



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Instituto de Química - INQUI
Programa de Pós- Graduação em Química



Rafael Rodrigo Piva Vasconcelos

**ABORDAGEM METALOPROTEÔMICA DO MERCÚRIO EM
AMOSTRAS DE LEITE MATERNO NAS COMUNIDADES
RIBEIRINHAS DA REGIÃO AMAZÔNICA - BRASIL**

Prof. Dr. Felipe André dos Santos

Campo Grande – 2022



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Instituto de Química - INQUI
Programa de Pós- Graduação em Química



Rafael Rodrigo Piva Vasconcelos

**ABORDAGEM METALOPROTEÔMICA DO MERCÚRIO EM
AMOSTRAS DE LEITE MATERNO NAS COMUNIDADES
RIBEIRINHAS DA REGIÃO AMAZÔNICA - BRASIL**

Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação do
Instituto de Química da Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul, como
parte dos requisitos para a obtenção do
título de doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Felipe André dos Santos

Campo Grande – 2022



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



ATA DE DEFESA DE TESE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DOUTORADO

Aos dezoito dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e vinte e dois, às catorze horas, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Felipe André dos Santos (UFMS), Diovaney Doffinger Ramos (UFMS), Lincoln Carlos Silva de Oliveira (UFMS), Marco Antonio Utrera Martines (UFMS) e WELDER ANGELO BALDASSINI (UNESP), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho do aluno: RAFAEL RODRIGO PIVA VASCONCELOS, CPF 31086819829, do Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Doutorado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "ABORDAGEM METALOPROTEÔMICA DO MERCÚRIO EM AMOSTRAS DE LEITE MATERNO NAS COMUNIDADES RIBEIRINHAS DA REGIÃO AMAZÔNICA - BRASIL" e orientação de Felipe André dos Santos. O presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra ao aluno que expôs sua Tese. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, o presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR	AVALIAÇÃO
Dr. Felipe André dos Santos (Interno)	APROVADO
Dra. Ana Camila Micheletti (Interno) (Suplente)	
Dr. Aroldo Geraldo Magdalena (Externo) (Suplente)	
Dr. Diovaney Doffinger Ramos (Externo)	APROVADO
Dr. Lincoln Carlos Silva de Oliveira (Interno) (Coorientador)	APROVADO
Dr. Marco Antonio Utrera Martines (Interno)	APROVADO
Dr. WELDER ANGELO BALDASSINI (Externo)	APROVADO

RESULTADO FINAL:

Aprovação	
Aprovação com revisão	X
Reprovação	

OBSERVAÇÕES:

Nada mais havendo a ser tratado, o Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

Assinaturas:

Presidente da Banca Examinadora

Aluno



Documento assinado eletronicamente por **Lincoln Carlos Silva de Oliveira, Professor do Magisterio Superior**, em 18/02/2022, às 16:57, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Diovany Doffinger Ramos, Professor do Magisterio Superior**, em 18/02/2022, às 16:58, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marco Antonio Utrera Martines, Professor do Magisterio Superior**, em 18/02/2022, às 16:59, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Felipe André dos Santos, Usuário Externo**, em 18/02/2022, às 16:59, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Welder Angelo Baldassini, Usuário Externo**, em 18/02/2022, às 17:00, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Rodrigo Piva Vasconcelos, Usuário Externo**, em 21/02/2022, às 08:54, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3050651** e o código CRC **E5C74774**.

COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Av Costa e Silva, s/nº - Cidade Universitária

23/02/2022 10:39

SEI/UFMS - 3050651 - Ata

Fone:

CEP 79070-900 - Campo Grande - MS

Referência: Processo nº 23104.001552/2022-96

SEI nº 3050651

Dedico à minha esposa Mayara, por cuidar da nossa família e do nosso lar nos
momentos em que me dedicava aos estudos.

Dedico aos meus filhos Rodrigo e Helena que são fontes de amor de onde tiro
força para sempre continuar.

Dedico também à minha mãe, ao meu pai e à minha irmã por todo o amor e
incentivo.

Sem vocês nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Química da UFMS de Campo Grande-MS pela estrutura e professores que me acompanharam nesses últimos anos.

Ao Departamento de Ciências Químicas e Biológicas da Unesp de Botucatu-SP pela estrutura disponibilizada.

À Faculdade de Ciências e Engenharia de Tupã pela estrutura disponibilizada.

Às empresas Venturo Consultoria Ambiental e Venturo Análises Ambientais pelos profissionais e estrutura disponibilizados.

À FAPESP e ao CNPQ por financiarem e tornar possível a execução do projeto.

À CAPES pela bolsa concedida.

Ao professor e amigo Dr. Ademir dos Santos por ter me incentivado a iniciar esse projeto.

Ao Prof. Dr. Felipe André dos Santos pela orientação, confiança e amizade.

Ao Dr. José Cavalcante pelas contribuições.

Ao Dr. Welder Baldassini pelas contribuições.

Aos membros da banca de qualificação Prof. Pedro Padilha e Prof. Lincoln Oliveira que muito contribuíram na etapa final do trabalho.

Aos amigos do Laboratório Venturo Análises Ambientais e Biolaqua Ambiental.

Aos amigos da turma da 2002 do IQSC.

RESUMO

Dada a problemática de contaminação por mercúrio por fontes naturais e antrópicas na região estudada, neste trabalho buscou-se identificar e caracterizar possíveis biomarcadores de proteínas do leite materno, ligadas ao mercúrio, a fim de possibilitar uma indicação prévia de contaminação por esse metal em lactantes. Foram realizadas coletas de 23 amostras de leite e de cabelo de lactantes ribeirinhas das comunidades de Livramento-AM – Rio Negro e Abunã-RO, Fortaleza de Abunã-RO, Nova Mutum Paraná-RO e Vila da Penha-RO – Rio Madeira. A quantificação de mercúrio total nas amostras de leite foi realizada por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) e os resultados ficaram entre $6,03 \pm 0,48$ e $83,49 \pm 1,08 \mu\text{g L}^{-1}$. Já a concentração de mercúrio total nas amostras de cabelo foi realizada utilizando-se a técnica de absorção atômica dedicado a amostras sólidas – SMS 100 da Perkin Elmer, e os resultados ficaram entre $0,33 \pm 0,005$ e $6,53 \pm 0,04 \text{ ng g}^{-1}$. O processo de fracionamento do proteoma foi feito por eletroforese bidimensional - 2D PAGE, com duas repetições por amostra. O número de *spots* proteicos separados ficou entre 92 ± 2 e 347 ± 3 . A correlação média entre os géis (*matching*) ficou entre 75,5 e 94,5%. As distribuições dos *spots* em relação aos pontos isoelétricos e massa molecular apresentaram uma distribuição homogênea distribuídos na faixa de 4 a 9 (ponto isoelétrico) e entre 15 a 75 kDa (massa molecular). O mapeamento do mercúrio nos *spots* proteicos realizado por GFAAS indicaram concentrações na faixa de 0,0011 e 0,0158 ng/mL. Os *spots* associados ao mercúrio foram caracterizados por espectrometria de massa em sequência acoplada com cromatografia líquida - LS-MS/MS. Em 35% dos *spots* foi identificada a Beta-casein O, 35% a Immunoglobulin kappa constant OS, 26% a Alpha-S1-casein OS e 4% a Immunoglobulin J chain. Essas proteínas foram as mais expressas quando em contato com o mercúrio, podendo ser possíveis biomarcadoras do mercúrio no leite materno.

Palavras-chave: Mercúrio, leite materno, metaloproteínas, biomarcadores, eletroforese bidimensional, espectrometria de absorção atômica, espectrometria por eletrospray acoplada a massas.

ABSTRACT

Given a problematic characterization of differentiation through natural sources and identified by natural sources of identification, in these possible works, linked to, an indication of natural protein markers by this metal in lactating women. Twenty-three samples of milk and hair were collected from riverine lactating women from the communities of Livramento-AM – Rio Negro and Abunã-RO, Fortaleza de Abunã-RO, Nova Mutum Paraná-RO and Vila da Penha-RO – Rio Madeira. The quantification of total mercury in the milk samples was performed by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS) and the results were between 6.03 ± 0.48 and $83.49 \pm 1.08 \mu\text{g L}^{-1}$. As for the total reference concentration in the hair samples, the absorption technique was performed using the optics dedicated to continuous samples – Perkin Elmer's SMS 100, and the results were between 0.33 ± 0.005 and 6.04 ng g^{-1} . The proteome fractionation process was performed by two-dimensional electrophoresis - 2D PAGE, with two replications per sample. The number of separate protein spots was between 92 ± 2 and 347 ± 3 . The apparently average between the gels was between 75.5 and 94.5%. As points in relation to isoelectric points and molecular mass, a distributed distribution of distributors⁹ (isoelectric point) between 15 to 7kDa (molecular mass). The mercury in the spots performed by GFAAS indicated mapping in the range of 0.011 and 0.0158 ng/mL. The points associated with mercury were characterized by sequence mass spectrometry coupled with liquid chromatography - LS-MS/MS. Beta-casein O was identified in 35% of the spots, 35% the constant kappa immunoglobulin OS, 26% the alpha-S1-casein OS and 4% the immunoglobulin chain. These proteins were in contact with the most expressed, and may be possible biomarkers of breast milk.

Keywords: Mercury, breast milk, metalproteins, biomarkers, two-dimensional electrophoresis, atomic absorption spectrometry, mass-coupled electrospray spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Dados do observatório do mercúrio (WWF-BRASIL; FIOCRUZ; CINCIA, 2021) - Visualização georreferenciada da contaminação de peixes e humanos por mercúrio (WWF-BRASIL; FIOCRUZ; CINCIA, 2021).	21
Figura 2. Pesquisa no portal de periódicos da CAPES/MEC. Filtro utilizado: No título - Metallomics ou Metallomic. Fonte: Autoria própria	23
Figura 3. Pesquisa no portal de periódicos da CAPES/MEC. Filtro utilizado: No título - <i>Metal</i> e <i>Protein</i> . Fonte: Autoria própria.....	24
Figura 4. Sobrevoos registram áreas de garimpos ilegais dentro da Terra Indígena Yanomami, em Roraima, em abril de 2021. Foto: CHRISTIAN BRAGA / GREENPEACE	25
Figura 5. Gráfico do desmatamento da Amazônia legal entre 1988 e 2020. (INPE, 2021)	26
Figura 6. Desmatamento na região de Rondônia. Acima, foto de satélite em 1988. Abaixo, foto de satélite em 2018. (QUADROS; ZANLORENSSI; MAIA, 2021)	27
Figura 7. Matriz por origem de combustível (ANEEL, 2021)	28
Figura 8. À esquerda, vinte e duas usinas hidrelétricas em operação na bacia do Vinte e duas usinas em operação na Bacia do Madeira. À direita, cinco usinas hidrelétricas em fase de construção ou em estudo na Bacia do Madeira (ANEEL, 2021).	29
Figura 9. Bioacumulação e Biomagnificação do mercúrio orgânico. Fonte: própria.	30
Figura 10. Toxicidade das formas de mercúrio – inorgânicas menos tóxicas e orgânicas mais tóxicas. Fonte: Própria.	30
Figura 11. Crianças com a doença congênita de Minamata devido à exposição ao metilmercúrio intrauterino. Foto: Modificado de HARADA, 1986.....	32
Figura 12. Evolução - Genômica, Proteômica e Metalômica. Fonte: Própria ...	34
Figura 13. Esquema simplificado de um espectrômetro de absorção atômica (PERKIN ELMER, 2008).	38
Figura 14. Esquema simplificado de um espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite (PERKIN ELMER, 2008).	39
Figura 15. Funcionamento do equipamento SMS 100 da Perkin Elmer (PERKIN ELMER, [s.d.]).....	40

Figura 16. Diagrama esquemático da fonte de íons eletrospray acoplado a um espectrômetro de massas Tandem (ESI-MS/MS) (CAVECCI, 2014).....	45
Figura 17. Área de estudo	47
Figura 18. Coleta de cabelo e leite.....	50
Figura 19. Focalização isoelétrica (Amersham Biosciences)	54
Figura 20. Corrida eletroforética em primeira dimensão	55
Figura 21. Corrida eletroforética em segunda dimensão.....	56
Figura 22. Passo a passo 2D-PAGE	56
Figura 23. Tratamento das imagens.....	58
Figura 24. Espectrômetro de absorção atômica dedicado para quantificação de mercúrio em amostras sólidas – equipamento SMS 100 da Perkin Elmer.....	59
Figura 25. Espectrômetro de Fluorescência Atômica, MERX da BrooksRand. 1 (amostrador automático); 2 (módulo mercúrio total); 3 (módulo para especiação de mercúrio); 4 (detector por CV-AFS).....	60
Figura 26. Purga das amostras com argônio. (VASCONCELOS, 2016)	61
Figura 27. Funcionamento do módulo mercúrio total para quantificação por fluorescência atômica. Fonte: (BROOKS RAND INSTRUMENTS, [s.d.]) Adaptada	61
Figura 28. Processamento dos <i>spots</i> proteicos para posterior quantificação de mercúrio total.....	62
Figura 29. Concentração de mercúrio total em amostras de leite de lactantes residentes em comunidades do alto Rio Madeira, Rondônia e alto Rio Negro, Amazonas.	68
Figura 30. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 22.....	70
Figura 31. Correlações das repetições dos géis entre o volume normalizado (%V) dos <i>spots</i> dos pares do gel da amostra da lactante 22.	73
Figura 32. Géis referentes as amostras da lactante 7, 9, 12, 21, 28, 29 e 30 com respectivos <i>spots</i> com a presença de Hg identificados.....	75
Figura 33. Proteínas de maior score identificadas nos <i>spots</i> proteicos por LC/ESI-MS/MS	80
Figura 34. Estrutura molecular obtida pelo UniprotKB da Beta-caseína e sua expressão com e sem a presença do mercúrio.....	81

Figura 35. Ilustração que descreve as interações de ligação de alta afinidade entre íons mercúrio e grupos tiol eletrofilicos (ou seja, cisteína). Com ligações putativas do íon mercúrio a grupos de cisteína (Cys) (PÉREZ; SHAH; BUTLER, 2020).	82
Figura 36. Estrutura molecular obtida pelo UniprotKB da Imunoglobulina Kappa constat e sua expressão com e sem a presença do mercúrio.....	83
Figura 37. Estrutura molecular obtida pelo UniprotKB da Alfa-caseína e sua expressão com e sem a presença do mercúrio.....	85
Figura 38. Estrutura molecular obtida pelo UniprotKB da Imunoglobulina J Chain, destacada cadeia leve, e sua expressão com e sem a presença do mercúrio.	86
Figura 39. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 1.....	95
Figura 40. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 2.....	95
Figura 41. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 3.....	96
Figura 42. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 4.....	96
Figura 43. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 5.....	96
Figura 44. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 6.....	97
Figura 45. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 7.....	97
Figura 46. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 8.....	97
Figura 47. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 9.....	98
Figura 48. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 10.....	98
Figura 49. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 11.....	98
Figura 50. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 12.....	99

Figura 51. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 21.....	99
Figura 52. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 22.....	99
Figura 53. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 24.....	100
Figura 54. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 25.....	100
Figura 55. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 26.....	100
Figura 56. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 27.....	101
Figura 57. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 28.....	101
Figura 58. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 29.....	101
Figura 59. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 30.....	102
Figura 60. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 31.....	102
Figura 61. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 32.....	102
Figura 62. Correlações das repetições dos géis entre o volume normalizado (%V) dos <i>spots</i> dos pares do gel da amostra da lactante 1 (à esquerda) e 2 (à direita)	103
Figura 63. Correlações das repetições dos géis entre o volume normalizado (%V) dos <i>spots</i> dos pares do gel da amostra da lactante 3 (à esquerda) e 4 (à direita)	103
Figura 64. Correlações das repetições dos géis entre o volume normalizado (%V) dos <i>spots</i> dos pares do gel da amostra da lactante 5 (à esquerda) e 6 (à direita)	104
Figura 65. Correlações das repetições dos géis entre o volume normalizado (%V) dos <i>spots</i> dos pares do gel da amostra da lactante 7 (à esquerda) e 8 (à direita)	104

Figura 66. Correlações das repetições dos géis entre o volume normalizado (%V) dos <i>spots</i> dos pares do gel da amostra da lactante 9 (à esquerda) e 10 (à direita)	105
Figura 67. Correlações das repetições dos géis entre o volume normalizado (%V) dos <i>spots</i> dos pares do gel da amostra da lactante 11 (à esquerda) e 12 (à direita)	105
Figura 68. Correlações das repetições dos géis entre o volume normalizado (%V) dos <i>spots</i> dos pares do gel da amostra da lactante 21 (à esquerda) e 22 (à direita)	106
Figura 69. Correlações das repetições dos géis entre o volume normalizado (%V) dos <i>spots</i> dos pares do gel da amostra da lactante 24 (à esquerda) e 25 (à direita)	106
Figura 70. Correlações das repetições dos géis entre o volume normalizado (%V) dos <i>spots</i> dos pares do gel da amostra da lactante 26 (à esquerda) e 27 (à direita)	107
Figura 71. Correlações das repetições dos géis entre o volume normalizado (%V) dos <i>spots</i> dos pares do gel da amostra da lactante 28 (à esquerda) e 29 (à direita)	107
Figura 72. Correlações das repetições dos géis entre o volume normalizado (%V) dos <i>spots</i> dos pares do gel da amostra da lactante 30 (à esquerda) e 31 (à direita)	108
Figura 73. Correlações das repetições dos géis entre o volume normalizado (%V) dos <i>spots</i> dos pares do gel da amostra da lactante 32	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Métodos mais frequentemente utilizados para a quantificação de mercúrio e seus respectivos limites de detecção (MICAROLI; BUENO; JARDIM, 2000).	36
Tabela 2. Programa utilizado na separação eletroforética em primeira dimensão (IEF) para fitas com gradiente de pH de 3 a 10.....	54
Tabela 3. Programa utilizado na separação eletroforética em segunda dimensão (2D-PAGE) para separação das proteínas por massa molecular.....	56
Tabela 4. Concentração de mercúrio total em amostras de cabelo de lactantes residentes em comunidades do alto rio Madeira, Rondônia e alto Rio Negro, Amazonas.	65
Tabela 5. Concentração de mercúrio total em amostras de leite de lactantes residentes em comunidades do alto Rio Madeira, Rondônia e alto Rio Negro, Amazonas.	67
Tabela 6. Resultados obtidos da análise de correlação entre as repetições das 24 amostras analisadas	71
Tabela 7. Concentração de mercúrio nos <i>spots</i> proteicos com sua respectiva massa molecular, PI, massa de proteína, obtidos no fracionamento de proteínas por 2D PAGE da amostra de leite das lactantes.	76
Tabela 8. Proteínas identificadas utilizando LC/ESI-MS/MS.....	78
Tabela 9. Proteínas de maior score identificadas nos <i>spots</i> proteicos por LC/ESI-MS/MS	79

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Por cento
$\mu\text{g L}^{-1}$	Microgramas por litro
$\mu\text{L min}^{-1}$	Micrograma por minuto
CAS	Chemical Abstracts Service
CVAAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Vapor frio
CVAFS	Espectrometria de Fluorescência Atômica com Vapor frio
DPI	Pontos por polegadas
g kg^{-1}	Grama por quilo
g mL^{-1}	Grama por mililitro
g mol^{-1}	Grama por mol
g	Grama
GFAAS	Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite
IEF	Focalização isoelétrica
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
kDa	Quilodalton
kV	Quilovolt
L	Litro
m/v	Massa/volume
m	Metro
mA	Miliampere
mg g^{-1}	Miligrama por grama
mg kg^{-1}	Miligrama por quilo
mg L^{-1}	Miligramas por litro
min	Minuto
mL	Mililitro
MM	Massa molecular
mol L^{-1}	Mol por litro
MTs	Metalotioneínas
mV:	Milivolt
ng g^{-1}	Nanograma por grama
ng L^{-1}	Nanograma por litro
ng mL^{-1}	Nanograma por mililitro

