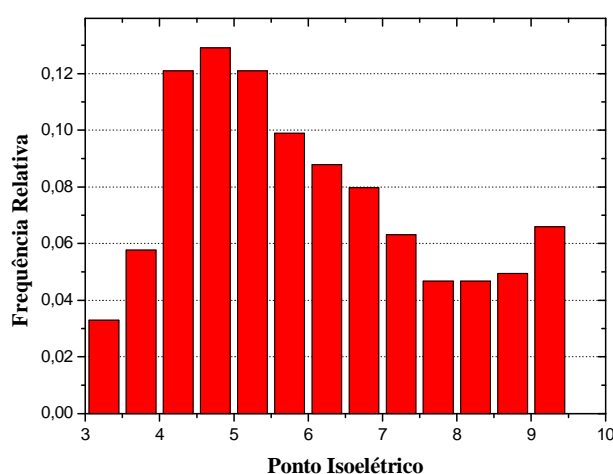
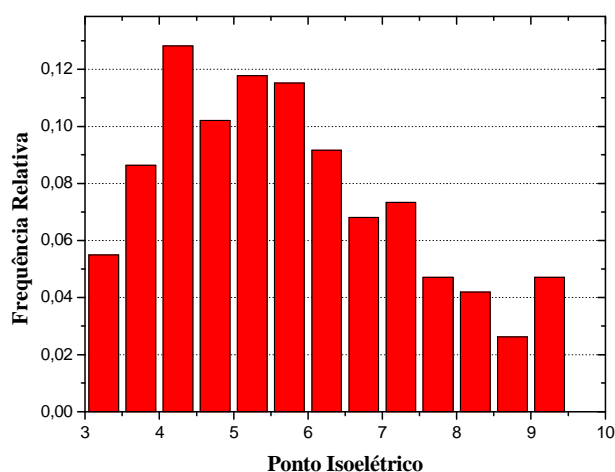
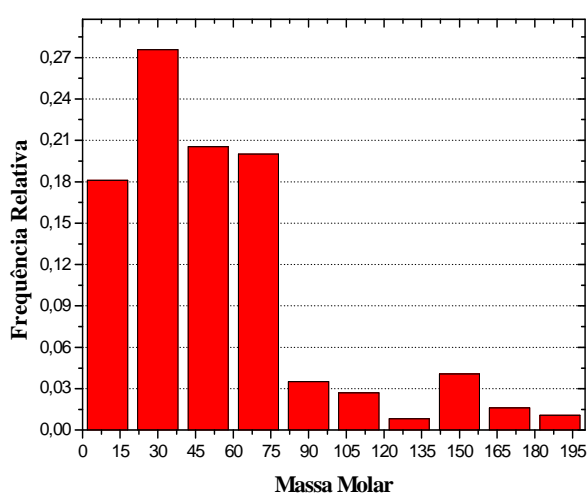
(Gel 1)**(Gel 3)**

Figura 28. Histograma de distribuição dos spots proteicos entre as repetições do gel D (Gel 1; Gel 3 – repetições do gel C).

Analisando-se as Figuras 25 - 28, observa-se que os histogramas de uma forma geral, com exceção do histograma da MMs da Figura 27 (gel 6 e 7), apresentam uma distribuição homogênea dos spots proteicos em função de seus respectivos pIs e MMs. Observa-se que a maioria dos spots proteicos que compõem o mapa proteômico da amostra objeto de estudo encontram-se distribuídos na faixa de 15 a 75 kDa, com pIs na faixa de 4 – 7, aproximadamente. O estudo de avaliação da distribuição dos spots nas repetições dos géis fornece resultados apenas qualitativos. A principal informação desse

estudo é demonstrar ao analista possíveis variações quanto a homogeneidade de distribuição dos spots proteicos em diferentes faixas de pH e também, permite identificar as regiões de alta frequência, o que pode ampliar a diversidade de proteínas em estudos por comparação de análise de imagens [68].

Depois de otimizados e avaliados os dois processos de precipitação das proteínas, precipitação em meio acetônico e etanólico. O procedimento de precipitação em meio acetônico foi mais eficiente do que o etanólico, no entanto, os géis obtidos nas corridas eletroforéticas em termos de quantidades de spots proteicos foram equivalentes e, apresentaram alta diversidade de proteínas. Conforme resultados apresentados, correlação média entre as repetições dos géis, considerando quatro diferentes procedimentos de corrida eletroforética foi de 77 ± 4 , o que é considerando muito bom no fracionamento de proteínas por 2D PAGE, no entanto, escolheu-se continuar os estudos com o procedimento de precipitação com solução gelada de acetona 80% devido sua maior eficiência.

4.6. Fracionamento das proteínas por 2D – PAGE da Lactante 16

O fracionamento das proteínas por 2D-PAGE foi feita com quatro repetições. Para precipitação das proteínas utilizou-se acetona 80% (v/v), pois como descrito no item 3.4.1, os dois agentes precipitantes tanto o etanol absoluto quanto acetona 80%, apresentaram resultados equivalentes. Nas Figuras 28, 30, 31, 32 ilustram quatro géis que correspondem as repetições do fracionamento das proteínas por 2D-PAGE com os spots proteicos nos quais foram detectado mercúrio destacados com círculo preto.

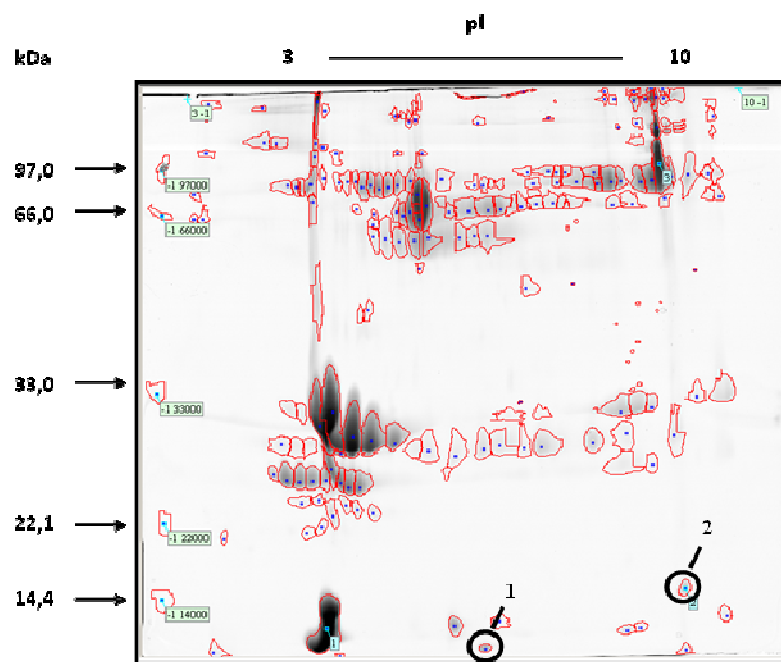


Figura 29: Gel de poliacrilamida 12,5% (m/v) de leite materno com 223 spots, pI situado na faixa de 3 a 10 e massa molar de proteína na faixa de 14,4 a 97,0 kDa (1ª repetição).

