



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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

CONTAMINAÇÃO POR MERCÚRIO EM POPULAÇÕES
RIBEIRINHAS DA REGIÃO AMAZÔNICA: IDENTIFICAÇÃO DE
BIOMARCADORES ASSOCIADOS À FREQUÊNCIA DE
EXPOSIÇÃO

NUBYA GONÇALVES CAVALLINI

PROF. DR. PEDRO DE MAGALHÃES PADILHA

DR. JOSÉ CAVALCANTE SOUZA VIEIRA

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

BOTUCATU – SP

2025

NUBYA GONÇALVES CAVALLINI

**CONTAMINAÇÃO POR MERCÚRIO EM POPULAÇÕES
RIBEIRINHAS DA REGIÃO AMAZÔNICA:** identificação de
biomarcadores associados à frequência de exposição

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*.

Orientador: Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha

Coorientador: Dr. José Cavalcante Souza Vieira

BOTUCATU – SP

2025

C377c

Cavallini, Nubya Gonçalves

Contaminação por mercúrio em populações ribeirinhas da região
Amazônica : identificação de biomarcadores associados à frequência de
exposição / Nubya Gonçalves Cavallini. -- Botucatu, 2025

88 p. : il., tabs., fotos, mapas

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

Orientador: Pedro de Magalhães Padilha

Coorientador: José Cavalcante Souza Vieira

1. Compostos mercuriais. 2. Estresse oxidativo. 3. Espectrometria de massa.
4. Marcadores bioquímicos. 5. Proteoma plasmático. I. Título.

REGISTRO DO POTENCIAL IMPACTO CIENTÍFICO, ECONÔMICO E SOCIAL DA TESE PARA SOCIEDADE

Título da Tese: Contaminação por mercúrio em populações ribeirinhas da região Amazônica: identificação de biomarcadores associados

Impacto científico: O presente estudo, desenvolvido a partir de estudos metalômicos, contribuiu para uma melhor compreensão da atuação do mercúrio em uma rede de interações proteicas. A identificação de proteínas com um padrão de atividade anormal é associada com a frequência de exposição ao mercúrio e permite a avaliação dos riscos de exposição ao mercúrio com elevada confiabilidade em curto espaço de tempo, possibilitando ações preventivas. Além disso, o processo de amostragem utilizando cartões *Noviplex™* permite coletar fluídos biológicos sem a necessidade de frascos especiais, equipamentos de refrigeração e centrifugação. Assim, essa técnica introduziu conveniência e redução de custos associados com coleta e transporte, gerando tecnologia bioanalítica sofisticada e diagnósticos em regiões dispersas e de difícil acesso, como no caso da região Amazônica.

Impacto econômico e social: Os biomarcadores de frequência de exposição ao mercúrio identificados poderão ser utilizados em programas de prevenção, monitoramento, controle e fiscalização da contaminação desse elemento em humanos, respaldando tecnicamente a magnitude dos impactos socioambientais e na saúde pública.

Thesis Title: Mercury Contamination in Riverside Populations in the Amazon Region: Identification of Associated Biomarkers.

Scientific Impact: This study, developed through metallomic analyses, contributed to a better understanding of the role of mercury in a network of protein interactions. The identification of proteins exhibiting abnormal activity patterns is associated with the frequency of mercury exposure and enables the assessment of mercury exposure risks with high reliability in a short period of time, thus facilitating preventive actions. Furthermore, the sampling process utilizing *Noviplex™* cards allows for the collection of biological fluids without the need for specialized containers, refrigeration equipment, or centrifugation. This technique introduces convenience and cost reduction related to sample collection and transport, leading to sophisticated bioanalytical technology and diagnostics in remote and hard-to-reach regions, such as the Amazon region.

Economic and Social Impact: The biomarkers for mercury exposure frequency identified in this study can be used in programs aimed at prevention, monitoring, control, and regulation of mercury contamination in humans, thereby providing technical support for assessing the magnitude of its socio-environmental impacts and public health consequences.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE NUBYA GONÇALVES CAVALLINI, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA GERAL E APLICADA, DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 10 dias do mês de fevereiro do ano de 2025, às 14h, no(a) Sala da Pós-Graduação da Central de Aulas II, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de NUBYA GONÇALVES CAVALLINI, intitulada **CONTAMINAÇÃO POR MERCÚRIO EM POPULAÇÕES RIBEIRINHAS DA REGIÃO AMAZÔNICA: IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES ASSOCIADOS À FREQUÊNCIA DE EXPOSIÇÃO**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. PEDRO DE MAGALHAES PADILHA (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Ciências Químicas e Biológicas / Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp, Profr. Dra. ADRIELLI CRISTINA PERES DA SILVA (Participação Presencial) do(a) Departamento de Ciências Químicas e Biológicas / Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp, Dra. BRUNA CAVECCI MENDONÇA (Participação Presencial) do(a) Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos - Unesp, Prof. Dr. LINCOLN CARLOS SILVA DE OLIVEIRA (Participação Presencial) do(a) Instituto de Química / Universidade Federal do Mato Grosso do Sul - UFMS, Prof. Dr. WELDER ANGELO BALDASSINI (Participação Presencial) do(a) Departamento de Nutrição Animal e Ciência da Carne / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Unesp. Após a exposição pela doutoranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: Aprovado. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.


Prof. Dr. PEDRO DE MAGALHAES PADILHA

DEDICATÓRIA

É de suma importância destacar as relações simbólicas com o ambiente, bem como a diversidade de práticas e manifestações culturais que, longe de serem homogêneas, caracterizam as identidades amazônicas, incluindo as das comunidades ribeirinhas. Desse modo, as implicações do processo industrial e utilitarista sobre as matrizes geracionais transcendem os aspectos meramente quantitativos relacionados ao meio ambiente e à saúde pública, abrangendo também os dinamismos e sincretismos únicos que permeiam a organização histórica e étnica desse território. Posto isto,

Dedico aos povos e comunidades tradicionais da Amazônia cuja cosmovisão, parafraseando o poeta potiguar François Silvestre, trazem no peito o cheiro e a cor da sua terra, a marca de sangue de seus mortos e a certeza de luta de seus vivos.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe Márcia e a minha irmã Bárbara pelo apoio e incentivo diário.

Ao meu namorado, amigo e companheiro, Bruno Poloni por ter proporcionado dias mais leves e felizes.

Aos amigos: Ana Paula Gomes, Angélica Dias, Bárbara Lopes, Bernardo Teixeira, Bruno Rosado, Bryan Fava, Eliete Brunetto, Filipe Rodolfo, Flávia Zanatta, Jordana Machado, Larissa Frozi e Natália Bosco.

A UNESP e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada pela oportunidade em ser parte contributiva a esta comunidade.

Ao meu orientador Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha, ao meu coorientador Dr. José Cavalcante Souza Vieira, pela dedicação, compreensão e paciência. E, ainda, ao Grupo do Laboratório de Bioanalítica e Metaloproteômica por toda colaboração nas diferentes etapas desta pesquisa.

Aos membros titulares da Comissão Examinadora, Prof.^a Dr.^a Adrielli Cristina Peres da Silva, Dr.^a Bruna Cavecci Mendonça, Prof. Dr. Lincoln Carlos Silva de Oliveira e Prof. Dr. Welder Angelo Baldassini e, aos suplentes Prof.^a Dr.^a Arianne Rozza Leite, Prof.^a Dr.^a Alessandra Augusto da Silva, Prof.^a Dr.^a Cristiane de Almeida Baldini Cardoso e Prof. Dr. Felipe André dos Santos pelo aceite e pelas valiosas contribuições.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processo 2019/02538-4; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Processo 408179/2022-8 e 404404/2023-5; e, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Processo 88881.3107432018-0.1 pelo Auxílio à Pesquisa.

*“Era uma vez na Amazônia a mais bonita floresta
Mata verde, céu azul, a mais imensa floresta
No fundo d'água as Iaras, caboclo lendas e mágoas
E os rios puxando as águas*

*Papagaios, periquitos, cuidavam de suas cores
Os peixes singrando os rios, curumins cheios de amores
Sorria o jurupari, uirapuru, seu porvir
Era: Fauna, flora, frutos e flores*

*Toda mata tem caipora para a mata vigiar
Veio caipora de fora para a mata definhar
E trouxe dragão-de-ferro, prá comer muita madeira
E trouxe em estilo gigante, prá acabar com a capoeira*

*Fizeram logo o projeto sem ninguém testemunhar
Prá o dragão cortar madeira e toda mata derrubar
Se a floresta meu amigo, tivesse pé prá andar
Eu garanto, meu amigo, com o perigo não tinha ficado lá*

*O que se corta em segundos gasta tempo prá vingar
E o fruto que dá no cacho prá gente se alimentar?
Depois tem o passarinho, tem o ninho, tem o ar
Igarapé, rio abaixo, tem riacho e esse rio que é um mar*

*Mas o dragão continua a floresta devorar
E quem habita essa mata, prá onde vai se mudar???
Corre índio, seringueiro, preguiça, tamanduá
Tartaruga: Pé ligeiro, corre-corre tribo dos Kamaiura*

*No lugar que havia mata, hoje há perseguição
Grileiro mata posseiro só prá lhe roubar seu chão
Castanheiro, seringueiro já viraram até peão
Afora os que já morreram como ave-de-arribação
Zé de Nana tá de prova, naquele lugar tem cova
Gente enterrada no chão*

*Pois mataram índio que matou grileiro que matou posseiro
Disse um castanheiro para um seringueiro que um estrangeiro
Roubou seu lugar*

*Foi então que um violeiro chegando na região
Ficou tão penalizado que escreveu essa canção
E talvez, desesperado com tanta devastação
Pegou a primeira estrada, sem rumo, sem direção
Com os olhos cheios de água, sumiu levando essa mágoa
Dentro do seu coração*

*Aqui termina essa história para gente de valor
Prá gente que tem memória, muita crença, muito amor
Prá defender o que ainda resta, sem rodeio, sem aresta
Era uma vez uma floresta na Linha do Equador”*

Saga da Amazônia (1984) - Vital Farias

RESUMO

O mercúrio é um elemento químico tóxico, não essencial aos processos metabólicos. Sua presença no ambiente causa contaminações e intoxicações em seres humanos. Nos ecossistemas aquáticos, este elemento químico sofre transformações químicas, sendo bioacumulado e biomagnificado ao longo da cadeia alimentar. Esse processo é mediado por microrganismos e resulta na formação de compostos organomercuriais, como o metilmercúrio (MeHg), que é absorvido por peixes e outros organismos aquáticos. Peixes predadores, localizados no topo da cadeia trófica, acumulam altos níveis de mercúrio. Essas concentrações podem ser transferidas para seus consumidores, incluindo répteis, aves e seres humanos. Na bacia Amazônica, a principal fonte de contaminação por mercúrio é a mineração de ouro, que começou na década de 1970. Como as comunidades ribeirinhas dependem do consumo de peixe, elas estão particularmente expostas a esses compostos mercuriais, que podem causar danos graves, dependendo da forma química, concentração e frequência de exposição. Além disso, ele está associado ao estresse oxidativo, mesmo em baixas concentrações. O objetivo deste estudo foi identificar biomarcadores relacionados à exposição ao mercúrio em populações ribeirinhas da região de Jirau, no rio Madeira, em Rondônia, Brasil. Amostras de sangue, plasma e *pellets* proteicos dessa população foram coletadas utilizando cartões *Noviplex™* com base na frequência de consumo de peixe, verificada por meio de um questionário qualitativo da dieta. O estudo foi desenvolvido por meio de abordagem metaloproteômicas utilizando espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) como componente de seletividade, a estratégia de *Shotgun* com espectrometria de massas em sequência acoplada a cromatografia líquida (LC-MS/MS) como componentes de seletividade/estrutural. Os resultados das determinações por GFAAS indicaram uma correlação positiva entre a concentração de mercúrio total (Hg_T) e a frequência de consumo de peixe. A partir disso, as amostras biológicas foram classificadas em: G1, grupo controle, referente às menores concentrações de Hg_T e G2, G3 e G4, grupos experimentais, relativos às determinações mais elevadas de Hg_T . Após o processo de clivagem proteolítica por *Shotgun*, análises da abundância de proteínas (PAA) utilizando LC-MS/MS do proteoma plasmático dos quatro grupos de voluntários identificaram 132 proteínas com *fold change* positivo e negativo e/ou *unique proteins*, considerando a comparação entre os grupos G2-G4 com grupo G1. Os resultados das PAA indicaram *fold change* positivo em relação às isoformas de *Immunoglobulins* (IGs), *Albumin* (ALB) e *Ceruloplasmin* (CP), podendo inferir que a *upregulation* dessas proteínas está associada à exposição dos grupos de voluntários às espécies mercuriais. A correlação positiva das concentrações de Hg_T com o consumo de peixe pelos grupos de voluntários corrobora com os dados metaloproteômicos e permite sugerir as isoformas de IGs, ALB e CP como candidatas a biomarcadores de exposição às espécies mercuriais em humanos. Destaca-se, que a *Immunoglobulin kappa variable 3-20* (IGKV3-20) se expressou como *unique protein* no G3 e G4 e a CP como *upregulated* no G4, grupos de voluntários que apresentaram as maiores concentrações de Hg_T . Como essas proteínas têm sítios de coordenação com características de base mole capazes de interagir com espécies de Hg, os dados do presente estudo potencializam IGKV3-20 e a CP como possíveis biomarcadores plasmático de exposição ao Hg. Os dados reportados nesta tese disponibilizam novos *insights* aos estudos de identificação de potenciais biomarcadores de exposição às espécies mercuriais em humanos, contribuindo para o avanço no entendimento dos efeitos desses xenobióticos no proteoma plasmático e oferecendo subsídios importantes para a promoção de estratégias de saúde pública. No entanto, é necessário conduzir estudos adicionais que possam confirmar as conclusões relatadas, como a combinação de técnicas 2D PAGE-GFAAS com a *Shotgun-LC-MS/MS* que permitiriam a identificação de espécies mercuriais em *spots* obtidos no fracionamento do proteoma plasmático e subsequente PAA.

Palavras-chave: Biomagnificação, espécies mercuriais, intoxicações humanas, proteoma plasmático.

ABSTRACT

Mercury is a toxic chemical element, non-essential to metabolic processes. Its presence in the environment causes contamination and poisoning in humans. In aquatic ecosystems, this chemical element undergoes chemical transformations, becoming bioaccumulated and biomagnified along the food chain. This process is mediated by microorganisms and results in the formation of organomercury compounds, such as methylmercury (MeHg), which is absorbed by fish and other aquatic organisms. Predator fish, located at the top of the trophic chain, accumulate high levels of mercury. These concentrations can be transferred to their consumers, including reptiles, birds, and humans. In the Amazon Basin, the primary source of mercury contamination is gold mining, which began in the 1970s. Since riverine communities rely on fish consumption, they are particularly exposed to these mercury compounds, which can cause severe damage depending on the chemical form, concentration, and frequency of exposure. Moreover, mercury is associated with oxidative stress even at low concentrations. The aim of this study was to identify biomarkers related to mercury exposure in riverine populations in the Jirau region, located on the Madeira River, in Rondônia, Brazil. Blood, plasma, and protein pellet samples from this population were collected using *Noviplex*TM cards based on fish consumption frequency, determined by a qualitative diet questionnaire. The study was developed through a metalloproteomics approach using Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (*GFAAS*) as a selectivity component and Shotgun strategy with Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (*LC-MS/MS*) as selectivity/structural components. *GFAAS* results showed a positive correlation between total mercury concentration (Hg_T) and fish consumption frequency. Based on this, biological samples were classified into: G1, the control group, representing the lowest Hg_T concentrations, and G2, G3, and G4, the experimental groups, corresponding to the highest Hg_T concentrations. After proteolytic cleavage by Shotgun, protein abundance analyses (*PAA*) using *LC-MS/MS* of the plasma proteome of the four volunteer groups identified 132 proteins with positive and negative fold changes and/or unique proteins, considering comparisons between the G2-G4 groups and the G1 group. *PAA* results indicated positive fold changes related to isoforms of Immunoglobulins (IGs), Albumin (ALB), and Ceruloplasmin (CP), suggesting that upregulation of these proteins is associated with volunteer group exposure to mercury species. The positive correlation between Hg_T concentrations and fish consumption in volunteer groups supports the metalloproteomic data and suggests IGs, ALB, and CP isoforms as potential biomarkers of mercury species exposure in humans. Notably, Immunoglobulin kappa variable 3-20 (*IGKV3-20*) was expressed as a unique protein in the G3 and G4 groups, and CP was upregulated in the G4 group, both of which had the highest Hg_T concentrations. As these proteins have coordination sites with molecular characteristics capable of interacting with mercury species, the data from this study highlight *IGKV3-20* and CP as potential plasma biomarkers for mercury exposure. The data presented in this thesis provide new insights into the identification of potential biomarkers for mercury species exposure in humans, contributing to a better understanding of the effects of these xenobiotics on the plasma proteome and offering valuable support for the development of public health strategies. However, additional studies are required to confirm the conclusions drawn, such as the combination of *2D PAGE-GFAAS* techniques with *Shotgun-LC-MS/MS*, which would allow the identification of mercury species in spots obtained from plasma proteome fractionation and subsequent *PAA*.

Keywords: Biomagnification, mercurial species, human poisoning, plasma proteome.

RESUMO PARA A SOCIEDADE

Já reparou que aqueles termômetros de vidro, que vinham com um líquido prata dentro, não são mais vendidos nas farmácias? A prata líquida é o mercúrio, um elemento químico perigoso, que não é necessário para o nosso corpo e pode causar sérios problemas à saúde humana e ao meio ambiente, e por isso foram retirados do mercado. Quando presente em rios, lagos, mares e oceanos, o mercúrio participa de um ciclo onde é transformado quimicamente pela atuação de microrganismos e acaba sendo absorvido e acumulado em vários seres que vivem nestes ambientes. Após sua absorção, o mercúrio permanece no organismo, sofrendo bioacumulação ao longo da cadeia alimentar. Isto significa dizer que, a acumulação de mercúrio em um ser vivo, adquirida pelo organismo através da ingestão de outros organismos, persiste ao longo do tempo e atinge um nível superior à concentração da substância no ambiente. Desta forma, os peixes que se alimentam de outros peixes, ou de outros animais, são aqueles onde os valores de mercúrio são mais altos, pois acumularam o poluente ao longo da vida. Na região onde realizamos este trabalho, a população que vive às margens do rio Madeira se alimenta basicamente de peixes, que se encontram cheios de mercúrio na carne, por conta do histórico das atividades do garimpo na região. A depender de quanto essas pessoas comem, elas podem estar sofrendo menos ou mais com a intoxicação por este elemento químico. Uma das consequências disso é o estresse oxidativo, que acontece pela ação de moléculas instáveis produzidas por nosso corpo. Essas moléculas, também chamadas de radicais livres, têm o potencial de causar a oxidação de células saudáveis, ou seja, danificar as células e as estruturas celulares. Para proteger o organismo, há um sistema conhecido por sistema antioxidante. Ele é formado por enzimas, vitaminas, como a vitamina C, e minerais, que captura, neutraliza e elimina os radicais livres. Só que, quanto maior o desequilíbrio entre a quantidade de radicais livres e a de antioxidantes, maior a gravidade desses danos às células, e maior a chance do aparecimento de doenças, como Alzheimer e Parkinson, diabetes, câncer e pressão alta. Por isso, o objetivo deste trabalho foi identificar proteínas anormais no organismo de pessoas que comem peixes nestas condições na região do rio Madeira em Rondônia. Como sinais de alerta para a presença de mercúrio no organismo, os resultados mostraram que certas proteínas no sangue, como a albumina, a hemoglobina, a imunoglobulina e a ceruloplasmina, podem ser indicativas de exposição ao mercúrio. A hemoglobina transporta oxigênio no sangue, desempenhando um papel importante na forma como o mercúrio é distribuído pelo corpo. As imunoglobulinas ajudam o corpo a reagir contra o mercúrio, enquanto proteínas antioxidantes, como a ceruloplasmina, ajudam a proteger as células dos danos causados por radicais livres. Radicais livres são moléculas ou fragmentos de moléculas altamente instáveis e potencialmente prejudiciais. Eles podem ser comparados a "partículas soltas" que estão à procura de algo com que se "ligar" ou "completar" sua estrutura. Quando isso ocorre, podem danificar células e comprometer o funcionamento normal do organismo. Esses radicais são produzidos naturalmente como resultado de processos que acontecem no corpo, mas sua formação também pode ser intensificada por fatores externos, como poluição, tabagismo e exposição a substâncias químicas. Embora o corpo possua sistemas de defesa, como antioxidantes, para combater os radicais livres e proteger as células, o excesso dessas moléculas pode sobrecarregar esses sistemas, resultando em danos celulares significativos. Por isso, é fundamental identificar e caracterizar proteínas relevantes. Elas podem auxiliar no monitoramento da contaminação ambiental por mercúrio e os impactos disso na saúde humana. Logo, monitorar os níveis de mercúrio pode ser crucial para proteger a saúde das comunidades ribeirinhas, permitindo uma detecção antecipada da exposição ao metal e colaborando na implementação de medidas de prevenção (Anexo III - Card da série "A pesquisa que eu faço". Produzido durante o curso da disciplina "Divulgação Científica", em parceria com a Agência de Divulgação Científica e Comunicação do IBB, sob responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Adriane Pinto Wasko).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática (A) do ciclo biogeoquímico do mercúrio e (B) da especiação do mercúrio em ecossistemas aquáticos.	22
Figura 2 - Origem da Metalômica: interconexão entre Genômica e Proteômica.	29
Figura 3 - Pesquisa de documentos na base de dados do <i>Scopus</i> . Filtro utilizado: <i>Article title, Abstract, Keywords - Metallomics and Mercury</i>	31
Figura 4 - Pesquisa de documentos na base de dados do <i>Scopus</i> . Filtro utilizado: <i>Article title, Abstract, Keywords - Metalloproteomics and Mercury</i>	32
Figura 5 - Fluxo de trabalho típico de um experimento <i>bottom-up</i>	36
Figura 6 - Identificação de peptídeos em banco de dados: comparação do espectro teórico gerado <i>in silico</i> a partir de um banco de dados de sequências de proteínas com o espectro <i>MS/MS</i> real.	37
Figura 7 - Mapa de localização das comunidades ribeirinhas amostradas ao longo do rio Madeira - RO.	38
Figura 8 - Cartões <i>Noviplex™</i> para coleta de sangue.	41
Figura 9 - Coleta de amostras de material biológico (sangue), realizada em agosto de 2021.	41
Figura 10 - Concentrações médias de mercúrio total determinadas por <i>GFAAS</i> nas amostras de sangue nos grupos de voluntários da população ribeirinha do rio Madeira, região de Jirau - RO.	48
Figura 11 - Concentrações médias de mercúrio total determinadas por <i>GFAAS</i> nas amostras de plasma nos grupos de voluntários da população ribeirinha do rio Madeira, região de Jirau - RO.	48
Figura 12 - Concentrações médias de mercúrio total nas amostras de <i>pellets</i> proteicos dos grupos de voluntários da população ribeirinha do rio Madeira, região de Jirau - RO.	50
Figura 13 - Concentrações médias de proteína total nos extratos de <i>pellets</i> proteicos dos grupos de voluntários da população ribeirinha do rio Madeira, região de Jirau - RO.	50
Figura 14 - Gráficos da análise funcional das proteínas <i>upregulated</i> ($p > 0,95$), <i>dowregulated</i> ($p < 0,05$) e proteínas que se expressaram somente em um grupo experimental (<i>Uniques</i>) das amostras de plasma dos voluntário do rio Madeira-Rondônia, utilizando o <i>software</i> Blast2GO.	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tendências emergentes em métodos analíticos utilizados na análise de estudos metalômicos.	33
Tabela 2 - Programa de aquecimento do tubo de grafite para a determinação de mercúrio nos extratos ácidos	43
Tabela 3 - Concentrações médias de proteína total de cada grupo voluntário	51
Tabela 4 - Proteínas identificadas por <i>Shotgun-LC-MS/MS</i> no plasma humano. Amostras coletadas com cartão <i>Noviplex</i> TM - Grupo 2x1	52
Tabela 5 - Proteínas identificadas por <i>Shotgun-LC-MS/MS</i> no plasma humano. Amostras coletadas com cartão <i>Noviplex</i> TM - Grupo 3x1	53
Tabela 6 - Proteínas identificadas por <i>Shotgun-LC-MS/MS</i> no plasma humano. Amostras coletadas com cartão <i>Noviplex</i> TM - Grupo 4 x 1	54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Problemática do mercúrio no Rio Madeira	14
1.2 Justificativa.....	16
1.3 <i>Hydrargyrum</i> (Hg): A água prata.....	17
1.4 Fontes antrópicas de mercúrio.....	17
1.4.1 Expansão Econômica e Populacional: O brilho dos anos de ouro	17
1.4.2 Expansão Econômica e Infraestrutural no Vale do Madeira: Da borracha à hidrelétrica de Jirau	19
1.5 Ciclo biogeoquímico: especiação, bioacúmulo e biomagnificação do Hg.....	20
1.6 Toxicidade do mercúrio: Contaminações, intoxicações e os impactos na saúde humana	23
1.7 Biomarcadores.....	25
1.7.1 Metaloproteínas e Proteínas ligadas a metais.....	25
2 OBJETIVOS.....	28
2.1 Objetivo Geral	28
2.2 Objetivos Específicos.....	28
3 REVISÃO DE LITERATURA	29
3.1 Metalômica: inter-relação entre genômica, proteômica e metaloproteômica	29
3.1.1 Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite - <i>GFAAS</i>	35
3.1.2 Espectrometria de massas em sequência acoplada à cromatografia líquida: <i>Shotgun-LC-MS/MS</i>	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 Área de Estudo e Pontos de amostragem: comunidades do rio Madeira	38
4.2 Desenho amostral	39
4.2.1 Aplicação de Questionários e Avaliação Qualitativa da Dieta	39
4.2.2 Obtenção, extração e fracionamento de amostras de sangue	40
4.3 Análises Laboratoriais.....	42
4.3.1 Determinação de mercúrio total nas amostras de sangue, plasma e <i>pellets</i> proteicos por Espectrometria de Absorção Atômica por Forno de Grafite - <i>GFAAS</i>	42

4.3.2 Extração e precipitação da fração proteica.....	44
4.3.3 Análise de expressão por <i>Shotgun-LC-MS/MS</i>	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	46
5.1 Otimização das condições experimentais para determinação de mercúrio total	46
5.2 Determinação de mercúrio total nas amostras de sangue e plasma.....	47
5.3 Mercúrio total nos extratos dos pellets proteicos e proteína total nos extratos dos pellets proteicos	49
5.4 Proteínas identificadas por <i>Shotgun</i> no plasma humano	51
5.4.1 Fracionamento do proteoma das amostras de plasma humano e análise de abundância relativa de proteínas por <i>Shotgun-LC-MS/MS</i>	51
6 CONCLUSÕES.....	66
7 REFERÊNCIAS	67
MATERIAL SUPLEMENTAR	78
ANEXO I.....	86
ANEXO II	90

1 INTRODUÇÃO

1.1 Problemática do mercúrio no Rio Madeira

O corpo fluvial denominado Madeira, banha três países: Brasil, Bolívia e Peru. Sua bacia hidrográfica possui 125 milhões de hectares, o tornando o 17º rio mais extenso do mundo. No que tange ao território brasileiro, é considerado um dos principais rios e sua importância se dá em função de ser o principal afluente do rio Amazonas, representando 24% da bacia Amazônica. O rio Madeira possui aproximadamente 3.240 km de extensão, dos quais cerca de 1.425 km percorrem a porção sudoeste e noroeste dos estados do Amazonas e Rondônia (BERNARDI et al., 2009; HORBE et al., 2013). Seu início de curso se dá nos Andes Bolivianos a partir da confluência dos rios Guaporé, Mamoré, Beni e Madre de Dios (BERNARDI et al., 2009; HORBE et al., 2013). Em território brasileiro, o rio altera sua direção para nordeste quando recebe as águas do rio Abunã e segue, condicionado às orientações tectônicas, até a sua foz no rio Amazonas (BERNARDI et al., 2009). Na margem direita, oposta ao rio Abunã, o Madeira recebe seus afluentes mais significativos: os rios Ribeirão, Castanho, Mutum-Paraná, Jaci-Paraná, São Francisco, Caracol, Candeias, Jamari e Ji-Paraná, além dos igarapés das Araras, Mururé e Cirilo (BERNARDI et al., 2009).

É caracterizado como um rio de múltiplos canais e de gradientes de natureza hidrológica, geomorfológica, hidráulica e/ou de transporte de sedimentos, pois possui variação em seus domínios. Os domínios de interesse para o presente trabalho se referem ao Domínio II que constitui o Alto Estrutural Guarajá-Mirim - Porto Velho, e Domínio III que faz menção ao vale fluvial do rio Madeira. Respectivamente, o rio Madeira possui traçado retilíneo predominante a levemente sinuoso com preponderância de ambiente erosivo, seccionando e retrabalhando rochas cristalinas. Posteriormente, adota um padrão meadrante até sua foz no rio Amazonas, onde seu substrato geológico é constituído por sedimentos terciários e quaternários indiferenciados, com baixa declividade, caracterizando seu caráter deposicional (ADAMY, 2016).

Possui pH próximo ao neutro, baixa concentração de matéria orgânica, altas taxas de nutrientes dissolvidos e águas brancas em decorrência das elevadas cargas de sedimentos em suspensão originários do escoamento sobre rochas da cordilheira, do cráton Amazônico e da própria bacia do Amazonas (BERNARDI et al., 2009; GALVÃO et al., 2009; GOMES et al., 2009; HORBE et al., 2013). Especificamente ao mencionar os sólidos em suspensão, vale ressaltar que a composição mineralógica dos mesmos é constituída, predominantemente, por argilominerais dos grupos das ilitas, caulinitas, cloritas e esmectitas (BERNARDI et al., 2009).

Quanto à sazonalidade climática da região Amazônica na qual está inserido o rio Madeira, esta é quem regula o comportamento dos corpos hídricos. Há grandes vazões na estação chuvosa, nos meses de fevereiro, março e abril; seguido de discretos decaimentos na estação seca nos meses de agosto, setembro e outubro. Tal fato implica alterações significativas na estocagem, no carreamento e transferência de sedimentos, substâncias e/ou compostos, pois quanto maior a velocidade do fluxo das águas, maior a capacidade de mobilidade dos sedimentos e dissolução dos demais componentes físico-químicos (ADAMY, 2016).

Portanto, a interação desses fatores é a causa da heterogeneidade química das águas que, devido à elevada carga de sedimentos particulados, faz com que as águas bicarbonatadas se tornem uma via de transporte de diversas substâncias, dentre elas, os íons metálicos como o mercúrio (Hg) (BERNARDI et al., 2009; GALVÃO et al., 2009; HORBE et al., 2013). Logo, o ciclo biogeoquímico do mercúrio, bem como suas concentrações finais, são determinados pelas características físicas e químicas da água, bem como pela hidrodinâmica do corpo aquático.