LISTA DE ABREVIATURAS

OMS	Organização Mundial de Saúde
pH	Potencial de hidrogênio
PI	Ponto isoelétrico
RPM	Rotações por minuto
SDS	Detergente docecil sulfato de sódio
SNC	Sistema Nervoso Central
T	Temperatura
v/v	Volume/volume
V	Volt
W	Watt
μL	Microlitros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
1.1	Justificativa.....	20
1.2	Problemática do mercúrio no Rio Madeira	24
1.3	Mercúrio – Fonte Antrópica e Natural.....	25
1.4	O desmatamento e a geração de energia hidrelétrica.....	26
1.5	Toxicidade do mercúrio	29
1.6	A toxicidade do mercúrio e o aleitamento materno	31
1.7	Biomarcadores	33
1.8	Os metais e as proteínas	33
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	35
2.1	Quantificação de mercúrio	35
2.1.1	Espectrometria de fluorescência atômica com geração de vapor frio	37
2.1.2	Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (GFAAS)	37
2.1.3	Espectrometria de Absorção Atômica com decomposição térmica e amalgamação em coluna de areia de ouro	40
2.2	Estudo proteômico	41
2.2.1	Eletroforese	41
2.2.2	Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE). ..	42
2.2.3	Eletroforese no estudo do leite materno	42
2.2.4	Digestão Tripídica.....	43
2.2.5	Espectrometria de massas com ionização por <i>eletrospray</i> (ESI- MS/MS).....	44
3	OBJETIVOS.....	45
3.1	Objetivo Geral	45
3.2	Objetivos específicos	45
4	MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1	Trabalhos de Campo.....	46
4.2	Equipamentos e acessórios	50
4.3	Reagentes e soluções.....	51
4.4	Determinação da concentração de proteína total.....	53

4.5	Separações eletroforéticas.....	53
4.6	Tratamento de imagens	57
4.7	Determinação de mercúrio total nas amostras de cabelo	59
4.8	Determinação de mercúrio total em leite por Fluorescência Atômica .	59
4.9	Determinação de mercúrio total nas amostras de leite materno, nos pellets e <i>spots</i> proteicos.....	62
4.10	Digestão trípica dos <i>spots</i> proteicos e identificação das proteínas por LC/ESI-MS/MS.....	63
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	65
5.1	Exposição ao mercúrio.....	65
5.1.1	Mercúrio total em amostras cabelo.....	65
5.1.2	Mercúrio total em amostras de leite.....	66
5.2	Determinação de proteína total	69
5.3	Eletroforese Bidimensional 2D-PAGE	70
5.4	Quantificação de Hg nos <i>spots</i> proteicos	74
5.5	Caracterização das proteínas	77
5.5.1	Proteínas de maior score identificadas.....	79
6	CONCLUSÃO	86
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
8	ANEXO 1 – Géis obtidos nas corridas eletroforéticas	95
9	ANEXO 2 – Correlações das repetições dos géis	103

1 INTRODUÇÃO

1.1 Justificativa

Dados do observatório do mercúrio (WWF-BRASIL; FIOCRUZ; CINCIA, 2021), plataforma georreferenciada desenvolvida pela WWF-Brasil, Fiocruz (Fundação Oswaldo Cruz), *CINCIA (Centro de Innovación Científica Amazónica)* e outras instituições, que reúne estudos e informações sobre contaminação do mercúrio na região Pan-Amazônica entre os anos de 1980 e 2021, permite a visualização, em forma georreferenciada, da problemática da contaminação de peixes e humanos por mercúrio – Figura 1.

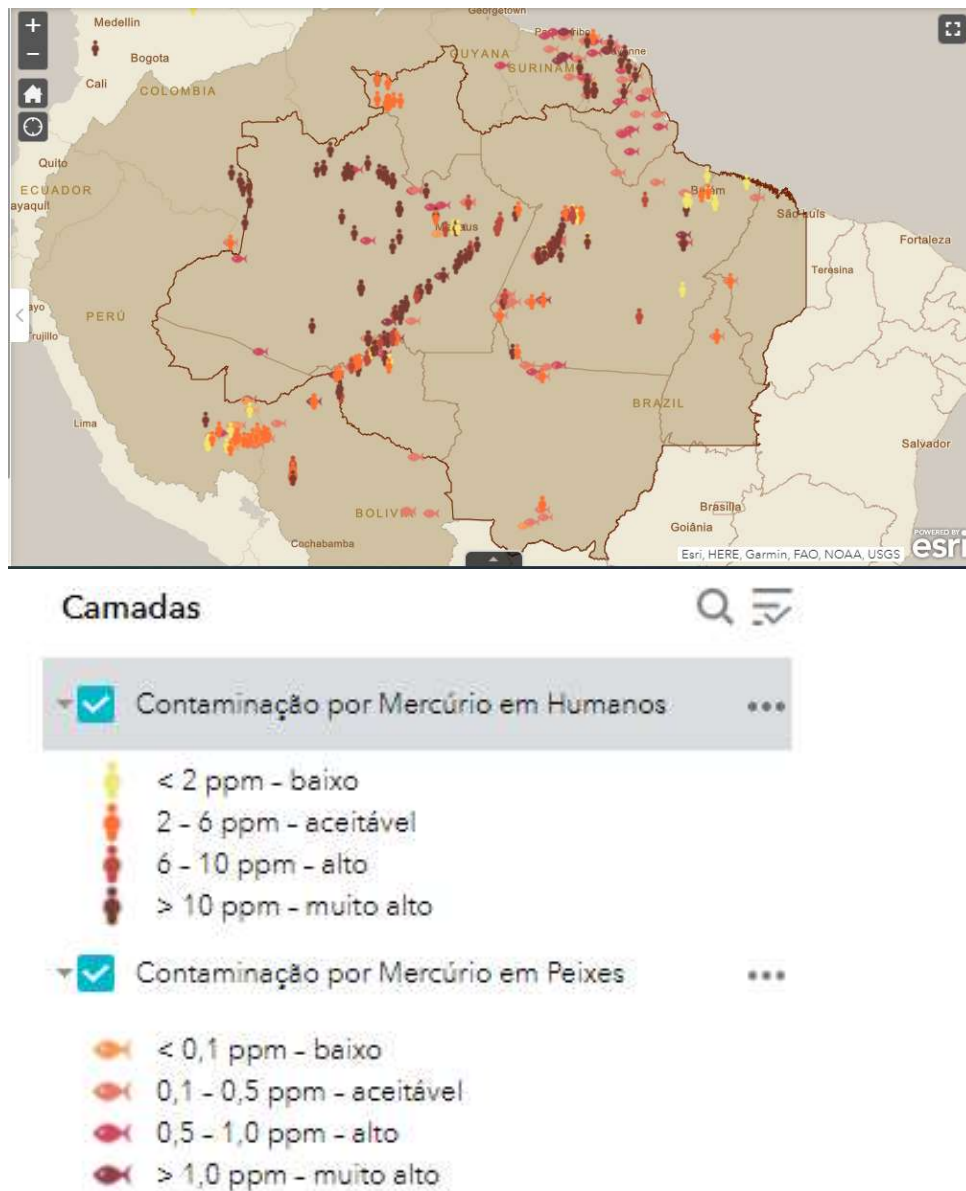


Figura 1. Dados do observatório do mercúrio (WWF-BRASIL; FIOCRUZ; CINCIA, 2021) - Visualização georreferenciada da contaminação de peixes e humanos por mercúrio (WWF-BRASIL; FIOCRUZ; CINCIA, 2021).

A poluição por mercúrio na bacia do Rio Negro-AM, região habitada por comunidades ribeirinhas, apresenta nos dias atuais um sério problema socioambiental na região, podendo, neste sentido, ser considerada uma região que apresenta características de um laboratório natural, na qual o presente estudo pode ser referência para a região. Os problemas ambientais nessa região causados pelo mercúrio, proveniente do garimpo de ouro, nas décadas de 80 e 90, volta a ser discutido entre os pesquisadores devido ao grande potencial de contaminação que ainda representa para a sociedade (AMORIM et al., 2000).

Inicialmente essas altas concentrações de mercúrio identificadas em sedimentos, solos, peixes e humanos foram atribuídas à atividade de garimpo. Entretanto, pesquisas recentes mostram que as elevadas concentrações de mercúrio nos sistemas bióticos e abióticos são também identificadas em locais que não possui esse tipo de atividade, de extração de ouro, e nem outros tipos de ações antrópicas. Independentemente da fonte de contaminação, pesquisas direcionadas ao esclarecimento dos processos químicos e biológicos da toxicidade do mercúrio são de fundamental importância para o avanço socioambiental desta região (ROULET et al., 2000).

O processo de metilação do mercúrio, no qual ocorre a transformação da sua forma inorgânica na orgânica (metilmercúrio), nos ambientes aquáticos é bem conhecida e também responsável por tornar viável a exposição e contaminação humana pelo consumo de peixes contaminados, sendo que o pescado é a principal fonte de nutrição das comunidades ribeirinhas do Rio Negro-AM. Nos mamíferos, o leite materno é uma via de excreção e pode ser uma via de exposição de compostos tóxicos, como o mercúrio, aos lactentes caso a mãe tenha sido contaminada pelo metal (AL-SALEH et al., 2013; CUNHA; COSTA; CALDAS, 2013; MOLINA-VILLALBA et al., 2015).

Algumas proteínas como as metalotioneínas apresentam grande afinidade por metais tóxicos, como o cádmio, chumbo, arsênio e mercúrio, o que permite que essas metaloproteínas atuem como inibidoras da ação tóxica dessas espécies metálicas. A literatura destaca que a expressão dessas proteínas pelos diferentes organismos está diretamente ligada à absorção dos metais potencialmente tóxicos – destacando-se o cádmio e o mercúrio – ou com a absorção em excesso de metais essenciais – como o zinco e o cobre (NORDBERG, 1998).

Considerando o exposto, estudos relacionados ao desenvolvimento de biomarcadores de expressões de metaloproteínas ligadas ao mercúrio poderão demonstrar previamente os riscos de contaminação da população ribeirinha da região do Rio Negro-AM. Nesse sentido, a metalômica, como área de pesquisa, contempla estudos analíticos, biológicos e bioquímicos, abrangendo os sequenciamentos, expressão e a caracterização de proteínas ligadas e/ou associadas a metais. Esta inovadora área que está crescendo rapidamente nos últimos anos (Figuras 2 e 3) vem contribuindo no esclarecimento tanto nos

aspectos funcionais quanto fisiológicos das metaloproteínas ou proteínas ligadas aos metais nos organismos vivos (HARAGUCHI, 2004). O esclarecimento de espécies mercuriais complexadas por proteínas utilizando análises metalômica e de especiação permitirá pesquisas sobre possíveis aumento ou diminuição de expressão dessas proteínas, frente às alterações fisiológica do leite e disponibilidades das espécies mercuriais no ambiente, fornecendo informações importantes em relação ao transporte de mercúrio nos seres humanos.

A Figura 2 traz um gráfico das publicações científicas, disponíveis no portal da CAPES/MEC (“Portal de Periódicos Capes/MEC,” 2021) com estudos contendo em seus títulos “Metallomics” ou “Metallomic”. Observa-se que se tratam de estudos relativamente novos, iniciados na década de 2000 e com aumento a partir de 2009, mantendo desde esse ano com uma média de 165 publicações/ano.

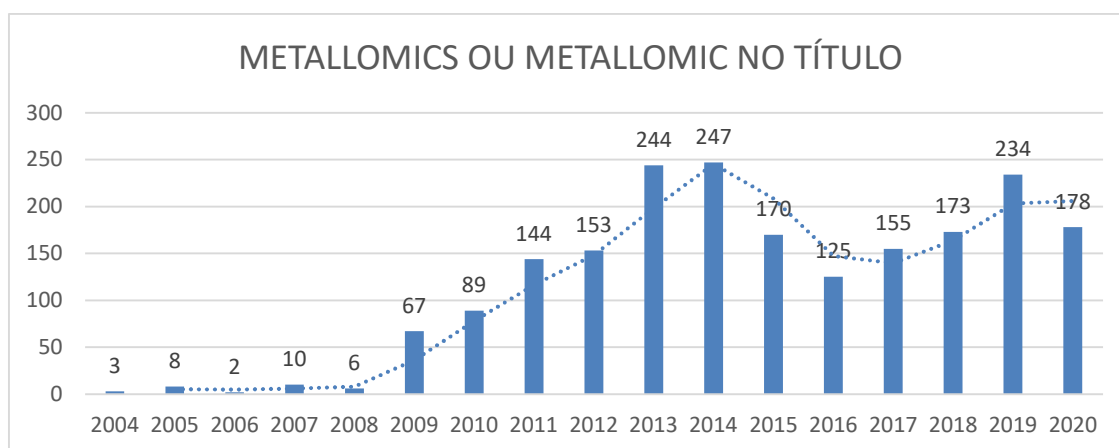


Figura 2. Pesquisa no portal de periódicos da CAPES/MEC. Filtro utilizado: No título - Metallomics ou Metallomic. Fonte: Autoria própria

A Figura 3 traz um gráfico das publicações científicas, disponíveis no portal da CAPES/MEC (“Portal de Periódicos Capes/MEC,” 2021) com estudos contendo em seus títulos “Metal” e “Protein”. Observa-se que se tratam de estudos que se iniciaram na década de 1990 e que vem crescendo de forma contínua desde então.

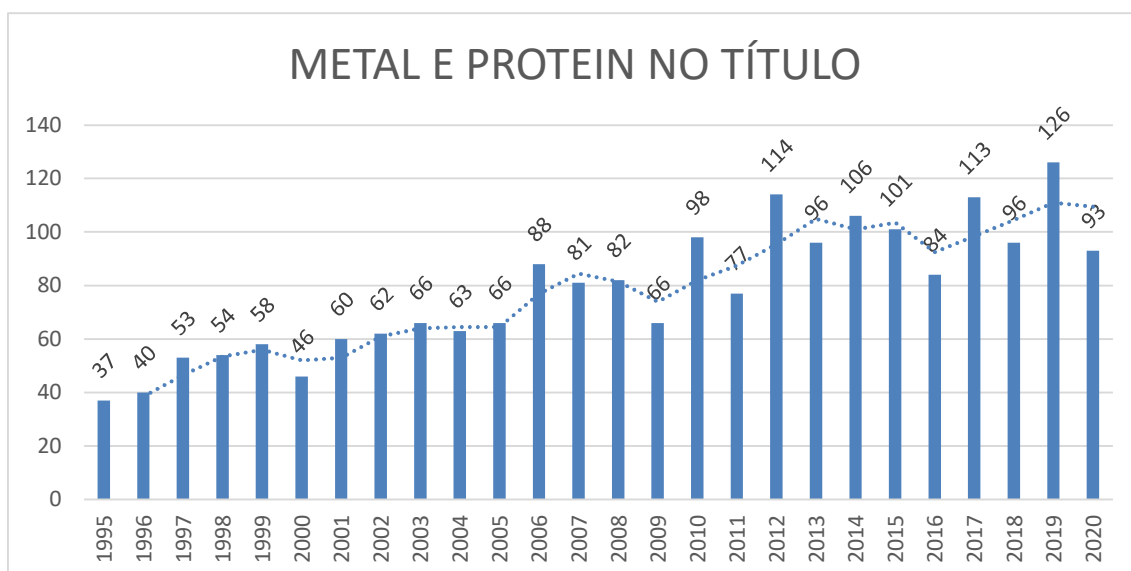


Figura 3. Pesquisa no portal de periódicos da CAPES/MEC. Filtro utilizado: No título - *Metal* e *Protein*. Fonte: Autoria própria

1.2 Problemática do mercúrio no Rio Madeira

O Rio Madeira é considerado o 17º maior rio em extensão no mundo, contendo 3.315 km, sendo um dos principais afluentes do Rio Amazonas, banhando os estados de Rondônia e Amazonas. Sua nascente está localizada na Cordilheira dos Andes, na Bolívia, sendo denominado na região como Rio Beni. Seu curso d'água segue descendo ao norte, passando por inúmeras cadeias de montanhas, encontra com o Rio Mamoré-Guaporé, tornando-se, então, o Rio Madeira, já em solo brasileiro (CEMADEN, 2018).

O Rio Madeira representa um importante recurso hidrelétrico tanto para o Brasil, contemplando as usinas de Jirau e Santo Antônio, quanto para a Bolívia, contemplando a usina de Cachuela Esperanza. Sua representatividade e importância vai além da capacidade de geração de energia, uma vez que também é utilizado pela população em geral da região para pesca, irrigação agrícola, transporte hidroviário e extração de minérios (JABUR, 2016).

A atividade garimpeira de ouro na região do Rio Madeira, e no próprio rio, teve início por volta de 1978, abrigoando 192 km² da região, sendo regularizada pelo Ministério de Minas e Energia, que criou a Reserva Garimpeira do Rio Madeira. A extração via garimpo desenvolveu-se no local por meio de balsas e dragas nas laterais do rio, com tratores de esteiras e bombas de pressão (AIRES, 2004).

O processo extrativista do ouro, pelo processo de amalgamação com mercúrio, sendo utilizado de forma desenfreada e desequilibrada por quase três décadas trouxe como consequência a contaminação por mercúrio do solo, água e do ar, chegando até a população da região (MEIRELLES, 2004).

1.3 Mercúrio – Fonte Antrópica e Natural

Estudos das últimas décadas demonstram que as águas e peixes de algumas regiões da Amazônia tem histórico de contaminação por mercúrio. Acreditava-se que essa contaminação era proveniente apenas das atividades do garimpo de ouro – Figura 4, que introduziu na região de 1980 a 2013 cerca de 200.000 toneladas de mercúrio .



Figura 4. Sobrevoio regista áreas de garimpos ilegais dentro da Terra Indígena Yanomami, em Roraima, em abril de 2021. Foto: CHRISTIAN BRAGA / GREENPEACE

Na década de 2000, Olalf Malm e Wilson Jardim estudaram regiões do Rio Negro sem atividades garimpeiras e, identificaram concentrações de mercúrio entre cinco e dez vezes maiores das identificadas regiões de garimpo, como no Madeira. As formações rochosas vulcânicas dos Andes - sul do Peru, onde nasce, são ricas em mercúrio e, então, concluem que as altas

concentrações de mercúrio identificadas no rio tem mais influência natural que antrópica (FADINI; JARDIM, 2001).

A propriedade de se volatilizar do Hg para a atmosfera, representa um risco invisível e perigoso, sendo os solos de floresta o principal depósito deste vapor de mercúrio, sendo repassado para a atmosfera, e os mais altos índices deste vapor são identificados próximos as partes do rio em que era intensa a atividade mineradora (BASTOS et al., 2008).

1.4 O desmatamento e a geração de energia hidrelétrica

Independentemente de a fonte de mercúrio ser natural ou antrópica, ações humanas como o desmatamento e a construção de barragens para a geração de energia elétrica podem agravar a problemática e, por isso, devem ser monitorados.

A retirada da mata altera o equilíbrio do mercúrio na natureza. Dados do Inpe (INPE, 2021) – Figura 5, trazem que após picos históricos de desmatamento na Amazônia legal de 29.100 km² em 1995 e 27.800 km² em 2004, observou-se uma redução na ordem de 504% após 10 (dez) anos – 5.000 km² em 2014. Porém, nos últimos 5 (cinco) anos – entre 2015 e 2020, o aumento do desmatamento foi da ordem de 118%, atingindo 10.900 km² em 2020.