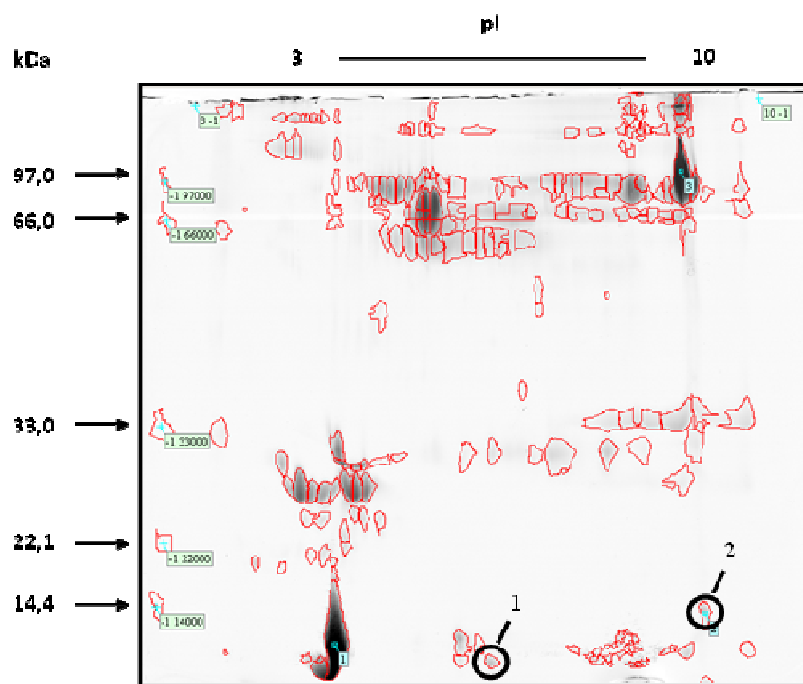


Figura 30: Gel de poliacrilamida 12,5% (m/v) de leite materno com 221 spots, pI situado na faixa de 3 a 10 e massa molar de proteína na faixa de 14,4 a 97,0 kDa (2ª repetição).

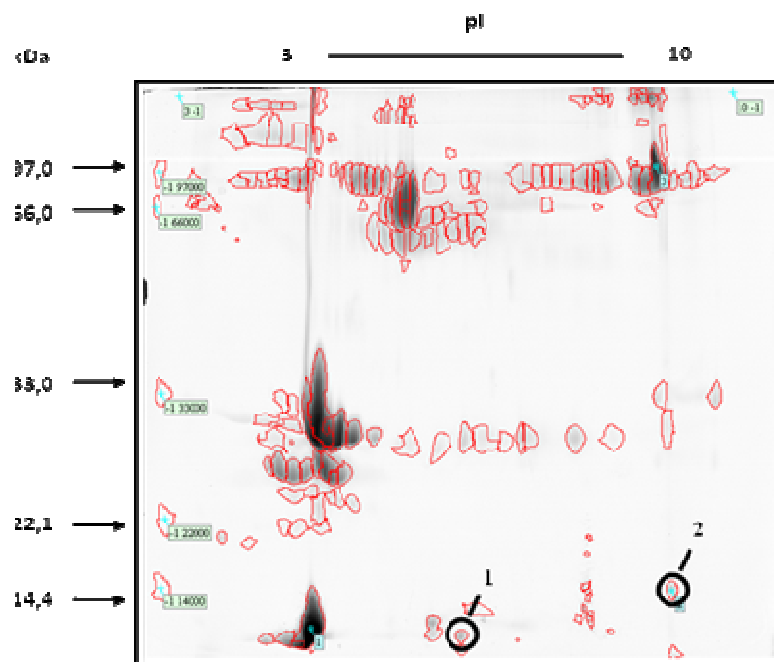


Figura 31: Gel de poliacrilamida 12,5% (m/v) de leite materno com 184 spots, pI situado na faixa de 3 a 10 e massa molar de proteína na faixa de 14,4 a 97,0 kDa (3ª repetição).

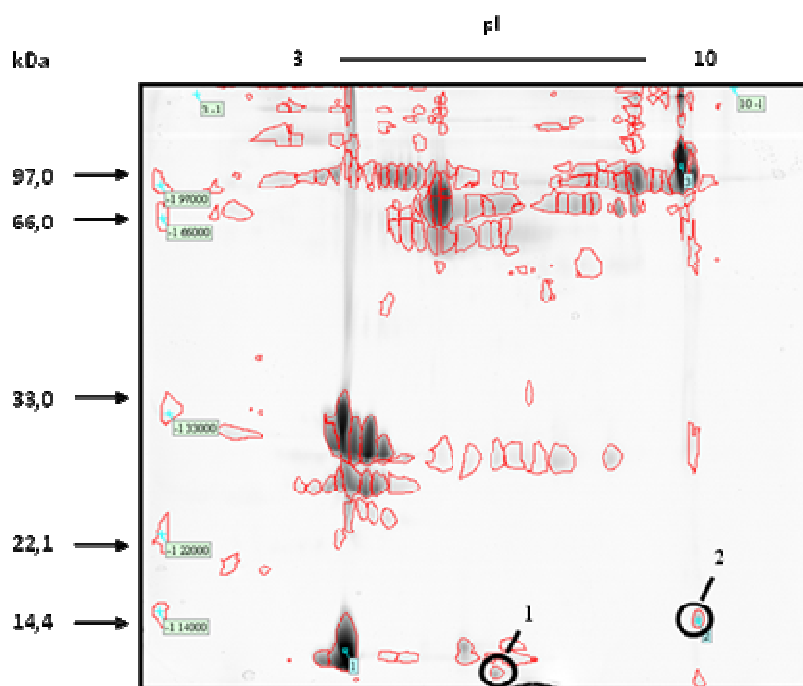


Figura 32: Gel de poliacrilamida 12,5% (m/v) de leite materno com 211 spots, pI situado na faixa de 3 a 10 e massa molar de proteína na faixa de 14,4 a 97,0 kDa (4ª repetição).