No vale do Madeira, a presença do mercúrio se encontra associada a fatores naturais e antrópicos. Segundo Roulet; Lucotte (1995) e Forsberg et al. (1999), os solos da região Amazônica, devido à sua composição ferralítica derivada do intemperismo das crostas lateríticas ferruginosas, são depósitos naturais de mercúrio. Como solos típicos de regiões tropicais úmidas, possuem altas concentrações de óxidos de ferro e alumínio, além de substâncias húmicas oriundas da deposição contínua de material vegetal. Esses fatores favorecem a dissolução e redução dos óxidos de ferro, a adsorção dos complexos ácido fúlvico-mercúrio e o influxo para o ambiente aquático por meio dos processos de lixiviação (TIPPING, 1981; ROULET; LUCOTTE, 1995; FORSBERG et al., 1999; LECHLER et al., 2000). Há também as concentrações de Hg provenientes das atividades produtivas regionais, que seguem escalas espaço-temporais para o território ao qual se fixam. O fluxo de capitais fixos na região demarca a infraestrutura da exploração mineral do ouro, da agropecuária desde a de subsistência até a moderna e, atualmente, dos grandes empreendimentos na área hidrotermoelétrica (LINHARES et al., 2009; SILVA, 2016; BASTOS et al., 2020). Vale ressaltar que o barramento artificial altera tanto a hidrodinâmica quanto a biogeoquímica natural do ecossistema. Ao represar as águas, ele impede a vazão natural dos cursos, criando estratificações térmicas e condições anóxicas no hipolímnio, a fração mais profunda do reservatório. O hipolímnio é caracterizado por possuir temperaturas mais baixas e menor circulação da água, o que explica a redução do oxigênio dissolvido e do pH, bem como os aumentos na alcalinidade e na condutividade. Consequentemente, essa água pode conter altos níveis de sulfeto de hidrogênio, o qual é produzido durante o processo de decomposição

anaeróbica. Ao gerar condições redutoras, favorece a metilação do mercúrio (CANAVAN; CALDWELL; BLOOM, 2000).

Logo, a territorialização para produção de insumos industriais, de bens de capitais e de extração mineral na região Amazônica se caracterizam, predominantemente, como impactos ambientais de origem antrópica, pois atuam como facilitadores da liberação e mobilização do Hg e de suas respectivas espécies para o ambiente, biota e seres humanos (SILVA, 2016; DOREA; DONANGELO, 2006; LACERDA; MALM, 2008; BASTOS et al., 2020).

1.2 Justificativa

Estes processos de liberação e mobilização, somados ao transporte, bioacúmulo e biomagnificação do Hg, também denominado ciclo biogeoquímico, quando tratado a nível de ecossistema aquático, envolve sistemas de reação mediada por microrganismos (ROCHA; ROSA; CARDOSO, 2004; TINÔCO, 2010; RAMOS-ROSAS et al., 2012). Como produto de tais interações, o Hg sofre transformações químicas levando à formação de compostos organomercuriais, como o metilmercúrio (MeHg). O mesmo é facilmente absorvido via trato gastrointestinal por peixes e outros indivíduos da biota aquática e, conseqüentemente, depositado nos tecidos. Desta forma, peixes predadores de topo de teia trófica, ao acumularem altos níveis de Hg, podem funcionar como reservatórios da referida forma química e repassar as concentrações acumuladas para seus consumidores, como répteis, aves e seres humanos (ROCHA; ROSA; CARDOSO, 2004; TINÔCO, 2010; RAMOS-ROSAS et al., 2012). Mediante o fato de que peixes são a principal fonte de proteína animal das populações ribeirinhas, a pesquisa se justifica pela preocupação com a frequência de exposição ao Hg e pelos conseqüentes efeitos deletérios nos sistemas urinário, respiratório, imunológico, reprodutor e nervoso central (FARINA et al., 2013; FAIAL et al., 2015).

Considerando o exposto, o estudo do mercúrio em sistemas biológicos pode levar a elucidação de possíveis biomarcadores relacionados com a frequência de exposição ao mercúrio em populações ribeirinhas expostas aos setores produtivos da região de Jirau/rio Madeira, Rondônia/Brasil. Neste sentido, a metalômica emerge como inovação científica que possibilita a integração de estudos analíticos com investigações inorgânicas e bioquímicas, visando obter informações sobre a distribuição e coordenação dos íons metálicos em relação às proteínas, assim como sua essencialidade e/ou toxicidade, além da concentração individual de cada espécie metálica. Essa abordagem contribui para o esclarecimento dos aspectos interacionais e conectivos de espécies metálicas e/ou metalóides com genes, proteínas, metabólitos e outras biomoléculas do

organismo e, portanto, do papel biológico exercido pelos íons metálicos ligados às biomoléculas (GARCIA; MAGALHÃES; ARRUDA, 2006; MOUNICOU; SZPUNAR; LOBINSKI, 2009; LOBINSKI et al., 2010).

1.3 *Hydrargyrum* (Hg): A água prata

De acordo com as definições estabelecidas pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (1988), o mercúrio (Hg) é o octogésimo elemento da tabela periódica, sendo definido como um metal de transição cujo átomo possui a capacidade sucessiva de formar cátions (IUPAC, 1988). Pode ser encontrado naturalmente em três categorias primárias, de acordo com seu estado de valência: o mercúrio elementar (Hg^0) em estado líquido ou gasoso; compostos de mercúrio inorgânico, incluindo o íon mercurioso (Hg_2^{2+}), forma pouco estável em sistemas naturais, e o íon mercúrico (Hg^{2+}); e os compostos orgânicos de mercúrio, nos quais o íon mercúrico apresenta-se ligado covalentemente a um radical orgânico, sendo o metilmercúrio (CH_3Hg^+) e o dimetilmercúrio ($(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$) os mais comuns (CETESB, 2023).

Com característica de poluente global, crônico e persistente, o mercúrio é denominado xenobiótico e sua toxicidade é considerada como uma preocupação para a saúde pública (WHO, 2010; CETESB, 2023).

1.4 Fontes antrópicas de mercúrio

1.4.1 Expansão Econômica e Populacional: O brilho dos anos de ouro

O histórico socioeconômico de Rondônia até a década de 60 se concentrava na exploração da borracha proveniente da seringueira (RIO; COELHO; WANDERLEY, 2015; BATISTA et al., 2018). A atividade extrativista proporcionou o aumento do contingente populacional e, conseqüentemente, da exploração do território, quando se descobriram as primeiras jazidas de cassiterita (BASTOS, 1988). Junto a tais fatores, era possível observar também uma degradação incipiente do meio ambiente natural a partir de desmatamentos, poluição dos corpos hídricos, declínio populacional de espécies da fauna e flora local e redução da qualidade ecossistêmica (BASTOS, 1988). O ciclo da borracha perdurou até meados dos anos 1968, quando se deu início ao ciclo da agricultura, potencializado pela abertura, revitalização e pavimentação da BR-364, que interliga Rio Branco (AC) ao Distrito Federal, da BR-425, que interliga a Vila de Abunã (RO) à cidade de Guajará-Mirim (RO) e pelos investimentos em diversos programas e

projetos do governo da ditadura militar para a integração nacional da região Amazônica (SOUZA; PESSOA, 2009; LINHARES; RODRIGUES; MARTA, 2017).

Paralelamente aos financiamentos agropecuários, ocorreu a proibição da mineração estanífera artesanal pelo Ministério de Minas e Energia em todo território rondoniense (LINHARES; RODRIGUES; MARTA, 2017). Por conseguinte, houve a descoberta de novas jazidas secundárias de ouro e diamante no Alto Rio Madeira, Serra Pelada, Peixoto de Azevedo, entre outras localidades e, já no final dos anos 1970, um aumento significativo do preço do ouro no mercado internacional (BASTOS, 1988; SOUZA; PESSOA, 2009; RIO; COELHO; WANDERLEY, 2015; LINHARES; RODRIGUES; MARTA, 2017; BATISTA et al., 2018).

Portanto, de modo a facilitar o entendimento da cronologia do ciclo de exploração aurífera em Rondônia, o mesmo pode ser classificado em cinco estágios. Como foco na ótica prevista para este estudo, apenas os três últimos são considerados relevantes e estes, de acordo com Linhares, Rodrigues e Marta (2017) estão relacionados “à introdução de novos métodos de produção mineral, até então não experimentados na antiga reserva garimpeira do rio Madeira, tais como: lavra manual (1978 a 1981), extração por meio de balsas (1981 a 1985) e dragas garimpeiras (1986 a 1992)” (LINHARES; RODRIGUES; MARTA, 2017, p. 43).

Em 1978, início do terceiro ciclo de exploração aurífera, é demarcada a segunda corrida do ouro. Pela consecutiva liberação da exploração mineral artesanal de ouro a partir das portarias nº 1345/79 e nº 1034/80, se presenciou uma nova onda de migração para os aluviões do Alto Rio Madeira, mais especificamente nas regiões do entorno imediato do rio como Abunã, Mutum-Paraná e Jaci-Paraná. Neste período, a produção de ouro era limitada devido ao método rudimentar de exploração por lavra manual (LINHARES; RODRIGUES; MARTA, 2017). Já no início quarto período do ciclo econômico, a exploração aurífera na área do rio Madeira passa por especializações. Inovações estas que foram caracterizadas pela introdução das primeiras balsas garimpeiras, cujo funcionamento baseava-se em bombas de sucção de depósitos sedimentares de aluvião¹. Este método de extração perdurou até 1985, ano no qual se pode observar o auge da produção de ouro no rio Madeira. O aumento da produção de ouro passou de 1.700 kg/ano para 3.500 kg/ano (LINHARES; RODRIGUES; MARTA, 2017).

Devido ao sucesso produtivo com o uso das balsas, o Departamento Nacional de Pesquisas Minerais instituiu oficialmente, em 1986, a ampla utilização das dragas. Este mecanismo se apresentava mais robusto quando comparado às balsas, dado suas dimensões, potências das bombas de sucção e, conseqüentemente, sua capacidade extratora. Assim, entre 1987 e 1992, a

¹ Material detritico composto por água, cascalho, sedimento e fragmentos finíssimos de ouro (LINHARES; RODRIGUES; MARTA, 2017, p. 59).

mineração aurífera no Alto Rio Madeira teve seu auge em função da especialização técnica-tecnológica (BASTOS, 1988; LINHARES; RODRIGUES; MARTA, 2017; BATISTA et al., 2018). A mecanização estabelecida propiciou um aumento significativo na produção, bastante superior aos registrados nos ciclos de lavra manual e de extração por meio de balsas garimpeiras (LINHARES; RODRIGUES; MARTA, 2017).

1.4.2 Expansão Econômica e Infraestrutural no Vale do Madeira: Da borracha à hidrelétrica de Jirau

Reconhecido como um território transfronteiriço, a singularidade do rio Madeira reside em uma diversidade de fluxos em rede, cujos potenciais de integração se caracterizam por uma dinâmica própria, marcada pelo histórico da expansão capitalista na segunda metade do século XX. A delimitação espaço-temporal dada pela construção da ferrovia Madeira-Mamoré contribuiu para a alteração do foco econômico: antes na produção de borracha; posteriormente, sob os eixos do desenvolvimento dos anos de 1970, para as atividades da agropecuária, da mineração e de seus respectivos escoamentos (SOUZA; PESSOA, 2009; RIO; COELHO; WANDERLEY, 2015; LINHARES; RODRIGUES; MARTA, 2017; BATISTA et al., 2018).

De modo a corroborar o interesse de abastecimento de matéria-prima, assim como reforçar a estratégia de conexão intercontinental e o papel dos investimentos em infraestrutura no vale do Madeira, se evidencia a era contemporânea da expansão Amazônica (RIO; COELHO; WANDERLEY, 2015). Os investimentos da rota do agronegócio passaram a ser congruentes ao capital fundamentado nos setores produtivos da geração de energia elétrica que, segundo Rio, Coelho e Wanderley (2015) pôde ser resumido como um projeto geopolítico de segurança energética que visava atenuar a dependência de energia importada e da coesão territorial com consequentes ampliações de conexões internacionais (RIO; COELHO; WANDERLEY, 2015).

Entretanto, mesmo frente a inúmeras alterações e readaptações nos projetos históricos do setor elétrico brasileiro, o ano de 2001 ficou marcado por uma crise energética em âmbito nacional, cujos motivos estavam intimamente relacionado à discrepância entre a capacidade instalada do setor elétrico brasileiro (SEB) e o crescimento do Produto Interno Bruto (PIB) (SOARES et al., 2022). Contudo, este desequilíbrio entre oferta e demanda de energia incitou a revitalização de planejamentos prospectados na Amazônia Legal ainda em 1970, como é o caso da Usina Hidrelétrica (UHE) de Jirau (SOARES et al., 2022).

Logo, inserida no padrão sociopolítico, socioeconômico e, ainda, simbólico que conformava a nova estrutura nacional, a região da UHE de Jirau se estabeleceu para a consolidação

da rede de Integração de Infraestrutura Regional Sul-Americana (IIRSA), fazendo parte do “Programa de Aceleração do Crescimento” (PAC) instituído pelo Decreto nº 6.025/2007 (RIO; COELHO; WANDERLEY, 2015; REIKDAL; SOUZA, 2024). O objetivo do IIRSA, como projeto multisetorial, era

“desenvolver e integrar o transporte, a energia e a infraestrutura de telecomunicações dos 12 países sul-americanos, criando áreas estratégicas em regiões interioranas com baixo índice populacional, mas que se constituíam em importantes reservas de matéria-prima e biodiversidade” (REIKDAL; SOUZA, 2024, p. 251).

Hoje, a referida UHE de Jirau está localizada ao longo do rio Madeira, em uma localidade denominada Ilha do Padre, a 120 quilômetros da capital Porto Velho (RO). Com suas obras iniciadas em 2009, a UHE de Jirau teve sua construção baseada na engenharia otimizada e, atualmente, conta com 7.875 metros de comprimento de barramento, os quais são compostos de enrocamento de terra na margem direita e de parte de núcleo asfáltico na margem esquerda (JIRAU ENERGIA, 2024). Desde sua inauguração, conta com 50 unidades geradoras com 75 megawatts de potência unitária em operação, o que lhe confere uma capacidade instalada de 3.750 megawatts, representando 3,7% de toda a energia hidrelétrica do país.

Logo, de acordo com a Jirau Energia², antiga Concessionária Energia Sustentável do Brasil, a aplicação de soluções inovadoras que compatibilizam as variáveis de modicidade tarifária e as novas tecnologias de turbinas e geradores à segurança energética necessária faz com que a UHE Jirau seja considerada a quarta maior geradora de energia elétrica do Brasil, ficando atrás apenas da Itaipu Binacional, Belo Monte e Tucuruí (ZARA et al., 2017; SOARES et al., 2022; JIRAU ENERGIA, 2024).

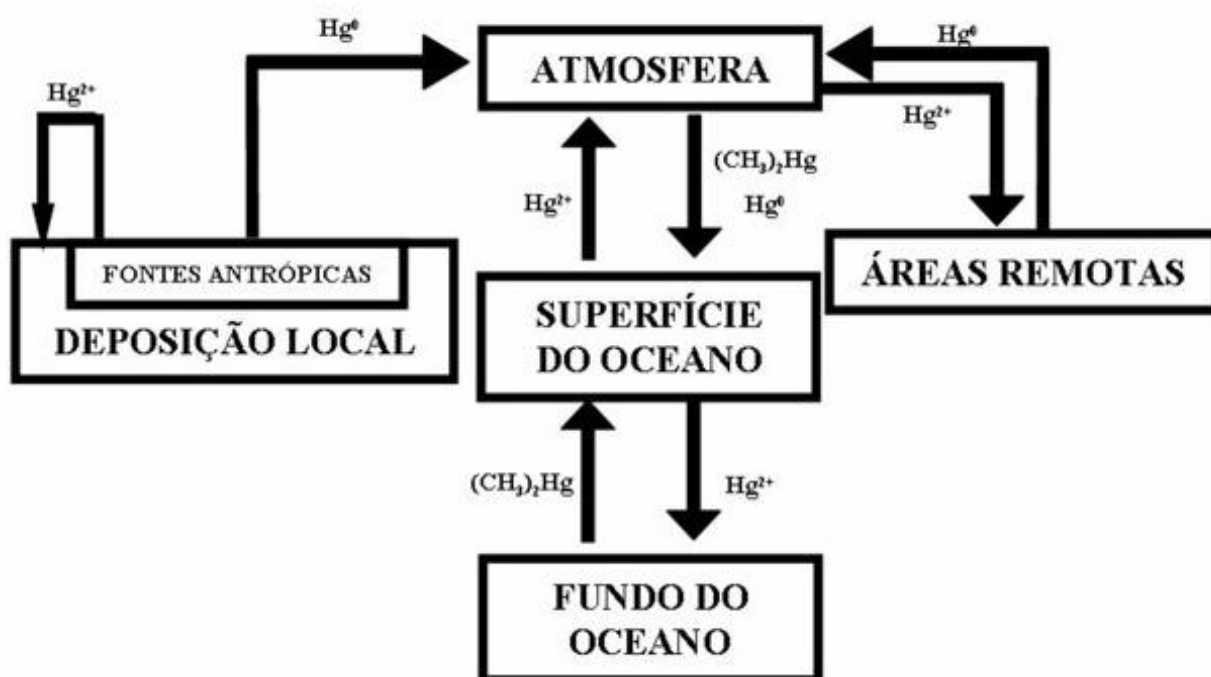
1.5 Ciclo biogeoquímico: especiação, bioacúmulo e biomagnificação do Hg

O mercúrio é um elemento cujas concentrações nos ecossistemas com ausência ou reduzida atividade antropogênica se apresentam em níveis de traço e ultra traço (LUO et al., 2022). Seu desprendimento para o meio ambiente ocorre a partir de processos naturais, como erupção vulcânica, erosão, lixiviação e evaporação (LUO et al., 2022), ou a partir de atividades antrópicas, como a construção e barragem para empreendimentos do setor elétrico e o garimpo.

² A Jirau Energia é uma Sociedade de Propósito Específico que tem como acionistas as empresas ENGIE, Eletrosul, Chesf e Mitsui.

A dinâmica de funcionamento destas ações, apesar de propiciar a expansão econômica territorial, também causa o revolvimento das camadas mais profundas dos constituintes sólidos de fundo do ecossistema aquático. Uma vez liberado para o meio ambiente, o mercúrio se conserva nos compartimentos da litosfera, da hidrosfera e da atmosfera, podendo ser deslocado e biodisponibilizado a partir de seu ciclo biogeoquímico: um sistema de reação mediada por microrganismos, como por exemplo pelas bactérias sulfato-redutoras, principalmente a espécie *Desulfovibrio desulfuricans* (MIRANDA et al., 2007; TINÔCO, 2010; RAMOS-ROSAS et al., 2012; CETESB, 2023). O sedimento mais profundo é o compartimento com maior aptidão para a conversão do mercúrio inorgânico em mercúrio orgânico, pois tem seu oxigênio consumido pela ação microbiana, estabelecendo condições anóxicas compatíveis ao processo de metilação. De acordo com os expostos por Miranda et al. (2007), bem como por Luo et al. (2022), a metilação biótica do mercúrio inorgânico para sua forma orgânica em ecossistemas aquáticos é induzida pela interação entre fatores bióticos e a presença de complexos orgânicos e inorgânicos presentes na coluna d'água e sedimentos. Além disso, a efetividade do processo de metilação depende não apenas da atividade microbiana, mas também de aspectos relacionados ao pH, potencial redox, temperatura e quantidade de mercúrio biodisponibilizada (MIRANDA et al., 2007; LUO et al., 2022).

A



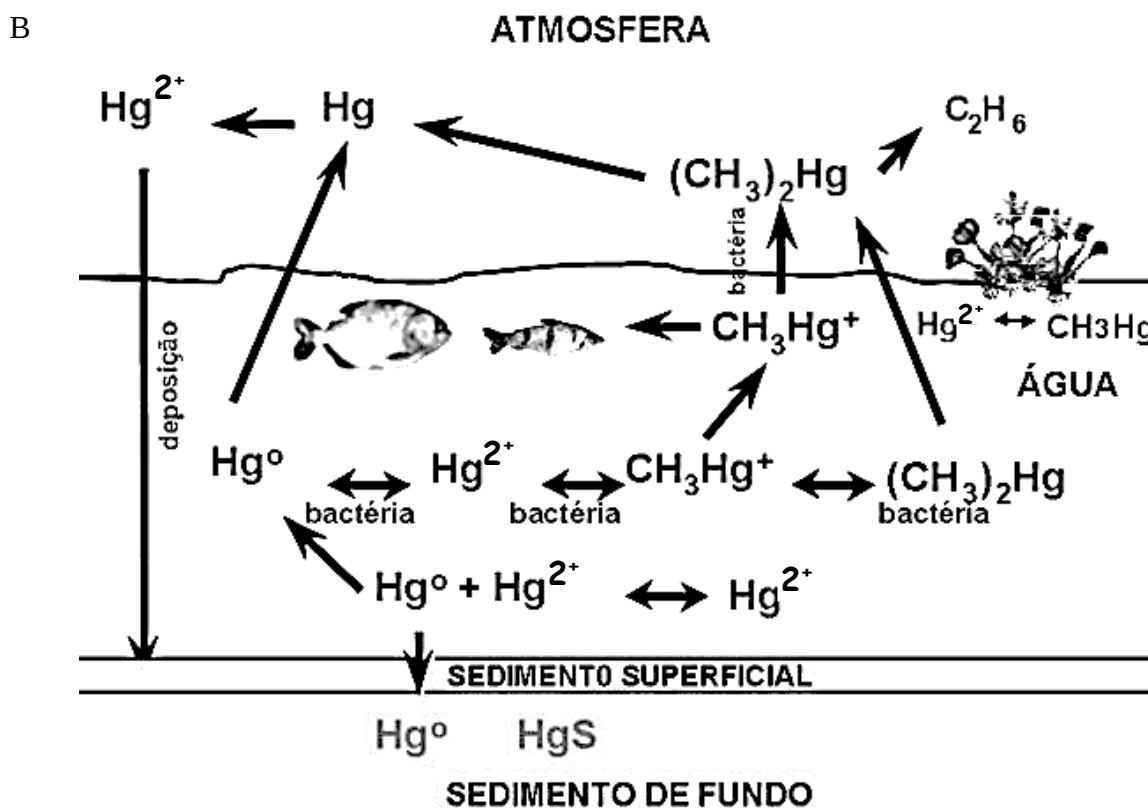


Figura 1 - Representação esquemática (A) do ciclo biogeoquímico do mercúrio e (B) da especiação do mercúrio em ecossistemas aquáticos.

Fonte: Miranda et al. (2007).

Logo, a agitação da interface sedimento-água, causada pela movimentação das turbinas geradoras e/ou das dragas de sucção, permite a suspensão do material sedimentado e, conseqüentemente, a liberação dos íons metálicos, que se ligam à matéria orgânica disponível e formam complexos organomercuriais (DOREA; DONANGELO, 2006; MIRANDA et al., 2007; LACERDA; MALM, 2008; SILVA, 2016; KULKARNI; DEOBAGKAR; ZINJARDE, 2018). Dentre os compostos organomercuriais, volta-se a atenção ao metilmercúrio em decorrência de sua baixa taxa de excreção e de sua afinidade com aminoácidos com grupo tiol em sua estrutura, como a cisteína (MIRANDA et al., 2007).

O metilmercúrio é incorporado à biota aquática pela ingestão de organismos contaminados e, após a absorção pelo trato gastrointestinal, é depositado nos tecidos dos animais em sua forma metilada. À medida que há uma progressão ao longo da cadeia alimentar, o metilmercúrio é transferido aos próximos níveis tróficos. Assim, peixes que ocupam níveis mais elevados da cadeia trófica, possuem maiores concentrações de metilmercúrio e passam a atuar como transportadores dessa espécie química de Hg para seus consumidores finais, incluindo os seres humanos, como exemplificado anteriormente pelo caso das populações ribeirinhas (ROCHA; ROSA; CARDOSO, 2004; TINÔCO, 2010; RAMOS-ROSAS et al., 2012; VIANA, 2023).

1.6 Toxicidade do mercúrio: Contaminações, intoxicações e os impactos na saúde humana

Os espaços territoriais que fazem menção aos entornos do rio Madeira estão intimamente relacionados ao período histórico entre as décadas de 80 e 90, quando o governo federal estimulava a ocupação baseada na política “*integrar para não entregar*”. Assim, o foco no desenvolvimento da região Amazônica possibilitou a instalação de colônias e, conseqüentemente, a interiorização e a fixação da população e da produção agropecuária e extrativista mineral. Entretanto, como supracitado, a partir da implementação do Programa de Aceleração do Crescimento, pode-se observar uma dicotomização das dinâmicas territoriais em Rondônia. Caracterizadas de “funcionalidades territoriais díspares”, houve a organização do espaço definida pelo Estado para a expansão e integração e, ao mesmo tempo, pelo Capital que fragmentou espacialmente a região Amazônica ante a necessidade dos interesses nacionais de tornar o Brasil autossuficiente em geração de energia elétrica (REIKDAL; SOUZA, 2024).

Neste contexto, a instalação das atividades agropecuárias, somadas ao extrativismo mineral e à implantação de usinas hidrelétricas para a formação do Complexo Rio Madeira, corroboram a narrativa da “incorporação da natureza ao processo produtivo” (SILVA, 2010, p. 50). A viabilização do desenvolvimento do Capital se desdobra para uma especialização territorial que reformula os processos valorativos da materialidade do território e desconsidera a indissociabilidade dos setores socioambientais, socioculturais e socioeconômicos. A omissão desses elementos, impõe crises associadas à perda da pluralidade local, à desordenação das dinâmicas naturais e, conseqüentemente, à qualidade de vida (SANTOS, 1999; CLAVAL, 2005; REIKDAL; SOUZA, 2024). Logo, tem-se uma desintegração territorial na qual uma cadeia sistêmica negativa concentrada no fluxo de exploração mineral do ouro e de grandes empreendimentos na área hidrotermoelétrica confronta a pesca de caráter artesanal, reproduzida culturalmente para a subsistência da população ribeirinha das localidades no rio Madeira, como Abunã, Fortaleza do Abunã e Nova Mutum Paraná.

A implicação acerca da insegurança alimentar em relação ao consumo de peixes contaminados por Hg é de suma importância, dado que a frequência de exposição ao elemento causa efeitos adversos nos órgãos e sistemas. Os sintomas relacionados à exposição ao mercúrio nos seres humanos se diferenciam de acordo com a forma química do Hg à que são expostos, pelos aspectos toxicológicos de absorção, transporte e excreção (CANO, 2014).

Quando o metal está presente na forma de metilmercúrio (MeHg), a bioacumulação aumenta significativamente. Menciona-se que no trato gastrointestinal, aproximadamente 95% do

MeHg é absorvido, sendo posteriormente redirecionado à corrente sanguínea, onde é distribuído sistemicamente para os demais tecidos em aproximadamente quatro dias após a exposição direta (SYVERSEN; KAUR, 2012). No plasma, devido a sua lipossolubilidade e afinidade por grupos sulfidrilas presentes em aminoácidos como a cisteína ou enzimas como a glutatona, há uma conjugação entre espécies organomercuriais e biomoléculas, que é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e alcançar o sistema nervoso central. Ao se converterem em complexos na estrutura de biomoléculas, adquirem também mobilidade através dos tecidos fazendo com que as denominadas metaloproteínas, ligadas aos íons ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn), magnésio (Mn), cobalto (Co), percam, parcial ou totalmente, suas respectivas funções. A inviabilização na expressão proteica das metaloproteínas conta com alterações patológicas relacionadas à inibição dos receptores ácido gama-aminobutírico e do sistema glutamatérgico. O neurotransmissor GABA está relacionado ao equilíbrio entre a excitação e inibição neuronal e, o glutamato, principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central, pode atuar como precursor do GABA. Logo, a redução nas concentrações dos mesmos acaba por evidenciar transtornos neuropsiquiátricos, como: ataxia, neurastenia, disartria, distúrbios visuais, tremores musculares, parestesia e em casos mais extremos, cegueira, coma e morte (CECCATELLI et al., 2010; KHOURY et al., 2013). O MeHg pode também afetar o sistema imunológico, causando sua debilidade; o sistema renal, desestabilizando o nível de creatinina; e o sistema cardiovascular, alterando a homeostase (ZAHIR et al., 2005). Além disso, de acordo com Roos (2011), os mecanismos de toxicidade em nível celular do MeHg envolvem alterações do sistema da homeostase do cálcio intracelular e nos sistemas antioxidante (ROOS, 2011).

No que tange ao desequilíbrio entre a síntese de compostos antioxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante endógena, este processo fisiológico sensibilizado é denominado como estresse oxidativo. Sua implicação se dá quando há um aumento na produção de radicais livres derivados do metabolismo do oxigênio molecular, designados como espécies reativas de oxigênio (ERO) (BRAY, 2000; ERCAL; GURER-ORHAN; AYKIN-BURNS, 2001; MENDES; PEREIRA; DE ANGELIS-PEREIRA, 2020). As ERO têm como fonte originária a mitocôndria, cuja principal função é a geração de energia por meio da síntese do trifosfato de adenosina (ATP). Elas podem ser formadas no meio intracelular durante os processos oxidativos, envolvidos com a produção de energia na cadeia transportadora de elétrons (BRAY, 2000; MENDES; PEREIRA; DE ANGELIS-PEREIRA, 2020). Frente a isso, o sistema de defesa antioxidante, com a função de inibição dos efeitos deletérios causados pela ação dos radicais livres, tem sua atuação excedida e/ou suprimida e as ERO podem atuar sobre a maioria das estruturas celulares, causando prejuízos às proteínas, membranas celulares, ácidos nucleicos. Como

resultados, se pode observar consequências em níveis genotóxicos, neurotóxicos, disfunções e destruição celular (HUSSAIN et al., 1997; BRAY, 2000; ERCAL; GURER-ORHAN; AYKIN-BURNS, 2001; PEROTTONI et al., 2004; CARVALHO et al., 2008). Estão implicadas na etiologia de um grande número de alterações degenerativas, incluindo patologias no sistema nervoso central, doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, como aterosclerose, doença cardíaca coronária, infarto do miocárdio e hipertensão, além de câncer, envelhecimento e diabetes mellitus (BRAY, 2000; MENDES; PEREIRA; DE ANGELIS-PEREIRA, 2020).