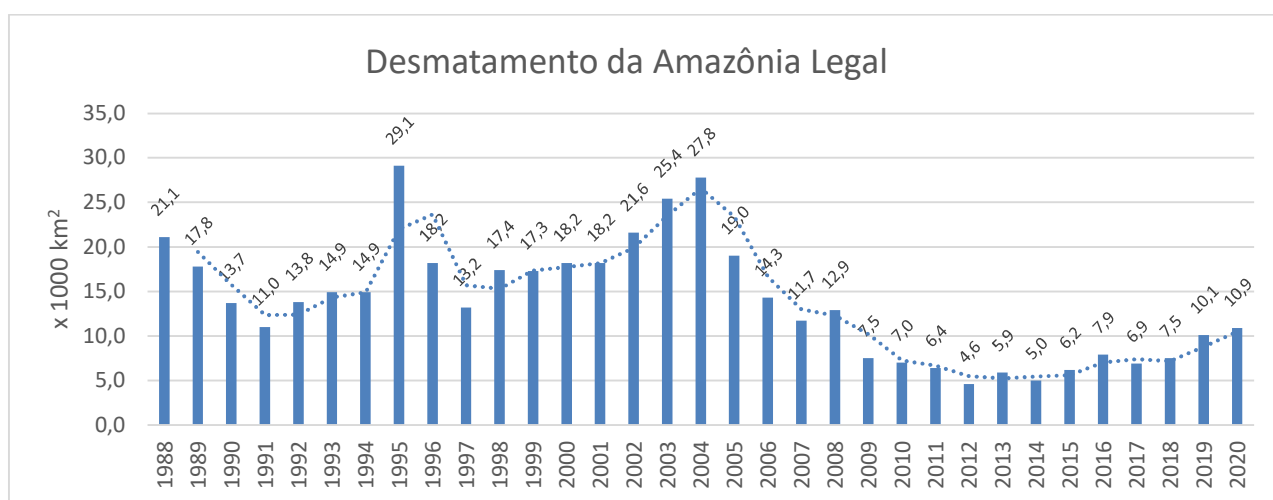


Figura 5. Gráfico do desmatamento da Amazônia legal entre 1988 e 2020. (INPE, 2021)

O resultado de 2020 contraria compromissos diplomáticos, políticos e legais assumidos pelo governo brasileiro nos últimos anos. O decreto 9.578/2018

(DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO - SEÇÃO 1 - 23/11/2018, 2018), que trata da Política Nacional sobre Mudança do Clima (PNMC), estimava 3.900 km² de desmatamento da Amazônia legal em 2020 e, o valor atingido é 180% maior.

O aumento no desmatamento deixa o solo mais exposto – Figura 6, podendo alterar o ciclo natural do mercúrio, aumentando a lixiviação de mercúrio natural para os rios e a evaporação do mercúrio para a atmosfera, que se espalha por meio das chuvas, podendo contaminar uma vasta região.

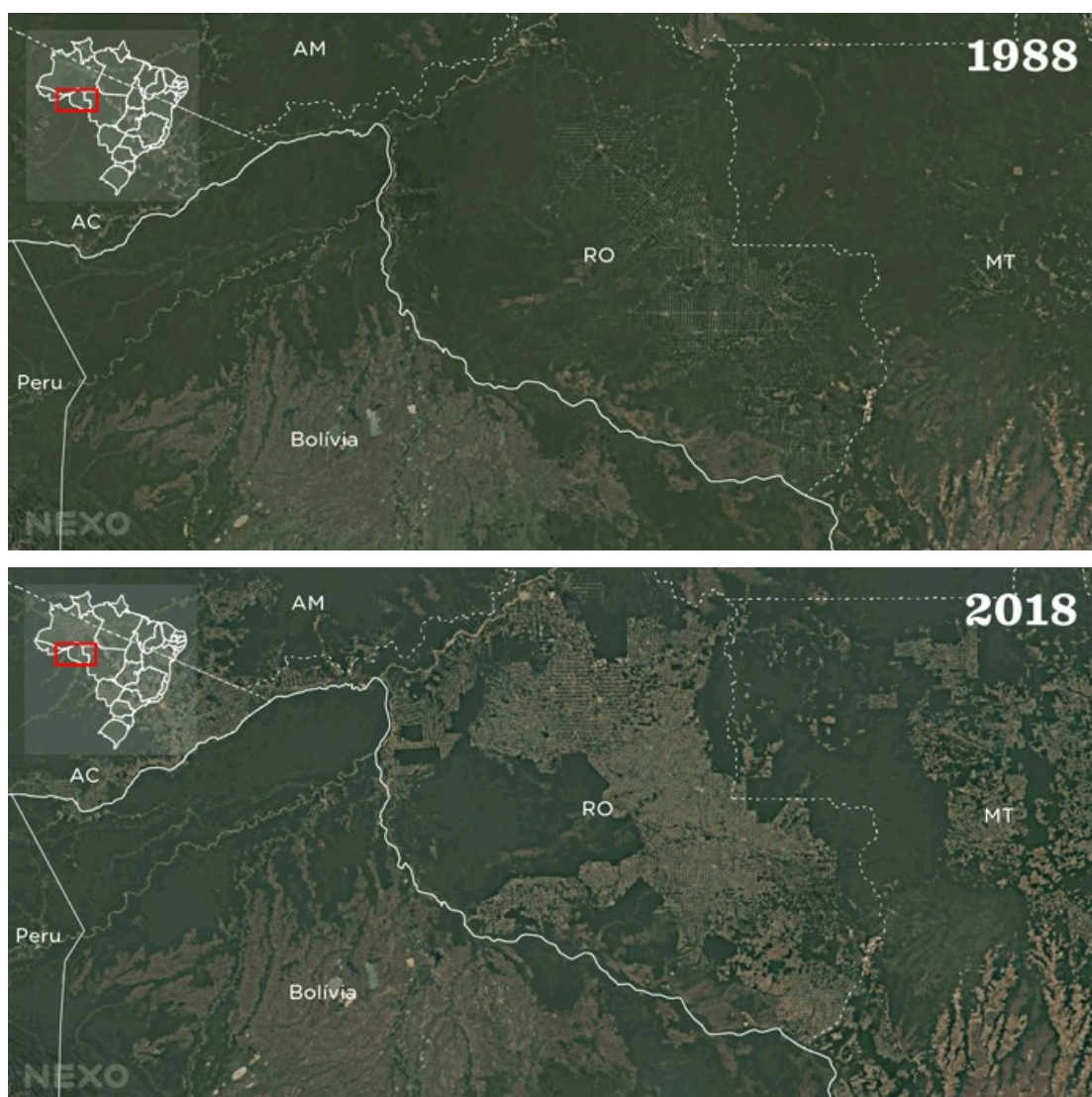


Figura 6. Desmatamento na região de Rondônia. Acima, foto de satélite em 1988. Abaixo, foto de satélite em 2018. (QUADROS; ZANLORENSSI; MAIA, 2021)

Também, o represamento dos rios, necessário para a instalação de usinas hidrelétricas, modifica o fluxo do mercúrio, que antes era transportado por meio

das correntes dos rios até o mar e, agora, ficam por muito tempo nos reservatórios, alterando as condições físico-químicas e biológicas da água e do sedimento, podendo deslocar o equilíbrio químico no sentido da transformação do mercúrio iônico (íons mercúrico e mercurioso) em sua forma orgânica, principalmente em metilmercúrio – sua forma mais tóxica (FADINI; JARDIM, 2001).

Dos 9523 empreendimentos geradores de energia elétrica em operação no Brasil, 61,02% (5811) utilizam como matriz a água – Figura 7. Ainda, o Programa Decenal de Expansão de Energia tem como meta a instalação de mais 50 novas usinas hidrelétricas até 2027 no Amazonas.

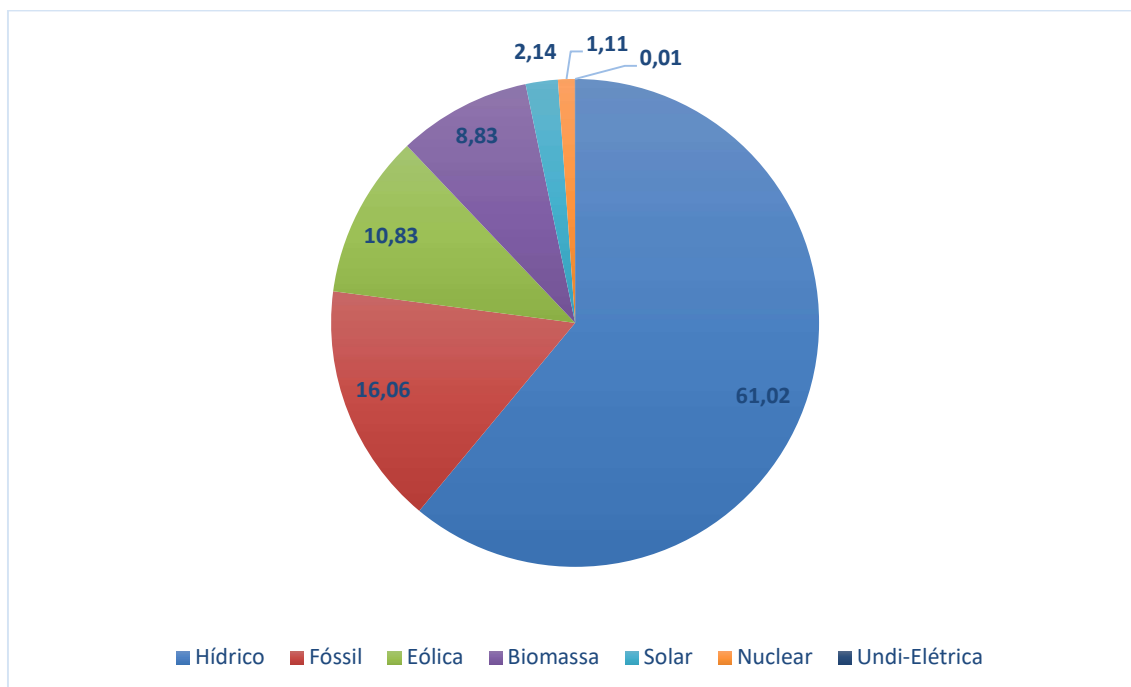


Figura 7. Matriz por origem de combustível (ANEEL, 2021)

O Brasil possui um grande potencial energético, que deve ser aproveitado. Porém, a sustentabilidade dos projetos deve ser sempre levada em consideração para que os impactos ambientais sejam minimizados. No caso do mercúrio, levando em consideração muitos estudos já realizados, é fundamental que seja monitorado para minimizar seu impacto na vida das populações ribeirinhas, animais e meio ambiente.

A Figura 8 traz as usinas em operação, em fase de construção e em estudo na bacia do Madeira.

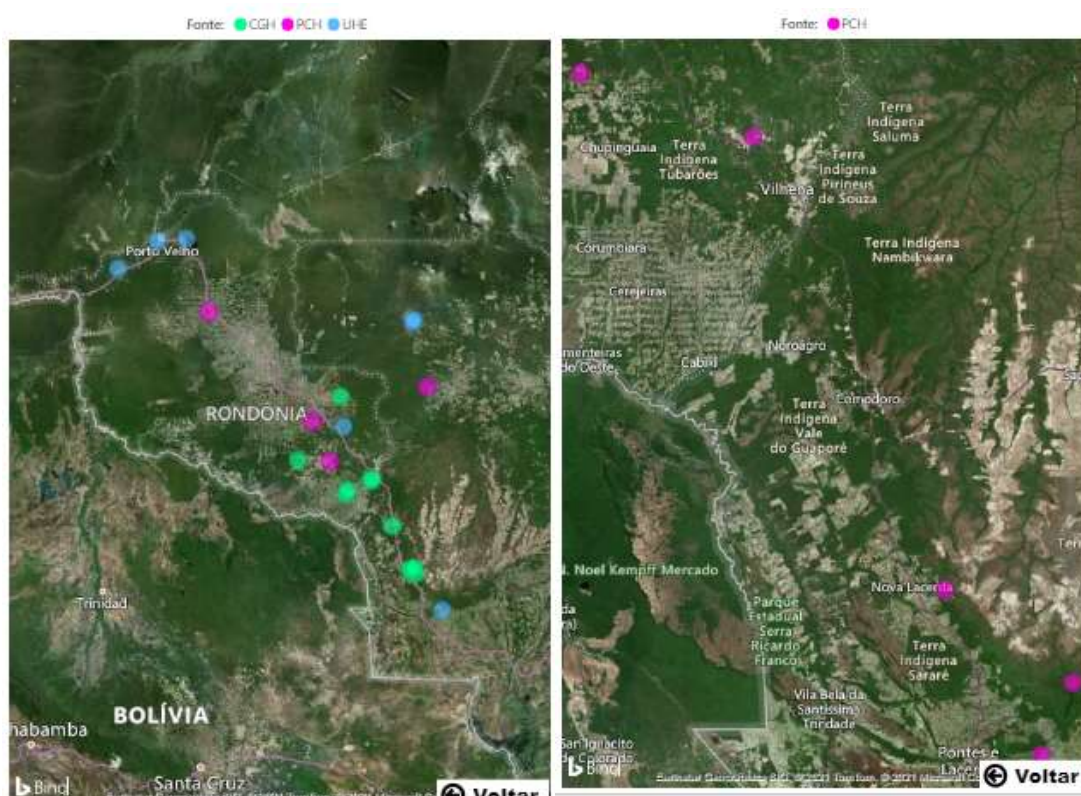


Figura 8. À esquerda, vinte e duas usinas hidrelétricas em operação na bacia do Vintém e duas usinas em operação na Bacia do Madeira. À direita, cinco usinas hidrelétricas em fase de construção ou em estudo na Bacia do Madeira (ANEEL, 2021).

1.5 Toxicidade do mercúrio

O mercúrio é tóxico e suas formas orgânicas lipossolúveis - metilmercúrio e dimetilmercúrio, potencializam sua toxicidade, possuindo propriedades cumulativas de bioacumulação (lenta eliminação no organismo) e de biomagnificação (acúmulo ao longo da cadeia trófica) – Figuras 9 e 10, podendo contaminar diversas formas de vida (LACERDA; SOLOMONS, 1992; PFEIFFER et al., 1989).

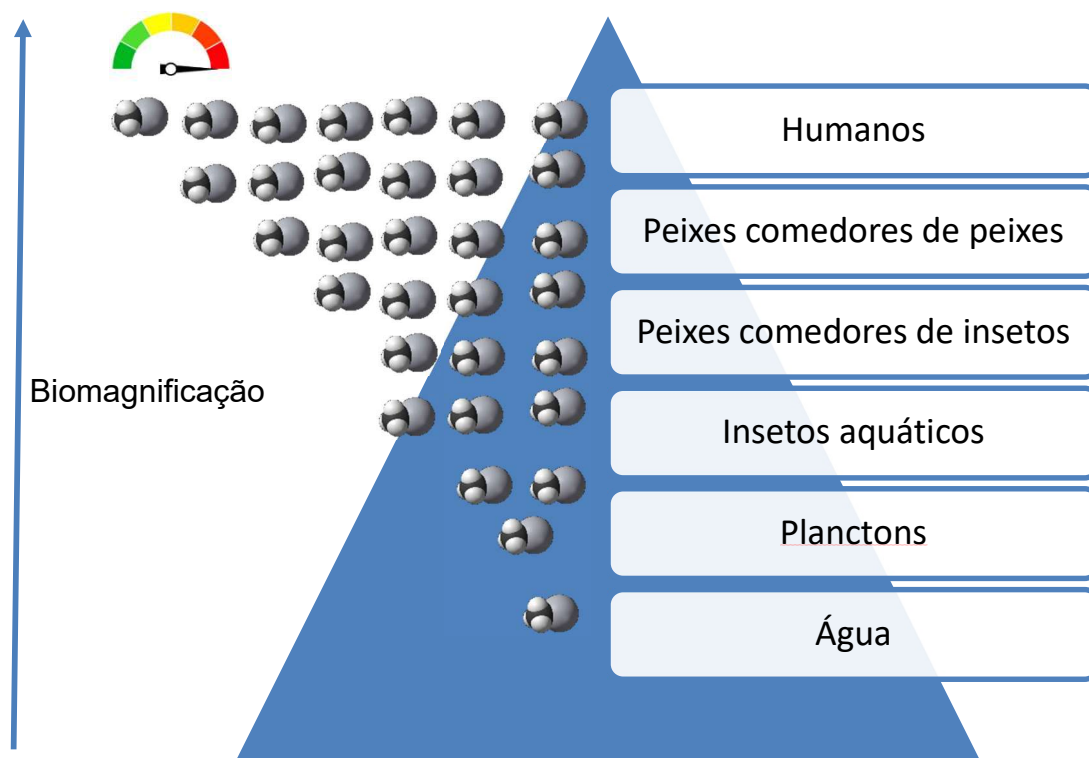


Figura 9. Bioacumulação e Biomagnificação do mercúrio orgânico. Fonte: própria.

Na natureza, o mercúrio é apresentado sob três diferentes formas, sendo elas: metálica, inorgânica e orgânica, que podem ser absorvidas no organismo humano por meio da absorção dérmica, inalação ou ingestão (MOURÃO, 2016). As formas inorgânicas do mercúrio, em condições específicas de pH e concentração de matéria orgânica presentes nos sedimentos de rios, são transformadas em metilmercúrio, sua forma orgânica mais tóxica que biomagnifica e bioacumula (JEDRYCHOWSKI et al., 2006).



Figura 10. Toxicidade das formas de mercúrio – inorgânicas menos tóxicas e orgânicas mais tóxicas. Fonte: Própria.

A contaminação humana por metilmercúrio ocorre, majoritariamente, por via oral, sendo absorvido por via gastrointestinal, e rapidamente distribuído aos

tecidos pela corrente sanguínea, atravessando a barreira hematoencefálica do córtex, se acumulando no sistema nervoso central (SNC) (MOURÃO, 2016).

Os principais sintomas de contaminação por metilmercúrio em crianças e adultos são: dormência nas extremidades e ao redor dos lábios, dificuldades para andar, dificuldades na fala, tremores, diminuição do campo visual, surdez e deficiência intelectual, atingindo sistema nervoso, sendo uma substância altamente neurotóxica (WHO, 1990).

Diversos estudos já indicam que peixes de diversas áreas da região amazônica contém altas concentrações de mercúrio, podendo contaminar a população que tem no peixe sua base alimentar (BOISCHIO; BARBOSA, 1993).

Os estudos sobre a toxicidade do mercúrio no organismo humano tiveram início após o surto de contaminação ocorrido em Minamata, Japão, na década de 1950, quando aproximadamente 600 pessoas morreram devido ao consumo de peixes contaminados por metilmercúrio provenientes de rios que recebiam efluentes industriais contendo mercúrio (WHO, 1990).

A partir desse incidente, e dos estudos realizados à época, o conjunto de sintomas das pessoas contaminadas recebeu o nome de “Doença de Minamata”, sendo eles: comprometimento neurológico, parestesia, constrição do campo visual, ataxia, deficiência auditiva, comprometimento motor e da fala (WHO, 1990).

Em 2013, na convenção de Minamata, 129 países, entre eles o Brasil, reconheceram a problemática global das contaminações por mercúrio e se comprometeram em reduzir a exposição humana e ambiental a esse metal. Em 2014, a convenção foi endossada pela Organização Mundial de Saúde – OMS (NILADRI BASU et al., 2014).

1.6 A toxicidade do mercúrio e o aleitamento materno

A amamentação é muito importante para o desenvolvimento de um recém-nascido, porém estudos indicam que o leite também pode transferir para o lactente substâncias tóxicas, entre elas o mercúrio, que estejam presentes no corpo da lactante (TUNDISI, 1999).

Ainda em Minamata – Figura 11, observou-se que as mães contaminadas deram à luz a crianças com sérios problemas neurológicos e diversos estudos posteriores, indicaram que o mercúrio tem a capacidade de passar pela placenta,

causando problemas para o feto e também para os bebês por meio do aleitamento materno.