Conforme ilustrado nas Figuras 29 - 32 os géis obtidos nas corridas eletroforéticas foram reproduzidos considerando a etapa de otimização do processo de

fracionamento por 2D-PAGE apresentado no primeiro relatório. Os géis apresentaram uma alta diversidade de spots proteicos, alguns com maior intensidade e mais concentrados na região com pI entre 4 e 9 e massa molar em torno de 22-33 e 60-97 kDa. A análise de correlação entre os géis demonstrou que 69% dos spots proteicos estavam presentes nas quatro repetições dos géis. O número médio de spots encontrados nas quatro repetições foi de 210 spots, com desvio padrão 18 spots, o que é considerado bom no fracionamento de proteínas por 2D-PAGE [51,52]. A Figura 33 ilustra a boa correlação obtida entre os géis, indicando as intensidade dos spots 1 e 2 nos quais foram detectados mercúrio em 3^a dimensão, que é o objetivo principal no processo de fracionamento dessas proteínas.

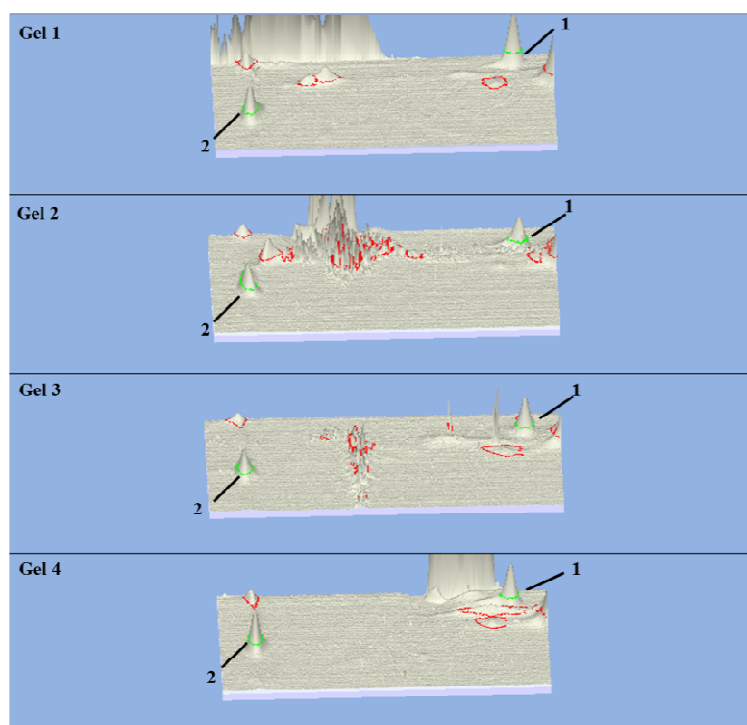


Figura 33: Ampliação em 3D da região selecionada do gel nos quais foram identificados a presença de mercúrio nos spots proteicos 1 e 2, indicados com círculo verde.

4.7. Quantificação de mercúrio nos spots proteicos da amostra de leite

Após a digestão ácida dos spots proteicos 1 e 2, foram feitas as quantificações de mercúrio pela técnica de fluorescência atômica utilizando a curva analítica apresentada na Figura 11. Foi determinada também a concentração de mercúrio presente na solução de ressolubilização dos *pellets* proteicos da amostra de leite da Lactante 16. Na Tabela 11 são apresentados os valores da concentração de mercúrio total na solução de

ressolubilização dos *pellets* proteicos da amostra de leite da Lactante 16, de massa molar e pI dos spots proteicos, a concentração de mercúrio e a massa de proteína nesses spots.

Tabela 11: Concentração de mercúrio na solução dos *pellets* proteicos e massa molar, pI, massa de proteína, concentração de mercúrio total nos spots 1 e 2 obtidos no fracionamento de proteínas por 2D PAGE da amostra de leite da lactante 16.

Amostras	pI	Massa Molar Da	Massa de Proteína (μg)**	Concentração de Hg
Solução*	-	-	-	12,80 $\mu\text{g/mL}$
Spot 1	6,76	10.729	1,60	4,70 mg/g^{***}
Spot 2	9,31	15.004	0,63	12,06 mg/g^{***}

*solução de ressolubilização dos *pellets* proteicos da amostra de leite da Lactante 16

**massa de proteína determinada utilizando o programa ImageMaster 2D Platinum 7.0

***mg de mercúrio por g de proteína do spot proteico

Os resultados apresentados na Tabela 11 não fornecem muitas informações porque não se sabe de quais proteínas se tratam. Dessa forma foi feita a conversão da das massas de mercúrio e das massas de proteínas para quantidades de átomos de mercúrio por molécula de proteína. Para isso, considerou-se as respectivas massas molares dos spots proteicos e do mercúrio, a massa de proteína nesses spots e que $1 \text{ kDa} = 1,661 \cdot 10^{-24} \text{ g}$. Esses cálculos possibilitaram a estimativa de quantos átomos de elementos estariam presentes por moléculas de proteína. Os cálculos estequiométricos utilizados na obtenção desses dados são apresentados a seguir.