1.7 Biomarcadores

Em decorrência do cenário de crescentes casos de impactos ambientais oriundos das atividades produtivas, há, igualmente, um aumento na pesquisa por ferramentas que auxiliem nos processos compreensivos dos efeitos tóxicos de compostos químicos em sistemas biológicos. Neste ponto, os biomarcadores representam um valioso recurso para a identificação da exposição a contaminantes, bem como para a avaliação dos efeitos adversos, principalmente no que tange à saúde pública (LIONETTO; CARICATO; GIORDANO, 2019).

Biomarcadores são definidos como determinações quantitativas de substâncias químicas presentes em meios biológicos, por exemplo sangue, urina e leite, e estão relacionados a alterações em níveis celular, fisiológico e molecular (OECD, 2012; BRANCO et al., 2017; LIONETTO; CARICATO; GIORDANO, 2019). A especificidade desses biomarcadores pode variar, dependendo de qual e de como uma determinada molécula é representativa no local alvo. Um exemplo disso é a alta especificidade com que o mercúrio induz a metalotioneína (MT), uma proteína citosólica essencial nos processos de homeostase e desintoxicação para a manutenção das condições de redução oxidativa, assim como, da regulação de radicais livres (LIONETTO; CARICATO; GIORDANO, 2019; MURRAY et al., 2003; BRANCO et al., 2017; VIEIRA et al., 2023; YANG et al., 2024).

1.7.1 Metaloproteínas e Proteínas ligadas a metais

É importante salientar a afinidade de metais por proteínas, principalmente ao considerar que muitos íons metálicos desempenham importantes funções em processos biológicos. Segundo Rosato, Valasatava e Andreini (2016) e Vieira (2017), são as interações entre o metal e a proteína que determinam as propriedades das metaloproteínas. Essas interações envolvem tanto

a esfera de coordenação do íon metálico quanto as interações entre a macromolécula e os resíduos de coordenação do metal (ROSATO; VALASATAVA; ANDREINI, 2016; VIEIRA, 2017).

Na literatura científica, “metaloproteínas” e “*metal-binding proteins*” são, muitas vezes, usados de maneira intercambiável, mas com nuances que podem variar dependendo do contexto, e se estabelecem justamente no tipo de relação entre o metal e a proteína. Metaloproteínas são proteínas que possuem um cofator metálico incorporado por meio de ligações específicas e de alta afinidade, ou seja, são proteínas que possuem um íon metálico como parte integrante de sua estrutura, no qual é necessário para sua atividade funcional como, por exemplo, a hemoglobina que contém ferro e é essencial para o transporte de oxigênio no sangue. Por outro lado, as proteínas ligadas a metais, ou *metal-binding proteins*, se referem a um grupo de proteínas/enzimas que incorporam íons metálicos em sua estrutura por meio de ligações inespecíficas. O metal não é parte constituinte fundamental para o desenvolvimento de uma determinada função no organismo, podendo apenas estar ligado na estrutura da proteína/enzima sem conferir atividade biológica à biomolécula (GARCIA; MAGALHÃES; ARRUDA, 2006; LIMA et al., 2010; LOBINSKI et al., 2010; BATAGLIOLI et al., 2019).

Neste sentido, existem alguns metais que, como o mercúrio, possuem uma forte afinidade pelos sítios de ligação nas proteínas, que normalmente são ocupados por metais essenciais. Essa afinidade permite que o mercúrio desloque esses metais, ocupando seu lugar e, consequentemente, inibindo a atividade biológica da proteína/enzima (GARCIA; MAGALHÃES; ARRUDA, 2006; LIMA et al., 2010; LOBINSKI et al., 2010; ROSATO; VALASATAVA; ANDREINI, 2016; BRANCO et al., 2017; VIEIRA, 2017; BATAGLIOLI et al., 2019).

As metalotioneínas (MTs) representam um grupo de proteínas de ligação a metais de grande importância para os seres vivos. Elas são proteínas de baixa massa molecular, variando entre 6 e 7 kDa, compostas por uma única cadeia de aproximadamente 60 aminoácidos. Cerca de 30% dessa cadeia é formada por cisteínas, as quais contêm um grupo tiol (-SH) em sua cadeia lateral, com grande afinidade para ligações com metais (BRANCO et al., 2017; VIEIRA, 2017). Justificando o fato de o Hg^0 e o MeHg serem reconhecidos por estimular a síntese de MT após sua conversão para Hg^{2+} nos tecidos, particularmente nos rins e no fígado, a MT desempenha diferentes papéis em diversos processos biológicos. Ela está envolvida em funções como desintoxicação de xenobióticos, atividade antioxidante, efeitos anticancerígenos e propriedades anti-inflamatórias (BRANCO et al., 2017; VIEIRA, 2017; LIONETTO; CARICATO; GIORDANO, 2019; MURRAY et al., 2003; VIEIRA et al., 2023; YANG et al., 2024). Considerando o exposto, e devido à afinidade por metais, as MTs são proteínas de grande interesse, pois

“Por apresentar superexpressão quando expostas a metais ou condições estressantes, as MTs são consideradas importantes biomarcadores específicos, sendo resultado de uma resposta do organismo frente a poluentes inorgânicos presentes no ambiente ou a doenças. Sabendo dessa característica das MTs, elas podem ser usadas como biomarcadoras de toxicidade do mercúrio nos organismos aquáticos, monitorando o surgimento das MTs e a quantidade de mercúrio ligado a elas” (VIEIRA, 2017, p. 21).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e validar metodologias para a detecção e identificação de potenciais biomarcadores associados à frequência de exposição ao mercúrio em amostras de plasma da população ribeirinha da região de Jirau, no rio Madeira, Rondônia. Essas metodologias também têm como objetivo serem aplicadas em programas mais abrangentes de prevenção, monitoramento, controle e fiscalização na região Amazônia, proporcionando suporte técnico para a compreensão da magnitude dos impactos socioambientais e das consequências para a saúde pública.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver e validar métodos analíticos para obtenção do proteoma das amostras, utilizando *Shotgun-LC-MS/MS* como componente de seletividade e cartões *Noviplex™* no processo de amostragem de plasma humano;
- Determinar a concentração de mercúrio total (Hg_T) na fração proteica das amostras de plasma por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (*GFAAS*);
- Identificar possíveis biomarcadores de exposição às espécies mercuriais por meio da análise de abundância de proteínas utilizando a estratégia *Shotgun* - cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em sequência (*Shotgun-LC-MS/MS*).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Metalômica: inter-relação entre genômica e proteômica

A metalômica é a ciência que estuda o metaloma, o qual é considerado a totalidade das espécies metálicas presentes em um sistema biológico. De acordo com Lobinski et al. (2010), dentre essas espécies metálicas se incluem os íons de metal livre, seus complexos com ligantes inorgânicos e biomoléculas contendo metal, por exemplo aminoácidos complexados com metal, metaloproteínas e metaloenzimas. Assim, a metalômica é uma área de pesquisa inter e transdisciplinar (HARAGUCHI, 2004; MOUNICOU; SZPUNAR; LOBINSKI, 2009; LOBINSKI et al., 2010; SCHAUMLÖFFEL, 2016; MARET, 2018).

Por sua afinidade com a genômica e com a proteômica, essa ciência permite esclarecer interações fisiológicas e funcionais das metaloproteínas com a qualidade e a saúde ecossistêmica (HARAGUCHI, 2004; MOUNICOU; SZPUNAR; LOBINSKI, 2009; SCHAUMLÖFFEL, 2016; LIMA et al., 2020). A conexão entre essas áreas pode ser entendida de acordo com suas respectivas abordagens (Figura 2). A genômica se refere à investigação da estrutura, da função, das interações e alterações do genoma, que é o conjunto completo do material genético de um organismo. Já a proteômica é o estudo global de todas as proteínas expressas em um organismo, tecido ou célula, na qual se analisa a estrutura, função, interações e regulações proteicas.

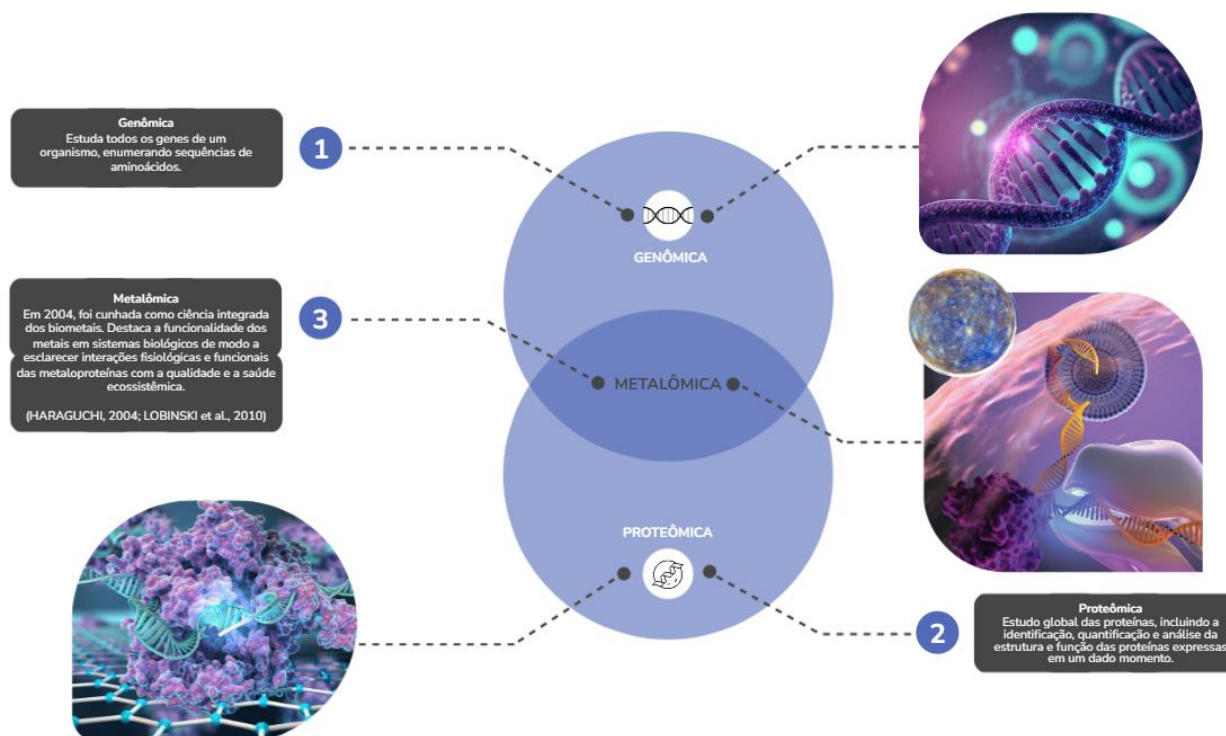


Figura 2 - Origem da Metalômica: interconexão entre Genômica e Proteômica.

Além disso, se considera a existência do campo da metaloproteômica, uma vertente da metalômica, cujo foco se centra nas proteínas que contêm metais ou que se ligam a metais. A metaloproteômica investiga como a presença de metais, essenciais ou não, influencia a estrutura e a função dessas proteínas, além de suas interações e papéis em processos biológicos. Assim, a metaloproteômica é especialmente relevante para entender os mecanismos de ação das proteínas e como elas contribuem para a homeostase de metais no organismo, além de suas implicações em doenças relacionadas a desequilíbrios metálicos (GÓMEZ-ARIZA et al., 2011). Assim, enquanto a proteômica oferece uma visão geral do conjunto de proteínas em um sistema, a metaloproteômica se concentra nas interações específicas e nas funções das proteínas que envolvem metais.

É na intersecção destas ciências, da genômica e da proteômica, que se origina a metalômica: uma área de pesquisa que estuda os metais e metalóides na esfera de suas distribuições, interações e conexões funcionais com biomoléculas, dentre as quais estão os genes e as proteínas (Figura 2) (HARAGUCHI, 2004; MOUNICOU; SZPUNAR; LOBINSKI, 2009; LOBINSKI et al., 2010; SCHAUMLÖFFEL, 2016; MARET, 2018).

Dessa forma, a metalômica pode ser retratada a partir de uma abordagem que requer considerações singulares quanto ao papel dos íons metálicos na biologia (LOBINSKI et al., 2010; MARET, 2018). Haraguchi (2004), Lobinski et al. (2010) e Maret (2018) ressaltam que a metalômica, dentro do plano da exploração das especificações funcionais dos metais em contextos biológicos, pode fornecer *insights* sobre mecanismos bioquímicos e fisiológicos para o desenvolvimento científico na biotecnologia e na saúde pública (HARAGUCHI, 2004; LOBINSKI et al., 2010; MARET, 2018; LIMA et al., 2020).

Neste contexto, um dos objetivos da metalômica é a identificação de biomarcadores de toxicidade do mercúrio, não apenas desse elemento, mas, especialmente neste estudo, e a compreensão de como as espécies mercuriais estão associadas ao ambiente de coordenação nas proteínas. O conceito de “ambiente de coordenação” está relacionado à forma como um metal interage e se liga a proteínas ou outras moléculas biológicas, como aminoácidos ou grupos funcionais, e como essas interações influenciam sua reatividade e sua capacidade de interagir com outras moléculas. Esse aspecto é fundamental para entender o papel de metais, como o mercúrio, no organismo e como ele pode afetar as funções biológicas. Possíveis resultados dessas análises incluem alterações na expressão de proteínas, seja pelo aumento ou diminuição, em resposta à disponibilidade de espécies mercuriais no ambiente, o que pode provocar mudanças na organização e funcionalidade dos sistemas biológicos devido aos impactos ambientais. Dessa forma, dados de significativa relevância poderão ser obtidos para a elucidação dos mecanismos

desse metal tóxico na biota aquática e nos seres humanos. Os biomarcadores relacionados à frequência de exposição ao mercúrio identificados poderão ser aplicados em programas de monitoramento de contaminação desse elemento em humanos. Além disso, eles podem possibilitar a identificação precoce e a avaliação dos riscos de exposição ao mercúrio com elevada confiabilidade em um curto período de tempo, permitindo a implementação de ações preventivas.

Por isso, também, seus conceitos e aplicações vêm sendo cada vez mais empregados em estudos que visam a caracterização da funcionalidade dos metais em sistemas biológicos, ou seja, na integração de estudos bioquímicos, inorgânicos e analíticos.

O histórico de progressos obtidos pela metalômica confirma sua posição como uma área de estudo inovadora no sequenciamento, expressão e caracterização de proteínas ligadas a metais e/ou associadas ao mercúrio. Esse fato é evidenciado pela sua crescente aplicação. A Figura 3 apresenta um gráfico que ilustra as publicações científicas disponíveis na base de dados *Scopus* referente a estudos cujos títulos, resumos e palavras-chave contêm os termos *Metallomics AND Mercury*. Entre o período de 2005 a 2024, foram encontrados 69 documentos.

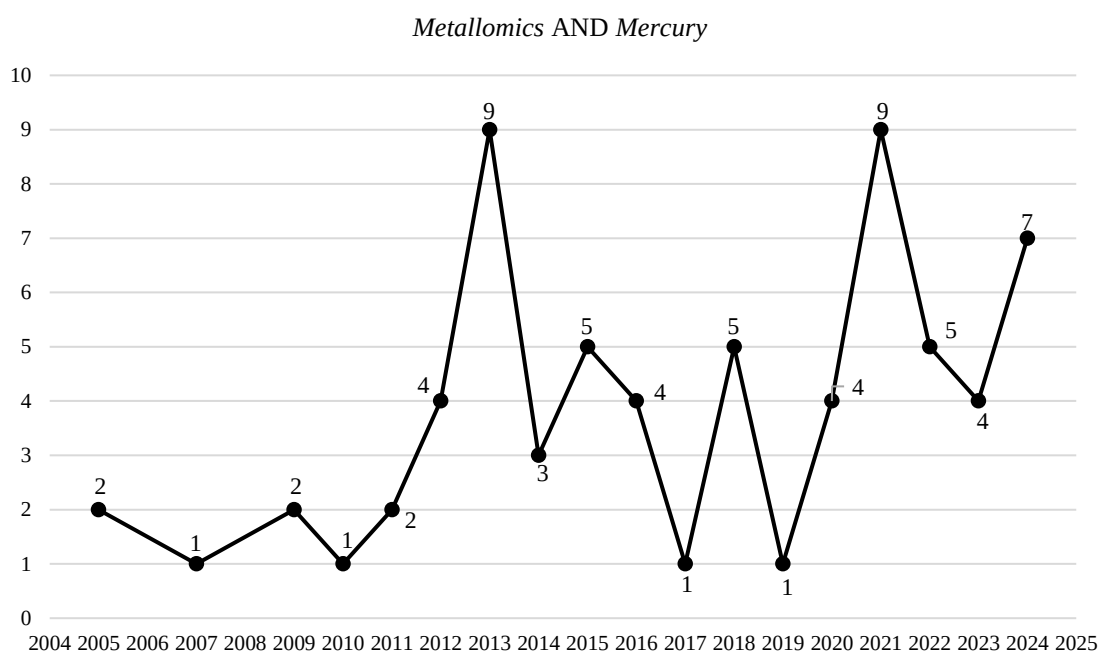


Figura 3 - Pesquisa de documentos na base de dados do *Scopus*. Filtro utilizado: *Article title, Abstract, Keywords - Metallomics and Mercury*.

Fonte: *Scopus* (2024).

Já Figura 4 traz um gráfico das publicações científicas disponíveis na base de dados *Scopus* referente a estudos cujos títulos, resumos e palavras-chave contêm os termos

Metalloproteomics AND Mercury. Entre o período de 2005 a 2024, foram encontrados 18 documentos.

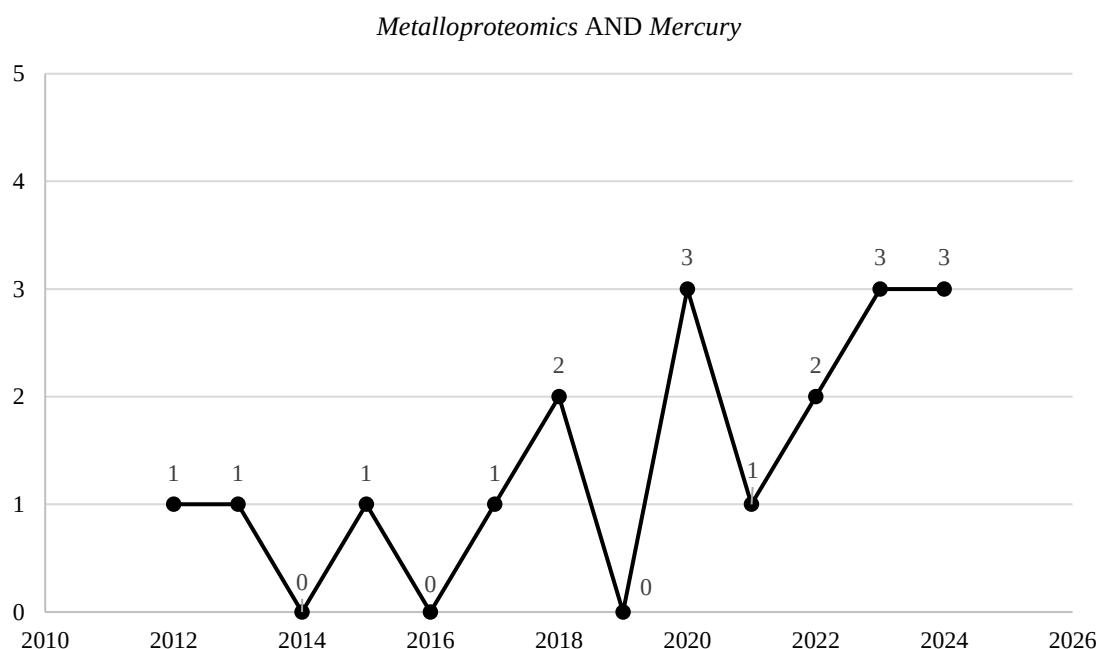


Figura 4 - Pesquisa de documentos na base de dados do *Scopus*. Filtro utilizado: *Article title, Abstract, Keywords - Metalloproteomics and Mercury*.

Fonte: *Scopus* (2024).

Nota-se que, em geral, as metodologias analíticas voltadas para análises metalômicas se baseiam em três componentes principais: o componente de seletividade, no qual há o isolamento das espécies-alvo da matriz a partir de técnicas de separação; o componente estrutural, fundamentado na detecção específica de moléculas para caracterização; e o componente de sensibilidade, focado na identificação e na quantificação da espécie metálica ou metaloide. As principais estratégias analíticas utilizadas nos estudos metalômicos mencionados nas Figuras 3 e 4 são apresentados a seguir (Tabela 1). As referências citadas consideram um período máximo de cinco anos, para garantir que o conteúdo científico esteja atualizado e reflita as descobertas mais recentes, avanços tecnológicos e tendências, além de assegurar a relevância e a precisão das informações no campo de estudo.

Tabela 1 - Tendências emergentes em métodos analíticos utilizados na análise de estudos metalômicos.

Metodologia	Publicação	Referência
Cromatografia de troca aniônica (AEX), cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) e cromatografia de fase reversa (RP) acoplada à espectrometria de massa plasma indutivamente acoplada	<i>The emerging application of LC-based metallomics techniques to unravel the bioinorganic chemistry of toxic metal(loid)s</i>	Negar, Gailer (2024) - <i>Journal of Chromatography</i>
Fluorescência de Raios-X com Radiação Síncrotron (SR-XRF)	<i>Non-targeted metallomics based on synchrotron radiation X-ray fluorescence spectroscopy and machine learning for screening inorganic or methylmercury-exposed rice plants</i>	Ao et al. (2024) - <i>Journal of Environmental and Occupational Medicine</i>
2D-PAGE, Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (GFAAS), Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massa em Sequência - Shotgun-LC-MS/MS	<i>Metallomic Approach to Mercury and Selenium in the Liver Tissue of <i>Psectrogaster amazonica</i> and <i>Raphiodon vulpinus</i> from the Brazilian Amazon</i>	Bataglioli et al. (2024) - <i>International Journal of Molecular Sciences</i>
2D-PAGE, Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (GFAAS), Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massa em Sequência - Shotgun-LC-MS/MS	<i>Metalloproteomic Investigation of Hg-Binding Proteins in Renal Tissue of Rats Exposed to Mercury Chloride</i>	De Alemida et al. (2024) - <i>International Journal of Molecular Sciences</i>
Espectrometria de Massa com Plasma Frio (CP-MS), Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Fluorescência Atômica de Vapor Frio (GC-CV-AFS) e fluorescência de Raios-X com Radiação Síncrotron (SR-XRF)	<i>Nano mercury selenide as a source of mercury for rice</i>	Xie et al. (2023) - <i>Environmental Pollution</i>
2D-PAGE, Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (GFAAS), Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massa em Sequência - Shotgun-LC-MS/MS	<i>Metalloproteomic approach to liver tissue of rats exposed to mercury</i>	Santiago et al. (2023) - <i>Chemosphere</i>
Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (GFAAS), Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massa em Sequência - LC-MS/MS	<i>The effects of mercury exposure on Amazonian fishes: An investigation of potential biomarkers</i>	Vieira et al. (2023) - <i>Chemosphere</i>
2D-PAGE, Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (GFAAS), Espectrometria de massa com ionização por eletrospray (ESI-MS/MS)	<i>Investigation of Protein Biomarkers and Oxidative Stress in <i>Pinirampus pirinampu</i> Exposed to Mercury Species from the Madeira River, Amazon-Brazil</i>	Vieira et al. (2022) - <i>Biological Trace Element Research</i>
2D-PAGE, Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (GFAAS), Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massa em Sequência - Shotgun-LC-MS/MS	<i>Mercury metalloproteomic profile in muscle tissue of <i>Arapaima gigas</i> from the Brazilian Amazon</i>	Da Cunha Bataglioli et al. (2022) - <i>Environmental Monitoring and Assessment</i>

Espectrometria de massa de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)	<i>A Metallomic Approach to Assess Associations of Plasma Metal Levels with Amnesic Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: Na Exploratory Study</i>	Lin et al. (2022) - <i>Journal of Clinical Medicine</i>
Espectrometria de massa de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)	<i>Inductively coupled plasma mass spectrometry based urine metallome to construct clinical decision models for autism spectrum disorder</i>	Liu et al. (2022) - <i>Metallomics</i>
Espectrometria de massa de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Fluorescência Atômica de Vapor Frio (GC-CV-AFS)	<i>Understanding the hepatotoxicity of inorganic mercury through guts: Perturbance to gut microbiota, alteration of gut-liver axis related metabolites and damage to gut integrity</i>	Lin et al. (2021) - <i>Ecotoxicology and Environmental Safety</i>
Espectrometria de massa de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Fluorescência Atômica de Vapor Frio (GC-CV-AFS)	<i>Towards screening the neurotoxicity of chemicals through feces after exposure to methylmercury or inorganic mercury in rats: A combined study using gut microbiome, metabolomics and metallomics</i>	Lin et al. (2021) - <i>Journal of Hazardous Materials</i>
Espectrometria de massa de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)	<i>Metallomics Analysis for Assessment of Toxic Metal Burdens in Infants/Children and Their Mothers: Early Assessment and Intervention Are Essential</i>	Yasuda, Tsutsui, Suzuki (2021) - <i>Biomolecules</i>
Cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) acoplada a espectrômetro de massa de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)	<i>Characterization of the mercury-binding proteins in tuna and salmon sashimi: Implications for health risk of mercury in food</i>	Nong et al. (2021) - <i>Chemosphere</i>
2D-PAGE, Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (GFAAS), Espectrometria de massa com ionização por eletrospray (ESI-MS/MS)	<i>Metalloproteomic Strategies for Identifying Proteins as Biomarkers of Mercury Exposure in <i>Serrasalmus rhombeus</i> from the Amazon Region</i>	Queiroz et al. (2021) - <i>Biological Trace Element Research</i>
Espectrometria de massa de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)	<i>Metal and essential element levels in hair and association with autism severity</i>	Fiore et al. (2020) - <i>Journal of Trace Elements in Medicine and Biology</i>
SDS-PAGE, Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Fluorescência Atômica de Vapor Frio (CV-AFS) e Cromatografia Líquida de Ultra Alto Desempenho em Escala Nanolitro acoplada à Ionização por Spray Eletrostático e Espectrometria de Massa em Tandem (nanoUPLC-ESI-MS/MS)	<i>Metalloproteomics analysis in human mammary cell lines treated with inorganic mercury</i>	Maniero et al. (2020) - <i>Journal of Trace Elements in Medicine and Biology</i>

Pode-se observar que métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massa se destacam consideravelmente em análises de matrizes complexas. A cromatografia líquida (*LC*) é eficaz na separação de compostos complexos presentes em amostras biológicas, como sangue, urina e saliva, permitindo que diferentes substâncias sejam isoladas antes de serem analisadas. A espectrometria de massa (*MS*), por sua vez, fornece uma identificação exata e a quantificação dos compostos separados, com base em suas características de massa e fragmentação. Logo, a combinação de *LC-MS/MS* permite uma análise detalhada e sensível, capaz de detectar compostos em concentrações muito baixas, o que é fundamental para estudos de biomarcadores e monitoramento de toxinas. Além disso, o acoplamento dessas técnicas oferece alta seletividade e sensibilidade, reduzindo interferências e aumentando a confiabilidade dos resultados.

Devido a robustez das técnicas mencionadas, este estudo utilizou as seguintes abordagens analíticas: espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (*GFAAS*), *Shotgun proteomics* e espectrometria de massas em sequência acoplada à cromatografia líquida (*LC-MS/MS*). Essas técnicas serão apresentadas e discutidas a seguir, com os protocolos detalhadamente descritos no Item 4: Materiais e Métodos.

3.1.1 Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite - *GFAAS*

A espectrometria de absorção atômica é uma técnica cujos princípios analíticos se baseiam na medição da absorção específica da intensidade da radiação eletromagnética proveniente de uma fonte de radiação primária emitida por átomos livres em estado gasoso. Sua utilização é voltada para a detecção e determinação quantitativa de elementos metálicos e metaloides em amostras de diferentes naturezas (KRUG; NÓBREGA; OLIVEIRA, 2004; QUEIROZ, 2017; VIEIRA, 2017). Há dois tipos de atomizadores mais utilizados na espectrometria de absorção atômica: a espectrometria de absorção atômica em chama (*FAAS*) e a espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (*GFAAS*). A diferenciação das técnicas se dá em virtude das concentrações dos elementos a serem analisados. Dessa forma, a *FAAS* é mais utilizada para análises elementares em níveis de mg L^{-1} , enquanto a *GFAAS*, para detecções em níveis de $\mu\text{g L}^{-1}$. Portanto, pode-se inferir que a absorção atômica em forno de grafite apresenta maior sensibilidade, característica garantida pela introdução de grande parte do analito no tubo de grafite, que é atomizado no caminho ótico. Esse sistema fechado forma a nuvem atômica de modo mais eficiente. Outra vantagem apresentada pela absorção atômica em forno de grafite, quando comparada à absorção atômica com chama, é a quantidade reduzida de amostra necessária para a análise dos analitos (KRUG; NÓBREGA; OLIVEIRA, 2004).

3.1.2 Espectrometria de massas em sequência acoplada à cromatografia líquida: *Shotgun-LC-MS/MS*

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em sequência (*LC-MS/MS*) é um método analítico considerado o padrão-ouro para a identificação e quantificação de peptídeos e proteínas em amostras biológicas. Sua funcionalidade se baseia em duas estratégias: o método *top-down* e o método *bottom-up* que, se diferenciam em função da integridade proteica. O método *top-down* é um método de análise no qual os dados informativos sobre as massas são gerados a partir dos íons das proteínas intactas. Já o método *bottom-up*, utilizado na metodologia desse trabalho, é também denominado “*Shotgun*” e consiste em processos interconectados e organizados de forma estruturada. De acordo com a Figura 5 proposta por Gao e Yates (2019), a sistemática atende a seguinte ordem: preparação da amostra, aquisição de dados por espectrometria de massas e, por fim, processamento dos dados (GAO; YATES, 2019).