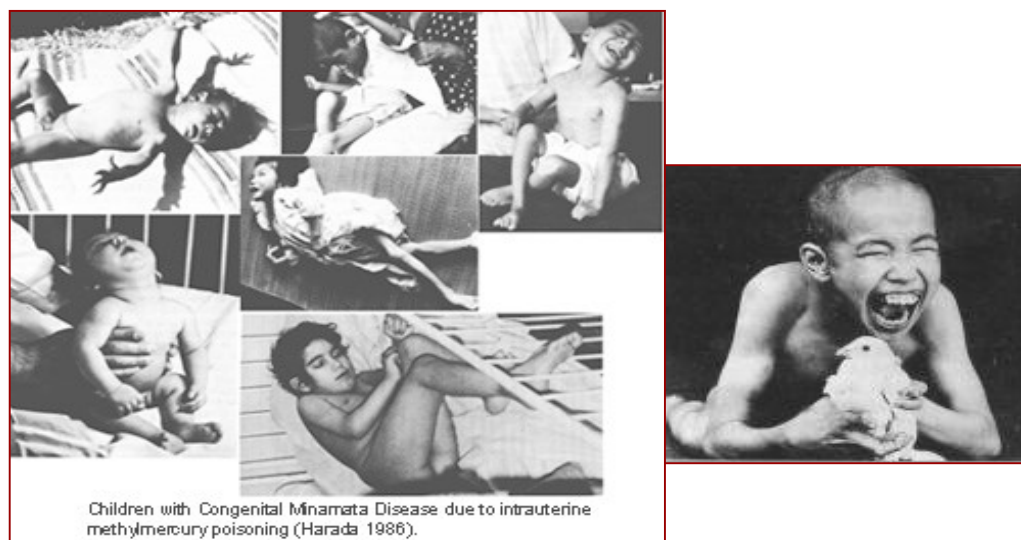


Figura 11. Crianças com a doença congênita de Minamata devido à exposição ao metilmercúrio intrauterino. Foto: Modificado de HARADA, 1986

A transferência do mercúrio da mãe para o feto, ocorre a partir das trocas sanguíneas, atingindo o cérebro do bebê, sendo a quantidade de mercúrio no sangue fetal maior que no sangue da mãe (SYVERSEN; KAUR, 2012). Durante a gravidez não existe nenhuma barreira que impeça a intoxicação do feto pela mãe contaminada pelo mercúrio, mesmo que o contato com a substância tenha sido por meio de pequenas quantidades, o bebê fica susceptível a contaminação. A exposição do bebê ao mercúrio também se evidencia, por meio do aleitamento materno, que, por se tratar de uma via de excreção do organismo da mulher, transfere a substância nociva e tóxica junto com outras substâncias benéficas do leite (CUNHA; COSTA; CALDAS, 2013).

Tanto a forma orgânica do Hg quanto a inorgânica são passadas ao bebê por meio das glândulas mamárias. A meia vida do mercúrio em mulheres é de aproximadamente 75 dias, no período de lactação este tempo é reduzido para em torno de 42 dias, indicando alta mobilização de Hg em lactantes (GREENWOOD et al., 1978), porém os níveis de mercúrio no leite materno, estão relacionadas com questões sociodemográficas, socioeconômicas e alimentares da mãe, assim quanto maior a exposição à substância, maior será a exposição do filho (AL-SALEH et al., 2013).

1.7 Biomarcadores

Detectar precocemente a contaminação por agentes químicos pode reduzir significativamente efeitos adversos na saúde. A exposição a esses agentes pode ser medida utilizando-se a monitorização de amostras ambientais, como água, ar e sedimentos ou por monitorização biológica, medindo parâmetros biológicos denominados indicadores biológicos ou biomarcadores em sangue, urina, leite e outros (COELHO; AMORIM, 2003).

Na Amazônia o quadro clínico de intoxicação por mercúrio é semelhante ao da malária. Nesse contexto, a utilização de biomarcadores que possam monitorar a presença de mercúrio antes que se torne um problema para a saúde de pessoas e animais, pode contribuir para que não ocorram intoxicações por mercúrio. (OPAS; OMS, 2011)

Para a avaliação da adequação de um biomarcador para mercúrio, algumas características devem ser consideradas: correlação deste com as várias formas e concentrações de mercúrio, variações da exposição ao longo do tempo, características culturais da população e a tecnologia disponível para os estudos (OPAS; OMS, 2011).

1.8 Os metais e as proteínas

No final do século 19, o padre austríaco Gregor Mendel, com seus estudos sobre ervilhas, deu início para o que décadas mais tarde foi chamado de genômica (SALZANO, 2000). A genômica estuda todos os genes de um organismo, enumerando sequências de aminoácidos. A expectativa à época era que a genômica nos daria diversas explicações, como por exemplo o funcionamento dos organismos vivos, o que não se concretizou.

Em 1938, o químico sueco Jöns Jakob Berzelius utilizou pela primeira vez o termo “proteína” para descrever uma classe específica de macromoléculas composta por cadeias de aminoácidos, que são abundantes nos organismos vivos. Em 1975, tiveram início os primeiros estudos que podem ser chamados de proteômica com a introdução da técnica do gel bidimensional e a identificação de algumas classes de proteínas (FLUIDIC ANALYTICS, 2019).

A partir dos primeiros estudos proteômicos, concluiu-se que o genoma é totalmente dependente do proteoma que trata do conjunto de todas as proteínas

expressas por um genoma. Enquanto a genômica fornece informações estatísticas, a proteômica possibilita uma visão mais abrangente dos organismos celulares e acelulares, assim como de seus processos.

Baseado nos estudos sobre a genômica e a proteômica, em 2002 o professor japonês Hiroki Haraguchi propôs uma nova área de estudo – a metalômica – Figura 12, que destaca o papel fundamental dos metais em sistemas biológicos, sendo responsáveis por muitas funções das proteínas. Cerca de 40 % das proteínas são metaloproteínas, o que embasa a importância dessa área de estudo (SUGIMOTO, 2007).

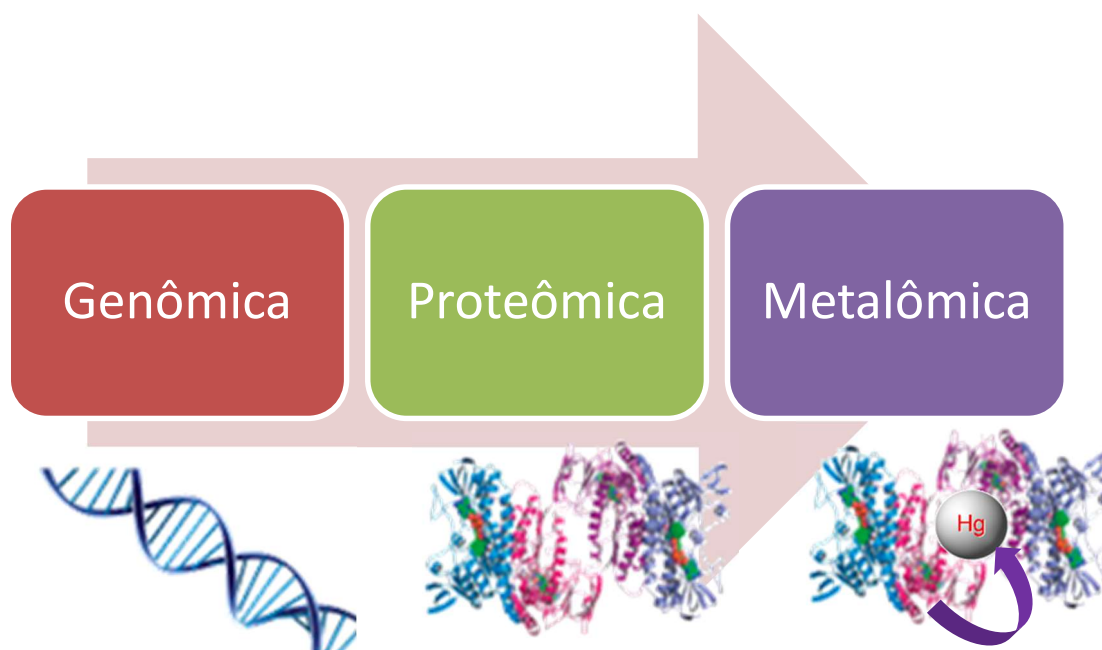


Figura 12. Evolução - Genômica, Proteômica e Metalômica. Fonte: Própria

Inúmeros metais são determinantes para o funcionamento de processos biológicos, como é o caso do ferro contido na porfirina da hemoglobina. Por outro lado, alguns metais como o cromo hexavalente, antimônio, arsênio, cádmio ou mercúrio são xenobióticos, espécies químicas estranhas no organismo e que são tóxicas (VIEIRA, 2017).

Os íons metálicos atuam na estabilização de biomoléculas por meio da proteção de cargas negativas, como na hemoglobina (estabilizada pelo ferro) e na vitamina B12 (estabilizada pelo cobalto). Também, no aspecto funcional, alguns íons como o ferro, cobre, zinco, cobalto e magnésio mudam

reversivelmente seu estado de oxidação, funcionando como catalisadores de sistemas enzimáticos (VIEIRA, 2017). Em contrapartida, alguns metais xenobióticos se ligam a metaloproteínas, fazendo com que percam total ou parcialmente suas funções no organismo o que leva a um desequilíbrio. O mercúrio, por exemplo, possui grande afinidade aos sítios com grupos sulfidrilas, podendo ocupar esse local e prejudicar sua função biológica (ROSATO; VALASATAVA; ANDREINI, 2016).

Dentre as metaloproteínas, tem-se a classe das metalotioneínas (MTs) citosólicas de baixa massa molecular (entre 6 e 7 kDa), que são compostas por uma cadeia de aproximadamente 60 aminoácidos. Nas metalotioneínas, aproximadamente 30% são cisteínas e seus grupos tiol – SH, que possuem Zn^{2+} naturalmente ligado à sua molécula. O zinco das MTs pode ser substituído por outros íons metálicos que possuam maior afinidade por seus sítios de ligações, como Cd^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{1+} , Ag^{2+} , e Au^{1+} (SANTOS, 2013).

Essa afinidade por alguns metais tóxicos, faz essas proteínas serem de grande interesse de estudos pois estão envolvidas em processos de desintoxicação do organismo por metais. As MTs são mais abundantes no fígado, pois é o principal órgão desintoxicante do organismo, que produz essas proteínas para proteger a estrutura celular (HAUSER-DAVIS et al., 2014).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Quantificação de mercúrio

Diversas técnicas podem ser utilizadas para a quantificação de mercúrio e a escolha da mais adequada deve levar em consideração alguns aspectos, como:

- Limite de detecção necessário;
- Faixa de trabalho necessária;
- Quantidade de amostra disponível;
- Matriz de interesse;
- Interferentes;
- Estrutura física necessária;
- Custo.

As técnicas mais comumente utilizadas para a quantificação de mercúrio estão listados na tabela 1.

Tabela 1. Métodos mais frequentemente utilizados para a quantificação de mercúrio e seus respectivos limites de detecção (MICAROLI; BUENO; JARDIM, 2000).

Método	Limite de Detecção Relatado
Método Colorimétrico	0,01-0,1 mg g ⁻¹
Espectrometria de Absorção Atômica - Forno de grafite (GF AAS)	1 ng g ⁻¹
Espectrometria de Absorção Atômica - Vapor frio - (CVAAS)	0,01-1 ng g ⁻¹
Espectrometria de Fluorescência Atômica - Vapor frio - (CVAFS)	0,001-0,01 ng g ⁻¹
Análise por Ativação com Nêutrons - Instrumental (INAA)	1-10 ng g ⁻¹
Radioquímica (RNAA)	0,01-1 ng g ⁻¹
Cromatografia Gasosa - Detector de Captura Eletrônica	0,01-0,05 ng g ⁻¹
Cromatografia Gasosa - Detector de Emissão Atômica	~ 0,05 ng g ⁻¹
Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massa	0,1 ng g ⁻¹
Cromatografia Gasosa - CVAAS / CVAFS	0,01-0,05 ng g ⁻¹
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - Detector de Ultravioleta	1 ng mL ⁻¹
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CVAAS	0,5 ng mL ⁻¹
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CVAFS	0,08 ng mL ⁻¹

Método	Limite de Detecção Relatado
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - Eletroquímico	0,1-1 ng mL ⁻¹
Plasma Acoplado Indutivamente - Espectrometria de Massa (ICP MS)	0,01 ng mL ⁻¹
Plasma Acoplado Indutivamente - Espectrometria de Emissão Atômica (ICP AES)	2 ng mL ⁻¹
Espectrometria Fotoacústica	0,05 ng
Fluorescência de Raio X	5 ng/g - 1 mg g ⁻¹
Métodos Eletroquímicos	0,1-1 mg g ⁻¹
Analizador de Filme de Ouro	0,05 mg g ⁻¹

Para o presente trabalho, foram utilizadas as técnicas de CVAFS para a quantificação de mercúrio total em leite, GFAAS para a quantificação de mercúrio total nos *spots* proteicos e absorção atômica com decomposição térmica para a quantificação de mercúrio total em cabelo.

2.1.1 Espectrometria de fluorescência atômica com geração de vapor frio

Os átomos de mercúrio florescem e absorvem por uma radiação de 253,7 nm, passando do estado fundamental (¹S₀) para o estado excitado (³P₁). A espectrometria de fluorescência atômica do vapor frio (CV-AFS) consiste da detecção do sinal de fluorescência emitido pelo mercúrio elementar e é uma das técnicas mais sensíveis para a sua quantificação (MICAROLI; BUENO; JARDIM, 2000).

Para a determinação, os compostos de mercúrio presentes na amostra devem ser convertidos para a forma iônica Hg²⁺ pela ação de agentes oxidantes. O mais comum é a utilização de misturas de ácidos, que devem ser escolhidos de acordo com a matriz a ser estudada. Após a oxidação, o Hg²⁺ é reduzido a Hg⁰ através do uso de SnCl₂ ou NaBH₄ para que fique disponível para ser quantificado. Se necessário limites de quantificação mais baixos, o mercúrio pode ser pré-concentrado em coluna contendo areia de quartzo recoberta por ouro (MICAROLI; BUENO; JARDIM, 2000).

2.1.2 Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (GFAAS)

Quando um átomo em seu estado fundamental absorve energia em comprimento de onda específico na forma de luz, ocorre a absorção atômica. A

absorção aumenta de forma diretamente proporcional à quantidade de átomos no caminho ótico e, desta forma, é possível quantificar os elementos de acordo com a quantidade de luz que absorvem (PERKIN ELMER, 2008).

Resumidamente, a espectrometria de absorção atômica requer – Figura 13:

- Fonte de luz primária – normalmente usada uma lâmpada de cátodo oco (HCL) ou lâmpada de descarga sem eletrodo (HCL);
- Fonte de calor – para a produção de átomos livres, é necessária uma fonte de calor, sendo que as mais utilizadas são as chamas de ar / acetileno ou óxido nítrico / acetileno;
- Monocromador – para dispersar os vários comprimentos de onda emitidos pela fonte de radiação e selecionar o feixe de interesse;
- Detector – para medir a luz com precisão;
- Sistema informatizado – para processar o sinal e exibição dos resultados.

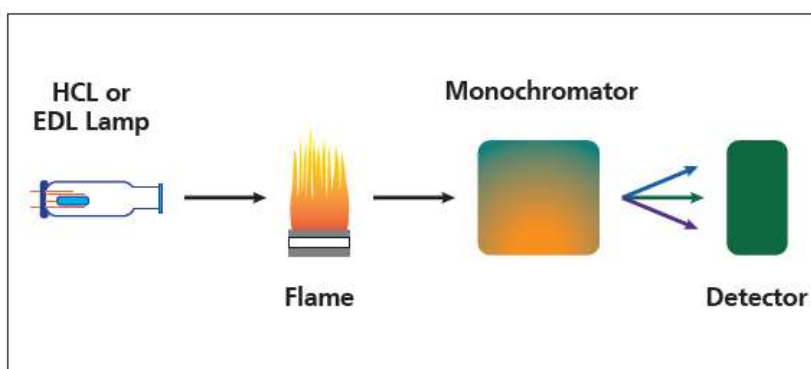


Figura 13. Esquema simplificado de um espectrômetro de absorção atômica (PERKIN ELMER, 2008).

A introdução da amostra na chama é realizada na forma de um aerossol formado pelo sistema de introdução de amostra formado por um nebulizador e uma câmara *spray*. O queimador fica alinhado de forma que o feixe de luz passe pela chama, onde a luz é absorvida (PERKIN ELMER, 2008).

A principal limitação dessa técnica é que sistema de introdução de amostras é relativamente ineficiente, sendo que apenas uma pequena fração da amostra (cerca de 1%) atinge a chama e a amostra passa rapidamente pelo caminho de luz, levando o limite de detecção para a faixa de mg L^{-1} . Para

menores limites de quantificação, pode então ser utilizada a vaporização eletrotérmica utilizando um forno de grafite (PERKIN ELMER, 2008).

Na espectroscopia de absorção atômica com forno de grafite – Figura 14, a amostra é introduzida em um tubo de grafite, que é primeiramente aquecido para a remoção do solvente e dos principais componentes da matriz, para apenas então atomizar a amostra restante. Dessa forma, praticamente todo analito (entre 90 e 100%) é atomizado e os átomos ficam retidos no tubo, no caminho da luz, por um período de tempo prolongado, melhorando significativamente a sensibilidade – faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ (PERKIN ELMER, 2008).

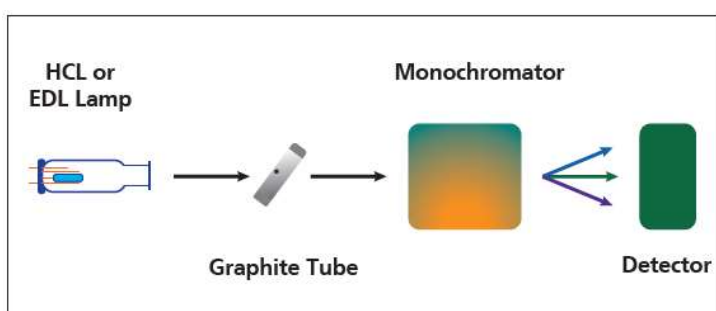


Figura 14. Esquema simplificado de um espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite (PERKIN ELMER, 2008).

2.1.3 Espectrometria de Absorção Atômica com decomposição térmica e amalgamação em coluna de areia de ouro

Na espectrometria de absorção atômica com decomposição térmica e amalgamação em coluna de areia de ouro, amostras sólidas primeiramente são secas para remoção de qualquer umidade. Então, ocorre a decomposição térmica das amostras a altas temperaturas, convertendo todo o mercúrio presente na amostra em Hg_0 volátil. Os gases gerados são então transportados para um tubo catalítico aquecido para a remoção de óxidos de enxofre e de nitrogênio e de halogênios que podem interferir na quantificação do mercúrio. O mercúrio elementar (Hg_0) gasoso gerado passa por um processo de amalgamação em uma coluna contendo areia de quartzo recoberta por ouro, ficando retido. Essa coluna é então aquecida para a uma temperatura suficiente para volatilizar o mercúrio que é transportado por um gás inerte de arraste (nitrogênio ou argônio) até o detector de absorção atômica para ser quantificado em comprimento de onda de 253,65 nm – Figura 15.

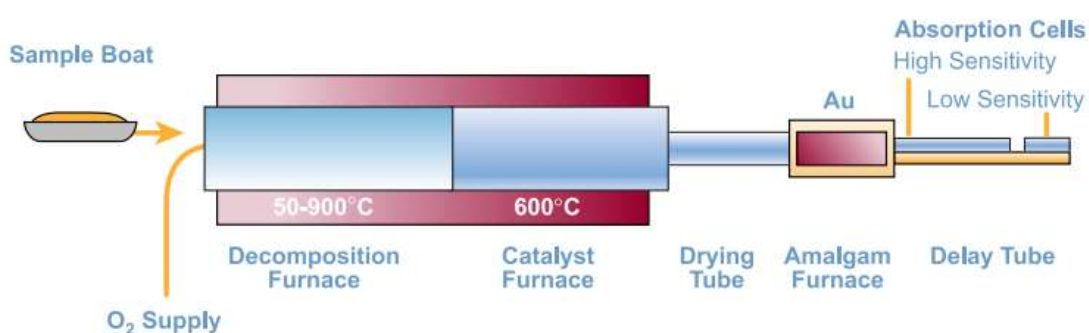


Figura 15. Funcionamento do equipamento SMS 100 da Perkin Elmer (PERKIN ELMER, [s.d.])