Cálculo da concentração de mercúrio em mg/g de ressolubilização dos pellets proteicos da amostra de leite da Lactante 16:

C_{Hg} na solução = 12,80 $\mu\text{g/mL}$ ou 12,80 mg/L

Concentração de proteína total na solução = 15,33 g/L

Dessa forma :

C_{Hg} na solução = 12,80 $\text{mg}/13,33 \text{ g}$

C_{Hg} na solução = 0,83 mg/g

Cálculo da concentração de mercúrio em mg/g no spot 1

Concentração de Hg no extrato do spot 1 = 1,50 $\mu\text{g/L}$

Volume de extrato = 5 mL, dessa forma: 1,50 μg \rightarrow 1000 mL

$$x \rightarrow 5 \text{ mL} \rightarrow x = C_{\text{Hg}} = 7,50 \cdot 10^{-3} \mu\text{g}/5 \text{ mL}$$

Massa de proteína no spot 1 = 1,60 μg ; $C_{\text{Hg}} = 7,50 \cdot 10^{-3} \mu\text{g}/1,60 \mu\text{g}$ ou

$$C_{\text{Hg}} = 4,70 \cdot 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{g} \text{ ou } C_{\text{Hg}} = 4,70 \text{ mg/g}$$

- Para o spot utiliza-se o mesmo cálculo considerando que a massa de proteína calculada para esse spot foi de 0,63 μg , sendo que a $C_{\text{Hg}} = 12,06 \text{ mg/g}$.

Dados utilizados no cálculo do número de moléculas de proteínas no spot 1 e 2:

- **Spot 1;** Massa Molar = 10.729 DA; Massa de Proteína = 1,60 μg = $1,6 \cdot 10^{-6} \text{ g}$;

- **Spot 2;** Massa Molar = 15.004 DA; Massa de Proteína = 0,63 μg = $0,63 \cdot 10^{-6} \text{ g}$

- 1 Da = $1,661 \cdot 10^{-24} \text{ g}$

- Mercúrio, Massa Molar = 200, 59 g mol^{-1} ; Concentração de mercúrio = **4,70 mg/g**

- Constante de Avogadro = $6,022 \cdot 10^{23}$

Cálculo do número de moléculas de proteínas no spot 1

$$1\text{Da} \longrightarrow 1,661 \cdot 10^{-24} \text{ g}$$

$$10.729 \text{ Da} \longrightarrow x \quad ; \quad x = 1,8 \cdot 10^{-20} \text{ g}$$

$$1 \text{ molécula} \longrightarrow 1,8 \cdot 10^{-20} \text{ g}$$

$$x \longrightarrow 1,6 \cdot 10^{-6} \text{ g} \quad ; \quad x = 8,9 \cdot 10^{13} \text{ moléculas}$$

Cálculo do número de átomos de mercúrio no spot 1

$$4,70 \text{ mg Hg} \longrightarrow \text{g de proteína}$$

$$x \longrightarrow 1,6 \cdot 10^{-6} \text{ g} \quad ; \quad x = 7,52 \cdot 10^{-6} \text{ mg} \text{ ou}$$

$$7,52 \cdot 10^{-9} \text{ g de Hg}$$

$$1 \text{ mol de Hg} \longrightarrow 200,59 \text{ g}$$

$$200,59 \text{ g} \longrightarrow 6,022 \cdot 10^{23} \text{ átomos de}$$

$$7,52 \cdot 10^{-9} \text{ g} \longrightarrow x \quad ; \quad x = 2,26 \cdot 10^{13} \text{ átomos de Hg}$$

Cálculo da relação entre átomos de Hg e moléculas de proteína

$n^\circ \text{ átomos de Hg}/n^\circ \text{ moléculas de proteína} = 2,26 \cdot 10^{13}/8,9 \cdot 10^{13} = 0,25$ ou seja: 1 átomo de mercúrio por 4 moléculas do proteína do spot 1.

Cálculo do número de moléculas de proteínas no spot 2

$$1\text{Da} \longrightarrow 1,661 \cdot 10^{-24} \text{ g}$$

$$15.004 \text{ Da} \longrightarrow x \quad ; \quad x = 2,50 \cdot 10^{-20} \text{ g}$$

$$1 \text{ molécula} \longrightarrow 2,50 \cdot 10^{-20} \text{ g}$$

$$x \longrightarrow 0,63 \cdot 10^{-6} \text{ g} \quad ; \quad x = 2,50 \cdot 10^{13} \text{ moléculas}$$

Cálculo do número de átomos de mercúrio no spot 2

$$12,06 \text{ mg Hg} \longrightarrow \text{g de proteína}$$

$$x \longrightarrow 0,63 \cdot 10^{-6} \text{ g} \quad ; \quad x = 7,60 \cdot 10^{-6} \text{ mg ou}$$

$$7,60 \cdot 10^{-9} \text{ g de Hg}$$

$$1 \text{ mol de Hg} \longrightarrow 200,59 \text{ g}$$

$$200,59 \text{ g} \longrightarrow 6,022 \cdot 10^{23} \text{ átomos de}$$

$$7,60 \cdot 10^{-9} \text{ g} \longrightarrow x \quad ; \quad x = 2,30 \cdot 10^{13} \text{ átomos de Hg}$$

Cálculo da relação entre átomos de Hg e moléculas de proteína

$$\text{n}^{\circ} \text{ átomos de Hg/n}^{\circ} \text{ moléculas de proteína} = 2,30 \cdot 10^{13} / 2,50 \cdot 10^{13} = 0,92 \\ \cong 1$$

Com base nos resultados dos cálculos apresentados acima é possível estimar a proporção mercúrio por molécula de proteína dos spots 1 e 2. Dessa forma, pode-se inferir que spot 1 da amostra de leite da lactante 16, cada molécula de proteína apresenta aproximadamente 1 átomo de mercúrio por 4 moléculas de proteínas e, utilizando-se o mesmo raciocínio de cálculo, o spot 2 apresenta aproximadamente 1 átomo de mercúrio por molécula de proteína. Esses resultados embora estimativos, permitem inferir que os spots proteicos 1 e 2 podem ser metaloproteínas que apresentam sítios de coordenação ligados a átomos de mercúrio.

4.8. Caracterização das proteínas por espectrometria de massas

Para a caracterização das proteínas por espectrometria de massas, o gel da Lactante 16 foi obtidos por 2D-PAGE em faixa de pH 3-10. Dois spots onde obteve concentração de mercúrio foram recortados (Figura 29 - 32) e, antes de serem analisados no espectrômetro de massas, foi feita digestão trípica desses spots. A busca em banco de dados gerou, no caso do spot 1, a identificação de mais de uma proteína. Desse modo, selecionou-se a proteína que apresentou a maior pontuação (score). A tabela 12 apresenta as proteínas identificadas e as Figuras 29 – 32 a sua localização no gel.