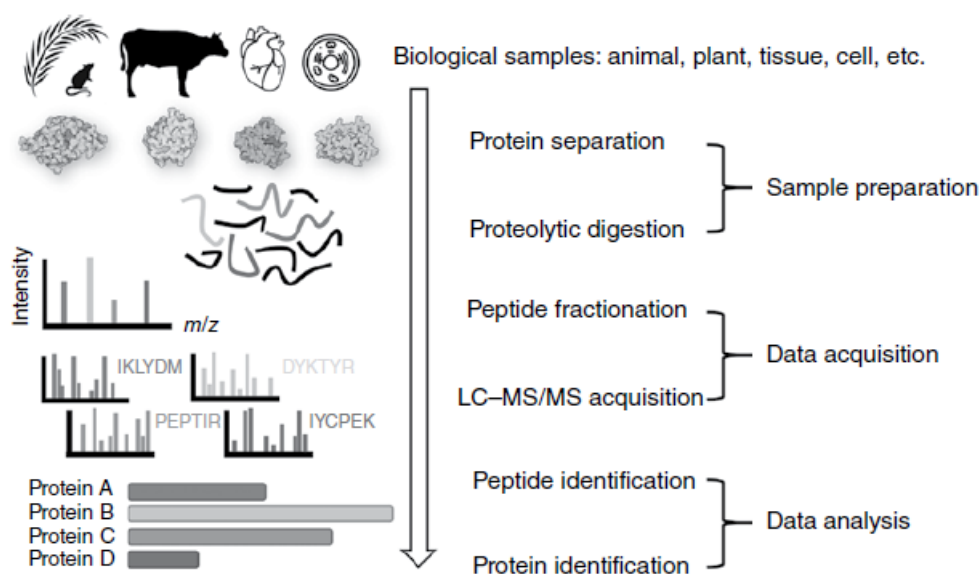


Figura 5 - Fluxo de trabalho típico de um experimento *bottom-up*.

Fonte: Gao; Yates (2019).

A etapa do método *Shotgun* que envolve o preparo das amostras biológicas se baseia na separação e no isolamento das proteínas de seus respectivos conteúdos não proteicos. A mistura de proteínas é reduzida e alquilada de modo a estabilizar a molécula a partir da linearização das proteínas pela quebra das ligações dissulfeto Cys-Cys e, então, submetida a digestão pela ação de uma protease como, por exemplo, a tripsina que, por possuir especificidade com resíduos de

arginina e lisina, resulta na geração de peptídeos com tamanhos adequados e propriedades de carga favoráveis para detecção por espectrometria de massas (*MS*). Ao final do processo de preparo da amostra, o produto obtido é uma mistura complexa de peptídeos (GAO; YATES, 2019; MEYER, 2021).

Posteriormente, um sistema *LC-MS* é utilizado para fracionar os peptídeos em fragmentos, aumentando assim a quantidade de dados *MS/MS* gerados a partir da mistura de peptídeos. A fim de acrescentar qualidade à resolução dessa mistura, se realiza uma etapa de limpeza com o objetivo de remover conteúdos não proteicos. Neste ponto, a mesma é passada por colunas de separação antes de introduzir os peptídeos na ionização por *electrospray*. As colunas de separação podem ser de fase reversa (RP), troca forte de cátions (SCX), exclusão por tamanho (SEC), cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC) e purificação por afinidade. Em geral, usa-se a fase reversa devido à sua eficácia em remover sais e outros compostos de pequenas moléculas (GAO; YATES, 2019). Na etapa final de processamento de dados, após os peptídeos serem ionizados e injetados no espectrômetro de massas, as informações são obtidas para cada peptídeo detectado, incluindo dados de *MS* (massa total) e *MS/MS* (fragmentação), e então analisadas por algoritmos que comparam os espectros com sequências de proteínas em bancos de dados (Figura 6). Logo, pode-se dizer que o método *Shotgun* se baseia na dedução de proteoformas, as quais são interpretadas logicamente a partir dos peptídeos gerados pela hidrólise enzimática de proteomas inteiros (GAO; YATES, 2019; MEYER, 2021).

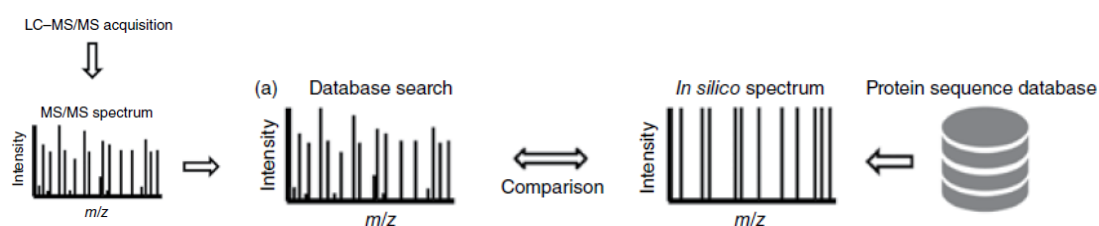


Figura 6 - Identificação de peptídeos em banco de dados: comparação do espectro teórico gerado *in silico* a partir de um banco de dados de sequências de proteínas com o espectro *MS/MS* real.

Fonte: Gao; Yates (2019).

A técnica *Shotgun* se destaca pela vantagem de caracterizar produtos com base em sua conformação proteica. Proteínas digeridas, ou seja, com estrutura desnaturada, possibilitam separações mais eficazes e, portanto, análises mais robustas por espectrometria de massas em sequência acoplada à cromatografia líquida (*LC-MS/MS*) (BRAGA, 2016; GAO; YATES, 2019; MEYER, 2021).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Área de Estudo e Pontos de amostragem: comunidades do rio Madeira

As comunidades do rio Madeira selecionadas para o presente estudo são: Abunã, Fortaleza do Abunã e Nova Mutum Paraná. A escolha das referidas localidades se deu em função de serem áreas diretamente relacionadas ao histórico de contaminação por mercúrio, consoante às atividades de garimpo e, não obstante, por estarem sob a influência do reservatório da UHE Jirau (LACERDA; MARINS, 1997; SILVA, 2016; DOREA; DONANGELO, 2006; MARQUES et al., 2011). A Figura 7 apresenta a área de estudo, a montante do eixo da UHE Jirau, indicando as 3 comunidades ribeirinhas supracitadas.

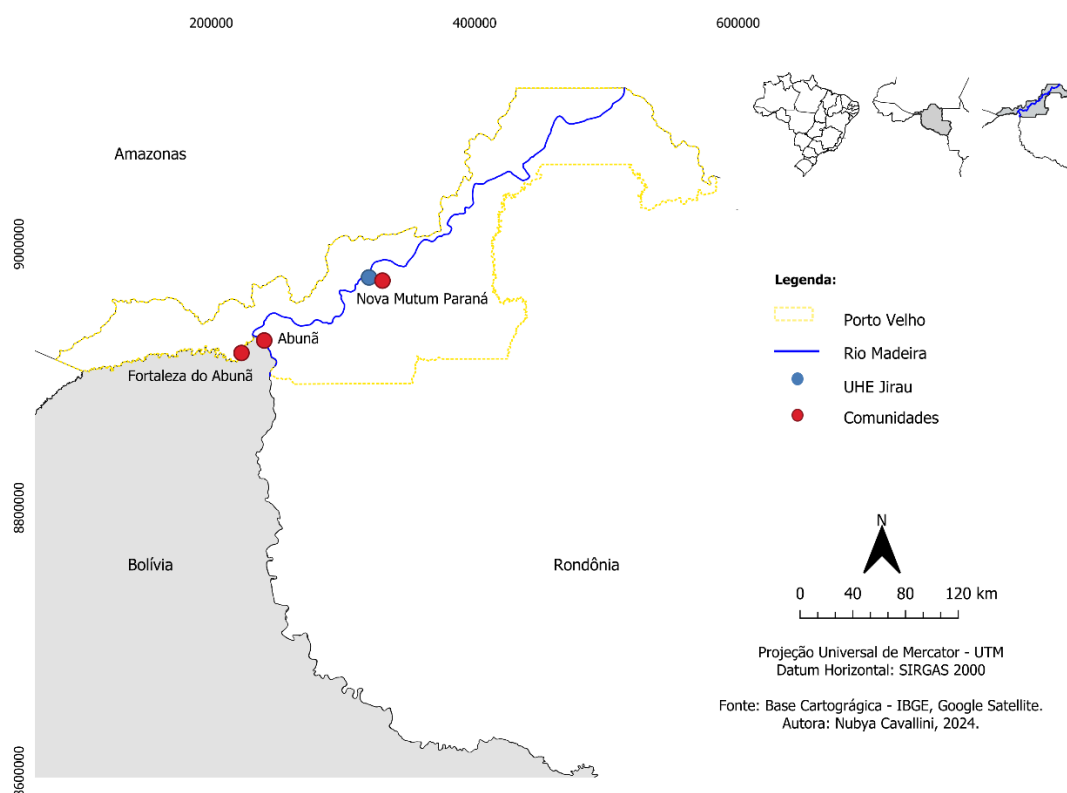


Figura 7 - Mapa de localização das comunidades ribeirinhas amostradas ao longo do rio Madeira - RO

A região de Abunã é um distrito de Porto Velho e é caracterizada por possuir significativa importância geográfica, histórica e cultural. Está localizada ao extremo oeste do Estado de Rondônia, onde faz fronteira com o Acre, com o Amazonas e com a Bolívia. Por estar localizada às margens do rio Madeira e da rodovia federal BR-364 (9°41'38.1"S; 65°21'23.9"W), única rota terrestre ao estado do Acre no extremo noroeste do Brasil, é uma localidade de

significativo afastamento dos principais centros urbanos, o que faz com que sua população baseie suas atividades econômicas na subsistência, especialmente no extrativismo e na pesca artesanal (SERRA; SILVA; BERNARDI, 2021).

Com propriedades de localização e organização socioeconômica e singularidades socioculturais semelhantes ao distrito de Abunã, Fortaleza do Abunã possui difícil acesso. A comunidade está localizada às margens do rio Abunã, na divisa com a Bolívia ($9^{\circ}46'25.1''\text{S}$; $65^{\circ}31'01.7''\text{W}$), onde a pesca artesanal é o cerne da manutenção econômica (SERRA; SILVA; BERNARDI, 2021).

Como aludido por Serra, Silva e Bernardi (2021), ambos territórios são qualificados como áreas tipicamente urbanas e se apoiam na economia pecuária, extrativista de subsistência e comercial de bens e serviços. Neste ponto, faz-se necessário ressaltar a mineração artesanal de ouro (SERRA; SILVA; BERNARDI, 2021).

Por fim, o último ponto referente às amostragens é o distrito de Nova Mutum Paraná. Como distrito de Porto Velho, a comunidade está localizada à margem da BR-364 a 115 km da capital ($9^{\circ}15'55.7''\text{S}$; $64^{\circ}33'03.4''\text{W}$). Nova Mutum Paraná é um território novo, planejado exclusivamente com o objetivo de reassentar a população diretamente afetada pela construção da UHE Jirau ($9^{\circ}16'16.0''\text{S}$; $64^{\circ}38'22.7''\text{W}$) e de seus respectivos trabalhadores. Portanto, o distrito apresenta uma economia baseada principalmente na prestação de serviços e uma cultura de hábitos e costumes diversos devido à variedade de origens antrópicas (SERRA; SILVA; BERNARDI, 2021).

4.2 Desenho amostral

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética sob CAAE nº 43167420.7.0000.5411.

Antes da execução de quaisquer protocolos envolvidos no desenvolvimento do trabalho, os participantes foram submetidos à entrevista de esclarecimento quando, frente à concordância, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo I).

4.2.1 Aplicação de Questionários e Avaliação Qualitativa da Dieta

Para a avaliação qualitativa da dieta e a verificação do consumo de pescado pela população ribeirinha das comunidades estudadas foi utilizado o questionário de frequência de consumo alimentar elaborado por Maciel e Enes (2006) (Anexo II). Participantes de ambos os sexos e de todas as faixas etárias poderiam participar voluntariamente desta avaliação.

O questionário supracitado contempla a análise em três grupos de alimentos, sendo eles: energéticos (pão, massas, biscoitos, cereais integrais, bolo, doces diversos, chá, café, refrigerante e suco de frutas), proteicos (leite, iogurte, queijo, ovos, carne suína, carne bovina, carne de frango, carne de peixe, carne de soja e feijão) e reguladores (frutas, legumes e verduras). Ademais, o mesmo apresenta também seis itens para a análise da frequência de consumo dentro de cada grupo, são estes: nunca; 3 a 6 vezes no semestre; 3 vezes no mês; 1 a 2 vezes na semana; diariamente; e, não quis responder.

4.2.2 Obtenção, extração e fracionamento de amostras de sangue

As amostras de sangue dos ribeirinhos foram coletadas em comunidades adjacentes ao rio Madeira, sendo elas: Fortaleza do Abunã, Abunã e Nova Mutum Paraná.

A coleta de sangue foi feita utilizando o sistema de cartões *Noviplex*TM (Figura 2). Desenvolvido pelo pesquisador Dr. Jiri Adamec e seus colaboradores, *Noviplex*TM é uma inovação como dispositivo de coleta de sangue autônomo usado para coletar volumetricamente alíquotas de plasma independente do volume de sangue total aplicado. Sua viabilidade encontra-se na sofisticação da coleta, pois não requer energia, frascos especiais, equipamentos, refrigeração e centrifugação; além disso, facilita o transporte das amostras, preservando suas propriedades físicas e químicas, com estabilidade de aproximadamente 6 meses a 22 °C ou 2 meses a 37 °C

O funcionamento para a extração do plasma ocorre dentro de três minutos, por um disco absorvente na parte inferior que se satura com um volume fixo de plasma através de uma ação capilar, permitindo o transporte econômico e seguro das amostras para laboratórios centrais, onde biomarcadores podem ser quantificados para avaliação de doenças ou (dis)funções fisiológicas (KIM; WOENKER; ADAMEC, 2013). A extração do plasma é iniciada pela aplicação de uma gota de sangue de volume entre 25-75 µL diretamente na “área de teste” sobre a camada superior da placa de extração do cartão *Noviplex*TM (Figura 8 e Figura 9). A amostra é direcionada para uma camada de dispersão através de um orifício entre o local de aplicação e a sobreposição. Em média de 1 minuto depois, um ponto de controle do lado do local de aplicação muda de branco para vermelho, indicando o espalhamento lateral e confirmando que o volume aplicado é suficiente. O espalhamento lateral é confirmado pela aparência visual das células vermelhas em uma pequena janela de observação lateral e localizada aproximadamente 2 mm distante do ponto de aplicação.

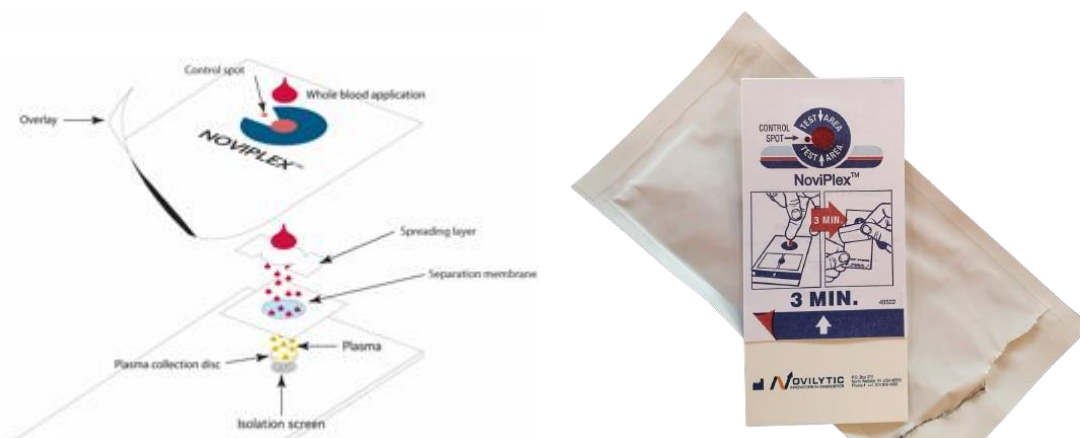


Figura 8 - Cartões *Noviplex*TM para coleta de sangue.

Fonte: Tânia Machado Silva (2021), Shimadzu Europa GmbH (2024).



Figura 9 - Coleta de amostras de material biológico (sangue), realizada em agosto de 2021.

Fonte: Tânia Machado Silva (2021)

O fracionamento ocorre abaixo da camada de dispersão usando uma propriedade de membrana porosa que têm as funções de remover as células do plasma por filtração e regular o fluxo do plasma para o disco de coleta. Com uma velocidade linear média de $1 \mu\text{m s}^{-1}$, o tempo necessário para o fracionamento da amostra é de aproximadamente 3 minutos.

Com as amostras de plasma obtidas, o grupo experimental exposto ao mercúrio ($n=28$), referentes às comunidades Fortaleza do Abunã, Abunã e Nova Mutum Paraná, que vivem em áreas vulneráveis pelos garimpos e estão localizadas às margens dos rios onde a principal via de incorporação do mercúrio é decorrente da alimentação, foram reclassificados de acordo com a frequência de exposição, avaliada por meio do questionário de avaliação qualitativa da dieta

(Anexo II). A partir disso, foram realizadas as análises metaloproteômicas e de determinação de mercúrio total. A camada superior da placa de extração de plasma foi destacada para expor o disco de recolhimento que está aderido a uma placa base e contém 2,7 μL da fração de plasma seco, o que corresponde a aproximadamente 200 μg de proteína. A amostra no disco de recolhimento foi seca à temperatura ambiente durante cerca de 15 minutos e armazenada à temperatura ambiente para análise posterior. Desta forma, os cartões *Noviplex*TM foram devidamente armazenados à temperatura ambiente, transportados e transferidos para o Instituto de Biociências de Botucatu - Departamento de Química e Bioquímica/UNESP.

4.3 Análises Laboratoriais

Os voluntários (n=28), compostos por homens e mulheres de diversas faixas etárias, foram divididos nos seguintes grupos: Grupo 1 ou grupo controle: se alimentam de pescado até três vezes por mês; Grupo 2: consomem pescado três vezes por semana; Grupo 3: até seis vezes por semana; e Grupo 4: diariamente. A formação dos grupos se baseou nas informações coletadas por meio do questionário de avaliação qualitativa da dieta, sendo confirmadas pelos dados das determinações de mercúrio total realizadas por *GFAAS*.

4.3.1 Determinação de mercúrio total nas amostras de sangue, plasma e *pellets* proteicos por Espectrometria de Absorção Atômica por Forno de Grafite - *GFAAS*

A determinação de mercúrio total nas amostras de sangue, plasma e *pellets* proteicos foi realizada pela técnica de espectrometria de absorção atômica - *GFAAS* - utilizando-se dos procedimentos validados por Bataglioli et al. (2024) e Almeida et al. (2024), descritos resumidamente a seguir. Primeiramente, se realizou a mineralização ácida das amostras em mistura de ácido sulfúrico 18 mol L^{-1} suprapuro e peróxido de hidrogênio 30% (m/m) – 4:1 (v/v). Nesta etapa, o procedimento consiste em deixar a mistura em contato com as amostras por um período de 2 horas em banho assistido por ultrassom sob aquecimento brando a 40° C até a completa mineralização, quando o extrato ácido se encontra translúcido. Realizado, os extratos ácidos foram resfriados e avolumados para 5 mL (BITARELLO et al., 2020).

Nas determinações foi utilizado espectrômetro de absorção atômica *Shimadzu* modelo AA-6800, equipado com corretor de absorção de fundo com lâmpada de deutério, tubo de grafite pirolítico com plataforma integrada e amostrador automático ASC-6100. Utilizou-se lâmpada de cátodo oco de mercúrio *Shimadzu*, operada com corrente de 12 mA. O comprimento de onda

utilizado foi de 253,7 nm e resolução espectral de 0,5 nm. O argônio foi empregado como gás inerte, mantendo-se um fluxo constante de 1 L min⁻¹ durante todo o programa de aquecimento; exceto na etapa de atomização, na qual o fluxo de gás foi interrompido. Os sinais de absorbância foram medidos na área do pico de absorção. Os tubos de grafite pirolítico com plataforma integrada, usados nas determinações de mercúrio, tiveram suas paredes internas recobertas com tungstênio a fim de aumentar sua vida útil. Para isso, injetaram-se alíquotas de 25 µL de solução contendo 1000 mg L⁻¹ do modificador tungstato de sódio dentro do atomizador, o qual em seguida foi submetido ao programa descrito por Moraes et al. (2013). Com aquecimento até 500 °C, íons tungstênio são depositados sobre a plataforma do tubo de grafite, formando uma camada de carvão de tungstênio que atua como modificador permanente.

A curva analítica foi preparada utilizando-se solução padrão estoque de Hg *Titrisol*® Merck. A diluição foi feita de modo a se obter concentrações dos padrões na faixa de 0,25 a 2,00 µg L⁻¹ de Hg_T . Os pares de dados absorbância - concentração foram utilizados no cálculo do coeficiente linear e angular, obtendo-se a seguinte equação de reta: $y = 0.00055 + 0,04912x$, com coeficiente de correlação linear (r) = 0,9993. Como y refere-se aos valores de absorbância e x de concentração de Hg_T , isolando essas variáveis se obtém: Concentração Hg_T (µg L⁻¹) = Absorbância - 0,00055/0,04912. Além disso, adicionou-se nitrato de zircônio às soluções padrão para que atuasse como modificador químico e de modo que a concentração final ficasse em 20 mg L⁻¹. Em seguida, injetaram-se 20 µL das soluções padrão no tubo de grafite recoberto com carvão de tungstênio utilizando-se a micropipeta do autoamostrador. As medidas de absorbância foram realizadas em triplicata e o programa de aquecimento do tubo de grafite otimizado para determinação de mercúrio encontra-se descrito na tabela abaixo (Tabela 2).

Tabela 2 - Programa de aquecimento do tubo de grafite para a determinação de mercúrio nos extratos ácidos

Etapas	Temperatura (°C)	Estágios		Fluxo de Argônio (L min ⁻¹)
		Rampa (s)	Aquecimento (s)	
Secagem	90	5	0	1
Secagem	120	5	5	1
Pirólise	250	5	5	1
Pirólise	760	5	10	1
Atomização	1600	5	5	0
Limpeza	1800	5	0	1

A determinação de mercúrio total nos extratos ácidos das amostras, obtidos na mineralização, foi realizada injetando-se alíquotas de 20 µL, preparadas a partir da mistura de 10 µL dos extratos ácidos com 4 µL de solução de nitrato de zircônio (100 mg L⁻¹) e 6 µL de água ultrapura, utilizando a micropipeta do amostrador automático do espectrômetro. Em seguida, as alíquotas de 20 µL foram injetadas para dentro do tubo de grafite recoberto com carvão de

tungstênio utilizando-se também a micropipeta do amostrador do espectrômetro. As medidas foram realizadas em triplicata e utilizando o programa de aquecimento do tubo de grafite mostrado na Tabela 2. A robustez da metodologia utilizada nas determinações foi avaliada por meio de análise de extratos ácidos obtidos no processo de mineralização dos materiais de referência certificados 955C – *Toxic Metals in Caprine Blood – Level 2* e *Fish Protein DORM-4* do *National Research Council of Canada (NRC)*.

Os resultados das determinações de mercúrio foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e analisados com o teste *T de Student* e o teste *F* no *software* estatístico SAS, versão 8 para verificar diferenças significativas. O nível de significância usado foi de 5% ($p < 0,05$) (QUEIROZ et al, 2018; BITARELLO et al., 2020).

4.3.2 Extração e precipitação da fração proteica

Os discos dos cartões *Noviplex™* contendo 2,7 μL de plasma, ou seja, aproximadamente 200 μg de proteína, foram destacados e as proteínas extraídas a partir da adição de 40 μL de tampão contendo 150 mmol L^{-1} de NaCl, 50 mmol L^{-1} de Tris-HCl em pH 8.0 e 1% (m/v) de NP-40. A concentração de proteína total das amostras foi determinada pelo método de Bradford utilizando albumina de soro bovino como padrão (BRADFORD, 1976). As curvas de calibração analítica foram construídas com concentrações de 50 a 500 mg L^{-1} a partir de uma solução padrão de albumina (1000 mg L^{-1}).

Com base nas determinações de proteína total no sangue e no plasma foram preparados três *pools* de *pellets* proteicos das amostras de plasma dos voluntários por grupo. Para isso, utilizou-se dois cartões dos sete voluntários de cada grupo. Em seguida, foi feita a precipitação de proteína nos extratos de cada um dos *pools*, para evitar possíveis interferências devido aos concomitantes das amostras. Para isso, utilizou-se o procedimento de precipitação com acetona 80% (v/v) como descrito por Braga et al. (2015) em estudos anteriores. Todo processo de precipitação foi conduzido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e, após a obtenção dos precipitados, os *pellets* proteicos foram separados dos sobrenadantes por centrifugação a 4°C e, em seguida, armazenados em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o início dos experimentos de determinação de mercúrio total, proteína total e análises por *Shotgun-LC-MS/MS*.

4.3.3 Análise de expressão por *Shotgun-LC-MS/MS*

Três porções de aproximadamente 20 mg de *pellets* proteicos de cada grupo (Grupo 1 - controle e Grupos 2 a 4 - experimentais) foram solubilizados com 500 μL de bicarbonato de amônio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$. Aliquotas de 50 μL de solução dos *pellets* proteicos contendo 50 μg de proteína total (concentração de cada solução foi ajustada para $1 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ por diluição com de bicarbonato de amônio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$) foram transferidas para microtubos *Lobind* (*Eppendorf*) e nestes adicionados 10 μL de bicarbonato de amônio a $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e 25 μL de *RapiGest*TM 0,2% (v/v), (*Waters, Manchester, UK*) e incubados a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram submetidas ao processo de redução e alquilação utilizando 2,5 μL 100 mmol L^{-1} DTT (*BIORAD*, cat# 161-0611) e 2,5 μL 300 mmol L^{-1} IAA (*GE*, cat# RPN 6302 V), respectivamente, na ausência de luz à temperatura ambiente por 30 minutos. Após a etapa de redução e alquilação, a digestão das amostras foi realizada a 37°C no período noturno adicionando-se 100 ng de tripsina (*PRO- MEGA*, cat #V5280). Após o processo de digestão, adicionaram-se alíquotas de 10 μL de TFA (*Sigma-Aldrich*, LC-MS 98%-100%) a 5% (v/v) e as amostras foram incubadas por 90 minutos a 37°C . Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas à 14000 rpm a 6°C por 30 minutos. Os sobrenadante foram recolhidos em frascos *Lobind* e submetidos à dessalinização em colunas C 18 Spin (*PIERCE*, cat #89870). Após o processo de dessalinização, as amostras foram ressuspensas em 200 μL de acetonitrila (*UHPLC, mass spectrometry Sigma-Aldrich*, cat. #900667) a 3% (v/v) e posteriormente submetidas à análise por LC-MS/MS.

A identificação dos peptídeos foi feita em um sistema *nanoACQUITY UPLC-Xevo QToF MS* (*Waters, Manchester, UK*). O *nanoACQUITY UPLC*[®] é equipado com coluna analítica de fase reversa *nanoACQUITY HSS T3* ($75 \mu\text{m} \times 150 \text{ mm}$, tamanho de partícula de $1,8 \mu\text{m}$). A coluna foi equilibrada com 93% da fase móvel A (ácido fórmico 0,1% em água) e 7% da fase móvel B (ácido fórmico 0,1 % em ACN 100%). Em seguida, os peptídeos foram separados com um gradiente linear da fase móvel de 7-85% (ácido fórmico 0,1 % em ACN 100%) por 70 minutos num fluxo de $0,35 \mu\text{L min}^{-1}$. A temperatura da coluna foi mantida em 35°C . O espectrômetro de massas *Xevo*[®] G2 Q-TOF foi operado em modo iônico positivo de *nanoeletrospray* e os dados foram coletados usando o método *MSE* em elevada energia (19-45 V), o que permite a aquisição simultânea dos dados dos íons precursores e seus fragmentos em uma única injeção. As condições de fonte usadas incluem: voltagem do capilar de 2,5 kV, cone de amostra de 30 V, cone de extração de 5,0 V e temperatura da fonte de 80°C . Os dados foram adquiridos durante 70 min, com varredura na faixa de 50-2000 Da. O *lockspray*, usado para garantir acurácia e reprodutibilidade, foi operado com uma solução de [Glu1]fibrinopeptídeo ($1 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$), com fluxo de 1 mL min^{-1} ,

como um íon de referência no modo positivo a m/z 785.8427. Os arquivos de dados *raw* da espectrometria de massa foram enviados para *Progenesis QI for Proteomics v.4.0 (Nonlinear Dynamics, Waters, Newcastle upon Tyne, UK)* para realizar a análise quantitativa. Para o alinhamento, uma amostra foi automaticamente selecionada como referência para o alinhamento. Os demais resultados foram alinhados com a referência (score de alinhamento maior que 80%), e a seleção do pico (*peak picking*) foi realizada usando o método de sensibilidade automática. As intensidades de pico foram então normalizadas calculando-se razões de abundância em relação a uma referência. A lista de picos foi pesquisada no banco de dados *UniProtKB/Swiss-Prot Homo sapiens* usando o *Mascot v.2.6 (Matrix Science, London, UK)*. Tripsina foi a enzima especificada e uma clivagem perdida foi permitida. A carbamidometilação da cisteína foi definida como uma modificação fixa e a oxidação da metionina como uma modificação variável. Uma tolerância de massa precursora de 10 ppm e uma de íon de fragmento de 0,01 Da foram aplicadas. Um *false discovery rate (FDR)* de 1% foi considerado. A quantificação relativa foi realizada utilizando peptídeos não conflitantes para quantificar as proteínas. Para uma proteína ser considerada diferencialmente expressa, ela deveria ser identificada e quantificada usando pelo menos dois peptídeos únicos e apresentar um valor $p < 0,05$ (proteínas reguladas negativamente) e um valor $1 - p > 0,95$ (proteínas reguladas positivamente).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Otimização das condições experimentais para determinação de mercúrio total

Os parâmetros relacionados à estabilidade térmica do Hg foram otimizados utilizando os procedimentos descritos por Almeida et al. (2024). No caso, as temperaturas de pirólise e de atomização foram otimizadas a partir dos extratos ácidos obtidos no processo de mineralização dos discos de amostragem dos cartões *Noviplex™*. Os sinais de absorbância obtidos para padrão 1,50 $\mu\text{g L}^{-1}$ foram comparados com os valores medidos para os extratos ácidos dos cartões *Noviplex*. Como resultado, observou-se a estabilização térmica do Hg a 700 °C para a temperatura de pirólise e a 1700 °C para a temperatura de atomização. A absorbância obtida para a triplicata dos padrões de Hg apresentaram excelente repetibilidade, apresentando desvios padrão relativo inferior a 2%, o que corrobora a eficiência da combinação do nitrato de zircônio como modificador químico em solução e do carbeto de tungstênio como modificador químico permanente (BITARELLO et al., 2020). Vale ressaltar também que os íons de permanganato, presentes no processo de mineralização dos discos de amostragem dos cartões *Noviplex™*, podem ter sido

reduzidos a dióxido de manganês durante a etapa de aquecimento do tubo de grafite. O dióxido de manganês depositado na parede interna do tubo de grafite atou em conjunto com o carbeto de tungstênio como modificador permanente, contribuindo também na estabilização térmica do mercúrio na temperatura de atomização (ALMEIDA et al., 2024).