Essa técnica tem a vantagem de reduzir e até eliminar o tratamento prévio das amostras, reduzindo o tempo de análise e reduzindo fontes de contaminação provenientes do preparo. Uma outra vantagem é que um único conjunto de condições de operação pode ser usado para a análise de matrizes diferentes e utilizando padrões analíticos aquosos para a curva analítica.

2.2 Estudo proteômico

2.2.1 Eletroforese

A eletroforese é uma técnica, segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), de migração elétrica de partículas coloidais carregadas ou polieletrólitos imersos em uma solução (ALMEIDA, 2010) e sua descoberta ainda é motivo de discussão na comunidade científica, apesar de ser mais comumente atribuída ao cientista alemão Ferdinand Friedrich von Reuss. Reuss após a realização de dois experimentos, nos quais se passava uma corrente elétrica por meio de água que se encontrava em um recipiente dividido por uma parede porosa, notou que ocorria um fluxo de água e partículas do material poroso do ânodo para o cátodo (CARVALHO; DOMINGUES, 2016).

A descoberta foi publicada por ele em 1809 apresentando como justificativa que o efeito observado se tratava de eletro-osmose (CARVALHO; DOMINGUES, 2016), porém muitos autores defendem que o efeito na realidade retratava a eletroforese e alegam que este seria então o primeiro registro do fenômeno. Além disto, existem indícios de que o químico francês Nicolas Gautherot observou o processo de eletroforese em um de seus experimentos em 1801, ou seja, cerca de 8 anos antes da publicação de Reuss (VASCONCELLOS et al., 2018).

Atualmente sabe-se que na eletroforese a resistência do meio utilizado como suporte, a carga efetiva e a concentração do tampão influenciam diretamente na força de deslocamento de uma partícula sob corrente elétrica constante. Ao se referir, por exemplo, às proteínas é preciso observar que estas possuem cargas positivas e negativas, apresentando mobilidade eletroforética inversamente proporcional à viscosidade do meio e diretamente proporcional à carga (LACERDA, 1995).

2.2.2 Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE)

Os fundamentos e metodologias da eletroforese bidimensional foram primeiramente introduzidas por Klose, em Berlim, e O'Farrell, nos Estados Unidos, em 1975. Tratava-se da combinação da focalização isoelétrica e da eletroforese em gel de poliacrilamida, que tornava possível a separação das proteínas em duas dimensões. Na primeira dimensão, a propriedade das cargas das proteínas é explorada por meio da focalização isoelétrica (IEF), onde um gradiente de pH é formado no gel. Na segunda dimensão, é explorada a propriedade da massa molecular (MM) das proteínas em condição desnaturante, ou seja, na presença do detergente docecil sulfato de sódio (SDS). Cada *spot* resultante no gel 2D-PAGE corresponde a uma espécie proteica presente na amostra (ANEEL, 2019; BARBOSA; DÓREA, 1998).

Apesar de ser uma técnica antiga, combinando-se os dois processos de separação proteica torna-se possível que a eletroforese bidimensional apresente uma maior e melhor capacidade de separação de misturas complexas, podendo chegar a mais de 10.000 proteínas em um único gel (ANEEL, 2019).

Para garantir que cada *spot* represente uma espécie de proteína, as interações moleculares proteicas precisam ser rompidas, submetendo-as a processos de desnaturação, desagregação, redução e solubilização. As condições da 2D-PAGE devem ser ajustadas em função do tipo de amostra estudada e a classe de proteína que se deseja pesquisar (SANTOS, 2013).

A eficiência na separação das proteínas da eletroforese 2D-PAGE possibilita realizar estudos comparativos que podem facilitar a identificação de espécies e biomarcadores entre os *spots* dos géis. Nos estudos proteômicos a identificação de diferenças quanto à expressão de proteínas e a verificação de *spots* novos ou ausentes, é uma das principais aplicações (VIEIRA, 2017).

2.2.3 Eletroforese no estudo do leite materno

O leite trata-se de um fluido biológico composto basicamente por água, lactose, gordura, compostos inorgânicos e proteínas, sendo a caseína e as proteínas do soro do leite as principais variando em proporção de acordo com a espécie (PRADO, 2002). No caso do leite materno estudos o reconhecem como

sendo o único alimento capaz de fornecer vários macronutrientes, compostos bioativos e elementos interativos (hormônios e compostos antimicrobianos), para crianças recém-nascidas e desta forma atender a todas as suas necessidades (CRUZ; FABRIZY, 1995).

A amamentação também proporciona para o recém-nascido proteção e reação contra infecções e inflamações, maturação do trato gastrointestinal, desenvolvimento e crescimento aprimorados dos tecidos infantis, redução do risco de alergias, doenças cardiovasculares e hipercolesterolemia, além de promover o bem-estar psicológico da mãe e do bebê. Nos primeiros dias é produzido o colostro, que apresenta grande quantidade de componentes imunológicos e fatores de desenvolvimento, porém com teor de gordura mais baixo. Nas semanas seguintes o leite materno passa por uma transição apresentando níveis mais elevados de lactose e vitaminas lipo e hidrossolúveis, assim como uma redução na quantidade de componentes imunológicos (CRUZ; FABRIZY, 1995).

A análise das proteínas presentes no leite materno pode ser feita pela proteômica, que pode ser definida como uma técnica de identificação, quantificação e estudo das modificações pós traducionais das proteínas em uma célula, tecido, fluídos biológicos ou mesmo organismos. Neste sentido as descobertas desta área estão diretamente relacionadas com os avanços nos métodos de separação e detecção simultânea de proteínas nas amostras do estudo, sendo as técnicas de eletroforese bidimensional e cromatografia as mais utilizadas e estudadas para fornecer resultados cada vez mais eficientes e sensíveis quando falamos em identificação e quantificação de níveis de expressão de proteínas por espectrometria de massa (ANEEL, 2019; LINK; ROSA, 2000).

2.2.4 Digestão Tripídica

Após serem extraídas e fracionadas pelos processos eletroforéticos, as proteínas a serem analisadas nos estudos proteômicos e/ou metaloproteômicos devem passar por digestão proteolítica, que é uma etapa crítica no sequenciamento por espectrometria de massas. Nessa etapa, as proteínas são fracionadas em peptídeos de massas molares que podem ser analisadas pelos

espectrômetros de massas. Para esse trabalho, foi utilizada a digestão tripídica, que é a mais utilizada por produzir peptídeos na faixa de 600 a 2500 Da, possuir alta atividade proteolítica e por ter custo relativamente mais baixo que outras enzimas (CAVECCI, 2014).

Existem dois tipos de digestão proteolítica: em gel de poliacrilamida (proteína obtida na separação eletroforética) e em solução (proteína presente na solução do extrato proteico). A tripsina cliva as ligações peptídicas das proteínas após os grupos carboxilas dos resíduos de argininas (Arg) e de lisinas (Lis), exceto quando essas ligações são com resíduos de prolina (Pro), ou seja, ligações Arg-Pro ou Lis-Pro (CAVECCI, 2014). Após essa etapa de digestão, os peptídeos podem ser caracterizados utilizando-se a espectrometria de massas.

2.2.5 Espectrometria de massas com ionização por *eletrospray* (ESI-MS/MS)

Em 1984, Masamichi Yamashita e John B. Fenn introduziram a espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI-MS/MS), técnica de ionização capaz de ionizar moléculas com massa acima de 1.000 Daltons, o que possibilitou conhecermos com mais detalhes as macromoléculas biológicas (BUSTILHOS, [s.d.]). Por possuir alta seletividade e sensibilidade, assim como relativa facilidade de uso e baixo consumo de amostra, essa técnica desde então está sendo amplamente utilizada. Entre as substâncias que podem ser analisadas estão as proteínas, ácidos nucleicos e complexos metálicos iônicos ou com sítios ácidos ou básicos (CAVECCI, 2014).

A ionização por eletrospray requer a formação de um spray eletrostático do analito. Para isso, a solução é bombeada em baixo fluxo ($\mu\text{L min}^{-1}$) em um capilar metálico de cerca de 0,1 mm de diâmetro e mantido sob um campo eletrostático de 1 a 7kV. Esse, posicionado entre 1 e 3 cm de um contra eletrodo, conduz a solução ao sistema de amostragem do espectrômetro de massas. Por migração eletroforética, o campo elétrico na ponta do capilar leva ao acúmulo de cargas na superfície do líquido, deformando a gota que recebe o nome de cone de Taylor. Essa gota permanece presa ao capilar até que a densidade de carga na sua superfície e o aumento da repulsão entre os íons superam a tensão superficial, ocorrendo a liberação de pequenas gotas com alta densidade de

carga. Como resultado final, os íons tornam-se completamente dessolvatados. Os íons moleculares carregados formados, são guiados para o detector de massas, sendo assim possível identificar as moléculas – Figura 16 (BUSTILHOS, [s.d.]; CAVECCI, 2014).

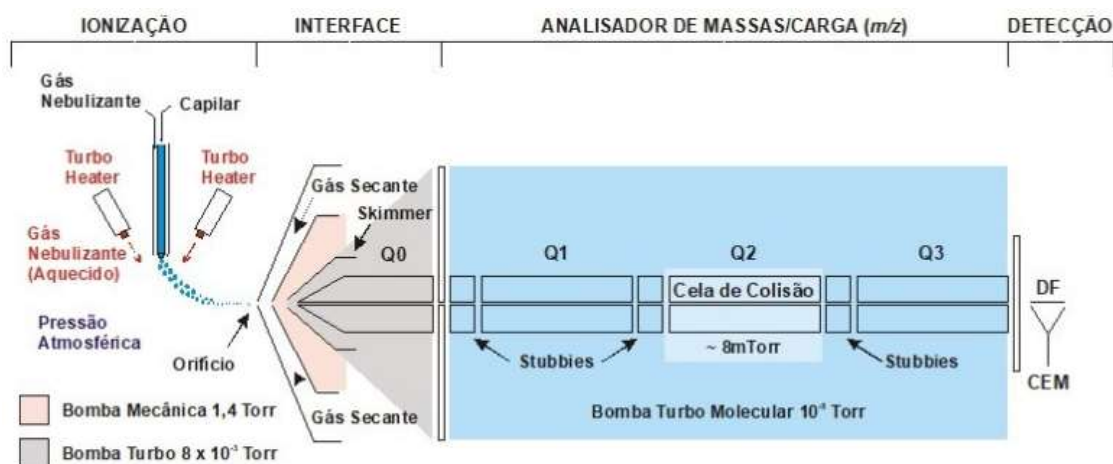


Figura 16. Diagrama esquemático da fonte de íons eletrospray acoplado a um espectrômetro de massas Tandem (ESI-MS/MS) (CAVECCI, 2014)

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Identificar possíveis metaloproteínas biomarcadoras de toxicidade do mercúrio e de espécies mercuriais aplicáveis à vigilância ambiental e saúde humana em amostras de leite materno de comunidades ribeirinhas do Amazonas, de forma a contribuir com a estimativa da magnitude de exposição total ou parcial ao mercúrio.

3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar métodos analíticos visando o fracionamento/separação de proteínas por 2D-PAGE de amostras de leite materno coletados em comunidades ribeirinhas do Amazonas;
- Identificar possíveis metaloproteínas biomarcadoras de mercúrio por meio da análise das imagens obtidas de géis de 2D PAGE;

- Otimizar procedimentos de extração de mercúrio das proteínas para posterior mapeamento por GFAAS e proceder análise de especiação nas amostras de leite materno;
- Caracterizar as proteínas presentes nos *spots* onde foi identificada a presença de mercúrio por LC/ESI-MS/MS.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Trabalhos de Campo

Todo o processo metodológico envolvendo os trabalhos de campo, ou seja, estabelecimento das estações de amostragens, foram conduzidos por pesquisadores que desenvolvem o Programa de Monitoramento do Comportamento de mercúrio na Área do HE Jirau, programa este financiado pela Agência Nacional de Energia Elétrica - ANEEL. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da UNB - CEP-FM 038/2010. Antes de qualquer coleta, todas as lactantes que concordarem em participar do estudo foram submetidas a uma breve entrevista para checagem do aceite da coleta de amostra leite materno. Essas lactantes foram selecionadas por uma equipe formada por uma médica, uma psicóloga e uma enfermeira. O processo de coleta do leite materno foi feito entre o primeiro e o décimo sétimo mês após o parto, seguindo normas técnicas da REDEBLH (BLH-IFF/NT-16.04 – Ordenha: Procedimentos Higiênico-Sanitários). A base legal desse programa de monitoramento é norteada por determinações da Legislação Brasileira (Portarias, Resoluções, Decretos, Instruções Normativas).

As amostras de cabelo e leite das lactantes foram coletadas em 4 comunidades da região do alto Rio Madeira a margem esquerda do rio, sendo elas: Nova Mutum Paraná, Vila da Penha, Abunã e Fortaleza do Abunã, áreas de influência do reservatório da UHE Jirau, no estado de Rondônia (Figura 17). Na região do alto Rio Negro no estado do Amazonas, foram visitadas 2 comunidades, Livramento e Santa Isabel, porém apenas na comunidade de Livramento as lactantes concordaram em participar do estudo.

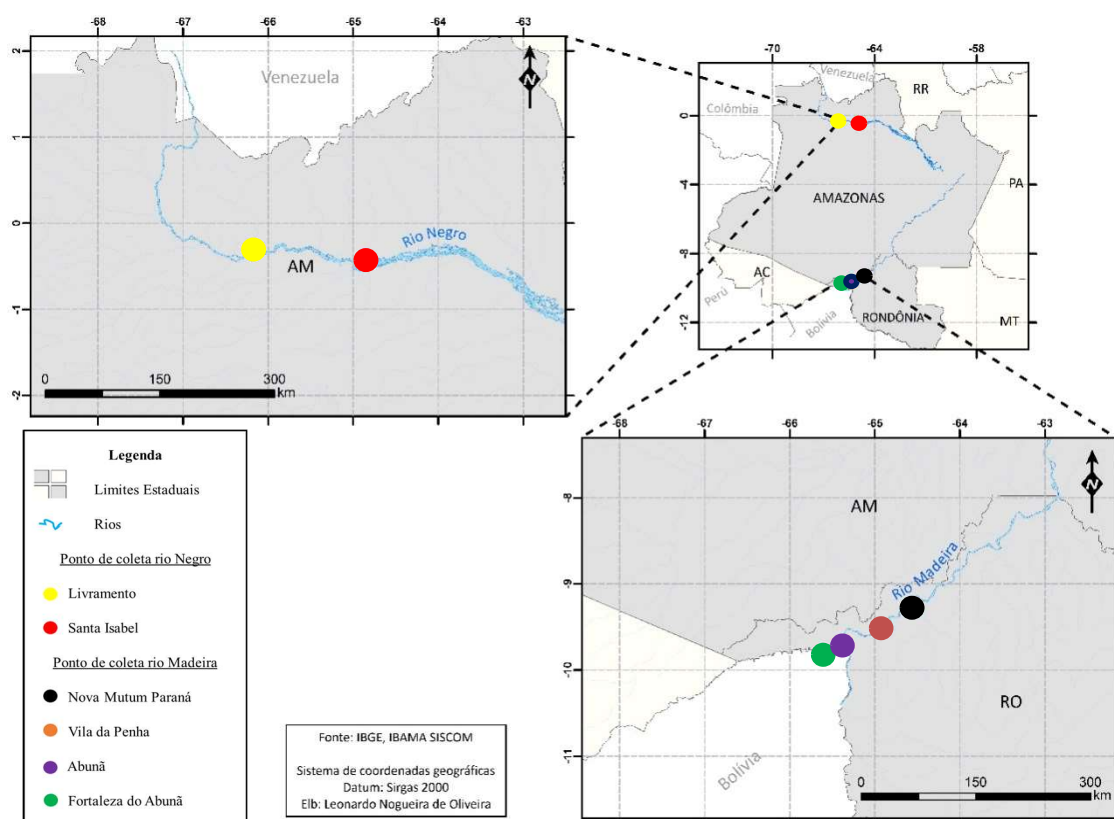


Figura 17. Área de estudo

As amostras de cabelo e leite foram coletadas com o apoio da empresa Venturo Análises Ambientais, empresa responsável pelo monitoramento de mercúrio no reservatório da Usina Hidrelétrica de Jirau. A empresa Venturo auxiliou com o transporte terrestre e aquático e com a equipe médica e de psicólogos na coleta de leite materno. Antes de qualquer coleta, as voluntárias que concordaram em participar deste estudo foram submetidas a uma breve entrevista para certificação do aceite da coleta de amostra biológica, sendo que todas assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e responderam um questionário. As amostras de cabelo foram coletadas para a avaliação dos níveis de exposição ambiental por via alimentar ao mercúrio. As amostras de cabelo (aproximadamente 5 g) foram coletadas da região da nuca, com tesoura de aço e por pessoal previamente treinado. Já as amostras de leite materno foram coletadas pelas próprias lactantes, por ordenha manual, em frascos de vidro esterilizados e entregues para a equipe do trabalho.

Foram no total 24 lactantes que concordaram e participar do estudo, sendo 12 lactantes de comunidade do rio Negro e 12 lactantes de comunidades do Rio Madeira, com idade média de $26,5 \pm 9$ anos, variando entre 18 e 35 anos.

O tempo de lactação variou entre 1 e 12 meses (Tabela 1). Todas as participantes se autodefiniram como donas de casa. Uma participante – a 26, declarou ter vivido e/ou trabalhado em regiões de garimpo na bacia do rio Madeira. Nenhuma delas declarou ter tido atividades garimpeiras ao longo do último ano. Ainda, quatro participantes, a lactante 2, 9, 12 e 26, declararam fazer uso de cigarro e consumo de bebida alcoólica em ocasiões especiais.

Tabela 1. Identificação das lactantes com o tempo de lactação e as comunidades onde residem.

Comunidades	Lactante	Tempo de Lactação
Livramento – AM	1	1 mês
Livramento – AM	2	6 meses
Livramento – AM	3	10 meses
Livramento – AM	4	3 meses
Livramento – AM	5	12 meses
Livramento – AM	6	2 meses
Livramento – AM	7	2 meses
Livramento – AM	8	1 mês
Livramento – AM	9	12 meses
Livramento – AM	10	1 mês
Livramento – AM	11	1 mês
Livramento – AM	12	5 meses
Abunã – RO	21	1 mês
Abunã – RO	22	12 meses
Abunã – RO	23	11 meses
Nova Mutum – RO	24	4 meses
Nova Mutum – RO	25	7 meses
Fortaleza do Abunã – RO	26	1 mês
Fortaleza do Abunã – RO	27	7 meses
Fortaleza do Abunã – RO	28	6 meses
Fortaleza do Abunã – RO	29	10 meses
Vila da Penha – RO	30	8 meses
Vila da Penha – RO	31	1 mês

Comunidades	Lactante	Tempo de Lactação
Abunã – RO	32	9 meses

Estudos apontam que a exposição ambiental ao mercúrio está relacionada com a dieta alimentar, e que sua principal via de contaminação é o consumo de peixes. Dessa forma, informações sobre os hábitos alimentares das lactantes são fundamentais para a avaliação da exposição ao mercúrio (ZHANG; WONG, 2007).

Utilizando questionários de frequência alimentar, realizou-se o inquérito recordatório do consumo de diversos alimentos ao longo dos 7 dias anteriores ao momento da entrevista, além de perguntas abertas sobre as fontes de proteína animal das participantes. Dentre as participantes da comunidade de Livramento (Rio Negro) as fontes de proteína animal foram peixe (7), frango (4) e da Caça (1). Dentre as participantes das comunidades do Rio Madeira, as fontes de proteína animal foram carne bovina (6), frango (3) e peixe (3).

Ao considerar a frequência do consumo de carne de bovina, frango e peixe ao longo dos 7 dias anteriores ao inquérito, a comunidade de Livramento Rio Negro tem a carne de peixe como a mais consumida (79% das refeições), seguida da carne de frango (13% das refeições) e de caça (8% das refeições). Já nas comunidades do Rio Madeira a carne de gado foi a mais consumida (73% das refeições), seguida da carne de peixe (21% das refeições) e de frango (6% das refeições).