Tabela 12. Proteínas identificadas utilizando espectrometria de massas para amostras de leite humano

Spot	Proteína	Acesso	Score	pI/MM experimental (kDa)	MM massas (kDa)	pI/MM teórica (kDa)	Cobertura (%)	Peptídeos sequenciados
1	Beta-casein	CASB_HUMAN	1425	6,80/10,80	26.01	5.52/ 25.40	6.19	VLPIPQQVVPYPQR
					----- STDYGIFQINSR AWWAWR			
2	Lysozyme C	LYSC_HUMAN	1150	9,30/15,00	17.72	9.38/ 16.50	20.95	VFER ATNYNAGDR
	Lysozyme C	LYSC_HUMAN	6803		17.72	9.38/ 16.50	17.57	VVRDPQGIR ATNYNAGDR DPQGIR LGMDGYR RLGMMDGYR

O spot 1, foi identificado neste trabalho como β -caseínas, localizada no gel com faixa de pH de 5,2 e massa molar igual a 26 kDa.

A caseína como uma classe de proteínas consiste de várias subunidades (α , β e κ) que formam micelas com Ca^{2+} e PO_4^{3-} , dando ao leite sua aparência branca característica. Sabe-se que ela também liga zinco e cobre. As β -caseínas, que tem 24-26 kDa, são as principais caseínas encontradas no leite materno. Atividades biológicas atribuídas à β -caseína ou aos seus fragmentos incluem o aumento da absorção de cálcio, imunostimulação e modulação, estímulo da síntese de DNA, etc [79,80]

Sabe-se que a sua síntese é baixa nos primeiros dias de lactação para, com o passar do tempo, ser uma das proteínas mais expressas do leite materno [81]. Todas as subunidades das caseínas (α , β e κ) não apresentam pontes de dissulfetos e, dessa forma, não formam estruturas globulares (estruturas secundárias e terciárias). Por apresentarem predominantemente estrutura primária, essas proteínas apresentam sítios de coordenação (grupos aminos e carboxílicos) terminais, principalmente dos aminoácidos glutamina e prolina, que se apresentam em maiores proporções na sequência peptídica. Esses sítios de coordenação formam ligações preferencialmente com íons cálcio mas, podem formar ligações com outros íons metálicos divalentes [82]. Observa-se pelos dados da Tabela 12, que os dados de massa molar obtidos no ESI MS/MS não coincidem com os dados estimados por 2D PAGE, no caso, como as β -caseínas apresentam predominantemente estrutura primária, pode ter ocorrido a clivagem da estrutura dessas proteínas em monômeros de menor massa molar, considerando as condições redutoras e reativas da 2D PAGE, no entanto, nos monômeros foram identificados a presença de mercúrio, o que indica que trata-se de uma ligação estável desse elemento com os sítios de ligação das frações monoméricas [82]. A literatura, até o momento, não apresenta nenhum trabalho que discute a possibilidade da ligação de mercúrio às caseínas. No entanto, como essas proteínas apresentam grupos amino aromáticos da glutamina, com características de base intermediária e podem formar ligações com íons como Hg^{2+} [78]. Essas ligações, mesmo não sendo específicas, caracterizam uma proteína *metal-binding*, não configurando o mercúrio como um cofator metálico [83]. Como o spot 1 apresentou expressão significativa e os dados obtidos de concentrações de mercúrio demonstraram que existe relação estequiométrica com a β -caseína (um átomo de mercúrio : 4 moléculas de β -caseína), pode-se inferir que este spot apresenta características de biomarcador de mercúrio [83].

O spot 2, foi identificado neste trabalho como Lysozyme C, localizada no gel com faixa de pH de 9.38 e massa molar igual a 17 kDa.

A Lisozima têm essencialmente uma função bacteriolíticas, esta presente nos vacúolos de fagócitos, nas secreções e nos fluídos extracelulares atinge sua maior concentração no leite humano (9-245,8 mg/L), concentração esta que chega a ser 300 vezes maior que no leite de vaca. A lisozima resiste ao pH ácido, é termoestável sendo encontrada intacta nas fezes de crianças alimentadas ao seio. A lisozima atua diretamente sobre a bactéria, mais especificamente clivando o peptoglican (polissacarídeo) de sua parede ou, ainda, potencializando a ação da IgA [84,85].

IgA é a imunoglobulina (anticorpo) mais abundante no leite humano, encontrada em grandes quantidades ao longo dos sistemas respiratório e gastrointestinal dos adultos. Estes anticorpos consistem de duas moléculas de IgA unidas e um componente chamado de secretor, que parece proteger as moléculas do anticorpo de serem degradadas pelo ácido gástrico e enzimas digestivas no estômago e intestinos. Crianças que não se alimentam de leite materno têm poucos meios de combater patógenos ingeridos até que comecem a fabricar IgA secretora por sua própria conta, frequentemente várias semanas ou mesmo meses após o nascimento [84,85].

A presença de metionina (base mole) na sequência peptídica da Lisozima C pode coordenar íons com características de ácido mole, como o Hg^{2+} [78, 83]. O spot 2 foi caracterizado como sendo essa proteína com mercúrio incorporado em sua estrutura. Esse spot apresenta expressão significativa e os dados obtidos na determinação de mercúrio demonstraram que existe relação estequiométrica (1 átomo mercúrio : 1 molécula de Lisozima), o que o qualifica como candidato à biomarcador de mercúrio [83].

5. CONCLUSÃO

As técnicas empregadas para a investigação de biomarcadores relacionados com metaloproteínas associadas ao mercúrio em amostra de leite materno mostraram-se relativamente eficazes. O uso da 2D-PAGE permitiu um bom fracionamento das proteínas. Os géis obtidos na fase de otimização indicaram que o procedimento de precipitação das proteínas em meio acetônico foi mais eficiente do que o etanólico, no entanto, os géis obtidos nas corridas eletroforéticas em termos de quantidades de spots

proteicos foram equivalentes e, apresentaram alta diversidade de proteínas, possibilitando assim uma boa corrida em diferentes faixas de pH.

A determinação de mercúrio nos spots proteicos obtidos no processo de fracionamento das proteínas por 2D PAGE indicaram a presença de mercúrio em dois spots proteico 1 e 2, com concentrações de 4,70 mg/g e 12,06 mg/g de mercúrio respectivamente, o que possibilitou estimar o número de átomos de mercúrio por moléculas de proteínas, indicando assim que tais proteínas são metaloproteínas ou proteínas metal ligante.