Com base no coeficiente angular da equação de reta da curva analítica (inclinação) e no desvios padrão, os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para o mercúrio foram de 0,014 e 0,047 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente ($\text{LOD} = 3\sigma/\text{inclinação}$; $\text{LOQ} = 10\sigma/\text{inclinação}$) (CURRIE, 1999). Com as condições experimentais otimizadas, o tubo de grafite teve uma vida útil de 467 queimas, indicando que o método de mineralização foi eficaz na eliminação do efeito de matriz, essencial para reduzir a absorção de fundo (*background*).

5.2 Determinação de mercúrio total nas amostras de sangue e plasma

A determinação de mercúrio total nas amostras de sangue, obtidos a partir do disco de coleta das cartões *Noviplex*TM e amostras de plasma, obtidas a partir dos eluatos dos discos de coleta dos cartões *Noviplex*TM foram realizadas por *GFAAS*, conforme procedimento descrito no item 3.4.1. Os gráficos das figuras 10 e 11 mostram as concentrações médias de mercúrio total na amostras de sangue e plasma fornecidas por grupos de voluntários. Os grupos denominados grupo 1, grupo 2, grupo 3 e grupo 4 foram montados com base nas informações disponibilizadas pelos voluntários por meio do questionário de frequência alimentar, aplicado durante a entrevista realizada antes da realização do procedimento de coleta, conforme descrito no item 3.4. Destaca-se que não foi possível montar um grupo de voluntários que não utilizavam peixe como fonte proteica na alimentação. Assim, para efeito de comparação, utilizou-se o grupo 1 (grupo que se alimentava de peixe apenas três vezes por mês) como controle.

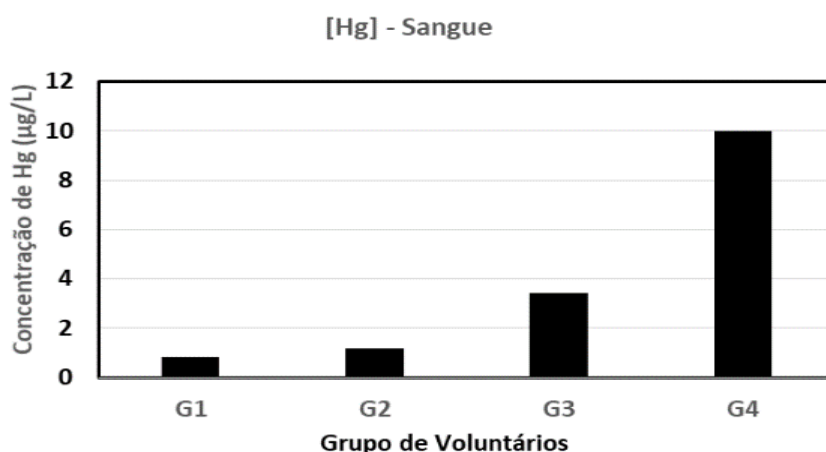


Figura 10 - Concentrações médias de mercúrio total determinadas por *GFAAS* nas amostras de sangue nos grupos de voluntários da população ribeirinha do rio Madeira, região de Jirau - RO.

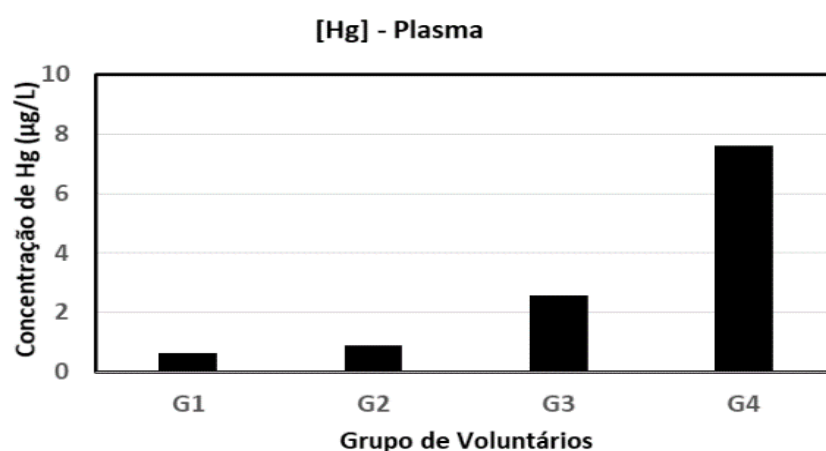


Figura 11 - Concentrações médias de mercúrio total determinadas por *GFAAS* nas amostras de plasma nos grupos de voluntários da população ribeirinha do rio Madeira, região de Jirau - RO.

As determinações de mercúrio total nas amostras de sangue dos voluntários (Figura 10) apresentaram concentrações médias de $0,84 \pm 0,07 \mu\text{g L}^{-1}$, $1,18 \pm 0,05 \mu\text{g L}^{-1}$, $3,43 \pm 0,20 \mu\text{g L}^{-1}$ e $10,00 \pm 0,41 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente para o grupo 1, grupo 2, grupo 3 e grupo 4. Pode-se observar um aumento gradativo da concentração de mercúrio total em função da frequência de ingestão de peixe, no caso, um aumento de 40% do grupo 1 para o grupo 2, de 408% do grupo 1 para o grupo 3 e de 1190% do grupo 1 para o grupo 4. O grau de correlação das concentrações de mercúrio total em relação ao consumo de peixe pelos voluntários dos grupos 1 - 4 foi avaliado por meio do coeficiente de correlação de Person (SCOTT et al, 2013), obtendo-se valor de ρ de Pearson igual 0,92, o que indica uma correlação positiva no processo de bioacumulação de mercúrio em função do consumo de peixe na dieta dos grupos de voluntários da população tradicional do rio Madeira que participaram do presente estudo. As concentrações de mercúrio total determinadas nos eluatos plasmáticos (Figura 11) apresentaram comportamento semelhante aos resultados obtidos nas amostras de sangue, ou seja, uma correlação positiva com a frequência

de consumo de pescados: Grupo 1 < Grupo 2 < Grupo 3 < Grupo 4 (ρ de Pearson = 0,90; $p < 0,01$). As concentrações médias nas determinações de mercúrio total foram de $0,64 \pm 0,05 \mu\text{g L}^{-1}$ para o grupo 1, de $0,89 \pm 0,04 \mu\text{g L}^{-1}$ para o grupo 2, de $2,58 \pm 0,14 \mu\text{g L}^{-1}$ para o grupo 3 e, por fim, de $7,60 \pm 0,27 \mu\text{g L}^{-1}$ para o grupo 4. No caso, observa-se que as concentrações nas amostras de plasma se apresentaram cerca de 25% menores que nas amostras de sangue, podendo-se inferir que a porcentagem do mercúrio total está ligado à fração dos eritrócitos.

Destaca-se que intervenções em saúde pública são fundamentadas em concentrações de mercúrio em sangue variando entre $5,8 \mu\text{g L}^{-1}$ e $9,20 \mu\text{g L}^{-1}$. Portanto, as maiores concentrações de mercúrio total, observadas no grupo 4 de voluntários com uma média de $10,00 \pm 0,41 \mu\text{g L}^{-1}$, ultrapassam o limite preconizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) de $9,20 \mu\text{g L}^{-1}$ no sangue (WHO, 2014) e, de $4-5 \mu\text{g L}^{-1}$ pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) (LOPES-ARAÚJO et al., 2023).

Todos os resultados das determinações de mercúrio total mencionados anteriormente foram validados por meio de análise do material de referência certificado 955C - *Toxic Metals in Caprine Blood - Level 2* do *National Research Council of Canada (NRC)*. Os resultados da análise de validação apresentaram valores médios inferiores a 2% em comparação com o valor certificado. A saber: valor determinado: $5,33 \pm 0,09 \mu\text{g L}^{-1}$ de mercúrio total; valor certificado: $5,42 \pm 0,66 \mu\text{g L}^{-1}$ de mercúrio total. Logo, os resultados obtidos em relação ao material certificado atesta a robustez do método de análise utilizado nas determinações de mercúrio total nas amostras de sangue e plasma.

5.3 Mercúrio total nos extratos dos pellets proteicos e proteína total nos extratos dos pellets proteicos

Os resultados obtidos nas determinações de mercúrio total nos extratos dos *pellets* proteicos (Figura 12) também apresentaram o mesmo comportamento observado para as determinações de mercúrio total nas amostras de sangue e eluatos plasmáticos. Isto é, uma correlação positiva com a frequência de consumo de pescados: Grupo 1 < Grupo 2 < Grupo 3 < Grupo 4.

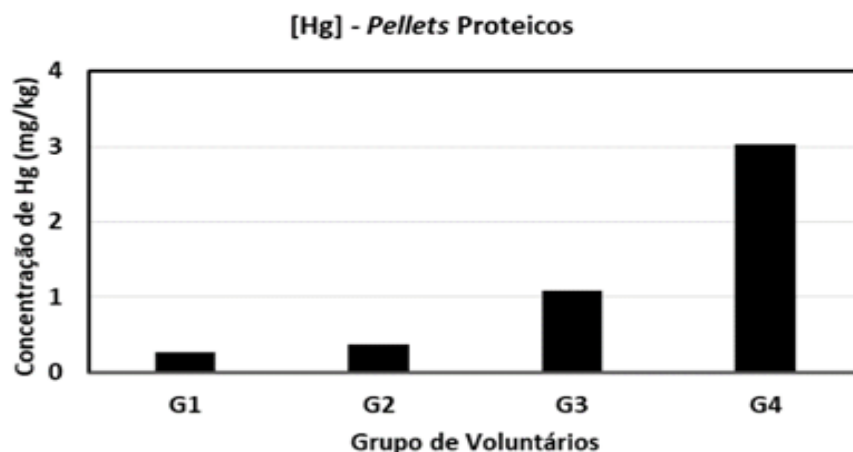


Figura 12 - Concentrações médias de mercúrio total nas amostras de *pellets* proteicos dos grupos de voluntários da população ribeirinha do rio Madeira, região de Jirau - RO.

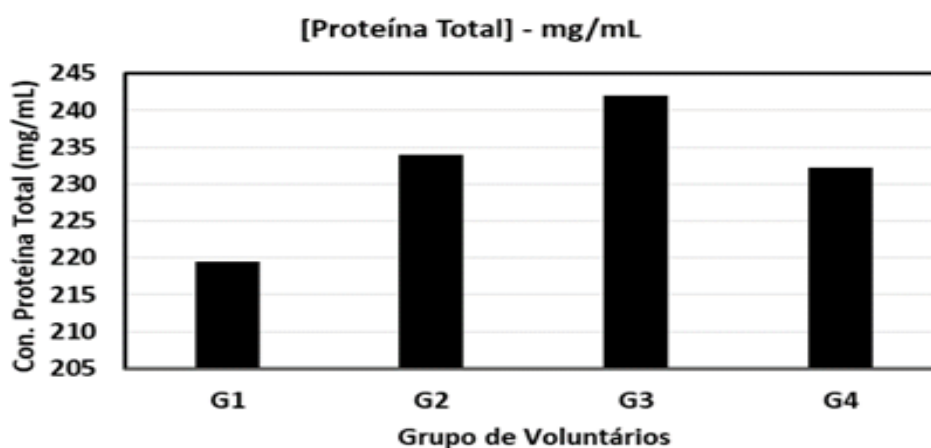


Figura 13 - Concentrações médias de proteína total nos extratos de *pellets* proteicos dos grupos de voluntários da população ribeirinha do rio Madeira, região de Jirau - RO.

As concentrações médias nas determinações de mercúrio total nos *pellets* proteicos (Figura 12) foram de $0,27 \pm 0,0085$ mg kg⁻¹ para o grupo 1, seguido de $0,36 \pm 0,036$ mg kg⁻¹ para o grupo 2, de $1,10 \pm 0,037$ mg kg⁻¹ para o grupo 3 e de $3,03 \pm 0,098$ mg kg⁻¹ para o grupo 4. Esses resultados também confirmam que a concentração de mercúrio total nos *pellets* proteicos indicam correlação positiva do processo de bioacumulação do mercúrio em relação à frequência de ingestão de pescados na alimentação dos voluntários da população ribeirinha do rio Madeira (ρ de Pearson = 0,91, $p < 0,01$). Os resultados obtidos foram validados por meio de análises de extratos ácidos obtidos no processo de mineralização dos materiais de referência certificado *Fish Protein DORM-4* do *National Research Council of Canada (NRC)*. Os resultados dessas determinações possuem diferença inferior a 2% em relação ao valor certificado, no caso: valor determinado: $404 \pm 7,40$ µg kg⁻¹, valor certificado: $410 \pm 55,0$ µg kg⁻¹. Dessa forma, os resultados das análises dos materiais certificados validam a robustez da metodologia utilizada na determinação de mercúrio total nas amostras de *pellets* proteicos.

Na Figura 13 são apresentados os resultados das concentrações médias de proteína total nas réplicas de *pools* dos extratos proteicos. Cada *pool* foi preparado pela mistura de quatro alíquotas de 40 μL dos eluatos obtidos no processo de extração do plasma dos discos de amostragem dos cartões *Noviplex*TM referentes a cada um dos grupos de voluntários. Os *pellets* proteicos foram precipitados por adição de acetona gelada nas alíquotas de 160 μL de eluatos, cujo procedimento encontra-se descrito no item 4.3.2, e posteriormente solubilizados em solução 0,50 mol L⁻¹ de hidróxido de sódio. Os valores médios de concentração de proteína total referente às replicatas dos *pools* de cada grupo de voluntários são apresentados na tabela 3.

Tabela 3 - Concentrações médias de proteína total de cada grupo voluntário

Grupo de voluntario	Valores médios de concentração de proteína total (mg mL⁻¹)
G1	219,5±4,15
G2	234,0±6,56
G3	242,0±4,36
G4	232,3±5,03

A determinação da concentração de proteínas total foi utilizada para normalizar a concentração nos extratos proteicos em 50 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$, para posteriormente serem utilizados no processo de clivagem proteolítica, etapa de preparo das amostras das amostras para as análises por *Shotgun* (BRAGA, 2016).

5.4 Proteínas identificadas por Shotgun no plasma humano

5.4.1 Fracionamento do proteoma das amostras de plasma humano e análise de abundância relativa de proteínas por *Shotgun-LC-MS/MS*

Com base nos resultados das determinações de mercúrio total nas amostras de plasma e nos extratos dos pools de pellets proteicos (Figura 11 e 12) foram realizados experimentos de fracionamento e análises de abundância relativa de proteínas por *Shotgun-LC-MS/MS* em amostras de *pools* de plasma dos voluntários dos Grupos 1 - 4. As amostras de plasma foram eluídas dos discos de amostragem dos cartões *Noviplex*TM conforme procedimento descrito no item 4.2.2. Para isso, foram preparados três *pools* de cada grupo que foram submetidos ao processo de clivagem proteolítica e, posteriormente, submetidas às análises por *LC-MS/MS*. As análises de abundância relativa de proteínas (análises de expressão proteica) foram realizadas considerando o Grupo 1 de voluntários (voluntários que apresentaram menor concentração de mercúrio total) como controle. Assim, as expressões proteicas dos Grupos 2 - 4 foram comparadas com a do grupo 1: Grupo 2 x Grupo1, Grupo 3 x Grupo 1 e Grupo 4 x Grupo 1. Os resultados obtidos são mostrados nas Tabelas

4 a 6. No total foram identificadas 133 proteínas e/ou enzimas com “*fold change*” e/ou como proteínas “*Uniques*”, considerando as comparações dos grupos G2-G4 com o grupo G1, e em média 41 proteínas por amostras de plasma. De forma geral, a metodologia de amostragem utilizando cartões *Noviplex*TM mostrou-se promissora quando comparada com análise proteômica direta de amostras de plasma (DA SILVA, 2024).

Tabela 4 - Proteínas identificadas por *Shotgun-LC-MS/MS* no plasma humano. Amostras coletadas com cartão *Noviplex*TM - Grupo 2x1.

<i>Accession</i>	<i>Description</i>	<i>Score PLGS</i>	<i>Dow regulated 2:1_p</i>
P20742	Pregnancy zone protein	46.57	0.03
<i>Accession</i>	<i>Description</i>	<i>Score PLGS</i>	<i>Up regulated 2:1_p</i>
P69892	Hemoglobin subunit gamma-2	1677.79	0.95
P02100	Hemoglobin subunit epsilon	1668.97	0.99
P02768	Albumin	67867.38	1
P02763	Alpha-1-acid glycoprotein 1	1633.71	1
P19652	Alpha-1-acid glycoprotein 2	829.73	1
P01009	Alpha-1-antitrypsin	5626.88	1
P01024	Complement C3	678.58	1
P00738	Haptoglobin	4725.97	1
P00739	Haptoglobin-related protein	994.9	1
P69905	Hemoglobin subunit alpha	27556.23	1
P68871	Hemoglobin subunit beta	39735.69	1
P69891	Hemoglobin subunit gamma-1	1668.97	1
P02790	Hemopexin	1113.03	1
P01876	Immunoglobulin heavy constant alpha 1	5133.31	1
P01877	Immunoglobulin heavy constant alpha 2	3923.13	1
P01859	Immunoglobulin heavy constant gamma 2	10460.06	1
P0CG04	Immunoglobulin lambda constant 1	26769.81	1
P0DOY2	Immunoglobulin lambda constant 2	27071.67	1
P0DOY3	Immunoglobulin lambda constant 3	27071.67	1
B9A064	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5	26771.72	1
P02787	Serotransferrin	4510.07	1
P02766	Transthyretin	953.87	1

Unique = proteínas que se expressaram em único grupo; **Dow** = Proteínas com valor de ‘p’ menor que 0,05; **Up** = Proteínas com valor de ‘p’ maior que 0,95.

Tabela 5 - Proteínas identificadas por *Shotgun-LC-MS/MS* no plasma humano. Amostras coletadas com cartão *Noviplex™* - Grupo 3x1.

Accession	Description	Score PLGS	Unique Proteins
P01619	Immunoglobulin kappa variable 3-20	458.17	G ₃
Accession	Description	Score PLGS	Up regulated 3:1_p
P02768	Albumin	67867.38	1
P02763	Alpha-1-acid glycoprotein 1	1633.71	1
P19652	Alpha-1-acid glycoprotein 2	829.73	1
P01009	Alpha-1-antichymotrypsin	5626.88	1
P02647	Apolipoprotein A-I	9740.11	1
P01024	Complement C3	678.58	1
P00738	Haptoglobin	4725.97	1
P00739	Haptoglobin-related protein	994.9	1
P69905	Hemoglobin subunit alpha	27556.23	1
P68871	Hemoglobin subunit beta	39735.69	1
P02042	Hemoglobin subunit delta	3791.38	1
P02100	Hemoglobin subunit epsilon	1668.97	1
P69891	Hemoglobin subunit gamma-1	1668.97	1
P69892	Hemoglobin subunit gamma-2	1677.79	1
P02790	Hemopexin	1113.03	1
P01876	Immunoglobulin heavy constant alpha 1	5133.31	1
P01877	Immunoglobulin heavy constant alpha 2	3923.13	1
P01857	Immunoglobulin heavy constant gamma 1	22854.95	1
P01859	Immunoglobulin heavy constant gamma 2	10460.06	1
P01860	Immunoglobulin heavy constant gamma 3	6136.29	1
P01861	Immunoglobulin heavy constant gamma 4	7340.77	1
P01834	Immunoglobulin kappa constant	13754.79	1
P0CG04	Immunoglobulin lambda constant 1	26769.81	1
P0DOY2	Immunoglobulin lambda constant 2	27071.67	1
P0DOY3	Immunoglobulin lambda constant 3	27071.67	1
P0CF74	Immunoglobulin lambda constant 6	15362.08	1
A0M8Q6	Immunoglobulin lambda constant 7	12860.5	1
B9A064	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5	26771.72	1
P02787	Serotransferrin	4510.07	1
P02766	Transthyretin	953.87	1

Unique = proteínas que se expressaram em único grupo; *Up* = Proteínas com valor de 'p' maior que 0,95.

Tabela 6 - Proteínas identificadas por *Shotgun-LC-MS/MS* no plasma humano. Amostras coletadas com cartão *Noviplex™* - Grupo 4 x 1.

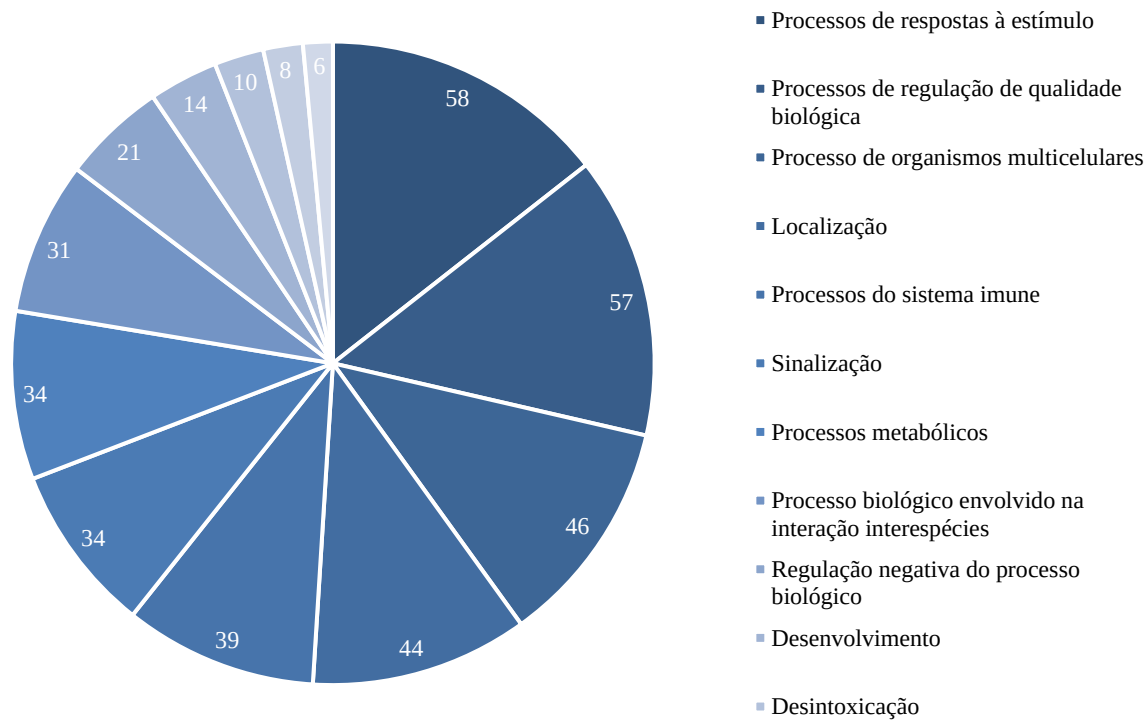
Accession	Description	Score PLGS	Unique Proteins
P02656	Apolipoprotein C-III	342.61	G ₄
P01619	Immunoglobulin kappa variable 3-20	439.43	G ₄
P00747	Plasminogen	75.78	G ₄
P02760	Protein AMBP	251.95	G ₄
Q15654	Thyroid receptor-interacting protein 6	110.49	G ₄
Accession	Description	Score PLGS	Dow regulated 4:1_p
P01023	Alpha-2-macroglobulin	968.86	0
P20742	Pregnancy zone protein	46.57	0
Accession	Description	Score PLGS	Up regulated 4:1_p
P02768	Albumin	67867.38	1
P02763	Alpha-1-acid glycoprotein 1	1633.71	1
P19652	Alpha-1-acid glycoprotein 2	829.73	1
P01011	Alpha-1-antichymotrypsin	214.4	1
P01009	Alpha-1-antitrypsin	5626.88	1
P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein	47.81	1
P02647	Apolipoprotein A-I	9740.11	1
P00450	Ceruloplasmin	59.28	1
P01024	Complement C3	678.58	1
P00738	Haptoglobin	4725.97	1
P00739	Haptoglobin-related protein	994.9	1
P69905	Hemoglobin subunit alpha	27556.23	1
P68871	Hemoglobin subunit beta	39735.69	1
P02042	Hemoglobin subunit delta	3791.38	1
P02100	Hemoglobin subunit epsilon	1668.97	1
P69891	Hemoglobin subunit gamma-1	1668.97	1
P69892	Hemoglobin subunit gamma-2	1677.79	1
P02790	Hemopexin	1113.03	1
P01876	Immunoglobulin heavy constant alpha 1	5133.31	1
P01877	Immunoglobulin heavy constant alpha 2	3923.13	1
P01857	Immunoglobulin heavy constant gamma 1	22854.95	1
P01859	Immunoglobulin heavy constant gamma 2	10460.06	1
P01860	Immunoglobulin heavy constant gamma 3	6136.29	1
P01861	Immunoglobulin heavy constant gamma 4	7340.77	1
P01871	Immunoglobulin heavy constant mu	258.14	1
P01834	Immunoglobulin kappa constant	13754.79	1
P0CG04	Immunoglobulin lambda constant 1	26769.81	1
P0DOY2	Immunoglobulin lambda constant 2	27071.67	1
P0DOY3	Immunoglobulin lambda constant 3	27071.67	1
P0CF74	Immunoglobulin lambda constant 6	15362.08	1
A0M8Q6	Immunoglobulin lambda constant 7	12860.5	1
B9A064	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5	26771.72	1
P02787	Serotransferrin	4510.07	1
P02766	Transthyretin	953.87	1

Unique = proteínas que se expressaram em único grupo; **Dow** = Proteínas com valor de 'p' menor que 0,05; **Up** = Proteínas com valor de 'p' maior que 0,95.

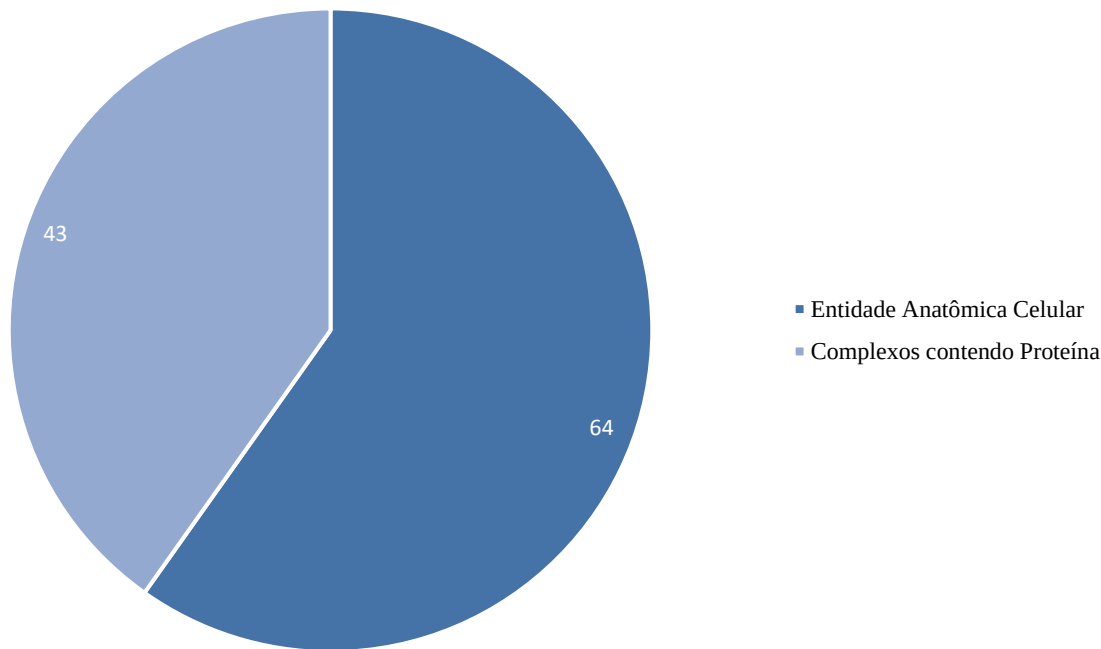
De modo a nortear a discussão das proteínas/enzimas que apresentaram “*fold change*” positivo/negativo (*Up regulated*; *Down regulated*), como também das proteínas que se expressaram em apenas um grupo (*Uniques*), optou-se por descartar as proteínas/enzimas que apresentaram diferença de expressão somente nas comparações dos grupos G2xG1 e G3xG1. Assim, as Tabelas 4 e 5 apresentam somente proteínas/enzimas que estão também presentes na Tabela 6 (G4xG1). Essa estratégia foi adotada considerando que o grupo foi composto por voluntários que se alimentam de peixe diariamente, o que aumenta a probabilidade de espécies mercuriais provocarem possíveis alterações no proteoma plasmático. Os dados proteômicos brutos são apresentados nas Tabelas 5MS - 12MS (Material Suplementar).

Com base nas sequências FASTA das proteínas/enzimas foi feita uma análise funcional utilizando o *software* Blast2Go. A análise funcional permitiu categorizar as proteínas/enzimas em relação aos processos biológicos, componentes celulares e funções biológicas nas quais estas estão envolvidas. O conjunto de figuras representado a seguir (Figura 14) mostra os resultados obtidos na análise funcional das proteínas que apresentaram “*fold change*” positivo/negativo (*Up regulated*; *Dow regulated*) e proteínas que se expressaram em apenas um grupo (*Uniques*).

Processos Biológicos



Componente Celular



Função Molecular

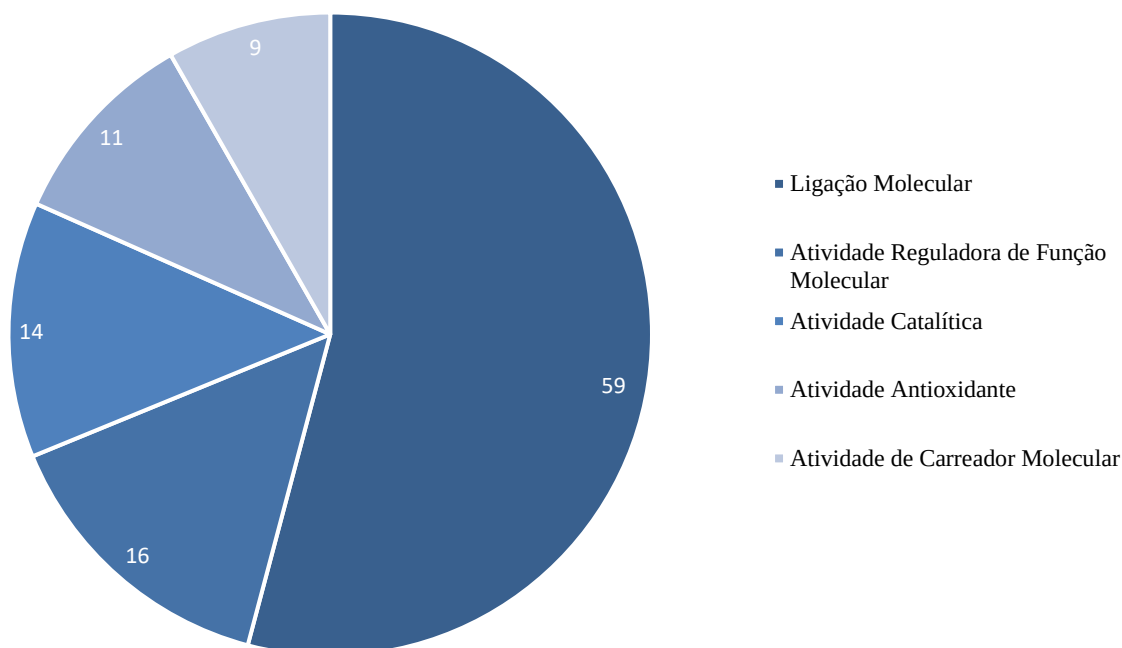


Figura 14 - Conjunto de gráficos da análise funcional das proteínas *upregulated* ($p > 0,95$), *down regulated* ($p < 0,05$) e proteínas que se expressaram somente em um grupo experimental (*Uniques*) das amostras de plasma dos voluntário do rio Madeira-Rondônia, utilizando o *software* Blast2GO.