Todas as amostras de leite materno, após o processo de coleta, foram devidamente identificadas, preparadas e armazenadas na Base de Operações do Programa de Monitoramento Hidrobiogeoquímico. Posteriormente, as amostras foram encaminhadas para os laboratórios de estudos metalômicos da Faculdade de Ciências e Engenharia da UNESP/Tupã, onde foram feitos os procedimentos específicos para extração, fracionamento e para o estudo metaloproteômico.

As amostras de cabelo foram coletadas – Figura 18, utilizando-se um protocolo internacional para avaliar o nível de exposição ambiental ao mercúrio. Essa metodologia foi escolhida pois já é acreditada e reconhecida internacionalmente.



Figura 18. Coleta de cabelo e leite

4.2 Equipamentos e acessórios

Para esse trabalho, foram utilizados os equipamentos e acessórios a seguir:

- Agitador do tipo Vórtex, Thermolyne M-37600 (Dubuque, EUA);
- Areia de quartzo recoberta por ouro;
- Balança analítica, Mettler AE100 (Bedford, EUA);
- Balança analítica, Mettler AE200 (Bedford, EUA);
- Banho Maria, UNIQUE USC 1800 (Indaiatuba, Brasil);
- Centrífuga refrigerada, Hettich Zentrifugen Universal 320/320R (Newport Pagnell, Reino Unido);
- Cubas para eletroforese do tipo SDS-PAGE, GE Healthcare (Uppsala, Suécia);
- Espectrofotômetro de Fluorescência Atômica, Brooks Rand modelo III
- Espectrofotômetro UV/Visível, ThermoSpectronic Genesys 6 (Rochester, EUA);
- Espectrômetro de Absorção Atômica (CVAAS), PerkinElmer SMS 100 Mercury Analyzer (PerkinElmer, Inc., Shelton, CT)
- Mesa Agitadora, Tecnal TE - 140 (Piracicaba, Brasil);
- Sistema de purificação, PURELAB ultra, ELGA Ultraionic (USA);
- Sistema para eletroforese 2D-PAGE, GE Healthcare Ettan™ Daltsix (Uppsala, Suécia);

- Sistema para focalização isoeletrica, Amersham Biosciences EPS1001 (Uppsala, Suécia);
- Vidrarias convencionalmente utilizadas em laboratórios de Química Analítica.

4.3 Reagentes e soluções

Foram utilizados reagentes de pureza analítica e, as soluções foram preparadas utilizando-se água deionizada. Foram utilizadas soluções de ácido nítrico ou clorídrico 10% (v/v) para a descontaminação por imersão por 12h das vidrarias e plásticos. Então, todo o material foi lavado com água deionizada e seco em temperatura ambiente.

Os seguintes reagentes/soluções foram utilizados para o desenvolvimento desta etapa do trabalho:

- Acetona P.A., C_3H_6O , MM = 58,08 g mol⁻¹ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);
- Ácido Acético Glacial, $C_2H_4O_2$, MM = 60,05 g mol⁻¹ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);
- Ácido Clorídrico, HCl, MM = 36,46 g mol⁻¹ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);
- Ácido Etilenodiaminotetracético dipotássico (K_2EDTA), $C_{10}H_{14}O_8N_2K_2 \cdot 2H_2O$, MM = 404,46 g mol⁻¹ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);
- Ácido Fosfórico 85%, H_3PO_4 , MM = 98,00 g mol⁻¹ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);
- Ácido Nítrico, HNO_3 , MM = 63,01 g mol⁻¹ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);
- Ácido sulfúrico (Mallinckrodt), utilizado na mineralização dos spots proteicos;
- Acrilamida, C_3H_5NO , MM = 71,08 g mol⁻¹ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Agarose grau Biologia Molecular (BioAgency, São Paulo, Brasil);
- Albumina de Soro Bovino (GE Healthcare UK);
- Azul de Bromofenol, $C_{19}H_9Br_4NaO_5S$, MM = 691,94 g mol⁻¹ (Bioagency, São Paulo, Brasil);
- Azul de Coomassie G-250, $C_{47}H_{50}N_3NaO_7S_2$, MM = 854,03 g mol⁻¹ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);

- Benzocaína, $C_9H_{11}NO_2$, MM = 165,19 g mol⁻¹ (Synth, Diadema, Brasil);
- Cloreto de Bromo: solução preparada a partir de KBr e KBrO₄ (Alpha-Aesar) e HCl de acordo com EPA 1999, utilizado na oxidação do mercúrio durante o processo de quantificação do Hg total;
- Cloreto Estanoso (Mallinckrodt), utilizado na redução do mercúrio no processo de quantificação do Hg total;
- Cloridrato de Hidroxilamina (Mallinckrodt), utilizado na decomposição do cloreto de bromo durante o processo de quantificação do Hg total;
- Ditiotreitól (DTT), $C_4H_{10}O_2S_2$, MM = 154,24 g mol⁻¹ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), $C_{12}H_{25}NaO_4S$, MM = 288,28 g mol⁻¹ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Etanol, C_2H_6O , MM = 46,07 g mol⁻¹ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);
- Fitas para focalização isoeletrica com anfólitos imobilizados de pH 3 a 10 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Fitas para focalização isoeletrica com anfólitos imobilizados de pH 4 a 7 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Glicerol 87%, $C_3H_8O_3$, MM = 92,09 g mol⁻¹ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Iodoacetamida, C_2H_4INO , MM = 184,96 g mol⁻¹ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Metanol, CH_4O , MM = 32,04 g mol⁻¹ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);
- N, N', N, N'-tetrametilenodiamina (TEMED), $C_6H_{16}N_2$, MM = 116,20 g mol⁻¹ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);
- N, N'-metilenobisacrilamida, $C_7H_{10}N_2O_2$, MM = 154,17 g mol⁻¹ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Óleo Mineral (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Padrão Protéico de Massa Molar (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Peróxido de Hidrogênio (Mallinckrodt), utilizado na mineralização dos spots proteicos.
- Persulfato de Amônio, $N_2H_8S_2O_8$, MM = 228,20 g mol⁻¹ (Mallinckrodt, Paris, França);

- Sulfato de Amônio, $\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$, $\text{MM} = 132,14 \text{ g mol}^{-1}$ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);
- Sulfonato de 3-[3-cloroamidopropil-dimetilamonio]-1-propano (CHAPS), $\text{C}_{32}\text{H}_{58}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$, $\text{MM} = 614,88 \text{ g mol}^{-1}$ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);
- Tiouréia, $\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$, $\text{MM} = 76,12 \text{ g mol}^{-1}$ (GE Healthcare, UK);
- Tris-hidroximetil amino metano, $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{O}_3\text{N}$, $\text{MM} = 121,14 \text{ g mol}^{-1}$ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Uréia, $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$, $\text{MM} = 60,06 \text{ g mol}^{-1}$ (BioAgency, São Paulo, Brasil).

4.4 Determinação da concentração de proteína total

Para quantificação da concentração de proteína total, fez-se necessário realizar um procedimento prévio de precipitação das proteínas. A precipitação das proteínas dos extratos proteicos de leite materno foi realizada adicionando-se solução gelada de acetona 80% (v/v) na proporção de 1:4 (amostra:acetona). Essa precipitação realizada durante 3 horas a 20 °C, garantindo assim que a precipitação ocorresse de maneira quantitativa. Em seguida o precipitado proteico foi centrifugado a 10000 rpm em ultracentrífuga refrigerada (BioAgency) por 10 min e o sobrenadante foi retirado. O precipitado proteico foi lavado mais duas vezes com a mesma solução utilizada para a precipitação (acetona). Após esses procedimentos, os precipitados proteicos foram solubilizados em tampão contendo uréia (7 mol L⁻¹), tiouréia (2 mol L⁻¹), CHAPS (2% m/v), anfólitos de pH 3 a 10 a 0,5% (v/v), azul de bromofenol (0,002%) e 2,8 mg de DTT, para ser utilizada nas corridas eletroforéticas.

4.5 Separações eletroforéticas

Na primeira etapa das separações eletroforéticas os extratos proteicos de leite materno foram aplicados em fitas de 13 cm para focalização isoeletrica que continham um gel pré-fabricado com os anfólitos imobilizados de pH 3 a 10. Essas fitas foram colocadas em um aparato, sobre o qual permaneceram por um período de 12h a temperatura ambiente para serem hidratadas com o extrato proteico. A essas fitas foram aplicadas aproximadamente 375 µg de proteína da amostra ($C = 1,5 \text{ µg µL}^{-1}$ – volume aplicado de 250 µL). Além do extrato proteico foi adicionado 900 µL de óleo mineral sobre as fitas. Após esse período, a fita

hidratada foi levada ao sistema para focalização isoeletrica (Amersham Biosciences) para corrida em primeira dimensão da eletroforese bi-dimensional – figuras 19 e 20, seguindo o programa descrito na tabela 2. (POLLARD; HULTMAN, 1997; SYVERSEN; KAUR, 2012).

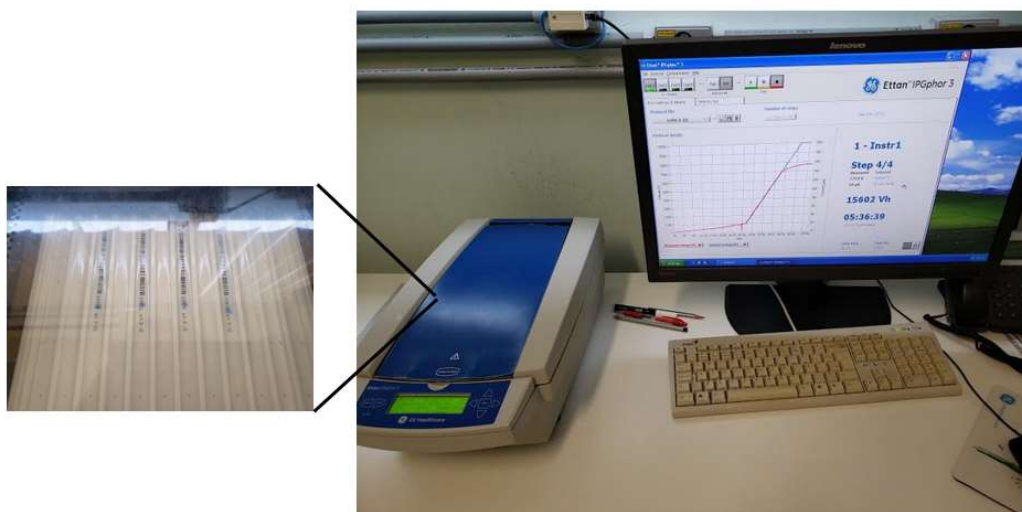


Figura 19. Focalização isoeletrica (Amersham Biosciences)

Tabela 2. Programa utilizado na separação eletroforética em primeira dimensão (IEF) para fitas com gradiente de pH de 3 a 10

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

Após o término da focalização isoeletrica, as fitas com as proteínas separadas em função do ponto isoeletrico (PI) foram “equilibradas” em duas etapas. Na primeira etapa foram usados 10 mL de solução contendo uréia 6 mol L⁻¹, SDS 2 % (m/v), glicerol 30% (v/v), Tris-HCl 50 mmol L⁻¹, azul de bromofenol 0,002% (m/v) e DTT 2% (m/v). Essa etapa denominada redução tem a finalidade de manter as proteínas em suas formas reduzidas. Na segunda etapa foi utilizada uma solução de composição similar, porém substituindo-se o DTT por

iodoacetamida 2,5% (m/v). Esta etapa é denominada alquilação e sua finalidade é alquilar os grupos tióis das proteínas, prevenindo que eles sejam reoxidados durante o processo eletroforético. Cada uma dessas etapas durou cerca de 15 minuto e foi realizada sob leve agitação em mesa agitadora (Quimis).

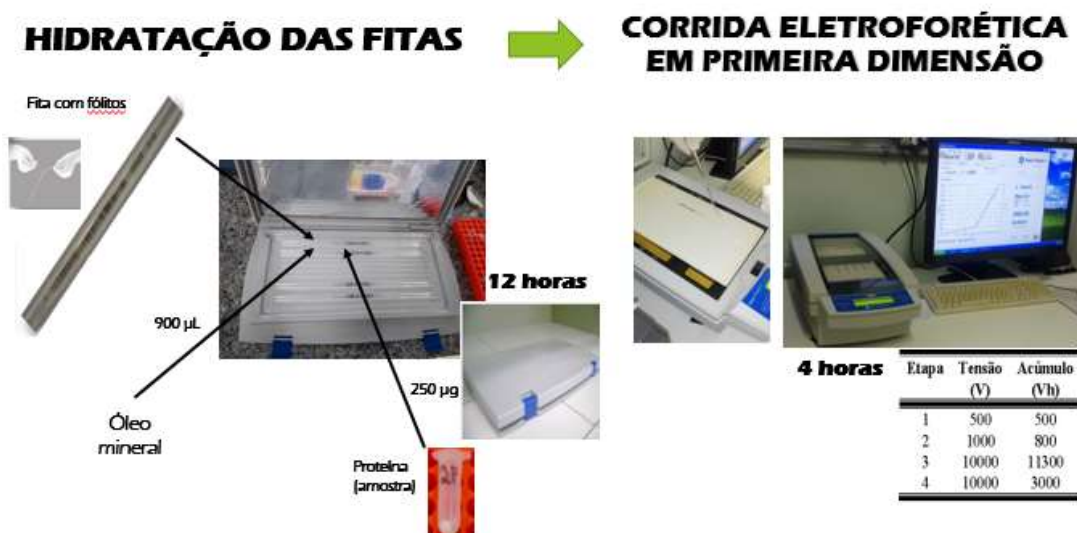


Figura 20. Corrida eletroforética em primeira dimensão

Após a etapa de equilíbrio das fitas, foi realizada a segunda dimensão do processo eletroforético (SDS-PAGE). A fita foi colocada acima de um gel de poliacrilamida 12,5 m/v, previamente preparado em placa de vidro de 180 x 160 x 1,5 mm. O géis de poliacrilamida foram preparados a partir das seguintes soluções: Acrilamida, N, N'-metilenobisacrilamida, Tris-hidroximetil amino metano, Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), N,N',N,N'-tetrametilenodiamina (TEMED), Ácido Clorídrico (HCl) para ajustar o pH para 8 e Persulfato de Amônio. Foi colocado sobre o gel de poliacrilamida, ao lado da fita, um pedaço de papel de filtro, ao qual foi aplicado 10 µL de padrão de massa molecular contendo as proteínas β-fosforilase (97,0 kDa), albumina (66,0 kDa), ovoalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α-lactoalbumina (14,4 kDa). A fita e o papel de filtro foram vedados com uma solução quente de agarose 0,5% (m/v), de modo a garantir o contato destes com o gel de poliacrilamida. Em seguida a corrida eletroforética em segunda dimensão foi realizada em sistema para eletroforese 2D-PAGE (GE Healthcare), ilustrado nas Figuras 21 e 22, em duas etapas, conforme descritas na Tabela 3.



Figura 21. Corrida eletroforética em segunda dimensão



Figura 22. Passo a passo 2D-PAGE

Tabela 3. Programa utilizado na separação eletroforética em segunda dimensão (2D-PAGE) para separação das proteínas por massa molecular

	Etapa	
	1	2
Tensão (V)	100	160
Corrente Elétrica (mA)	290	290

	Etapa	
	1	2
Potência (W)	100	100
Tempo (min)	30	350

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

4.6 Tratamento de imagens

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

O tratamento das imagens – Figura 23, foi sempre realizado para três géis de leite materno obtidos de um mesmo processo de separação eletroforética.

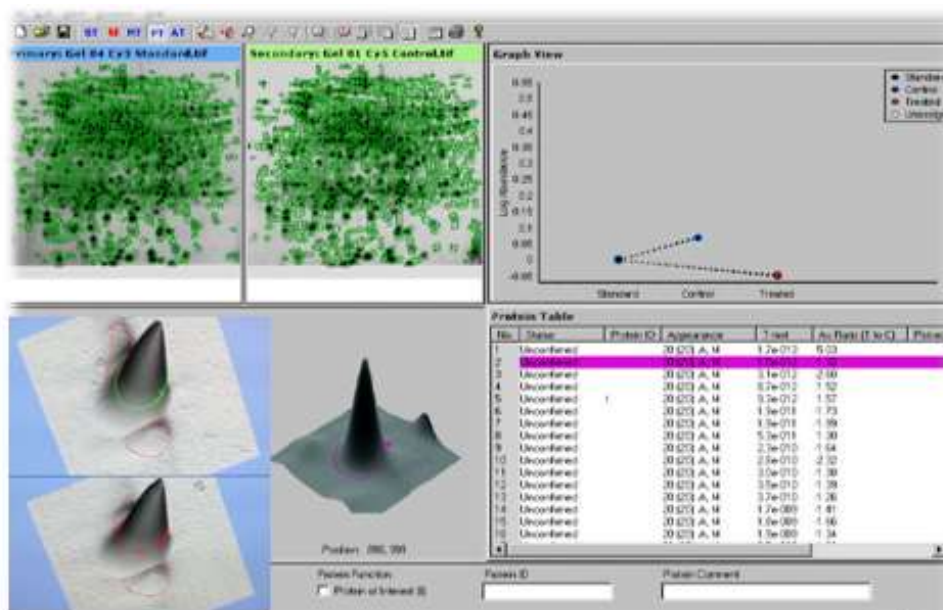


Figura 23. Tratamento das imagens

Iniciou-se pelo ajuste de contraste da imagem do gel de forma a melhorar a visualização pelo analista. Depois, realizou-se a seleção de uma pequena região do gel, a qual continha *spots* de expressão intermediária. Os parâmetros para a detecção, smooth (fixa o número de vezes que o programa homogeneiza a região selecionada antes de seguir a detecção) – 5, saliency (medida que se baseia na curvatura do *spot*, filtra *spots* reais) – 39 e área (elimina regiões menores que as indicadas) – 48. Em seguida, estendeu-se estes parâmetros para todo o gel por meio de uma ferramenta do programa para a detecção automática.

A equivalência entre os *spots* dos três géis (matching) foi realizada pela definição manual de 04 *landmarks* (*Spots* claramente definido e indicados nos dois géis). Nesta etapa de matching o gel com maior número de *spots* foi selecionado como sendo o gel padrão para se realizar a comparação entre os três géis. Neste processo não foi preciso fazer ajuste manual dos *spots*, pois os géis apresentaram uma boa correlação (matching >75%).

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

4.7 Determinação de mercúrio total nas amostras de cabelo

Para a quantificação de mercúrio total nas amostras de cabelo, foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica dedicado para quantificação de mercúrio em amostras sólidas – equipamento SMS 100 da Perkin Elmer – Figura 24.



Figura 24. Espectrômetro de absorção atômica dedicado para quantificação de mercúrio em amostras sólidas – equipamento SMS 100 da Perkin Elmer

Primeiramente, as amostras de cabelo foram cortadas com tesoura inox em pedaços de aproximadamente 5 mm. Então, as amostras foram transferidas para um filtro qualitativo inserido em um funil de vidro sobre um béquer. O cabelo foi então lavado por três vezes com acetona PA (aproximadamente 10 mL), intercalando com lavagem com água purificada (aproximadamente 10 mL). Após a lavagem, o cabelo foi transferido para outro papel filtro para secagem. Após a secagem, foi inserido na “barquinha” de níquel previamente tarada para ser pesada. Após o registro da massa do cabelo, as “barquinhas” foram colocadas no rack do amostrador automático para serem automaticamente inseridas no forno do equipamento.

4.8 Determinação de mercúrio total em leite por Fluorescência Atômica

Primeiramente, as amostras de leite foram descongeladas a temperatura ambiente para posterior transferência de 0,5 mL para béquer de 250 mL de forma alta. Então, foi adicionado sob agitação 3,0 mL de solução de peróxido de hidrogênio 30% (v/v) e deixou-se em repouso por 12 horas. Após esse período, adicionou-se alíquotas de 1,0 mL de ácido nítrico concentrado e 4,0 mL de ácido

sulfúrico concentrado. Os béqueres foram então cobertos por filme plástico contendo pequenos furos para garantir refluxo e saída de vapores e levados a chapa aquecedora para aquecimento a 60 °C por 2 horas. Então, foi adicionado 15,0 mL de solução de permanganato de potássio sob leve agitação e deixou-se em repouso por 12 horas. A solução foi transferida para balões volumétricos de 25 mL e completou-se os volumes com água ultrapura (SANTOS, 2013).