Com a caracterização dos spots proteicos foi possível identificar que as proteínas 1 e 2 são as β -caseínas e as Lisozima C respectivamente. Com base nos dados obtidos é possível inferir, no caso da β caseína, que a ligação do mercúrio não é específica, tratando-se de uma proteína *metal-binding*, não configurando o mercúrio como um cofator metálico, o que não desqualifica a β caseína como possível biomarcadora de mercúrio. Em relação a Lisozima C, a presença de metionina (base mole) na sequência peptídica pode estabelecer ligações com íons metálicos com características de ácido mole, como o Hg^{2+} , configurando uma ligação mais estável desse íon com grupos sulfidrila da Lisozima C e, caracterizando essa proteína como possível biomarcador de mercúrio.

6. REFERÊNCIAS

- [1] COUTO, R. C. S. **Hidrelétricas e Saúde na Amazônia: Um Estudo sobre a Tendência da Malária na Área do lago da Hidrelétrica de Tucuruí, Pará**. Tese de Doutorado, Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Instituto Oswaldo Cruz. 1996.
- [2] TUBAKI, R. M.; MENEZES, R. M. T. ; CARDOSO JUNIOR, R. P. Estudos em monitoramento entomológico: mudanças na frequência de mosquitos em habitats ripários da usina hidroelétrica de Igarapava, Sudeste do Brasil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, July/Aug, vol.46, no.4, p.223-229. 2004.
- [3] BASTOS, W. R. et. al. **Programa de Monitoramento Hidrobiogeoquímico do AHE JIRAU – Bacia do Rio Madeira**. Tectebel Energia, 2009.
- [4] GUIMARÃES J.R.D. et. al. Mercury in human and environmental samples from two lakes in Amapá, Brazilian Amazon: Natural background and anthropogenic contamination. **Ambio**, v. 28, p. 296-301, 1999.

- [5] FADINI, P. S.; JARDIM, W. F. Is the Negro river basin (Amazon) impacted by naturally occurring mercury? **Sci. Tot. Environ**, v. 275, p. 71-82, 2001.
- [6] HARAGUCHI, H. Metallomics as integrated biometal science. **J. Anal. At. Spectron**, v. 19, p. 5-14, 2004.
- [7] GARCIA, J.S.; MAGALHÃES, C.S.; ARRUDA, M.A.Z. Trends in metal-binding and metalloprotein analysis. **Talanta**, v. 69, p. 1-15, 2006.
- [8] LIMA, E. R. Z.; COLON, J. C.; SOUZA, M. T. Alterações auditivas em trabalhadores expostos ao mercúrio. **Rev. CEFAC**, v. 11, supl. 1, p. 62-67, 2009.
- [9] OLIVARES, I. R. B. **Emissões antrópicas de mercúrio para atmosfera na região de Paulínia/SP**. 2003. Dissertação (Mestrado)- Universidade Estadual de Campinas/SP. 2003.
- [10] JOSINO, C. M. et al. **A presença de mercúrio em casa constituiu um risco de contaminação humana e/ou ambiental?** Relato de um caso. Rio de Janeiro. 1997.
- [11] RUBEN, S. **Manual de elementos químicos**. Edgard Blücher Ltda, s/p. 1967.
- [12] AZEZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. As bases toxicológicas da ecotoxicologia. São Paulo. **Rima**. Intertox, 2003.
- [13] FARIA, M. A. M. Mercurialismo metálico crônico ocupacional. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, p. 116-127, 2003.
- [14] NASCIMENTO, S. E.; CHASIN, A. A. M. Ecotoxicologia do mercúrio e seus compostos. **Série Cadernos de Referencia Ambiental**, v. 1, p. 1-176, 2001.
- [15] MIRANDA, M. R. Mercúrio em sistemas aquáticos: fatores ambientais que afetam a metilação. Laboratório de Traçadores Wolfgang Christian Pfeiffer, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, **Artigo Oecol. Brás**, v. 11, p. 240-251, 2007.
- [16] VECCHIO, F. B. **Qualidade de vida e avaliação física em intoxicados por mercúrio: Estudo observacional transversal descritivo**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, 2005.
- [17] SILVEIRA, L. C. L.; VENTURA, D. F.; PINHEIRO, M. C. N. Toxicidade mercurial - avaliação do sistema visual em indivíduos expostos a níveis tóxicos de mercúrio. **Ciência e Cultura** On-line version ISSN 2317-6660, v. 56 n.1 São Paulo Jan./Mar. 2004.
- [18] WATANABE, C.; SATOH, H. Evolution of four understanding of methylmercury as a hearth threat. **Environmental Health Perspective**, v. 104, p. 367-379, 1996.

- [19] CARVAHO, W. A. **Efeito do metilmercúrio sobre a secreção de prolactina induzida por estresse de imobilização em ratos Wistar**. Dissertação de mestrado, Belém: Universidade Federal do Pará, p. 54, 2001.
- [20] BOENING, D. W. Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. **Chemosphere**, v. 40, p. 1335-1351, 2000.
- [21] LINHARES, D. P. et al. Mercúrio em diferentes tipos de solos marginais do baixo rio Madeira – Amazônia Ocidental. **Geochimica Brasiliensis**, v. 23, p. 117-130, 2009.
- [22] BASTOS, W. R.; LACERDA, L. D. A contaminação por mercúrio na bacia do rio madeira: uma breve revisão. **Geochimica Brasiliensis**, v. 18, p. 99-114, 2004.
- [23] BAHIA, M. O. **Le potentiel génotoxique du mercure: mutations HPRTet effects cytogénétiques**. Dissertação de Mestrado, Montreal: Université du Québec à Montreal, p. 119, 1997.
- [24] ROCHA, J. C. et. al. Reduction of mercury(II) by tropical river humic substances (Rio Negro) - Part II. Influence of structural features (molecular size, aromaticity, phenolic groups, organically bound sulfur). **Talanta**, v. 61, p. 699-704, 2003.
- [25] ROULET, M.; LUCOTTE, M.; GUIMARÃES, J. R. D.; RHEAULT, I. Methylmercury in water, seston and epiphyton of an Amazonian river and its foodplain, Tapajós river, Brazil. **The Sci. Total Environ**, v. 261, p. 43-48, 2000.
- [26] MAURO, J. B. N.; GUIMARÃES, J. R. D.; MELAMED, R. Mercury methylation in macrophyte roots of a tropical lake. **Water Air Soil Pollut**, v. 127, p. 271-280, 2001.
- [27] RAVICHANDRAN, M. Interactions between mercury and dissolved organic matter – a review. **Chemosphere**, v. 55, p. 319-331, 2004.
- [28] GUEDES, N. C. C. **Protocolo de avaliação do mercúrio potencialmente tóxico em águas naturais**. Tese (Doutorado)- Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas/SP, 2009.
- [29] CLARO, F. A.; ITO, F. R.; BASTOS, F. M.; RIBEIRO, M. E. Mercúrio no Amálgama Odontológico: Riscos da Exposição, Toxicidade e Métodos de Controle – Revisão da Literatura. **Rev. biociências**, Taubaté, v. 9, p. 47-54, 2003.
- [30] BOYD, S. A. et. al. Mercury Exposure and Cutaneous Disease. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 43, p. 81-90, 2000.
- [31] HERCULANO, P. M. et. al. Intoxicação por metilmercúrio ativa a óxido nítrico sintase em cultura de células da retina chick. Universidade Federal do Pará, Belém, PA, **Braz. J. Méd. Biol. Res.**, v. 39, p. 415-418, 2006.