Neste sentido, analisando os resultados obtidos nas análises por *Shotgun-LC-MS/MS* (Tabelas 4 - 6) e da análise funcional (Figura 14) observa-se que as proteínas que apresentaram “*fold change*” positivo (*Up regulated*), considerando as comparações dos grupos 2 e 3 com o grupo 1, participam em sua maior parte de atividades do sistema imunológico, sendo representadas pelas isoformas das *Immunoglobulins* (IGs). As isoformas de subunidades da *Hemoglobin* (HB), também apresentaram “*fold change*” positivo. Nesse caso, as isoformas da HB são liberadas no plasma após a hemólise dos eritrócitos formando um complexo com a proteína plasmática *Haptoglobin* (HP), proteína que também apresentou “*fold change*” positivo em todas as análises, formado o complexo HP-HB (SARPONG-KUMANKOMAH; GAILER, 2019). As demais proteínas/enzimas identificadas com “*fold change*” positivos estão relacionadas a processos de regulação, mediação e inibição biológica; ligação a metais, e complexo proteína-proteína; e, transporte molecular como as isoformas 1 e 2 da *Alpha-1-acid glycoprotein*, *Alpha-1-antitrypsin*, *Alpha-2-HS-glycoprotein*, *Apolipoprotein A-I*, *Complement C3*, *Hemopexin*, *Serotransferrin* e *Transthyretin* (UNIPROT, 2024). No entanto, entre as proteínas que apresentaram “*fold change*”, a *Ceruloplasmin* (CP), chama a atenção por ser uma glicoproteína de ligação a íons cobre (ácido

intermediário), tendo “*fold change*” positivo somente na análise comparativa do G4 x G1. Semelhante à glutathiona peroxidase, a CP apresenta atividade antioxidante, atuando na remoção de peróxido de hidrogênio e hidroperóxido lipídico na presença de tióis, por apresentar sequência FASTA com cisteína e metionina terminais, aminoácidos que apresentam grupos sulfidrila (base mole) (PEARSON, 1963; PARK et al., 1999; STOJ; KOSMAN, 2003; UNIPROT, 2024). A *Albumin* (ALB), proteína que participa ativamente de atividades de regulação e transporte no sangue e no plasma, se destaca principalmente no transporte de íons zinco no plasma (base intermediária), e assim como a CP, apresenta em sua sequência FASTA com cisteína e metionina terminais, aminoácidos com grupos sulfidrila (base mole), o que explica a afinidade por íons zinco (PEARSON, 1963; LU et al., 2008; UNIPROT, 2024). Assim como a CP, a *Serotransferrin* (TF) também se sobressai na presente análise, principalmente por ser uma proteína responsável pelo transporte de ferro de locais de absorção e degradação do heme. Além disso, ela está diretamente relacionada à quelação de íons metálicos, o que auxilia na redução da toxicidade desses metais no organismo, prevenindo danos celulares e aos órgãos.

Em relação às proteínas/enzimas com “*fold change*” negativo, a análise por *Shotgun-LC-MS/MS* (Tabelas 4-6) e a análise funcional (Figura 14) mostram expressões negativas nas análises de comparações dos grupos G2 x G1 e G4 x G1, em relação às comparações entre os grupos G3 x G1. De forma geral, as análises indicaram baixa abundância relativa de proteínas e/ou enzimas *down regulated*.

Considerando as comparações entre G4 e G1, estas revelam-se mais significativas em relação à influência das espécies mercuriais. A proteína *Pregnancy zone protein* (PZP), cuja principal função é inibir proteinases através de clivagem específica, foi observada nas análises comparativas entre G2 e G1, bem como entre G4 e G1. A *Alpha-2-macroglobulin* (A2M), que tem a mesma função da PZP, apresentou *down regulated* somente nas comparações entre G4 x G1 (UNIPROT, 2024). Embora a PZP e a A2M contenham metionina em suas sequências FASTA, um aminoácido com grupos sulfidrila (ácidos moles) que se liga fortemente a espécies mercuriais, é importante considerar que ambas as proteínas desempenham a função principal de clivagem proteolítica de proteinases. Assim, devido à baixa abundância relativa (*down regulated*) é pouco provável que tenha sido causada pelas concentrações de mercúrio encontradas nas amostras de plasma dos voluntários dos grupos G2 e G4 (PEARSON, 1963; UNIPROT, 2024).

Em relação às proteínas/enzimas que se expressaram apenas em um único grupo (*Uniques*), a análise por *Shotgun-LC-MS/MS* (Tabelas 4-6) e a análise funcional (Figura 14) permitem observar as comparações entre os grupos G3 x G1 e G4 x G1. Nas comparações entre G3 e G1, a *Immunoglobulin kappa variable 3-20* (IGKV3-20) que, assim como todas as

Immunoglobulins, atuam na mediação da imunidade humoral através do reconhecimento de antígenos, apresentou expressão no grupo G3 e, uma expressão exclusiva no grupo G4 nas comparações G4 x G1. Nas comparações do G4 x G1, expressaram como proteínas únicas em relação ao grupo G4, além da *Immunoglobulin kappa variable 3-20* (IGKV3-20), as proteínas *Apolipoprotein C-III* (Apo C-III), que é uma proteína que atua na homeostase dos triglicerídeos; o *Plasminogen* (PLG), que é uma enzima cuja principal função é a degradação de coágulos de fibrina no plasma; *Protein AMBP*, também conhecida como *Alpha-1-macroglobulin* ou precursor da bikutina, que desempenha um papel fundamental na remoção de oxidantes nocivos, na homeostase dos glóbulos vermelhos e na manutenção da homeostase redox mitocondrial; e, por fim, a *TRIP6* que interage com o receptor da tireóide e desempenha um papel crucial na reorganização do citoesqueleto de actina e na invasividade celular (UNIPROT, 2024). Dessa forma, é considerada anômala em relação à maioria dos dados do agrupamento, podendo representar padrões interessantes ou casos raros que podem ser importantes para a análise ou indicar novas descobertas.

Como já destacado anteriormente, assumindo uma condição de compromisso para nortear a discussão da possível alteração do proteoma plasmático do grupo de voluntários, em consequência das concentrações de mercúrio total nas amostras de plasma, a seguir serão discutidas separadamente algumas proteínas/enzimas que apresentaram “*fold change*” positivo e/ou expressaram-se somente em um único grupo. Nas discussões serão consideradas as funções específicas dessas macromoléculas no proteoma plasmático e achados da literatura que reportam possível relação de espécies mercuriais com as funções que essas proteínas/enzimas desempenham nos compartimentos celulares.

- *Isoformas de subunidades da Hemoglobina e Haptoglobina e/ou Haptoglobina-related protein*

A análise da abundância relativa das proteínas revelou que as isoformas da *Hemoglobina* (HB), incluindo as variantes *alfa*, *beta*, *delta*, *epsilon*, *gama-1* e *gama-2*, apresentaram um aumento na expressão (*up regulation*) nas três comparações realizadas com o grupo controle (G1) e com os demais grupos (G2-G\$). Este grupo, composto por indivíduos que se alimentam de peixe apenas três vezes por mês, exibiu concentrações menores de mercúrio em todas as amostras analisadas (sangue, plasma e *pellets* proteicos) por GFAAS.

A literatura reporta estudo por meio da junção de cromatografia por exclusão por tamanho com espectrometria de emissão atômica de plasma indutivamente acoplado (SEC-ICP-OES) na investigação da ligação de íons Cd^{2+} , Hg^{2+} e CH_3Hg^+ em hemácias de coelhos (GIBSON

et al., 2017). Em relação às espécies mercuriais, os autores conseguiram elucidar a formação do complexo $x\text{Hg}^{2+}$ - HB. Achados recentes, reportados por Almeida et al. (2024), identificaram por meio de estudo metaloproteômico espécies mercuriais em *spots* proteicos, no qual foi caracterizado as subunidades *beta 1* e 2 de HB em tecido renal de ratos expostos ao cloreto de mercúrio. Em ambos os estudos, os autores inferem que a ligação de espécies mercuriais poderia ocorrer por meio da formação de complexos com grupos sulfidril de cisteínas terminais presentes na estrutura das subunidades da HB. Análise da abundância relativa de proteínas do proteoma renal dos ratos expostos ao cloreto de mercúrio, indicaram “*fold change*” negativo para as isoformas *beta 1* e 2 e *alfa ½* de subunidades da HB, o que não corrobora com os resultados obtidos no presente estudo. Outro estudo recente de Bataglioli et al. (2024), também identificou por meio de estratégias metaloproteômicas, espécies mercuriais em *spots* proteicos de fígado da espécie de peixe amazônico *Psectrogaster amazonica*. Nos *spots* proteicos foram identificadas as isoformas *beta 1* e 2 de subunidade de HB. Com base no estudo de Almeida et al. (2004), destacados acima, apesar da significativa regulação positiva das subunidades da HB nas análises por *Shotgun-LC-MS/MS* na comparação dos grupos G4 - G1, não é possível indicar com exatidão que as concentrações relativamente altas de mercúrio total do grupo G4 no sangue, no plasma e também nos pellets proteicos do plasma (concentrações médias: 10,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ no sangue; 7,60 $\mu\text{g L}^{-1}$ no plasma; 3,03 $\pm$ 0,098 mg kg^{-1} nos *pellets*) podem ser responsáveis pelo aumento de expressão das subunidades da HB.

As proteínas *Haptoglobin* (HP) e a *Haptoglobin-related protein* (HPR) mostraram um aumento significativo na expressão, conforme revelado nas análises por *Shotgun-LC-MS/MS*. Essas proteínas são sintetizadas no fígado em resposta à estimulação por citocinas durante períodos de inflamação e liberadas na corrente sanguínea (NARYZHNY; LEGINA, 2021). Do ponto de vista molecular, a HP é uma glicoproteína sérica com alta afinidade pela hemoglobina. Sua principal função é se ligar à hemoglobina livre presente no plasma, de modo a impedir a perda de ferro livre, um elemento essencial para várias funções biológicas, e evitar a sobrecarga de ferro, que pode causar danos celulares. A interação entre a *Hemoglobin* (HB) e a *Haptoglobin* (HP) resulta na formação de um complexo (HB-HP) não covalente que atenua as propriedades oxidativas do heme/HB. Logo, tanto a HP como a HPR se ligam às subunidades de HB com alta afinidade e atuam na depuração das subunidades de HB livre de células para permitir a reciclagem hepática do ferro heme no fígado como resposta à prevenção do dano oxidativo (ANDERSEN et al., 2017; SARPONG-KUMANKOMAH; GAILER, 2019; NARYZHNY; LEGINA, 2021; UNIPROT, 2024). Portanto, a formação dos complexos HP-HB e HPR-HB é uma explicação plausível para o aumento na expressão observada para a HP e HPR.

- *Isoformas de Immunoglobulins*

As análises por *Shotgun-LC-MS/MS* demonstraram um aumento na regulação de diversas isoformas de *Immunoglobulins* (IGs) nas comparações dos grupos G2 x G1, G3 x G1 e G4 x G1. As *Immunoglobulins* são proteínas essenciais do sistema imunológico, responsáveis pela identificação e neutralização de substâncias estranhas, como toxinas. Em resposta à toxicidade do mercúrio, a regulação positiva das IGs pode ser interpretada como um mecanismo adaptativo, voltado para a mitigação de danos causados pela presença do mercúrio no organismo.

Essas *Immunoglobulins*, que podem ser secretadas ou ligadas à membrana dos linfócitos B, desempenham um papel crucial na imunidade humoral. Elas atuam como receptores para antígenos específicos, o que desencadeia a expansão clonal e a diferenciação dos linfócitos B em células plasmáticas. Essas células plasmáticas, por sua vez, secretam outras IGs, que são responsáveis pela fase efetora da resposta imunológica, levando à eliminação dos antígenos ligados (SCHROEDER; CAVACINI, 2010). A regulação positiva das IGs, portanto, pode ser vista não apenas como uma resposta a uma inflamação local, mas também como parte de uma resposta sistêmica mais ampla frente à exposição a agentes tóxicos, como o mercúrio.

No contexto da toxicidade do mercúrio, conforme discutido no item 1.6 sobre a toxicidade e seus impactos na saúde humana, o mercúrio induz um estresse oxidativo significativo, o que ativa diversas vias de defesa do sistema imunológico. Esse estresse resulta na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e em uma resposta inflamatória (BRAY, 2000; ERCAL; GURER-ORHAN; AYKIN-BURNS, 2001; MENDES; PEREIRA; DE ANGELIS-PEREIRA, 2020). O aumento das *Immunoglobulins*, particularmente as classes IgG e IgM, está frequentemente associado à neutralização dessas espécies reativas (KANG et al., 2024). Além disso, o aumento das IGs pode indicar que o sistema imunológico está não apenas tentando eliminar o mercúrio, mas também lidando com os danos causados por esse metal nas estruturas celulares e proteínas do organismo. Outro aspecto importante da regulação positiva das IGs é sua relação com a produção de anticorpos autoimunes em casos de exposição crônica ao mercúrio. Ao modificar proteínas e estruturas celulares, o mercúrio pode induzir uma resposta imune contra essas modificações e produzir anticorpos autoimunes. Embora os complexos antígeno-anticorpo desempenhem um papel na detoxificação, eles também podem contribuir para o desenvolvimento de doenças autoimunes, especialmente quando o sistema imunológico passa a reconhecer erroneamente as próprias células do organismo como alvos. Isso evidencia a complexidade da resposta imunológica ao mercúrio, onde há um equilíbrio delicado entre proteção e danos

(POLLARD et al., 2019; ERCAL; GURER-ORHAN; AYKIN-BURNS, 2001; KANG et al., 2024).

A literatura reporta o estudo metaloproteômico de Vieira et al. (2017) que identificou espécies mercuriais em *spot* proteico do tecido hepático da espécie *Mylossoma duriventre*, espécie de peixe Amazônico. No *spot* proteico foi identificada a Região V da cadeia pesada da Ig 5a (*Ig heavy chain V region 5a*), uma isoforma que apresenta subunidades polipeptídicas de *Immunoglobulins*, onde "Ig" se refere a "*Immunoglobulins*", que é um tipo de anticorpo; a cadeia pesada é uma das duas subunidades que formam a estrutura de uma *Immunoglobulins*; e, a "região V" (ou variável) está associada à parte da cadeia responsável pela diversidade dos anticorpos (VIEIRA et al., 2017; UNIPROT, 2024). A concentração de mercúrio total determinada no *spot* proteico foi de 68 mg g⁻¹. Os autores justificaram que a alta concentração de mercúrio total determinada no *spot* está relacionada à presença de cisteína na região 5 da cadeia pesada da Ig, aminoácido que apresenta grupos sulfidril, uma base mole, que pode formar ligação estável com espécies mercuriais, consideradas ácidos moles. Mais recentemente, Almeida et al. (2024) analisaram tecido renal de ratos expostos ao cloreto de mercúrio. O estudo indicou que a Região C da cadeia gama-1 da Ig (*Ig gamma-1 chain C region*) apresentou regulação positiva, e as Região C da cadeia gama-2b da Ig (*Ig gamma-2b chain C region*) e Região C da cadeia kappa da Ig, alelo B (*Ig kappa chain C region B allele*) se expressaram somente no grupo exposto ao cloreto de mercúrio, o que corrobora com os resultados do presente estudo. Os achados dos estudos destacados acima, podem a princípio, justificar a variação positiva apresentadas pelas isoformas de Igs nas análises por *Shotgun-LC-MS/MS*, nas comparações dos grupos G2 x G1, G3 x G1 e G4 x G1.

● *Albumin*

A *Albumin* (ALB) é considerada uma proteína multifuncional, sintetizada no fígado e presente no plasma humano em concentrações normais variando entre 35 e 50 g L⁻¹. A mesma atua fisiologicamente em várias funções importantes, incluindo transporte de metais, ácidos graxos, colesterol, pigmentos biliares e medicamentos (LU et al., 2008; UNIPROT, 2024). De acordo com Lu et al. (2008) e Roche et al. (2008), a ALB é considerada uma proteína-chave na regulação da pressão osmótica do sangue. Nesse contexto, suas concentrações plasmáticas estão intimamente relacionadas ao equilíbrio do escape transcapilar, um processo no qual líquidos e proteínas do sangue migram para os tecidos adjacentes devido ao aumento da permeabilidade capilar, frequentemente observado em condições de inflamação, lesão ou doenças. Esse fenômeno pode

levar ao desenvolvimento de edema e perda proteica, afetando a função corporal normal. Além disso, um dos papéis mais relevantes da ALB, especialmente no contexto deste estudo, é sua capacidade de se ligar a espécies químicas e/ou radicais livres, conferindo-lhe propriedades antioxidantes. Sua estrutura flexível, composta por três domínios, favorece uma ampla variedade de locais de ligação a íons metálicos. Dentre estes, destaca-se a Cys34, único resíduo de cisteína reduzido livre e, cinco resíduos de metionina: *Met87*, *Met 123*, *Met 298*, *Met 446* e *Met548*. Esse arranjo estrutural é relevante para a interação da ALB com espécies mercuriais, que podem se ligar aos tióis da cisteína (Cys), facilitando o acesso do complexo MeHg-Cys ao SNC. O complexo é semelhante ao aminoácido metionina e pode ser transportado através das membranas celulares. Além disso, a ligação covalente de compostos mercuriais a enzimas contendo cisteína, pode inibir suas funções, resultando em um aumento na produção de ERO e subsequente estresse oxidativo, como descrito por Roche et al. (2008), Branco et al. (2017) e Uniprot (2024) e corroborado por Li et al. (2007) em estudo abrangente da interação de espécies mercuriais com a ALB. Os autores investigaram as interações de mercúrio inorgânico (Hg^{2+}), metilmercúrio (MeHg^+), etilmercúrio (EtHg^+) e fenilmercúrio (PhHg^+) com a Albumina Sérica Humana (HSA) utilizando uma técnica híbrida, a eletroforese capilar acoplada à espectrometria de absorção atômica eletrotérmica (*CE-ETAAS*). Estudo para obter informações estruturais utilizando dicroísmo circular e espectroscopia Raman foram feitos concomitantemente. Com base nos dados experimentais obtidos, os autores propuseram a estequiometria para as interações de Hg^{2+} , MeHg^+ , EtHg^+ e PhHg^+ com ALB de 6:1, 4:1, 4:1 e 3:1, respectivamente. Os autores concluíram que os complexos ALB com as espécies mercuriais são formados principalmente por meio de ligação com enxofre dos grupos sulfidrilas de resíduos de metionina/cisteína presentes da estrutura da ALB, mas com participação de grupos C-O e C-N de resíduos de outros aminoácidos que compõem a sequência peptídica da ALB.

No estudo de Almeida et al. (2024) mencionado anteriormente, o mercúrio total foi determinado em *spot* proteico utilizando estratégias metaloproteômicas, ou seja, utilizando as técnicas *2D PAGE-GFAAS-LC-MS/MS*. Esse estudo caracterizou a ALB no proteoma renal de ratos expostos ao cloreto de mercúrio, com concentrações de 120 mg kg^{-1} . Contudo, a análise da abundância relativa das proteínas no proteoma renal dos ratos expostos não revelou alterações significativas para a ALB, possivelmente devido a uma resposta mais localizada ou específica no tecido renal, relacionada a sua meia-vida (cerca de 20 dias) e ao seu escape transciliar. Com base nisso, os resultados de regulação positiva observados para a ALB no presente estudo pode refletir uma resposta sistêmica mais ampla, podendo ainda não estar relacionados diretamente às concentrações de mercúrio total determinado nas amostras de sangue, plasma e *pellets* proteicos dos voluntários dos grupos G1 a G4.

● *Ceruloplasmin*

A *Ceruloplasmin* (CP) é uma glicoproteína multifuncional de fase aguda, sintetizada principalmente no fígado (HOCHSTRASSER et al., 2005; LIU et al., 2022; UNIPROT, 2024). É considerada um oxidase multicobre (LIU et al., 2022). A presença de íons cobre confere à CP diversas atividades enzimáticas como: atividade ferroxidase no processo de oxidação do Fe^{2+} a Fe^{3+} sem a liberação de radicais oxigênio; catalisação da oxidação de Cu^+ e na oxidação de aminas biogênicas; participação no processo de degradação da desaminase fornecendo íons Cu^{2+} ; e, atividade semelhante à glutathione peroxidase, podendo remover tanto peróxido de hidrogênio quanto hidroperóxido lipídico na presença de tióis, o que pode ser considerado, a principal atividade enzimática da CP (STOJ; KOSMAN, 2003; HOCHSTRASSER et al., 2005; LIU et al., 2022). Sua estrutura multifuncional é composta por seis domínios compactos, com capacidade de se ligar a átomos de cobre (Cu) e, por isso, denominados domínios do tipo cupredoxina. Dentre os seis átomos de Cu presentes, três estão localizados nos domínios 2, 4 e 6 da CP, os quais possuem sítios de ligação para um centro de cobre mononuclear tipo I (T1), que desempenha um papel crucial na atividade redox da proteína. Os sítios T1 formam um complexo mononuclear, no qual o átomo de cobre está coordenado ao nitrogênio com dois resíduos de histidina nos domínios 4 e 6, a um ligante de cisteína e a um quarto ligante mais fraco, uma metionina. Além disso, a estrutura da CP apresenta em sua sequência FASTA resíduos de cisteína e metionina, aminoácidos com grupos sulfidril e tioéter que podem coordenar espécies mercuriais (PEARSON, 1963; BENTO et al., 2007; LIU et al., 2022).

A atividade e a concentração da CP estão intimamente relacionadas a diversos fatores, sendo os principais deles a resposta imunológica do organismo, o controle da eliminação de radicais livres, o processo de oxidação e a apoptose de granulócitos neutrófilos, além da presença de processos inflamatórios. Esses elementos desempenham um papel crucial na modulação da função da CP, uma vez que a proteína interage com o sistema imunológico, ajudando a mitigar os efeitos da inflamação e participando ativamente na regulação de processos oxidativos e apoptóticos (LIU et al., 2022; UNIPROT, 2024).

Estudo desenvolvido por Guzzi et al. (2016) reporta um decréscimo nos níveis de CP plasmática em humanos exposto à amálgama de mercúrio. Os autores analisaram os níveis de CP plasmático em 52 pacientes expostos a amálgama de mercúrio. Os resultados médios obtidos foram de $0,28 \pm 0,08 \text{ g L}^{-1}$, para mulheres ($n=34$) e $0,24 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1}$, para homens ($n=18$). No entanto, os níveis normais de CP plasmática em humanos é de 0,20 a $0,50 \text{ g L}^{-1}$ (VIRIT et al., 2008). Nesse

caso, os níveis de CP determinados por Guzzi et al. (2016) estão dentro da faixa considerada normal para humanos, inviabilizando uma conclusão mais robusta em relação aos dados obtidos no presente estudo.

No entanto, considerando a grande afinidade de espécies mercuriais por grupos sulfidrilas (R-S-H) e/ou tioéter (R₂-S:), e que a CP apresenta cisteína (aminoácido com grupos R-S-H) e metionina (aminoácidos com grupos R₂-S:) terminais na sua sequência *FASTA*, existe uma probabilidade significativa do aumento de expressão nos grupos G3 e G4 dos voluntários estar associada com as concentrações mais altas de mercúrio total. Assim, os *insights* reportados no presente estudo em relação a CP podem nortear novos estudos como, por exemplo, a associação das técnicas *2D PAGE-GFAAS* para fazer o mapeamento de espécies mercuriais em *spots* proteicos obtidos no fracionamento do proteoma plasmático e posterior comparação com dados da análise de abundância relativa de proteínas plasmáticas por *Shotgun-LS-MS/MS*.

6 CONCLUSÕES

A técnica de amostragem de sangue utilizando os cartões *Noviplex™* demonstrou eficácia na obtenção e no procedimento de extração do plasma para o fracionamento do proteoma plasmático e para a análise de abundância relativa de proteínas e enzimas por meio da estratégia analítica *Shotgun-LC-MS/MS*.

Os resultados das determinações de mercúrio total (Hg_T) nas amostras de sangue e plasma mostraram uma correlação positiva com o consumo de pescado. Dessa forma, permitiram também a classificação dos voluntários em grupo controle (G1) ou expostos (G2- G4) em função da determinação quantitativa de Hg_T .

As análises indicaram que as diferenças observadas entre os grupos experimentais (G2-G4) e o grupo de controle (G1) estavam relacionadas à presença e à quantidade de diferentes formas e isoformas de *Immunoglobulins* (anticorpos) e subunidades da *Hemoglobin* (proteínas que compõem a *Hemoglobin*, como as cadeias alfa e beta). A partir disso e com base nos achados da literatura, pode-se inferir que as diferenças na expressão das isoformas das *Immunoglobulins* (IGs) estão relacionadas à exposição dos voluntários às espécies mercuriais. No caso das isoformas de subunidades da *Hemoglobin*, embora a literatura também mencione a interação de proteínas de ligação a metais, como as subunidades da *Hemoglobin* com mercúrio, os resultados do presente estudo não corroboram um efeito significativo de regulação negativa para essas isoformas. Um achado relevante foi a expressão significativamente aumentada da *Ceruloplasmin* (CP), uma glicoproteína que pode atuar como antioxidante contra os efeitos causados por xenobióticos, como o mercúrio. A *Ceruloplasmin* possui sítios de coordenação com características de bases moles, como grupos sulfidríla, que lhe conferem a capacidade de coordenar espécies mercuriais, também classificadas como bases moles. Com isso, pode-se inferir que as isoformas de *Immunoglobulins* (IGs), especialmente a *Immunoglobulin kappa variável 3-20* (IGKV3-20), que foi expressa apenas nos grupos G3 e G4, juntamente com a CP, que foi encontrada com regulação aumentada no grupo G4, podem ser consideradas potenciais biomarcadores para a exposição a espécies mercuriais em humanos.

7 REFERÊNCIAS

- ADAMY, A. Dinâmica fluvial do Rio Madeira. In: SILVA, R. G. C. (Org.). *Porto Velho, cultura, natureza e território*. 1. ed. Temática: Porto Velho, p. 120-147, 2016.
- ANDERSEN, C. B. F.; STODKILDE, K.; SAEDERUP, K. L.; KUHLEE, A.; RAUNSER, S.; GRAVERSEN, J. H. ; MOESTRUP, S. K. Haptoglobin. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 26, n. 14, p. 814-831, 2017.
- BATAGLIOLI, I. C.; VIEIRA, J. C. S.; QUEIROZ, J. V.; FERNANDES, M. S.; BITTARELLO, A. C.; BRAGA, C. P.; BUZALAF, M. A. R.; ADAMEC, J.; ZARA, L. F.; PADILHA, P. M. Physiological and functional aspects of metal-binding protein associated with mercury in the liver tissue of pirarucu (*Arapaima gigas*) from the Brazilian Amazon. *Chemosphere*, v. 236, p. 124320, 2019.
- BATAGLIOLI, I. C.; VIEIRA, J.; SIVA, J. D.; ANDRADE, L.; FARIA, V.; CORCOBA, R.; ALMEIDA, R. D.; ZARA, L.; BUZALAF, M.; ADAMEC, J.; PADILHA, P. M. Metallomic Approach to Mercury and Selenium in the Liver Tissue of *Psectrogaster amazonica* and *Raphiodon vulpinus* from the Brazilian Amazon. *Int. J. Mol. Sci.*, 25, 11946, 2024.
- BASTOS, J. B. S. Principais depósitos minerais brasileiros. *DNPM*, v. III, p. 575-580, 1988.
- BASTOS, W. R.; DÓREA, J. G.; LACERDA, L. D.; ALMEIDA, R.; COSTA-JUNIOR, W. A.; BAÍA, C. C.; SOUSA-FILHO, I. F.; SOUSA, E. A.; OLIVEIRA, I. A. S.; CABRAL, C. S.; MANZATTO, A. G.; CARVALHO, D. P.; RIBEIRO, K. A. N.; MALM, O. Dynamics of Hg and MeHg in the Madeira River basin (Western Amazon) before and after impoundment of a run-of-river hydroelectric dam. *Environmental Research*, v. 189, p. 109896, 2020.
- BATAGLIOLI, I. C.; VIEIRA, J. C. S.; QUEIROZ, J. V.; DA SILVA, M. F.; BITTARELLO, A. C.; BRAGA, C. P.; BUZALAF, M. A. R.; ADAMEC, J.; ZARA, L. F.; PADILHA, P. M. Physiological and functional aspects of metal-binding protein associated with mercury in the liver tissue of pirarucu (*Arapaima gigas*) from the Brazilian Amazon. *Chemosphere*, v. 236, p. 124320, 2019.
- BATAGLIOLI, I. C.; QUEIROZ, J. V.; VIEIRA, J. C. S.; CAVALLINE, N. G.; BRAGA, C. P.; BUZALAF, M. A. R.; ZARA, L. F.; ADAMEC, J.; PADILHA, P. M. Mercury metalloproteomic profile in muscle tissue of *Arapaima gigas* from the Brazilian Amazon. *Environ Monit Assess*, 194, 705, 2022.
- BATAGLIOLI, I.; VIEIRA, J.; SIVA JD, A. L.; FARIA, V.; CORCOBA, R.; ALMEIDA, R.; ZARA, L. F.; BUZALAF, M. A. R.; ADAMEC, J.; PADILHA, P. M. Metallomic Approach to Mercury and Selenium in the Liver Tissue of *Psectrogaster amazonica* and *Raphiodon vulpinus* from the Brazilian Amazon. *Int J Mol Sci*. v. 25, n. 22, p. 11946, 2024.
- BATISTA, C. G.; CAVALCANTE, F. R. C.; SOUZA, D. S.; WATANABE, C. Y. V. Perfil econômico de Rondônia pós-instalação das usinas hidrelétricas do rio Madeira. In: ANDRADE, D. F. (ed.). *Sustentabilidade e Responsabilidade Social em Foco - Volume 4*. Belo Horizonte: Organização Editora Poisson, p. 62-74, 2018.