A solução contendo a amostra foi então transferida para um frasco de vidro específico para o amostrador automático do equipamento e foi adicionado 100 µL de cloreto estano (SnCl₂) para a volatilização do mercúrio por redução – $\text{Sn}^{2+}_{(l)} + \text{Hg}^{2+}_{(l)} \rightarrow \text{Sn}^{4+}_{(l)} + \text{Hg}^{0+}_{(g)}$. O frasco então foi imediatamente fechado e vertido algumas vezes para homogeneização. Após essa etapa, as soluções ficam estáveis por até 48 horas para serem quantificadas.

O sistema utilizado para quantificação do mercúrio total (Figura 25) é composto por um amostrador automático, um módulo para mercúrio total e um detector por CV-AFS.



Figura 25. Espectrômetro de Fluorescência Atômica, MERX da BrooksRand. 1 (amostrador automático); 2 (módulo mercúrio total); 3 (módulo para especiação de mercúrio); 4 (detector por CV-AFS).

Os frascos contendo as amostras com o mercúrio na forma Hg⁰ foram então colocados no amostrador automático onde uma agulha perfura o septo, injeta argônio, borbulhando a solução, e transporta o Hg⁰ para ser quantificado – Figura 26.

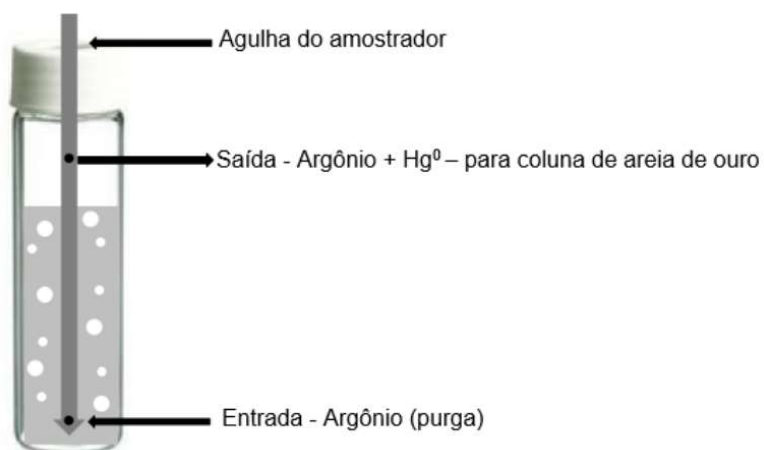


Figura 26. Purga das amostras com argônio. (VASCONCELOS, 2016)

Após a purga, o gás passa por uma coluna contendo cal sodada para a remoção de umidade, que pode interferir na análise. O gás de arraste contendo o mercúrio passa então por uma armadilha de coleta contendo quartzo recoberto por ouro que adsorve o mercúrio. Automaticamente essa armadilha é aquecida e libera o mercúrio para uma armadilha analítica que o adsorve e libera automaticamente após aquecimento, sendo transportado para o detector de fluorescência contendo uma lâmpada que emite em comprimento de onda de 253,7 nm, o comprimento de onda de maior fluorescência do mercúrio e um tubo fotomultiplicador que permite a quantificação do mercúrio total – Figura 27.

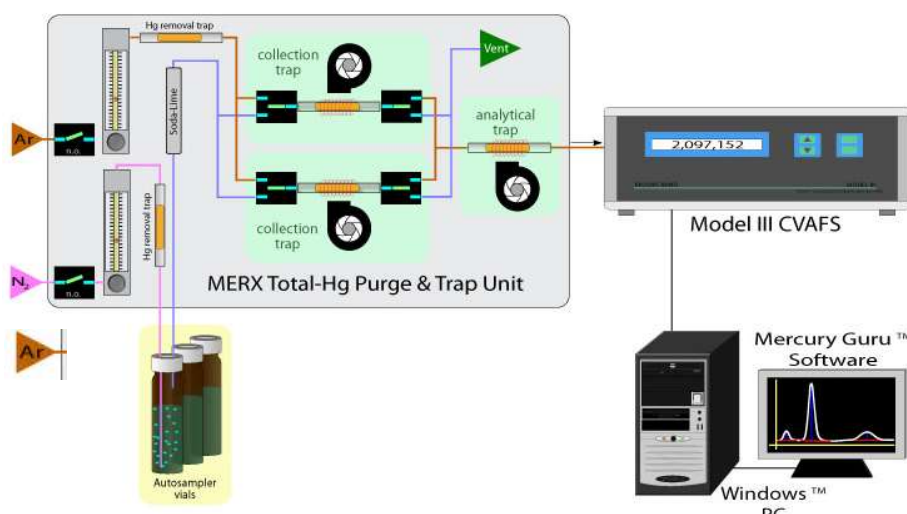


Figura 27. Funcionamento do módulo mercúrio total para quantificação por fluorescência atômica. Fonte: (BROOKS RAND INSTRUMENTS, [s.d.]) Adaptada

4.9 Determinação de mercúrio total nas amostras de leite materno, nos pellets e *spots* proteicos

Três *spots* proteicos, aproximadamente 50 mg, recortados dos géis de poliacrilamida foram transferidos para tubos de digestão de 5 mL. Para cada tubo de digestão foram transferidas alíquotas de 1,0 mL de ácido sulfúrico concentrado e 0,25 mL de peróxido de hidrogênio 30% (m/m). O conjunto de tubos foi colocado em bloco digestor com leve aquecimento, até completa mineralização das amostras (extrato transparente). Em seguida, os extratos ácidos obtidos foram transferidos para balões volumétricos de 5 mL completando-se os volumes com água ultrapura – Figura 28.

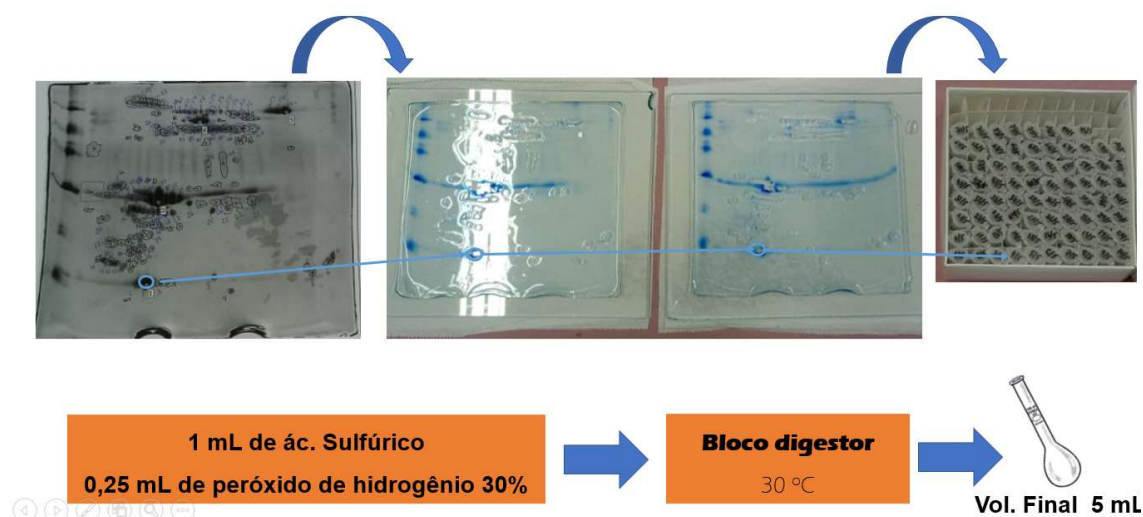


Figura 28. Processamento dos *spots* proteicos para posterior quantificação de mercúrio total

A quantificação de mercúrio total nos *spots* proteicos foi feita por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite, SHIMADZU modelo AA-6800 equipado com corretor de absorção de fundo com lâmpada de deutério e sistema self-reverse (SR), tubo de grafite pirolítico com plataforma integrada e amostrador automático ASC-6100. Foi utilizada lâmpada de cátodo oco de mercúrio SHIMADZU, operada com corrente mínima de 12 mA e corrente máxima de 400 mA (corrente utilizada na correção de fundo – BG). O comprimento de onda utilizado foi de 253,7 nm e resolução espectral de 0,5 nm. Argônio foi utilizado como gás inerte, mantendo-se um fluxo constante de 1 L min⁻¹ durante todo o programa de aquecimento, exceto na etapa de atomização,

na qual o fluxo de gás foi interrompido. Os sinais de absorvância foram medidos em área de pico por apresentar melhor repetibilidade dos resultados.

4.10 Digestão trípica dos *spots* proteicos e identificação das proteínas por LC/ESI-MS/MS

Os *spots* foram recortados dos géis em segmentos de aproximadamente 1 mm³, transferidos para tubos de 2,0 mL contendo 200 µL de ácido acético 5% e armazenados a 4 °C. Posteriormente, os segmentos de gel foram lavados por três vezes em uma solução contendo acetonitrila (ACN) 50% (v/v) e bicarbonato de amônio (AmBic) 0,025 mol L⁻¹ por 30 minutos para serem descorados. Em seguida, foram desidratados duas vezes em acetonitrila P.A. por 10 minutos. Depois de desidratados, os *spots* foram submetidos à redução com DTT 20 mmol L⁻¹ em AmBic 0,05 mol L⁻¹ incubados por 40 minutos a 56 °C, substituído por solução de IAA a 0,055 mol L⁻¹ em AmBic 0,05 mol L⁻¹. Após 30 minutos no escuro em temperatura ambiente o líquido foi removido e os fragmentos lavados em AmBic 0,025 mol L⁻¹, em seguida desidratados em ACN P.A. A ACN descartada e os resíduos remanescentes foram evaporados em temperatura ambiente por cinco minutos.

Para a digestão das proteínas, os fragmentos de gel foram reidratados em 15 µL de solução contendo 150 ng de tripsina (*Trypsin Gold Mass Spectrometry, Promega*, EUA) em AmBic 0,025 mol L⁻¹ por 15 minutos. Em seguida foi adicionado 50 µL de AmBic 0,025 mol L⁻¹ para total cobertura dos *spots* e o material foi incubado a 37 °C por 14 horas. Ao fim das 14 horas a ação da tripsina foi interrompida pela adição de 15 µL de solução bloqueadora (ACN 50% (v/v) e ácido fórmico 5% (v/v)). Os peptídeos foram eluídos com duas lavagens de 15 minutos com solução de eluição A (ACN 50% (v/v) e ácido fórmico 1% (v/v)), uma lavagem de 15 minutos com solução de eluição B (metanol 60% (v/v) e ácido fórmico 1% (v/v)) e mais duas lavagens com ACN p.a, a 45 °C sob sonicação em banho ultrassônico (Ultracleaner 1600A, Unique, Brasil) com 40 KHz de frequência fixa e potência de 30W. As soluções contendo os peptídeos extraídos foram submetidas a concentração em concentrador a vácuo (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) em temperatura ambiente, por 2-3 horas e armazenada a -20 °C. Antes de ser realizado o sequenciamento dos peptídeos, as soluções das amostras passaram por processo de limpeza utilizando colunas

C18 ZipTip (Millipore). Estas foram recondicionadas com solução TFA 0.1% (m/v) em ACN p.a, TFA 0.1% em ACN 50% (v/v) e TFA 0.1% (m/v). Os peptídeos foram suspensos com 10 μ L de solução TFA 0.1% (m/v), passada pela coluna para retenção dos peptídeos e possíveis impurezas e lavada com solução contendo mistura de TFA 0,1% (v/v) preparada em MeOH 5% (v/v) por 3 vezes. Os peptídeos foram recuperados passando na coluna 10 μ L de TFA 0,1% (v/v) preparado em ACN 50% (v/v), colocado em novo microtubo e concentrado até o volume final de aproximadamente 1 μ L. A análise dos peptídeos tripticos foram realizados no sistema nanoACQUITY UPLC (Waters, Milliford, USA) acoplado ao espectrômetro de massas Xevo Q-TOF G2 (Waters, Milliford, USA). O sistema UPLC nanoACQUITY é equipado com coluna HSS T3 (Acquity UPLC HSS T3 column 75 mm x 150 mm; 1.8 μ m, Waters), previamente equilibrada com 7% da fase móvel B (100% ACN + 0.1% ácido fórmico). Os peptídeos foram separados por meio de um gradiente linear de 7-85% (v/v) de fase móvel B durante 20 min com fluxo de 0.35 μ L min⁻¹ e a temperatura da coluna mantida a 45°C. O espectrômetro foi operado em modo íon positivo, com resolução de pelo menos 20000 FWHM (full-width halfmaximum) e em modo de aquisição independente de dados (LC-MSE), com o tempo de aquisição de dados de 20 min por *spot*. Os dados foram coletados utilizando energia de colisão constante de 15 eV no modo MS de baixa energia e 45 eV modo de alta energia. A correção das massas foi realizada utilizando calibração externa com padrão de Glu-1-fibrinopeptide B, 1 pmol mL⁻¹ infundido por meio do lock mass com fluxo de 300 nL min⁻¹, amostrado a cada 30s.

Os espectros de massa obtidos do nanoUPLC-MSE foram processados utilizando o *software Protein Lynx Global Server* (PLGS) versão 3.0. A identificação das proteínas foi obtida por meio do algoritmo de contagem de íons incorporado ao *software*. Os dados obtidos foram buscados no banco de dados do *UniProt* (Universal Protein Resource).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Exposição ao mercúrio

5.1.1 Mercúrio total em amostras cabelo

As quantificações de mercúrio total no cabelo - Tabela 4, foram realizadas utilizando-se um analisador automático para a determinação direta de mercúrio por decomposição térmica e amalgamação em coluna de ouro, SMS 100 Solid Mercury Analysis Systems da Perkin Elmer. Todas as análises foram feitas em triplicata. Na comunidade do Rio Negro (Livramento) apresentaram média de $1,97 \mu\text{g g}^{-1} \pm 1,71$, variando entre 0,33 a $6,53 \mu\text{g g}^{-1}$. Nas comunidades localizadas na região do Rio Madeira, apresentaram média de $1,22 \mu\text{g g}^{-1} \pm 0,55$, variando entre 0,46 a $2,35 \mu\text{g g}^{-1}$. As duas regiões estudadas apresentaram limites inferiores ao preconizado pela Organização Mundial da Saúde, de $14 \mu\text{g}$ de Hg por grama de cabelo. Esse limite é um indicador de possíveis efeitos neurotóxicos que poderiam ser esperados na população.

Tabela 4. Concentração de mercúrio total em amostras de cabelo de lactantes residentes em comunidades do alto rio Madeira, Rondônia e alto Rio Negro, Amazonas.

Comunidades	Lactante	HgT ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Livramento - AM	1	$0,890 \pm 0,001$
Livramento - AM	2	$3,040 \pm 0,021$
Livramento - AM	3	$1,220 \pm 0,005$
Livramento - AM	4	$3,820 \pm 0,026$
Livramento - AM	5	$1,080 \pm 0,007$
Livramento - AM	6	$0,330 \pm 0,005$
Livramento - AM	7	$1,220 \pm 0,011$
Livramento - AM	8	$1,370 \pm 0,014$
Livramento - AM	9	$6,530 \pm 0,040$
Livramento - AM	10	$1,320 \pm 0,006$
Livramento - AM	11	$2,810 \pm 0,013$
Livramento - AM	12	$1,840 \pm 0,029$
Abunã - RO	21	$0,580 \pm 0,003$

Comunidades	Lactante	HgT ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Abunã - RO	22	0,460 $\pm$ 0,001
Abunã - RO	23	1,030 $\pm$ 0,001
Nova Mutum - RO	24	0,910 $\pm$ 0,007
Nova Mutum - RO	25	1,520 $\pm$ 0,009
Fortaleza do Abunã - RO	26	2,350 $\pm$ 0,014
Fortaleza do Abunã - RO	27	1,280 $\pm$ 0,009
Fortaleza do Abunã - RO	28	1,990 $\pm$ 0,010
Fortaleza do Abunã - RO	29	1,330 $\pm$ 0,007
Vila da Penha - RO	30	1,490 $\pm$ 0,010
Vila da Penha - RO	31	0,770 $\pm$ 0,004
Abunã - RO	32	0,960 $\pm$ 0,008

5.1.2 Mercúrio total em amostras de leite

Todas as análises foram feitas em triplicata por CVAFS. Na comunidade do Rio Negro (Livramento) as concentrações de Hg no leite materno apresentaram concentrações de 5,30 a 79,70 $\mu\text{g L}^{-1}$ e nas comunidades localizadas na região do Rio Madeira as concentrações variaram de 6,03 a 83,49 $\mu\text{g L}^{-1}$ – Tabela 5.

Tabela 5. Concentração de mercúrio total em amostras de leite de lactantes residentes em comunidades do alto Rio Madeira, Rondônia e alto Rio Negro, Amazonas.

Comunidades	Lactante	HgT ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Livramento - AM	1	8,51 $\pm$ 1,09
Livramento - AM	2	24,81 $\pm$ 2,88
Livramento - AM	3	27,70 $\pm$ 1,13
Livramento - AM	4	33,16 $\pm$ 1,70
Livramento - AM	5	9,51 $\pm$ 1,27
Livramento - AM	6	30,99 $\pm$ 2,23
Livramento - AM	7	46,78 $\pm$ 2,87
Livramento - AM	8	52,90 $\pm$ 2,57
Livramento - AM	9	67,33 $\pm$ 1,99
Livramento - AM	10	5,30 $\pm$ 0,77
Livramento - AM	11	33,68 $\pm$ 20,90
Livramento - AM	12	79,70 $\pm$ 1,20
Abunã - RO	21	39,21 $\pm$ 2,20
Abunã - RO	22	26,27 $\pm$ 3,73
Abunã - RO	23	*
Nova Mutum - RO	24	8,19 $\pm$ 1,17
Nova Mutum - RO	25	22,69 $\pm$ 1,98
Fortaleza do Abunã - RO	26	15,08 $\pm$ 3,15
Fortaleza do Abunã - RO	27	6,03 $\pm$ 0,48
Fortaleza do Abunã - RO	28	27,46 $\pm$ 3,97
Fortaleza do Abunã - RO	29	83,49 $\pm$ 1,08
Vila da Penha - RO	30	27,47 $\pm$ 3,08
Vila da Penha - RO	31	16,80 $\pm$ 2,12
Abunã - RO	32	25,08 $\pm$ 1,85

**insuficiente a quantidade de amostras para análise.*

A Organização Mundial da Saúde estabelece concentrações máximas de metais em alimentos, sendo considerado o limite de ingestão tolerável (PTWI) de 5 $\mu\text{g/kg}$ peso corpóreo, ou 0,71 $\mu\text{g/kg}$ peso corpóreo /dia de HgT. Para avaliar

os riscos da exposição ao Hg pelo consumo de leite é necessário ter conhecimento da concentração de HgT no leite, do consumo do leite pelo bebê e de seu peso corpóreo (MORAES, 2013).

Considerado o peso corpóreo aproximado da criança 4 kg e o volume médio consumido de 150 g de leite humano / kg de peso corpóreo, tem-se que a concentração máxima de HgT no leite deve ser igual ou menor que $4,73 \mu\text{g L}^{-1}$, para que não ultrapasse o PTWI.

Portanto, pode ser inferido que na população amostral deste estudo 100% das amostras de leite ultrapassam o PTWI – Figura 29, o que pode representar risco de exposição dos bebês pelo consumo de leite das lactantes participantes deste estudo.