- [32] SHENKER, B. J.; GUO, T. L.; SHAPIRO, I. M. Mercury-Induced Apoptosis in Human Lymphoid Cells: Evidence That the Apoptotic Pathway Is Mercurial Species Dependent. **Environ. Res.**, v. 84 A, p. 89-99, 2000.
- [33] SCHUURS, A. H. B. Reproductive Toxicity of Occupational Mercury. A Review of the Literature. **Journal of Dentistry**, v. 27, p. 249-256, 1999.
- [34] DREXLER, H.; SCHALLER, K. H.; The mercury concentration in breast milk resulting from amalgam fillings and dietary habits. **Environ. Res.** v. 77, p. 124-129, 1998.
- [35] SANDBORGH-ENGLUND, G.; ASK, K.; BELFRAGE, E.; EKSTRAND, J. Mercury exposure in utero and during infancy. **Tox. Environ. Health**, v. 63, p. 17-20, 2001.
- [36] SAKAMOTO, M. et. al. Declining risk of methylmercury exposure to infants during lactation. **Environ. Res.**, v. 90, p. 185, 2002.
- [37] YANG, J. et. al. Maternal-fetal transfer of metallic mercury via the placenta and milk. **Clin Sci Lab Ann**, v. 27, p. 135-141, 1997.
- [38] GUNDAKER, C. et. al. Lead and mercury in breast milk. **Pediatrics**, v. 110, p. 873-878, 2002.
- [39] JENSEN, T. K. et. al. Effects of breast feeding on neuropsychological development in a community with methylmercury exposure from seafood. **J. Epid. Exp. Sci. Env. Epid.** v. 15, p. 423-430, 2005.
- [40] DUNN, A.M., BURNS, C, SATLLER, B. Environmental Health of Children. **J. Ped. Heal. Care**, v. 17, p. 223-231, 2003.
- [41] GRANDJEAN, P.; BUDTZ-JORGENSEN, E.; WHITE, R. F. Methylmercury exposure biomarkers as indicators of neurotoxicity in children aged 7 year. **Amer. J. Epid.**, v. 150, p. 301-304, 1999.
- [42] STEUERWALD, U. et. al. Maternal seafood diet, methylmercury exposure, and neonatal neurological function. **The J. of Ped.**, v. 136, p. 599-605, 2000.
- [43] MARQUES, R. C. **Avaliação da exposição ao mercúrio e seus compostos sobre o desenvolvimento neuropsicomotor em crianças de Porto Velho-RO.** Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais), Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, Brasil. Belém, p. 102, 2002.
- [44] GAO, Y. et. al. Detection of metalloproteins in human liver cytosol by synchrotron radiation X-ray fluorescence after sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 485, p. 131-137, 2003.

- [45] ROMANOWSKI, S. M. M.; MANGRICH, A. S.; NEVES, A. Síntese e caracterização de novos compostos de coordenação de cobre (II) com ligantes não simétricos N,O-doadores: contribuições para o sítio ativo da galactose oxidase. **Química Nova**, v. 24, p. 592-598, 2001.
- [46] Chang, C. C. et. al. Mn,Cd-metallothionein-2: a room temperature magnetic protein. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 340, p. 1134-1138, 2006.
- [47] MELENDEZ, L. B. et. al. Determinação de Metalotioneínas e Fitoquelatinas utilizando a técnica de HPLC-ICP-MS. **Revista Virtual de Química**, v. 4, p. 612-622, 2012.
- [48] BINZ, P. A.; KÄGI, J. H. R. Metallothionein: molecular evolution and classification. In: Klaassen, C. D., **Metallothionein Birkhauser Verlag Basel**, ed. IV, 1999.
- [49] MONSERRAT, J. M. et. al. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Comparative biochemistry and physiology*. **Pharmacology, toxicology and endocrinology**, v. 146, p. 221-234, 2007.
- [50] LEMOS, M. F. L.; SOARES, A. M. V. M.; CORREIA, A. C.; ESTEVES, A. C. Proteins in ecotoxicology - how, why and why not? **Proteomics**, v. 10, p. 873-887, 2010.
- [51] HYLLAND, K.; HAUX, C.; HOGSTRAND, C. Hepatic metallothionein and heavy metals in dab *Limanda limanda* from the German Bight. **Marine Ecology Progress Series**, v. 91, p. 89- 96, 1992.
- [52] SCHLENK, D.; ZHANG, Y. S.; NIX, J. Expression of hepatic metallothionein messenger RNA in feral fish and caged fish species correlates with muscle mercury levels. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 31, p. 282-286, 1995.
- [53] OLSVIK, P. A.; GUNDERSEN, P.; ANDERSEN, R. A.; ZACHARIASSEN, K. E. Metal accumulation and metallothionein in two populations of brown trout, *Salmo trutta*, exposed to different natural water environments during a run-off episode. **Aquatic toxicology**, v. 50, p. 301-316, 2000.
- [54] FILIPOVI, V.; RASPOR, B. Metallothionein and metal levels in cytosol of liver, kidney and brain in relation to growth parameters of *Mullus surmuletus* and *Liza aurata* from the Eastern Adriatic Sea. **Water Research**, v. 37, p. 3253-3262, 2003.
- [55] NEVES, R. C. F. et. al. Fracionamento de cobre em proteínas do plasma, músculo e fígado de tilápia do Nilo. **Química Nova**, v. 35, p. 493-498, 2012.