BENTO, I.; PEIXOTO, C.; ZAITSEV, V. N.; LINDLEY, P.F. Ceruloplasmin revisited: structural and functional roles of various metal cation-binding sites. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* v. 63, Pt 2, p. 240-248, 2007.

BERNARDI, J. V. E.; LACERDA, L. D.; DÓREA, J. G.; LANDIM, P. M. B.; GOMES, J. P. O.; ALMEIDA, R.; MANZATTO, A. G.; BASTOS, W. R. Aplicação da análise das componentes principais na ordenação dos parâmetros físico-químicos no alto rio Madeira e afluentes, Amazônia ocidental. *Geochimica Brasiliensis*, v. 23, p. 79-90, 2009.

BIELICKI, J. K.; ODA, M. N. Apolipoprotein A-I(Milano) and apolipoprotein A-I(Paris) exhibit an antioxidant activity distinct from that of wild-type apolipoprotein A-I. *Biochemistry*, v. 41, p. 2089-2096, 2002.

BITARELLO, A. C.; VIEIRA, J. C. S.; BRAGA, C. P.; BATAGLIOLI, I. C.; OLIVEIRA, G.; ROCHA, L. C.; ZARA, L. F.; BUZALAF, M. A. R.; OLIVEIRA, L. C. S.; ADAMEC, J.; PADILHA, P. M. Metalloproteomic approach of mercury-binding proteins in liver and kidney tissues of *Plagioscion squamosissimus* (corvina) and *Colossoma macropomum* (tambaqui) from Amazon region: Possible identification of mercury contamination biomarkers. *Science of the Total Environment*, v. 711, n. 134547, 2020.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAGA, C. P. Aplicação de ferramentas proteômicas e metaloproteômicas na caracterização de biomarcadores plasmáticos e hepáticos de ratos submetidos ao diabetes tipo 1. 2016. 276 f. Tese (Doutorado em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biomoléculas: estrutura e função) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências de Botucatu, 2016.

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

BRAGA, C. P.; CAVALCANTE, J. C. S.; LEITE, A. L.; FERNANDES, A. A. H.; BUZALAF, M. A. R.; PADILHA, P. M. Metalloproteomic and differential expression in plasma in a rat model of type 1 diabetes. *Int. J. Biol. Macromol.*, v. 104, p. 414-422, 2017.

BRAGA, C. P.; VIEIRA, J. C. S.; GROVE, R. A.; BOONE, C. H. T.; LEITE, A. L.; BUZALAF, M. A. R.; FERNANDES, A. A. H.; ADAMEC, J.; PADILHA, P. M. A proteomic approach to identify metalloproteins and metal-binding proteins in liver from diabetic rats. *Int. J. Biol. Macromol.*, v. 96, p. 847-832, 2017.

BRANCO, V.; CAITO, S.; FARINA, M.; ROCHA, J. T.; ASCHNER, M.; CARVALHO, C. Biomarkers of mercury toxicity: past, present, and future trends. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, v. 20, n. 3, p. 1-14, 2017.

BRASIL. Decreto nº 6.025, de 22 de fevereiro de 2007. Institui o Programa de Aceleração do Crescimento (PAC). Diário Oficial da União, Brasília, DF, 22 fev. 2007. Seção 1, p. 2.

- BRAY, T. M. Dietary antioxidants and assessment of oxidative stress. In: *Nutrition*, p. 578-581, 2000.
- CANAVAN, C. M.; CALDWELL, C. A.; BLOOM, N. S. Discharge of methylmercury enriched hypolimnetic water from a stratified reservoir. *Science of the Total Environment*, v. 260, p. 159-170, 2000.
- CANO, T. M. Efeitos deletérios e teratogênicos da exposição ao mercúrio - Revisão da literatura. *Rev. Med. Saude Brasilia*, v. 3, n. 3, p. 288-300, 2014.
- CARVALHO, C. M. L.; CHEW, E. H.; HASHEMY, S. I.; LU, J.; HOLMGREN, A. Inhibition of the human thioredoxin system: A molecular mechanism of mercury toxicity. *J. Biol. Chem.*, v. 283, n. 18, p. 11913-11923, 2008.
- CECCATELLI, S.; DARÉ, E.; MOORS, M. Methylmercury-induced neurotoxicity and apoptosis. *Chemico-Biological Interactions*, v. 188, p. 301-308, 2010.
- CLAVAL, P. Geografia econômica e economia. **GeoTextos**, v. 1, n. 1, p. 11-27. 2005.
- Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. CETESB. *Ficha de informação toxicológica: Mercúrio e seus compostos*. São Paulo: CETESB, 2023.
- CURRIE, L. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). *Analytica Chimica Acta*, v. 391, p. 105-126, 1999.
- DA SILVA, J.; ANDRADE, L.; RODRIGUES, P.; CORDEIRO, L.; LIMA, G.; LOPES, J.; CASTILLO, E.; MARTINS, R.; ASSUNÇÃO, A.; VIEIRA, J.; BUSALAF, M.; ADAMEC, J.; SARTORI, J.; PADILHA, P. Plasma Proteome Alterations of Laying Hens Subjected to Heat Stress and Fed a Diet Supplemented with Pequi Oil (*Caryocar brasiliense* Camb.): New Insights in the Identification of Heat Stress Biomarkers. *Biomolecules*, v. 14, p. 1424, 2024.
- DE ALMEIDA, E. C.; FARIA, V. D.; CIRINÊU, F. D.; SANTIAGO, M. G. A.; MIOTTO, B.; VIEIRA, J. C. S.; BRAGA, C. P.; ADAMEC, J.; FERNANDES, A. A. H.; BUZALAF, M. A. R.; PADILHA, P. M. Metalloproteomic Investigation of Hg-Binding Proteins in Renal Tissue of Rats Exposed to Mercury Chloride. *Int. J. Mol. Sci.*, 25, 164, 2024.
- DELANGHE, J. R.; LANGLOIS, M. R. Hemopexin: a review of biological aspects and the role in laboratory medicine. *Clinica Chimica Acta*, v. 312, n. 1-2, p. 13-23, 2001.
- DOREA, J. G.; DONANGELO, C. M. Early (in uterus and infant) exposure to mercury and lead. *Clin. Nutr.*, v. 25, n. 3, p. 369-376, jun. 2006.
- ERCAL, N.; GURER-ORHAN, H.; AYKIN-BURNS, N. Toxic metals and oxidative stress: part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr. Top. Med. Chem.*, v. 1, n. 6, p. 529-359, 2001.
- FAIAL, K. et al. Mercury levels assessment in hair of riverside inhabitants of the Tapajós River, Pará State, Amazon, Brazil: fish consumption as a possible route of exposure. *J Trace Elem Med Biol.*, v. 30, p. 66-76, 2015.

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

FENTON, D. E. *Biocoordination Chemistry*. Oxford: Oxford Chemistry Primers, 1995.

FORSBERG, B. R.; JARDIM, W. F.; ZEIDEMANN, V. K.; FADINI, P. S.; CARNEIRO, A.; PADOVANI, C. R.; SILVA-FORSBERG, M. C.; ROULET, M.; LUCOTTE, M.; NAKAZONO, E. M.; MARTINS, A. E.; CHAGAS, E. C. The biogeochemistry of mercury in the Negro River basin (Brazilian Amazon). *Proceedings of the 5th International Conference on Mercury as a Global Pollutant*, Rio de Janeiro, 1999. p. 153.

GALVÃO, R. C. F.; BERNARDI, J. V. E.; DÓREA, J. G.; BARBOSA, A. C.; BASTO, W. R.; MANZATTO, A. G. et al. Uso de krigagem indicativa para verificação da distribuição de mercúrio total em sedimentos de fundo no alto rio Madeira. In: *I Conferência Programa Piloto para a Proteção das Florestas Tropicais*, p. 7, 2008.

GALVÃO, R. C. F.; GOMES, J. P. O.; ALMEIDA, R.; BASTOS, W. R.; LACERDA, L. D.; BERNARDI, J. V. E. Variação sazonal de elementos-traço associados aos sólidos em suspensão no alto rio Madeira, Amazônia Ocidental. *Geochimica Brasiliensis*, v. 23, p. 67-68, 2009.

GAO, Y.; YATES, J. R. Protein analysis by Shotgun Proteomics. In: TAO, W. A.; ZHANG, Y. (Eds.). *Mass Spectrometry-Based Chemical Proteomics*, First Edition. p. 1-38, 2019.

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

GOMES, J. P. O.; NASCIMENTO, E. L.; BERNARDI, J. V. E.; BASTOS, W. R.; LACERDA, L. D. Geoquímica de elementos-traço em sólidos em suspensão no alto rio Madeira, Rondônia, Brasil. *Geochimica Brasiliensis*, v. 23, p. 49-67, 2009.

GÓMEZ-ARIZA, J. L.; JAHROMI, E. Z.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, M.; GARCÍA-BARRERA, T.; GAILER, J. Liquid chromatography-inductively coupled plasma-based metallomic approaches to probe health-relevant interactions between xenobiotics and mammalian organisms. *Metallomics*, v. 3, p. 566, 2011.

GUZZI, G.; RONCHI, A.; BARBARO, M.; BRAMBILLA, L.; FERRUCCI, S. M.; PIGATTO, P. D. M. Mercury exposure and serum ceruloplasmin. *Toxicology Letters*, v. 258, 2016.

HARAGUCHI, H. Metallomics as integrated biometallic science. *E. Anal. No. Espectro*, v. 19, p. 5-14, 2004.

HOCHSTRASSER, H.; TOMIUK, J.; WALTER, U.; BEHNKE, S.; SPIEGEL, J.; KRÜGER, R.; BECKER, G.; RIESS, O.; BERG, D. Functional relevance of ceruloplasmin mutations in Parkinson's Disease. *The FASEB Journal*, v.19, n. 13, p. 1851-1853, 2005.

HORBE, A. M. C.; QUEIROZ, M. M. A.; MOURA, C. A. V.; TORO, M. A. G. Geoquímica das águas do médio e baixo rio Madeira e seus principais tributários - Amazonas - Brasil. *Acta Amazonica*, v. 43, n. 4, p. 489-504, 2013.

HOUSTON, M. C. Role of mercury toxicity in hypertension, cardiovascular disease, and stroke. *Journal of Clinical Hypertension*, v. 13, p. 621-627, 2011.

HUSSAIN, S.; RODGERS, D. A.; DUHART, H. M.; ALI, S. F. Mercuric chloride-induced reactive oxygen species and its effect on antioxidant enzymes in different regions of rat brain. *J Environ Sci Health B.*, v. 32, p. 395-409, 1997.

IUPAC. *Pure and Applied Chemistry*, v. 60, n. 3, p. 431-436, 1988.

JIRAU ENERGIA. A Estrutura da Usina Hidrelétrica Jirau. Disponível em: <https://www.jirauenergia.com.br/conheca-a-uhe/>. Acesso em: 07 jan. 2024.

KANG, B.; WANG, J.; GUO, S.; YANG, L. Mercury-induced toxicity: Mechanisms, molecular pathways, and gene regulation. *Science of The Total Environment*, v. 943, p. 173577, 2024.

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

KIM, J. H.; WOENKER, T.; ADAMEC, J.; REGNIER, F. E. Simple, miniaturized blood plasma extraction method. *Anal. Chem.*, v. 85, n. 23, p. 11501-11508, 2013.

KRUG, F. J.; NOBREGA, J. A.; OLIVEIRA, P. V. Espectrometria de Absorção Atômica - Parte 1 - Fundamentos e Atomização com Chama. **Disciplina de Pós-Graduação**. Espectrometria de Absorção Atômica, ESALQ, 40 p., 2004.

KULKARNI, R.; DEOBAGKAR, D.; ZINJARDE, S. Metals in mangrove ecosystems and associated biota: A global perspective. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 153, p. 215-228, 2018.

LACERDA, L. D.; MARINS, R. V. Anthropogenic mercury emissions to the atmosphere in Brazil: The impact of gold mining. *J. Geochemical Explor.*, v. 58, n. 2-3, p. 223-229, 1997.

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

LECHLER, P. J.; MILLER, J. R.; LACERDA, L. D.; VINSON, D.; BONZONGO, J.-C.; LYONS, W. B.; WARWICK, J. J. Elevated mercury concentrations in soils, sediments, water, and fish of the Madeira River basin, Brazilian Amazon: a function of natural enrichments? *Science of The Total Environment*, v. 260, n. 1-3, p. 87-96, 2000.

LEMOES, N. B.; ANGELI, J. K.; FARIA, T. O.; RIBEIRO JUNIOR, R. F.; VASSALLO, D. V.; PADILHA, A. S.; STEFANON, I. Low Mercury Concentration Produces Vasoconstriction, Decreases Nitric Oxide Bioavailability and Increases Oxidative Stress in Rat Conductance Artery. *PLoS One*, v. 7, n. 11, 2012.

LI, N.; TIAN, G. W.; WANG, Y.; ZHANG, H.; WANG, Z.; LI, G. Prognostic role of the pretreatment C-reactive protein/Albumin ratio in solid cancers: a meta-analysis. *Scientific Reports*, v. 7, p. 41298, 2017.

LI, D.; LU, D.; MORAN, E.; SILVA, R. F. B. Examining water area changes accompanying dam construction in the Madeira River in the Brazilian Amazon. *Water*, v. 12, p. 1921, 2020.

LI, Y.; CHEN, R.; WANG, C.; DENG, J.; LUO, S. Double-edged functions of hemopexin in hematological related diseases: from basic mechanisms to clinical application. *Frontiers in Immunology*, v. 14, p. 1274333, 2023.

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

LIMA, P. M.; VIEIRA, J. C. S.; CAVECCI-MENDONÇA, B.; FLEURI, L. F.; LEITE, A. L.; BUZALAF, M. A. R.; PEZZATO, L. E.; BRAGA, C. P.; PADILHA, P. M. Identification of Zinc Absorption Biomarkers in Muscle Tissue of Nile Tilapia Fed with Organic and Inorganic Sources of Zinc Using Metallomics Analysis. *Biological Trace Element Research*, v. 194, p. 259, 2020.

LINHARES, J. M. S.; RODRIGUES, W. B.; MARTA, J. M. C. Exploração aurífera artesanal e a migração de garimpeiros para o território rondoniense. *Fronteiras: Revista de História*, v. 19, n. 33, p. 43-69, 2017.

LINHARES, D. P.; SILVA, J. M.; LIMA, T. R.; GOMES, J. P. O.; ALMEIDA, R. Mercúrio em diferentes tipos de solos marginais do baixo rio Madeira - Amazônia ocidental. *Geochemica Bras.*, v. 23, n. 1, p. 117-130, 2009.

LIONETTO, M.; CARICATO, R.; GIORDANO, M. Pollution Biomarkers in Environmental and Human Biomonitoring. *Open Biomark J*, 9 (1): 1-9, 2019.

LOPES-ARAÚJO, A.; ARRIFANO, G. P.; MACCHI, B. M.; OLIVEIRA, M. A.; SANTOS-SACRAMENTO, L.; RODRÍGUEZ MARTÍN-DOIMEADIOS, R. C.; JIMÉNEZ-MORENO, M.; MARTINS FILHO, A. J.; ALVAREZ-LEITE, J. I.; ORÍÁ, R. B.; NASCIMENTO, J. L. M. do; CRESPO-LOPEZ, M. E. Hair mercury is associated with dyslipidemia and cardiovascular risk: An anthropometric, biochemical and genetic cross-sectional study of Amazonian vulnerable populations. *Environmental Research*, v. 229, p. 115971, 2023.

LIU, Z.; WANG.; ZHANG, C.; ZHOU, S.; JI, G. Molecular Functions of Ceruloplasmin in Metabolic Disease Pathology. *Diabetes Metab Syndr Obes.* v. 3, n.15, p. 695-711, 2022.

LOBINSKI, R.; BECKER, J. S.; HARAGUCHI, H.; SARKAR, R. Metallomics: guidelines for terminology and critical evaluation of analytical chemistry approaches (IUPAC technical report). *Pure Appl. Chem.*, v. 82, p. 493-504, 2010.

LU, Y.; LIU, J.; CHEN, X.; LI, W.; LIU, Z. The role of albumin in the pathophysiology of liver disease. *Hepatology Research*, v. 38, n. 9, p. 811-819, 2008.

LUO, M.; ZHOU, C.; MA, T.; GUO, W.; PERCIVAL, L.; BAEYENS, W.; GAO, Y. Anthropogenic activities influence the mobilization of trace metals and oxyanions in coastal sediment porewaters. *Sci. Total Environ.*, v. 839, p. 156-353, 2022.

MACIEL, E. S.; ENES, C. C. Perfil alimentar e prática de atividade física em um programa da universidade aberta à terceira idade. *Nutr. Bras.*, v. 5, n. 3, p. 134-138, 2006.

MARET, W. In: ARRUDA, M. A. Z. (org.). *Metallomics: The Science of Biometals*. New York: Springer International Publishing, 2018. Cap. 1.

MARQUES, R. C.; DÓREA, J. G.; MCMANUS, C.; LEÃO, R. S.; BRANDÃO, K. G.; MARQUES, R. C.; VIEIRA, I. H. I.; GUIMARÃES, J. R. D.; MALM, O. Hydroelectric reservoir inundation (Rio Madeira Basin, Amazon) and changes in traditional lifestyle: impact on growth and neurodevelopment of pre-school children. *Public Health Nutr [Internet]*, v. 14, n. 4, p. 661-669, 2011.

MEYER, J. G. Qualitative and Quantitative Shotgun Proteomics Data Analysis from Data-Dependent Acquisition Mass Spectrometry. In: CARRERA, M.; MATEOS, J. (Eds.). *Shotgun Proteomics Methods in Molecular Biology*. Volume 2259. New York: Springer Nature, 2021. p. 297-308.

MENDES, A. P. A.; PEREIRA, R. C.; ANGELIS-PEREIRA, M. C. Estresse oxidativo e sistemas antioxidantes: conceitos fundamentais sob os aspectos da nutrição e da ciência dos alimentos. In: CORDEIRO, C. A. M. *Tecnologia de alimentos: tópicos físicos, químicos e biológicos*. 1. ed. v. 2. Editora Científica Digital, 2020. p. 296-312.

MILLER, M. Apolipoprotein C-III. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 37, n. 6, p. 1013-1014, 2017.

MIRANDA, M. R.; COELHO-SOUZA, S. A.; GUIMARÃES, J. R. D.; CORREIA, R. R. S.; OLIVEIRA, D. Mercúrio em sistemas aquáticos: Fatores ambientais que afetam a metilação. *Oecol. Bras.*, v. 11, n. 2, p. 240-251, 2007.

MONTOYA, M. T.; PORRES, E.; SERRANO, S.; FRUCHART, J. C.; MATA, P.; GERIQUE, J. A. G.; CASTRO, G. R. Fatty acid saturation of the diet and plasma lipid concentrations, lipoprotein particle concentrations and cholesterol efflux capacity. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 75, p. 484-491, 2002.

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

MOUNICOU, S.; SZPUNAR, J.; LOBINSKI, R. Metallomics: the concept and methodology. *Chem. Soc. Rev.*, v. 38, p. 1119-1138, 2009.

MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W. *Harper's Illustrated Biochemistry*. 26. ed. New York: McGraw-Hill Medical Publishing Division, 2003.

NARYZHNY, S. N.; LEGINA, O. K. Haptoglobin as a biomarker. *Biomed Khim*, v. 67, n. 2, p. 105-118, 2021.

NGUYEN, H. D.; KIM, M. S. In silico identification of molecular mechanisms for stroke risk caused by heavy metals and their mixtures: Sponges and drugs involved. *NeuroToxicology*, v. 96, p. 222-239, 2023.

OECD. *Collection of Working Definitions*. 2012.

PARK, Y. S.; SUZUKI, K.; TANIGUSHI, N.; GUTTERIDGE, J. M. Glutathione peroxidase-like activity of caeruloplasmin as an important lung antioxidant. *FEBS Letters*, v. 458:2, p. 133-136, 1999.

PEROTTONI, J.; RODRIGUES, O. E. D.; PAIXÃO, M. W.; ZENI, G.; LOBATO, L. P.; BRAGA, A. L.; ROCHA, J. B. T.; EMANUELLI, T. Renal and hepatic ALA-D activity and selected oxidative stress parameters of rats exposed to inorganic mercury and organoselenium compounds. *Food Chem. Toxicol.*, v. 42, n. 1, p. 17-28, 2004.

PEARSON, R. G. Hard and soft acids and bases. *Journal of the American Chemical Society*, v. 85, p. 3533-3539, 1963.

POLLARD, K. M.; CAUVI, D. M.; TOOMEY, C. B.; HULTMAN, P.; KONO, D. H. Mercury-induced inflammation and autoimmunity. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, v. 1863, n. 12, p. 129299, 2019.

QIU, G.; FENG, X.; WANG, S.; FU, X.; SHANG, L. Mercury distribution and speciation in water and fish from abandoned Hg mines in Wanshan, Guizhou province, China. *Sci. Total Environ.*, v. 407, n. 18, p. 5162-5168, 2009.

QUEIROZ, J. V. Abordagem metalômica quantitativa de mercúrio em peixes da região amazônica. 2015. Dissertação (mestrado) – Curso de Zootecnia. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2017.

QUEIROZ, J.; VIEIRA, J. C. S.; BATAGLIOLI, I. C.; BITTARELLO, A. C.; BRAGA, C. P.; OLIVEIRA, G.; PADILHA, C. C. F.; PADILHA, P. M. Total mercury determination in muscle and liver tissue samples from Brazilian Amazon fish using slurry. *Biological Trace Element Research*, v. 184, p. 517-522, 2018.

RAMOS-ROSAS, N. N.; VALDESPINO, C.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, J.; GALLOREYNOSO, J. P.; OLGUÍN, E. J. Heavy metals in the habitat and throughout the food chain of the Neotropical otter, *Lontra longicaudis*, in protected Mexican wetlands. *Environ. Monit. Assess.*, v. 185, p. 1163-1173, 2012.

REIKDAL, D.; SOUZA, U. G. T. F. Ribeirinhos e usinas hidrelétricas no rio Madeira: impactos socioambientais, reconhecimento e expulsões. In: MONTEIRO, R. N.; IADANZA, E. E. S.; LASTRES, H. M. M. (coords.). *Tensões e vivências afirmativas na Amazônia brasileira*. Salamanca: Ediciones Universidad de Salamanca, p. 247-268, 2024.

RESOLUTION WHA67.11. Public health impacts of exposure to mercury and mercury compounds: the role of WHO and ministries of public health in the implementation of the Minamata Convention. In: *Sixty-seventh World Health Assembly*, Geneva, 19–24 maio 2014. Geneva: Organização Mundial da Saúde, 2014.

RIO, G. A. P.; COELHO, M. C. N.; WANDERLEY, L. J. Rio Madeira: fronteiras, redes e rotas. *Novos Cadernos NAEA*, v. 18, n. 2, p. 93-109, jun-set. 2015.

ROCHA, J. C.; ROSA, A. H.; CARDOSO, A. A. *Introdução à química ambiental*. Porto Alegre: Bookman, 2004.

ROCHE, M.; RONDEAU, P.; SINGH, N. R.; TARNUS, E.; BOURDON, E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Letters*, 582, 1783-1787, 2008.

ROOS, D. H. Mecanismos de captação e toxicidade do metilmercúrio: envolvimento do sistema glutamatérgico e do cálcio em fatias e mitocôndrias de ratos. 2011. Tese (Doutorado em Bioquímica Toxicológica) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

ROSATO, A.; VALASATAVA, Y.; ANDREINI, C. Minimal functional sites in metalloproteins and their usage in structural bioinformatics. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, n. 5, p. 671, 2016.

ROULET, M.; LUCOTTE, M. Geochemistry of mercury in pristine and flooded ferrallitic soils of a tropical rain forest in French Guiana, South America. *Water, Air, and Soil Pollution*, v. 80, p. 1079-1088, 1995.

SALES, R. L.; PELUZIO, M. C. G.; COSTA, N. M. B. Lipoproteínas: uma revisão do seu metabolismo e envolvimento com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. *Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição*, v. 25, p. 71-86, 2003.

SANTOS, M. Modo de produção técnico-científico e diferenciação espacial. *Território*, Rio de Janeiro, n. 6, p. 5-20, 1999.

SARPONG-KUMANKOMAH, J.; GAILER, K. D. The Effect of Mercury on the Immune System. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 67, p. 14-22, 2019.

SCHAUMLÖFFEL, D.; *Metallomics: Analytical Techniques and Speciation Methods*, 1. ed., Nova Iorque: Willey, 2016.

SCHROEDER, H. W. JR.; CAVACINI, L. Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 125, n. 2, supl. 2, p. S41-S52, 2010.

SCOTT, M.; FLAHERTY, D.; CURRALL, J. Statistics: are we related?. *Journal of Small Animal Practice*, v. 54, n. 3, p. 124-128, 2013.

SERRA, C. V.; SILVA, T. M.; BERNARDI, J. V. E. Dinâmica de exposição ao mercúrio em população do alto rio Madeira, Rondônia - Brasil. *Fórum Ambiental da Alta Paulista*, v. 17, n. 4, p. 27-41, 2021.

SILVA, F. A. M. Infraestrutura e dinâmica econômica social do território em Porto Velho no período de construção das usinas hidrelétricas do rio Madeira. *RPGeo*, v. 3, n. 1, p. 101-117, 2016.

STOJ, C.; KOSMAN, D. J. Cuprous oxidase activity of yeast Fet3p and human ceruloplasmin: Implication for function. *FEBS Letters*, v. 554, n. 3, p. 422-426, 2003.

SOARES, K. J.; FREITAS, G. A.; MENEZES, B. F.; ROCHA, M. H. F. F.; MOREIRA, G. A.; NAVES, A. C. T. S. G.; RODRIGUES, L. G. M.; PASSOS, M. A.; OLIVEIRA, D.; MARQUES, R. F. P. V.; SOARES, D. J.; FERREIRA, I. T. R. Marcos históricos do setor hidrelétrico brasileiro. *Research, Society and Development*, v. 11, n. 7, p. 1-16, 2022.

SOUZA, M. M. O.; PESSOA, V. L. S. A contrarreforma agrária em Rondônia: colonização agrícola, expropriação e violência. In: Encontro de Grupos de Pesquisa, V. Santa Maria, 2009.

Anais... Agricultura, desenvolvimento regional e transformações sócio-espaciais, Universidade Federal de Santa Maria, p. 1-15, 2009.

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

TINÔCO, A. A. P.; AZEVEDO, I. C. D. D.; MARQUES, E. A. G.; MOUNTEER, A. H.; MARTINS, C. P.; NASCENTES, R.; REIS, E. L.; NATALINO, R. Evaluation of mercury contamination in Descoberto, MG. *Eng. Sanit. Ambient.*, v. 15, n. 4, p. 305-314, out/dez. 2010.

TIPPING, E. The nature of the interactions of humic substances with metals. *Science of the Total Environment*, v. 22, n. 2, p. 129-136, 1981.

VALKO, M.; JOMOVA, K.; RHODES, C. J.; KUČA, K.; MUSÍLEK, K. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Archives of Toxicology*, v. 90, p. 1-37, 2016.

VIANA, J. G. M. *Estudo da biomagnificação do mercúrio total e orgânico na cadeia trófica aquática no Rio Madeira-RO*. Instituto de Química - INQUI - Programa de Pós-Graduação em Química, Campo Grande, 2023.

VIEIRA, J. C. S. Investigação de metalotioneínas em peixes da região do Jirau – bacia do rio Madeira - Rondônia. 2017. Tese (doutorado) – Curso de Biologia Geral e Aplicada, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2017.

VIEIRA, J. C. S.; BRAGA, C. P.; OLIVEIRA, G.; LEITE, A. L.; QUEIROZ, J. V.; BITTARELLO, A. C.; BUZALAF, M. A. R.; ZARA, L. F.; PADILHA, P. M. Identification of protein biomarkers of mercury toxicity in fish. *Environ Chem Lett*, v. 15, p. 717-724, 2017.

VIEIRA, J. C. S.; DE OLIVEIRA, G.; CAVALLINI, N. G.; BRAGA, C. P.; ADAMEC, J.; ZARA, L. F.; BUZALAF, M. A. R.; PADILHA, P. M. Investigation of Protein Biomarkers and Oxidative Stress in Pinirampus pirinampu Exposed to Mercury Species from the Madeira River, Amazon-Brazil. *Biol Trace Elem Res*, v. 200, p. 1872-1882, 2022.

VIEIRA, J. C. S.; BRAGA, C. P.; QUEIROZ, J. V.; CAVECCI-MENDONÇA, B.; OLIVEIRA, G.; FREITAS, N. G.; FERNANDES, A. A. H.; FERNANDES, M. S.; BUZALAF, M. A. R.; ADAMEC, J.; ZARA, L. F.; PADILHA, P. M. The effects of mercury exposure on Amazonian fishes: An investigation of potential biomarkers. *Chemosphere*, v. 316, p. , 2023.

VIRIT, O.; SELEK, S.; BULUT, M.; SAVAS, H. A.; CELIK, H.; EREL, O.; HERKEN, H. High ceruloplasmin levels are associated with obsessive compulsive disorder: a case control study. *Behav Brain Funct.*, v. 18, n. 52, 2008.

WHO. *Preventing disease through healthy environments exposure to mercury: a major public health concern*. Genebra: Organização Mundial da Saúde, 2010.

WIGGERS, G. A.; PEÇANHA, F. M.; BRIONES, A. M.; PÉREZ-GIRÓN, J. V.; MIGUEL, M.; VASSALLO, D. V.; CACHOFEIRO, V.; ALONSO, M. J.; SALAICES, M. Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, v. 295, n. 3, p. 1033-1043, 2008.

WOLF, M. B.; BAYNES, J. W. Cadmium and mercury cause an oxidative stress-induced endothelial dysfunction. *BioMetals*, v. 20, n. 1, p. 73-81, 2007.

YANG, W. S.; LI, R.; SHEN, Y. Q.; WANG, X. C.; LIU, Q. J.; WANG, H. Y.; LI, Q.; YAO, G. E.; XIE, P. Importance of lipid ratios for predicting intracranial atherosclerotic stenosis. *Lipids in Health and Disease*, v. 19, n. 1, p. 160, 2020.

YANG, R.; ROSHANI, D.; GAO, B.; LI, P.; SHANG, N. Metallothionein: A Comprehensive Review of Its Classification, Structure, Biological Functions, and Applications. *Antioxidants*, 13, 825, 2024.

ZAHIR, F.; RIZWI, S. J.; HAQ, S. K.; KHAN, R. H. Low dose mercury toxicity and human health. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, v. 20, n. 2, p. 351-360, 2005.

ZARA, L. F.; SANTOS, A.; ROCHA, J. C.; PADILHA, P. M.; JARDIM, W. F. Biomarcadores de toxicidade do mercúrio aplicados ao setor hidrelétrico na região Amazônica. São Carlos: Editora Cubo, 2017.

ZHOU, Y.; ADDAI, F. P.; ZHANG, X.; LIU, Y.; WANG, Y.; LIN, F.; TUFFOUR, A.; GU, J.; LIU, G.; SHI, H. Heavy metal-induced lipogenic gene aberration, lipid dysregulation and obesogenic effect: a review. *Environ Chem Lett*, n. 20, p. 1611–1643, 2022.

MATERIAL SUPLEMENTAR

TABELA 1MS - RESULTADOS OBTIDOS EM AMOSTRAS DE SANGUE DE VOLUNTÁRIOS DA
POPULAÇÃO RIBEIRINHA DO RIO MADEIRA,
REGIÃO DE JIRAU - RO.

Voluntários – Identificação	Concentração de Mercúrio Total ($\mu\text{g L}^{-1}$)
ID – 2 (grupo 1)	0,83±0,018
ID – 3 (grupo 1)	0,78±0,015
ID – 4 (grupo 1)	0,91±0,023
ID – 5 (grupo 1)	0,87±0,019
ID – 10 (grupo 1)	0,71±0,014
ID – 25 (grupo 1)	0,90±0,020
ID – 27 (grupo 1)	0,85±0,017
ID – 8 (grupo 2)	1,12±0,023
ID – 12 (grupo 2)	1,21±0,025
ID – 14 (grupo 2)	1,10±0,020
ID – 15 (grupo 2)	1,22±0,026
ID – 16 (grupo 2)	1,18±0,024
ID – 23 (grupo 2)	1,25±0,030
ID – 28 (grupo 2)	1,20±0,023
ID – 9 (grupo 3)	3,32±0,067
ID – 17 (grupo 3)	3,24±0,064
ID – 18 (grupo 3)	3,53±0,071
ID – 20 (grupo 3)	3,62±0,074
ID – 22 (grupo 3)	3,74±0,077
ID – 29 (grupo 3)	3,33±0,056
ID – 34 (grupo 3)	3,26±0,052
ID – 1 (grupo 4)	10,42±0,19
ID – 6 (grupo 4)	9,80±0,16
ID – 11 (grupo 4)	9,71±0,15
ID – 13 (grupo 4)	10,10±0,18
ID – 19 (grupo 4)	9,30±0,14
ID – 21 (grupo 4)	10,24±0,17
ID – 24 (grupo 4)	10,40±0,18

Grupo 1 – se alimentam de pescado até três vez por mês; Grupo 2 – se alimentam de pescado três vezes por semana; Grupo 3 – se alimentam de pescado até seis vezes por semana; Grupo 4 - se alimentam de pescado diariamente.

TABELA 2MS - RESULTADOS OBTIDOS EM AMOSTRAS DE PLASMA DOS VOLUNTÁRIOS DA POPULAÇÃO RIBEIRINHA DO RIO MADEIRA, REGIÃO DE JIRAU - RO (GRUPOS 1 – 4)

Voluntários – Identificação	Concentração de Mercúrio Total ($\mu\text{g L}^{-1}$)
ID – 2 (grupo 1)	0,64 $\pm$ 0,012
ID – 3 (grupo 1)	0,60 $\pm$ 0,011
ID – 4 (grupo 1)	0,69 $\pm$ 0,015
ID – 5 (grupo 1)	0,66 $\pm$ 0,013
ID – 10 (grupo 1)	0,54 $\pm$ 0,011
ID – 25 (grupo 1)	0,68 $\pm$ 0,014
ID – 27 (grupo 1)	0,65 $\pm$ 0,013
ID – 8 (grupo 2)	0,85 $\pm$ 0,016
ID – 12 (grupo 2)	0,91 $\pm$ 0,017
ID – 14 (grupo 2)	0,84 $\pm$ 0,015
ID – 15 (grupo 2)	0,92 $\pm$ 0,016
ID – 16 (grupo 2)	0,88 $\pm$ 0,015
ID – 23 (grupo 2)	0,94 $\pm$ 0,016
ID – 28 (grupo 2)	0,91 $\pm$ 0,015
ID – 9 (grupo 3)	2,50 $\pm$ 0,047
ID – 17 (grupo 3)	2,43 $\pm$ 0,044
ID – 18 (grupo 3)	2,65 $\pm$ 0,045
ID – 20 (grupo 3)	2,71 $\pm$ 0,051
ID – 22 (grupo 3)	2,81 $\pm$ 0,055
ID – 29 (grupo 3)	2,53 $\pm$ 0,045
ID – 34 (grupo 3)	2,45 $\pm$ 0,044
ID – 1 (grupo 4)	7,82 $\pm$ 0,15
ID – 6 (grupo 4)	7,54 $\pm$ 0,13
ID – 11 (grupo 4)	7,30 $\pm$ 0,12
ID – 13 (grupo 4)	7,60 $\pm$ 0,13
ID – 19 (grupo 4)	7,16 $\pm$ 0,12
ID – 21 (grupo 4)	7,70 $\pm$ 0,14
ID – 24 (grupo 4)	7,90 $\pm$ 0,15

Grupo 1 – se alimentam de pescado até três vez por mês; Grupo 2 – se alimentam de pescado três vezes por semana; Grupo 3 – se alimentam de pescado até seis vezes por semana; Grupo 4 – se alimentam de pescado diariamente.

TABELA 3MS - RESULTADOS DAS DETERMINAÇÕES DE MERCÚRIO TOTAL NOS EXTRATOS DOS PELLETS PROTEICOS.

Grupos de Voluntários	Pools	Massa de <i>pellet</i> - mg	Conc. Hg ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	*Conc. Hg ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
1	1.1	11,00	275,0	266,3$\pm$8,504
	1.2	11,55	266,0	
	1.3	10,45	258,0	
	2.1	11,05	375,0	
2	2.2	11,60	362,0	362,3$\pm$12,50
	2.3	12,15	350,0	
	3.1	11,60	1122	
	3.2	12,15	1084	
3	3.3	12,70	1049	1085$\pm$36,51
	4.1	12,15	3133	
	4.2	12,70	3031	
4	4.3	13,25	2937	3034$\pm$98,03

TABELA 4MS - RESULTADOS DAS DETERMINAÇÕES DE PROTEÍNA TOTAL NOS EXTRATOS DOS PELLETS PROTEICOS.

Grupos de Voluntários	Pools	Concentração (mg mL ⁻¹)	Concentração Média (mg mL ⁻¹)
1	1.1	215,30	219,45±4,150
	1.2	219,45	
	1.3	223,60	
	2.1	233,0	
2	2.2	241,0	234,0±6,557
	2.3	228,0	
	3.1	240,0	
3	3.2	247,0	242,0±4,359
	3.3	239,0	
	4.1	233,0	
4	4.2	237,0	232,3±5,033
	4.3	227,0	

TABELA 5MS - PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR SHOTGUN NO PLASMA HUMANO. AMOSTRAS COLETADAS COM CARTÃO NOVIPLEX. GRUPO 2 X 1- ÚNICAS.

Accession	Description	Score PLGS	Unique
P06312	Immunoglobulin kappa variable 4-1	588.31	1

Coluna 'Única' = proteínas exclusivas de um tratamento.

TABELA 6MS - PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR SHOTGUN NO PLASMA HUMANO. AMOSTRAS COLETADAS COM CARTÃO NOVIPLEX. GRUPO 2 X 1- DOW REGULADAS.

Accession	Description	Score PLGS	2:1_Ratio	2:1_P
P01857	Immunoglobulin heavy constant gamma 1	22854.95	0.886920439	0
P01860	Immunoglobulin heavy constant gamma 3	6136.29	0.869358235	0
P01861	Immunoglobulin heavy constant gamma 4	7340.77	0.869358235	0
P01834	Immunoglobulin kappa constant	13754.79	0.913931182	0
A0M8Q6	Immunoglobulin lambda constant 7	12860.5	0.93239382	0
P20742	Pregnancy zone protein	46.57	0.913931182	0.03

Dow = Proteínas com valor de 'p' menor que 0.05

TABELA 7MS - PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR SHOTGUN NO PLASMA HUMANO. AMOSTRAS COLETADAS COM CARTÃO NOVIPLEX. GRUPO 2 X 1– UP REGULADAS.

Accession	Description	Score PLGS	2:1_Ratio	2:1_P
P69892	Hemoglobin subunit gamma-2	1677.79	1.030455	0.95
P01011	Alpha-1-antichymotrypsin	214.4	1.127497	0.99
P02100	Hemoglobin subunit epsilon	1668.97	1.433329	0.99
P02768	Albumin	67867.38	1.271249	1
P02763	Alpha-1-acid glycoprotein 1	1633.71	1.404948	1
P19652	Alpha-1-acid glycoprotein 2	829.73	1.390968	1
P01009	Alpha-1-antitrypsin	5626.88	1.20925	1
P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein	47.81	1.552707	1
P02647	Apolipoprotein A-I	9740.11	1.336427	1
P00450	Ceruloplasmin	59.28	1.221403	1
P01024	Complement C3	678.58	1.20925	1
P00738	Haptoglobin	4725.97	1.616074	1
P00739	Haptoglobin-related protein	994.9	1.552707	1
P69905	Hemoglobin subunit alpha	27556.23	1.127497	1
P68871	Hemoglobin subunit beta	39735.69	1.2586	1
P69891	Hemoglobin subunit gamma-1	1668.97	1.462285	1
P02790	Hemopexin	1113.03	1.568312	1
P01876	Immunoglobulin heavy constant alpha 1	5133.31	1.521962	1
P01877	Immunoglobulin heavy constant alpha 2	3923.13	1.552707	1
P01859	Immunoglobulin heavy constant gamma 2	10460.06	1.105171	1
P01871	Immunoglobulin heavy constant mu	258.14	1.599994	1
P0CG04	Immunoglobulin lambda constant 1	26769.81	1.161834	1
P0DOY2	Immunoglobulin lambda constant 2	27071.67	1.161834	1
P0DOY3	Immunoglobulin lambda constant 3	27071.67	1.150274	1
B9A064	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5	26771.72	1.185305	1
P02787	Serotransferrin	4510.07	1.419068	1
Q8NG11	Tetraspanin-14	643.75	1.161834	1
P02766	Transthyretin	953.87	1.32313	1

Up = Proteínas com valor de 'p' maior que 0.95.

TABELA 9MS - PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR SHOTGUN NO PLASMA HUMANO. AMOSTRAS COLETADAS COM CARTÃO NOVIPLEX. GRUPO 3 X 1 - ÚNICAS.

Accession	Description	Score PLGS	Unique
Q8NG11	Tetraspanin-14	643.75	1
P01019	Angiotensinogen	63.76	3
P06727	Apolipoprotein A-IV	73.06	3
P10909	Clusterin	76.78	3
P02008	Hemoglobin subunit zeta	62.35	3
P04196	Histidine-rich glycoprotein	65.47	3
P01764	Immunoglobulin heavy variable 3-23	438.87	3
P01768	Immunoglobulin heavy variable 3-30	438.87	3
P0DP02	Immunoglobulin heavy variable 3-30-3	438.87	3
P0DP03	Immunoglobulin heavy variable 3-30-5	438.87	3
P01772	Immunoglobulin heavy variable 3-33	438.87	3
P01767	Immunoglobulin heavy variable 3-53	438.87	3
A0A0C4DH42	Immunoglobulin heavy variable 3-66	438.87	3
A0A0B4J1X5	Immunoglobulin heavy variable 3-74	438.87	3
P01619	Immunoglobulin kappa variable 3-20	458.17	3
A0A0C4DH25	Immunoglobulin kappa variable 3D-20	109.09	3
P05155	Plasma protease C1 inhibitor	73.1	3
P00747	Plasminogen	140.32	3
P02760	Protein AMBP	151.21	3
Q6IMI6	Sulfotransferase 1C3	68.02	3
Q6UXI7	Vitrin	76.16	3

Coluna 'Única' = proteínas exclusivas de um tratamento.

TABELA 9MS - PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR SHOTGUN NO PLASMA HUMANO. AMOSTRAS COLETADAS COM CARTÃO NOVIPLEX. GRUPO 3 X 1– UP REGULADAS.

Accession	Description	Score PLGS	3:1_Ratio	3:1_P
P02768	Albumin	67867.38	1.858928051	1
P02763	Alpha-1-acid glycoprotein 1	1633.71	1.584073998	1
P19652	Alpha-1-acid glycoprotein 2	829.73	1.41906754	1
P01011	Alpha-1-antichymotrypsin	214.4	1.233678052	1
P01009	Alpha-1-antitrypsin	5626.88	1.491824707	1
P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein	47.81	2.159766213	1
P01023	Alpha-2-macroglobulin	968.86	1.233678052	1
P02647	Apolipoprotein A-I	9740.11	1.632316236	1
P00450	Ceruloplasmin	59.28	1.552707215	1
P01024	Complement C3	678.58	1.462284582	1
P00738	Haptoglobin	4725.97	1.41906754	1
P00739	Haptoglobin-related protein	994.9	1.363425117	1
P69905	Hemoglobin subunit alpha	27556.23	1.363425117	1
P68871	Hemoglobin subunit beta	39735.69	1.682027618	1
P02042	Hemoglobin subunit delta	3791.38	1.665291179	1
P02100	Hemoglobin subunit epsilon	1668.97	1.716006899	1
P69891	Hemoglobin subunit gamma-1	1668.97	1.682027618	1
P69892	Hemoglobin subunit gamma-2	1677.79	1.537257535	1
P02790	Hemopexin	1113.03	1.786038401	1
P01876	Immunoglobulin heavy constant alpha 1	5133.31	1.632316236	1
P01877	Immunoglobulin heavy constant alpha 2	3923.13	1.69893226	1
P01857	Immunoglobulin heavy constant gamma 1	22854.95	1.433329435	1
P01859	Immunoglobulin heavy constant gamma 2	10460.06	1.491824707	1
P01860	Immunoglobulin heavy constant gamma 3	6136.29	1.404947596	1
P01861	Immunoglobulin heavy constant gamma 4	7340.77	1.404947596	1
P01871	Immunoglobulin heavy constant mu	258.14	2.203396474	1
P01834	Immunoglobulin kappa constant	13754.79	1.258600015	1
P0CG04	Immunoglobulin lambda constant 1	26769.81	1.616074385	1
P0DOY2	Immunoglobulin lambda constant 2	27071.67	1.584073998	1
P0DOY3	Immunoglobulin lambda constant 3	27071.67	1.599994191	1
P0CF74	Immunoglobulin lambda constant 6	15362.08	1.50681778	1
A0M8Q6	Immunoglobulin lambda constant 7	12860.5	1.197217372	1
B9A064	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5	26771.72	1.599994191	1
P20742	Pregnancy zone protein	46.57	1.11627807	1
P02787	Serotransferrin	4510.07	1.665291179	1
P02766	Transthyretin	953.87	1.584073998	1

Up = Proteínas com valor de 'p' maior que 0.95.

TABELA 10MS - PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR SHOTGUN NO PLASMA HUMANO. AMOSTRAS COLETADAS COM CARTÃO NOVIPLEX. GRUPO 4 X 1 - ÚNICAS.

Accession	Description	Score PLGS	Unique
P02656	Apolipoprotein C-III	342.61	4
P01619	Immunoglobulin kappa variable 3-20	439.43	4
P00747	Plasminogen	75.78	4
P02760	Protein AMBP	251.95	4
Q15654	Thyroid receptor-interacting protein 6	110.49	4

Coluna 'Única' = proteínas exclusivas de um tratamento.

TABELA 11MS - PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR SHOTGUN NO PLASMA HUMANO. AMOSTRAS COLETADAS COM CARTÃO NOVIPLEX. GRUPO 4 X 1 – DOW REGULADAS.

Accession	Description	Score PLGS	4:1_Ratio	4:1_P
P01023	Alpha-2-macroglobulin	968.86	0.860707971	0
P20742	Pregnancy zone protein	46.57	0.818730751	0

Dow = Proteínas com valor de 'p' menor que 0.05

TABELA 12MS - PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR SHOTGUN NO PLASMA HUMANO. AMOSTRAS COLETADAS COM CARTÃO NOVIPLEX. GRUPO 4 X 1– UP REGULADAS.

Accession	Description	Score PLGS	4:1_Ratio	4:1_P
P02768	Albumin	67867.38	1.616074385	1
P02763	Alpha-1-acid glycoprotein 1	1633.71	1.750672504	1
P19652	Alpha-1-acid glycoprotein 2	829.73	1.858928051	1
P01011	Alpha-1-antichymotrypsin spot 5	214.4	1.197217372	1
P01009	Alpha-1-antitrypsin	5626.88	1.284025417	1
P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein	47.81	1.296930074	1
P02647	Apolipoprotein A-I	9740.11	1.491824707	1
P00450	Ceruloplasmin	59.28	1.271249144	1
P01024	Complement C3	678.58	1.41906754	1
P00738	Haptoglobin	4725.97	1.896480852	1
P00739	Haptoglobin-related protein	994.9	1.954237353	1
P69905	Hemoglobin subunit alpha	27556.23	1.616074385	1
P68871	Hemoglobin subunit beta	39735.69	1.786038401	1
P02042	Hemoglobin subunit delta	3791.38	1.768267039	1
P02100	Hemoglobin subunit epsilon	1668.97	1.858928051	1
P69891	Hemoglobin subunit gamma-1	1668.97	1.786038401	1
P69892	Hemoglobin subunit gamma-2	1677.79	1.632316236	1
P02790	Hemopexin	1113.03	1.733253039	1
P01876	Immunoglobulin heavy constant alpha 1	5133.31	1.284025417	1
P01877	Immunoglobulin heavy constant alpha 2	3923.13	1.309964465	1
P01857	Immunoglobulin heavy constant gamma 1	22854.95	1.476980773	1
P01859	Immunoglobulin heavy constant gamma 2	10460.06	1.433329435	1
P01860	Immunoglobulin heavy constant gamma 3	6136.29	1.584073998	1
P01861	Immunoglobulin heavy constant gamma 4	7340.77	1.537257535	1
P01871	Immunoglobulin heavy constant mu spot 7	258.14	1.840431425	1
P01834	Immunoglobulin kappa constant	13754.79	1.10517092	1
P0CG04	Immunoglobulin lambda constant 1	26769.81	1.404947596	1
P0DOY2	Immunoglobulin lambda constant 2	27071.67	1.433329435	1
P0DOY3	Immunoglobulin lambda constant 3	27071.67	1.404947596	1
P0CF74	Immunoglobulin lambda constant 6	15362.08	1.41906754	1
A0M8Q6	Immunoglobulin lambda constant 7	12860.5	1.363425117	1
B9A064	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5	26771.72	1.433329435	1
P02787	Serotransferrin	4510.07	1.69893226	1
P02766	Transthyretin	953.87	1.537257535	1

Up = Proteínas com valor de 'p' maior que 0.95.

ANEXO I

CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DE APRECIÇÃO ÉTICA - CAAE

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EFEITO DA FREQUÊNCIA DE EXPOSIÇÃO AO MERCÚRIO EM POPULAÇÕES RIBEIRINHAS DA REGIÃO AMAZÔNICA: IDENTIFICAÇÃO DE POSSÍVEIS BIOMARCADORES

Pesquisador: PEDRO DE MAGALHAES PADILHA

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 4

CAAE: 43167420.7.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Química e Bioquímica

Situação do Parecer:
Aprovado

BRASILIA, 28 de Julho de 2021

Assinado por:
Jorge Alves de Almeida Venancio
(Coordenador(a))

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar
Bairro: Asa Norte CEP: 70.710-040
UF: DF Município: BRASILIA
Telefone: (61)3015-5877 E-mail: conep@saude.gov.br

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)
RESOLUÇÃO 466/2012**

CONVIDO, o(a) Senhor(a) para participar do Projeto de Pesquisa intitulado “Efeito da frequência de exposição ao mercúrio em populações ribeirinhas da região Amazônica: identificação de possíveis biomarcadores”, que será desenvolvido por mim, Nubya Gonçalves Cavallini (Bióloga, doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada/IBB - UNESP - Botucatu/SP), com orientação do Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha (Professor Associado do Departamento de Ciências Químicas e Biológicas do Instituto de Biociências da UNESP/Botucatu/SP).

Esta pesquisa envolve o desenvolvimento de um estudo sobre a frequência de exposição ao mercúrio em amostras de plasma de populações ribeirinhas da região de Jirau/rio Madeira, Rondônia/Brasil. A coleta de sangue será feita por profissionais capacitados a partir de uma pequena incisão na ponta do dedo com o auxílio de uma lanceta em um procedimento parecido como o teste rápido de açúcar no sangue (teste de glicemia). Após a incisão na ponta do dedo do participante, o sangue será coletado por aplicação de uma gota sobre um disco de coleta de um cartão, denominado *Noviplex™*. Serão utilizados seis cartões *Noviplex™* na coleta de sangue por participante. Assim, o volume total de sangue coletado será de seis (6) gotas por participante. Considerando o bem-estar físico, psíquico e emocional dos participantes, destacamos que todo o procedimento durante o processo da pesquisa é de baixo risco e pode causar um leve desconforto ou sensibilidade local na incisão da agulha na ponta do dedo no ato da coleta do sangue. O sangramento provocado pelo uso da agulha utilizada será somente o necessário para cobrir a área de teste dos cartões e não causará hemorragia, infecção e nenhuma outra alteração fisiológica. No que se refere à possibilidade de complicações e danos imediatos decorrentes da amostragem, como dor, mal-estar, lesão ou hematoma, será proporcionado assistência integral, imediata e gratuita por profissionais da área da saúde, sendo eles: um(a) médico(a), um(a) enfermeiro(a) e um(a) psicólogo(a). Não há risco de morte associado ou já relatado em estudos anteriores de mesma natureza. Este tipo de amostragem garante a todos os participantes que serão respeitados o anonimato, a integridade física, os valores culturais, sociais, morais, religiosos e éticos, bem como os hábitos e costumes quanto indivíduo e comunidade. Informamos ainda que, o sangue coletado será usado de imediato e em sua totalidade exclusivamente para o trabalho de pesquisa a ser realizado no Instituto de Biociências - UNESP, Botucatu-SP (IBB - UNESP). Ou seja, não serão guardadas ou armazenadas nenhuma amostra de sangue coletada para análises futuras ou com outro objetivo que não seja a análise de mercúrio. Entenda-se como imediato, o tempo transcorrido de transporte do sangue coletado nas comunidades próximas do rio Madeira/Rondônia para o IBB - UNESP na cidade de Botucatu/SP até a realização das análises.

Logo que chegarem ao Laboratório da UNESP, Botucatu-SP (IBB - UNESP), as amostras de sangue coletadas serão submetidas ao processo de separação do plasma. No plasma serão feitas análises de mercúrio, separação das proteínas e identificação de mercúrio ligado às proteínas. As proteínas com mercúrio ligado em suas estruturas serão posteriormente estudadas quanto a uma possível utilização como biomarcador de exposição ao mercúrio. Dessa forma, o objetivo principal da pesquisa é identificar nas amostras de sangue coletadas, proteínas que possam atuar como biomarcadores de exposição ao mercúrio. A participação no estudo proporcionará como benefício imediato ao participante, acesso ao resultado da análise do sangue coletado quanto a contaminação ou não por mercúrio. Como benefício futuro, o participante estará colaborando na identificação de biomarcadores de frequência de exposição ao mercúrio, os quais poderão permitir a identificação prévia e avaliações dos riscos de exposição ao mercúrio com elevada confiabilidade e possibilitando rápidas ações preventivas.

Vocês, integrantes das comunidades ribeirinhas, interessados em participar da pesquisa, serão entrevistados e responderão a um questionário de aproximadamente 20 minutos. Não haverá nenhum tipo de gravação de áudio e vídeo. O questionário apresentará somente questões escritas para a avaliação qualitativa da dieta e a verificação do consumo de peixe, e será utilizado como critério de inclusão ou exclusão do voluntário na pesquisa. No caso de qualquer desconforto, apreensão ou constrangimento quanto ao conteúdo ou modo de aplicação das perguntas, vocês têm o direito e a plena liberdade assegurada de não responder ao questionário

e, portanto, de não contribuir ou não permanecer na pesquisa. As comunidades ribeirinhas selecionadas para a participação nas entrevistas são dos municípios de Fortaleza do Abunã, Abunã e Nova Mutum Paraná. As entrevistas serão realizadas nos postos de saúde dos respectivos municípios nos dias 02, 03 e 04 de agosto de 2021. Os voluntários selecionados na etapa de entrevistas serão recrutados para a etapa de coleta de sangue, que será realizada nos dias 05, 06 e 07 de agosto de 2021, também nos postos de saúde dos respectivos municípios. Antes das entrevistas e preenchimento dos questionários, será feita uma reunião com todos vocês interessados em participar desta pesquisa a fim de esclarecer sobre a natureza da pesquisa, objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e incômodos que esta possa lhes acarretar e, igualmente, para garantir o repasse dos resultados obtidos com a pesquisa aos participantes pelo pesquisador responsável.

Os dados obtidos na pesquisa serão tratados de forma sigilosa. Somente o Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha e eu, Nubya Gonçalves Cavallini, poderemos vincular um resultado de análise com sua identidade. Para isso, logo após a coleta de sangue, o cartão *Noviplex™* será identificado por um número e uma ficha vinculada ao número com a identidade do participante será entregue ao Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha que manterá sob total sigilo todas as informações pessoais que constam na ficha, arquivando-as em seu escritório no IBB/UNESP. Para as publicações dos resultados, vocês participantes serão identificados pelo número que consta no cartão *Noviplex™* utilizado na coleta de sangue, sem qualquer demonstrativo de identidade.

Na divulgação dos resultados, o pesquisador responsável (Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha) entregará em mãos a cada um de vocês, um envelope lacrado com o resultado das análises de mercúrio no sangue e das proteínas identificadas como possíveis biomarcadores de exposição ao mercúrio. O pesquisador responsável (Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha), o patrocinador da pesquisa (Fundação de Instituto de Biociências - FUNDIBIO) e a Instituição participante da pesquisa (Instituto de Biociência - UNESP), garantem aos participantes da pesquisa nos quais forem identificados e evidenciados quaisquer problemas de saúde não identificados previamente, o direito ao acompanhamento e encaminhamento clínico gratuito. Reforçamos novamente, conforme informado no parágrafo 2, que um(a) médico(a), um(a) enfermeiro(a) e um(a) psicólogo(a) ficarão disponíveis para assistência imediata e gratuita a possíveis danos diretos e indiretos, como por exemplo, dor, mal-estar, lesão ou hematoma, que os voluntários podem estar expostos no processo de coleta de sangue. Os honorários dos profissionais disponibilizados para assistência imediata aos voluntários serão de responsabilidade do pesquisador responsável e do patrocinador.

Todos os custos com os procedimentos de coletas de sangue e com as análises da pesquisa serão de responsabilidade do pesquisador responsável (Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha) e do patrocinador da pesquisa (Fundação de Instituto de Biociências - FUNDIBIO). Os voluntários da pesquisa e seus acompanhantes não arcarão com nenhum custo financeiro direto ou indireto referente a procedimentos e/ou exames relacionados a pesquisa.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será elaborado em duas (2) vias de igual teor, o qual uma (1) via será entregue aos participantes devidamente rubricada, e a outra via será arquivada e mantida pelos pesquisadores por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Qualquer dúvida adicional, vocês participantes poderão entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, localizado na Chácara Butignolli s/n° em Rubião Júnior - Botucatu - São Paulo, através dos telefones (14) 3880-1608 ou (14) 3880-1609 de 2ª a 6ª feira das 8:00 às 12:00 e das 13:30 às 17:00. Os dados de localização dos pesquisadores envolvidos estão descritos logo abaixo.

Após terem sido sanadas todas as possíveis dúvidas a respeito deste estudo,

Eu CONCORDO em participar de forma voluntária, estando ciente que todos os meus dados estarão resguardados através do sigilo que os pesquisadores se comprometeram. Estou ciente que os resultados desse estudo poderão ser publicados em revistas científicas.

LOCAL, ____/____/____

Participante da Pesquisa

Pedro de Magalhães Padilha
Pesquisador Responsável
Endereço: Rua Professora Doutora Irina
Delanova Gemtchujnicov, s/n. Botucatu/SP
Telefone: (14) 3880-0609
E-mail: pedro.padilha@unesp.br

Nubya Gonçalves Cavallini
Doutoranda
Endereço: Rua Professora Doutora Irina
Delanova Gemtchujnicov, s/n. Botucatu/SP
Telefone: (14) 3880-0609
E-mail: nubya.cavallini@unesp.br

ANEXO II

QUESTIONARIO DE FREQUÊNCIA ALIMENTAR
FREQUÊNCIA RELATIVA DE INGESTÃO ALIMENTAR POR GRUPO

ENERGÉTICO

ALIMENTOS	(0) Nunca	(1) 3 a 6 vezes/sem	(2) 3 vezes/mês	(3) diariamente	(4) 1 a 2 vezes/sem	(5) Não respondeu	PONTOS
Refrigerantes							
Suco de frutas							
Chás							
Café							
Doces diversos							
Bolo							
Cereais integrais							
Biscoito doce							
Biscoito salgado							
Massas diversas							
Pão							

PROTÉICO

ALIMENTOS	(0) Nunca	(1) 3 a 6 vezes/sem	(2) 3 vezes/mes	(3) diariamente	(4) 1 a 2 vezes/sem	(5) Não respondeu	PONTOS
Feijão							
Carne de soja							
Carne de peixe							
Carne de frango							
Carne bovina							
Carne suína							
Ovos							
Queijos							
Iogurte							
Leite							

REGULADOR

ALIMENTOS	(0) Nunca	(1) 3 a 6 vezes/sem	(2) 3 vezes/mes	(3) diariamente	(4) 1 a 2 vezes/sem	(5) Não respondeu	PONTOS
Verduras							
Legumes							
Frutas							

NOME:

ANEXO III

A PESQUISA QUE EU FAÇO

Contaminação por mercúrio em populações ribeirinhas da região Amazônica: identificação de biomarcadores associados à frequência de exposição

PARA TODO MUNDO ENTENDER:
Como podemos identificar o mercúrio no corpo humano a partir da quantidade de peixe que comemos

80
Hg
Mercúrio
200.59

Nubya Gonçalves Cavallini
(PPG C. Biológicas - Genética)

Instituto de Biociências
Unesp Botucatu
60 ANOS

Card da série "A pesquisa que eu faço" que foi lançado ao longo do ano de 2023 em comemoração ao aniversário de 60 anos do Instituto de Biociências de Botucatu. Produzido durante o curso da disciplina "Divulgação Científica", em parceria com a Agência de Divulgação Científica e Comunicação do IBB, sob responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Adriane Pinto Wasko.