- [56] MORAES, P. M. et. al. A Preliminary and Qualitative Metallomics Study of Mercury in the Muscle of Fish from Amazonas, Brazil. **Biological Trace Element Research**, v. 150, p. 195-199, 2012.
- [57] SANTOS, F. A. et. al. Metallomic study of plasma samples from Nile tilapia using SR-XRF and GFAAS after separation by 2D PAGE: initial results. **Microchimica Acta**, v. 173, p. 43-49, 2011.
- [58] LIMA, P. M. et. al.. Analytical approach to the metallomic of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver tissue by SR-XRF and FAAS after 2D-PAGE separation: Preliminary results. **Talanta**, v. 82, p. 1052-1056, 2010.
- [59] ROCHA, J.C. et. al. Reduction of mercury(II) by tropical river humic substances (Rio Negro) - Part II. Influence of structural features (molecular size, aromaticity, phenolic groups, organically bound sulfur), **Talanta**, v. 61, p. 699-707, 2003.
- [60] OLIVEIRA, L.C. et. al. Distribuição de mercúrio em diferentes solos da Bacia do Médio Rio Negro-AM: influência da matéria orgânica no ciclo biogeoquímico do mercúrio. **Química Nova**, v. 30, p. 274-280, 2007.
- [61] GOMES, J.P.O. et. al. Geoquímica de elementos-traço em sólidos em suspensão no alto rio Madeira, Rondônia, Brasil. **Geochimica Brasiliensis**, v. 23, p. 49-67, 2009.
- [62] GALVÃO, R.C.F. et. al. Variação sazonal de elementos-traço associados aos sólidos em suspensão no alto rio Madeira, Amazônia Ocidental. **Geochimica Brasiliensis**, v. 23, p. 67-68, 2009.
- [63] BASTOS, W. & LACERDA, L.D. A contaminação por Mercúrio na bacia do Rio Madeira: Uma breve revisão. **Geochimica Brasiliensis**, v. 18, n. 2, p. 99-114, 2004.
- [64] TSCHÖPEL, P. et al. Zur Ursache und Vermeidung systematischer fehler bei elementbestimmungen in wäßrigen lösungen im ng/ml – und pg/ml. **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, v. 302, n. 3, p. 1-14, 1980.
- [65] LANÇAS, F.M.; SILVA, J.C.R.; BICUDO, R.C.; NETO, M.B. A química analítica do proteoma. **Analytica**, v. 6, p. 60-67, 2003.
- [66] LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- [67] **Determination of Total Mercury in Coal and Fly Ash Using Thermal Decomposition and Amalgamation Coupled with Atomic Absorption**. PerkinElmer LAS Application Note 008646_01: URL address if posted on your website.

- [68] GÓMEZ-ARIZA, J.L. et. al. Use of mass spectrometry techniques for the characterization of metal bound to proteins (metalloomics) in biological systems, **Anal. Chim. Acta.** n. 524, p. 15-22, 2004.
- [69] DOUMAS B. T., BAYSE D. B., BORNER K., CARTER R. J. A candidate reference method for determination of total protein in serum. II. Test for transferability. **Clin. Chem.** v. 27, p. 1651-1654, 1981.
- [70] BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. **Introdução à química de alimentos.** 3ª ed., São Paulo: Livraria Varela, p. 238, 2003.
- [71] LUCARINI, A.C.; KILIKIAN, B.V. Comparative study of Lowry and Bradford methods: interfering substances. **Biotechnology Techniques**, v.13, p.149-154, 1999.
- [72] Manual do usuário, 11-0034-38, Image master 2D platinum 7.0, GE HEALTHCARE, Edition AA, 2007.
- [73] MORAES, P. M. et. al. GFAAS determination of mercury in muscle samples of fish from Amazon, Brazil. **Food Chemistry**, v. 141, p. 2614-2617, 2013.
- [74] MAGARELLI, G.; FOSTIER, A. H. Quantificação de fluxos de mercúrio gasoso na interface solo/atmosfera utilizando câmara de fluxo dinâmica: aplicação na bacia do rio negro. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 968-974, 2005.
- [75] Instituto Nacional de Metrologia. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos**, DOQ-CGCRE-008, rev. 2, p. 13-14, 2007.
- [76] CURRIE, L. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). **Anal. Chim. Acta.**, v. 391, p.105-126, 1999.
- [77] **Determination of Total Mercury in Coal and Fly Ash Using Thermal Decomposition and Amalgamation Coupled with Atomic Absorption.** PerkinElmer LAS Application Note 008646_01: URL address if posted on your website.
- [78] PEARSON R. G. Hard and soft acids and bases. **J. Am. Chem. Society**, v. 85, p. 3533-3539, 1963.
- [79] LONNERDAL, B; FORSUM, E. Casein content of human milk. **The American Journal of Clinical Nutritional**, v. 41, n. 1, p. 113-120, 1985.
- [80] KROENIG, T. A; MUKERJI, P; HARDS, R. G. Analysis of beta-casein and its phosphoforms in human milk. **Nurition Research**, v.18, n.7, p. 1175-1186, 1998.
- [81] LONNERDAL, B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. **The American Journal of Clinical Nutritional**, v.77 n.6, p. 1537-543, 2003.

- [82] LGNNERDAL, B. O. et. al. *FEBS Letters*, v. 269, p. 153-156, 1990.
- [83] GARCIA, J. S.; MAGALHÃES, C. S.; ARRUDA, M. A. Z. Trends in metal binding and metalloprotein analysis. **Talanta**, v. 69, p. 1-15, 2006.
- [84] BARROS, M. D.; KULESZA, T. M.; RANNA, W. Papel do leite materno na defesa do lactente contra infecções. **Revista Pediatria de São Paulo**, v. 4, p. 88-102, 1982.
- [85] NEWMAN, J. How breast milk protects newborns. **Scientific American**, v. 4, p. 76-79, 1995.