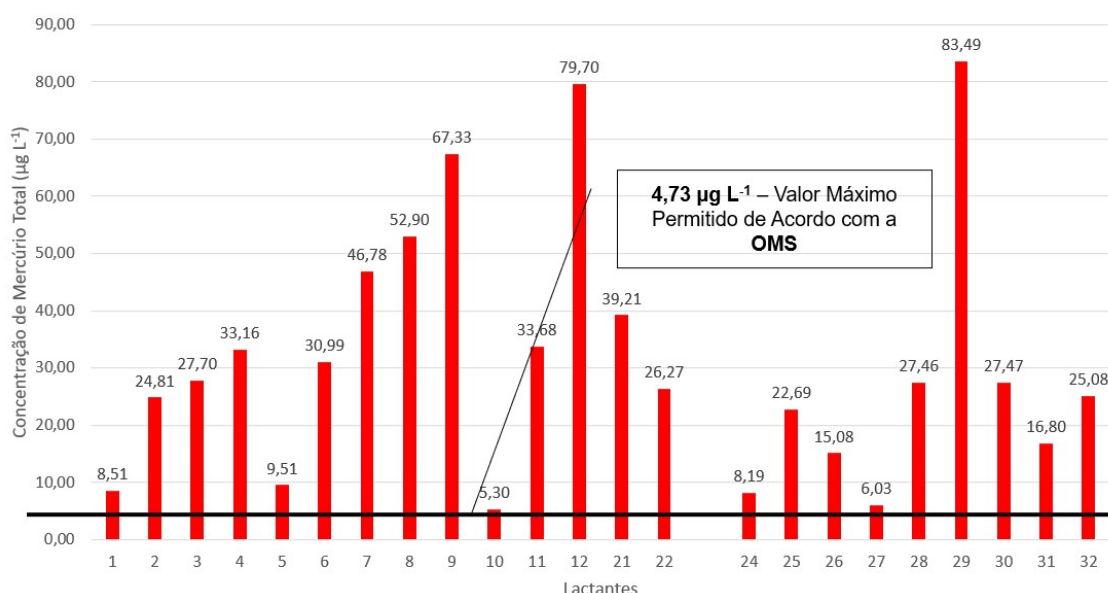


Figura 29. Concentração de mercúrio total em amostras de leite de lactantes residentes em comunidades do alto Rio Madeira, Rondônia e alto Rio Negro, Amazonas.

Entretanto, as comparações de exposição frente ao PTWI devem ser consideradas com restrições devido ao pequeno grupo amostral e a falta de informações descritivas sobre consumo do leite e o peso corpóreo dos indivíduos alimentados pelas lactantes dessas comunidades. Além disso, as concentrações de mercúrio no leite materno identificadas nesta população de estudo estão condizentes com os resultados relatados na literatura científica para a região Amazônica (BARBOSA; DÓREA, 1998; SANTOS, 2013).

Também devido ao pequeno número amostral, não é possível correlacionar o consumo de peixes com a concentração de Hg total no cabelo das participantes. As concentrações de Hg nas amostras de cabelo estão condizentes aos estudos relatados no Programa de Monitoramento Hidrobiogeoquímico de Mercúrio da UHE Jirau, onde variaram entre 0,1 e 18,5, com média $3,2 \pm 1,8 \mu\text{g g}^{-1}$ (ESBR, 2019).

A contaminação por Hg via a alimentação de leite materno pode causar possíveis danos neurológicos em crianças, porém o benefício que a amamentação proporciona é de extrema importância no desenvolvimento do lactente. Também, a contaminação por mercúrio pode ocorrer por outros meios, como por exemplo, as vacinas que fazem uso do Timerosal, sendo necessários estudos sobre as diversas fontes desse metal e considerar as possibilidades de contaminação por outros metais neurotóxicos ao qual a criança pode estar exposta (VIEIRA, 2017).

Estudos na região amazônica apresentam valores maiores de concentração de Hg total em amostras de cabelo, onde os valores ultrapassam $50 \mu\text{g g}^{-1}$ em famílias residentes no alto Rio Madeira e entre 2,00 a $27,00 \mu\text{g g}^{-1}$ em comunidades ribeirinhas do Rio Tapajós (BOISCHIO; BARBOSA, 1993; FAIAL et al., 2014). A baixa concentração de Hg total no cabelo das participantes desse estudo pode estar relacionada ao fato de as comunidades estarem divididas entre a Amazônia dos Rios (ribeirinha) e Amazônia das Estradas. Nas comunidades residentes perto de estradas, as proteínas de bovinos e de frangos são mais acessíveis, reduzindo o consumo de peixes.

5.2 Determinação de proteína total

A quantificação da concentração total de proteínas nos extratos proteicos provenientes da centrifugação das amostras de leite materno possibilita calcular a massa proteica a ser aplicada no gel de poliacrilamida, levando em consideração a concentração do gel (12,5%), considerando a fita IEF de 13 cm.

A proteína total foi quantificada pelo método do biureto, usando albumina de soro bovino como padrão.

Os resultados das concentrações de proteína total das 24 amostras variaram de 11,69 a $20,38 \text{ g L}^{-1}$. As amostras de leite deste estudo foram coletadas das lactantes entre 1 a 12 meses de lactação, período este classificado

como leite maduro, de acordo com Ballard et al. (2013). Os resultados encontrados estão condizentes ao trabalho de Pozzi (2013), que encontrou aproximadamente $18,69 \text{ g L}^{-1}$ nas amostras de leite maduro. Dessa forma, as concentrações médias de proteínas nas amostras desse estudo estão de acordo com a literatura científica (POZZI et al., 2015).

5.3 Eletroforese Bidimensional 2D-PAGE

Os experimentos da eletroforese por 2D-PAGE foram feitos com 2 repetições por amostra. Para precipitação das proteínas utilizou-se acetona 80% (v/v), pois estudos preliminares dos agentes precipitantes tanto o etanol 96% quanto acetona 80%, apresentaram resultados equivalentes. Para obtenção do gel, utilizou-se uma concentração do gel de poliacrilamida foi 12,5% e fita com anfólitos pré-formados de 13 cm com faixa de pH de 3 a 10 e padrões de massa molecular de 14 a 97 KDa. Os tratamentos das imagens foram realizados por meio do software ImageMaster 2D Platinum 7.0. A Figura 30 ilustra um exemplo de gel obtido no processo de fracionamento das proteínas por 2D PAGE na amostra da lactante 22. Os resultados dos demais géis estão ilustrados no Anexo 1.



Figura 30. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 22

De forma geral todos os géis apresentaram uma boa resolução e uma grande diversidade de proteínas, o que demonstra que a separação de proteínas foi eficiente. Após as análises e tratamento das imagens dos géis obteve-se os resultados de correlação entre as repetições das corridas, bem com a contagem de *spots* (proteínas) dos mesmos, os resultados estão apresentados a Tabela 6.

Tabela 6. Resultados obtidos da análise de correlação entre as repetições das 24 amostras analisadas

Géis/Lactante	Número de <i>Spots</i> Média ± Desvio Padrão	Correlação Média Entre os Géis – (%)
1	127±3	93±2
2	121±2	94±2
3	92±2	90±1
4	146±5	85±3
5	194±11	87±4
6	118±2	92±1
7	111±3	88±2
8	115±1	87±1
9	140±1	92±1
10	201±21	84±8
11	129±19	77±12
12	124±7	95±5
21	229±8	77±3
22	234±4	81±1
24	303±3	76±1
25	173±22	83±10
26	166±0	77±0
27	190±4	77±1
28	235±15	80±4
29	212±19	80±6
30	267±12	81±3,5
31	347±3	76±1

Géis/Lactante	Número de <i>Spots</i> Média $\pm$ Desvio Padrão	Correlação Média Entre os Géis – (%)
32	186 $\pm$ 7	81 $\pm$ 4

A comparação das imagens entre os pares de géis foi realizada considerando-se o parâmetro “*matching*” (correlação média entre os géis), que consiste em identificar quais *spots* são equivalentes entre esses pares. Para isso, foram indicados manualmente *spots* (*landmarks*) em cada um dos pares de géis no processamento do *matching*. Após esse procedimento, o programa faz a comparação entre o par de géis, considerando os demais *spots*, identificando assim os *spots* que são equivalentes. É considerado um bom *matching* aqueles acima de 70%. Analisando a tabela 6 observa-se que todos géis obtidos das amostras apresentaram valores maiores, variando de 75,5 % (Gel da amostra 24) a 94,5% (Gel da amostra 12). Em relação ao número de *spots* (proteínas) os valores variaram de 111 a 347 *spots*, a quantidade de *spots* presentes nos géis é dependente de inúmeras variáveis como por exemplo, o ambiente em que a pessoa vive, sua dieta, dentre outros fatores, devido a esses fatores a expressão das proteínas nos géis podem alterar.

No estudo das imagens dos géis, também foi feito a correlação entre os *spots* dos pares de géis considerando o volume normalizado - %V. A figura 31 ilustra o resultado do gel da lactante 22. Dessa forma, é possível analisar a correlação de expressão entre as proteínas dos *spots* proteicos analisados. Os resultados dos demais géis estão ilustrados no Anexo 2.

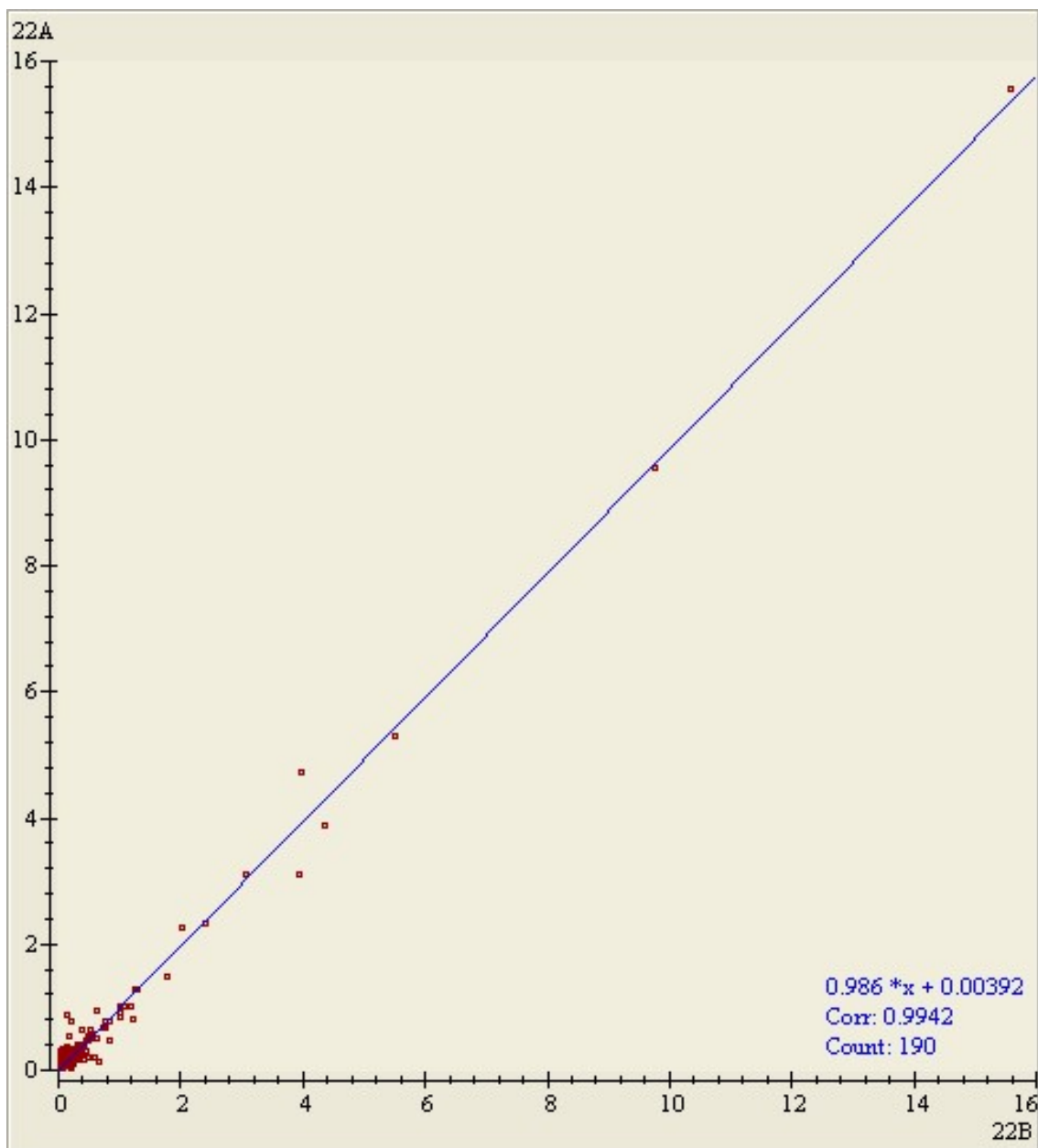


Figura 31. Correlações das repetições dos géis entre o volume normalizado (%V) dos *spots* dos pares do gel da amostra da lactante 22.

Cada ponto dos gráficos representam a relação entre o volume normalizado dos *spots* correlacionados durante o processo de matching. Analisando-se as imagens dos géis de todas as amostras, observou-se uma razoável correlação ($R > 0,86$) entre os *spots* dos pares de géis considerando a %V. No caso, considerando cada gráfico, quanto mais próximo o ponto estiver da reta, menor será a diferença de %V entre os *spots* equivalentes. Observou-se assim, que poucos *spots* de todas corridas eletroforéticas realizadas, estão

distantes da reta (razão > 1,8), ou seja, pode-se inferir que os *spots* equivalentes nos pares de géis analisados, apresentam uma boa correlação entre suas expressões.

Na análise das imagens dos géis observou-se também a distribuição dos *spots* em relação aos pontos isoelétricos e massa molecular. Os géis de todas as amostras apresentaram uma distribuição homogênea, sendo que a maioria dos *spots* proteicos que compõem o mapa proteômico da amostra objeto de estudo encontram-se distribuídos na faixa de 15 a 75 kDa, com PIs na faixa de 4 – 9, aproximadamente. A principal informação desse estudo é demonstrar ao analista a identificação das regiões de alta frequência, o que pode ampliar a diversidade de proteínas em estudos por comparação de análise de imagens. Devido aos bons resultados obtidos das imagens dos géis, deu-se continuidade ao estudo recortando todos *spots* presentes nos géis das amostras para a quantificação do mercúrio, podendo assim mapear o mercúrio nos *spots* presentes no gel para posteriormente caracterizá-los.

5.4 Quantificação de Hg nos *spots* proteicos

Todos os *spots*, aproximadamente 4.160, presentes nos géis das 23 amostras foram recortados dos géis, passaram por digestão ácida e foram quantificados por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite. Os resultados da determinação de Hg total nos *spots* proteicos indicaram a presença de Hg em apenas 33 *spots*, distribuídos em 7 amostras (géis). A Figura 32 ilustra os géis das corridas 2D-PAGE com os *spots* proteicos nos quais foram detectados a presença de mercúrio. A Tabela 7 apresenta os valores da concentração de mercúrio total em cada *spot*, com suas respectivas massas moleculares e ponto isoelétrico.

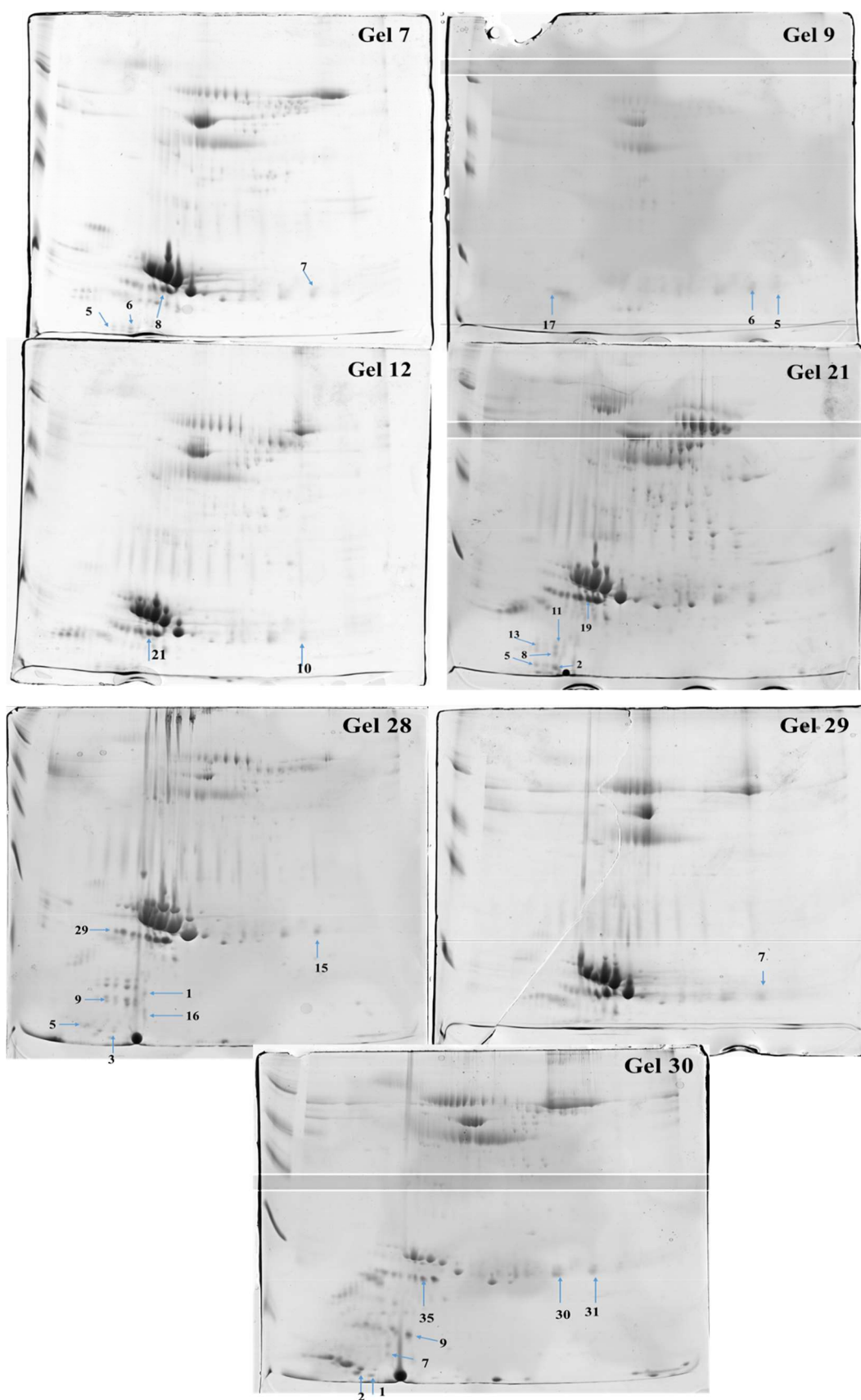


Figura 32. Géis referentes as amostras da lactante 7, 9, 12, 21, 28, 29 e 30 com respectivos *spots* com a presença de Hg identificados

Tabela 7. Concentração de mercúrio nos *spots* proteicos com sua respectiva massa molecular, PI, massa de proteína, obtidos no fracionamento de proteínas por 2D PAGE da amostra de leite das lactantes.

Lactante	Nº <i>Spot</i>	PI	MM	HgT ($\mu\text{g L}^{-1}$)
7- Livramento-AM	5	4,008	18,384	0,0076
	6	4,325	18,229	0,0147
	7	8,219	25,983	0,0136
	8	4,943	23,995	0,0101
9 - Livramento-AM	5	9,846	16,116	0,0062
	6	9,215	16,250	0,0070
	17	4,648	14,015	0,0037
12 - Livramento-AM	10	8,271	22,220	0,0148
	21	5,189	23,825	0,0155
21- Abunã-RO	2	4,453	15,853	0,0038
	5	3,860	16,607	0,0049
	8	4,315	18,183	0,0043
	11	4,648	19,613	0,0076
	13	4,315	18,183	0,0050
	19	5,346	23,636	0,0066
28 - Fortaleza do Abunã-RO	1	4,838	21,918	0,0085
	3	4,107	15,617	0,0037
	5	3,794	16,154	0,0098
	9	4,155	19,741	0,0065
	15	8,972	24,850	0,0024
	16	4,886	19,920	0,0208
	29	4,276	24,743	0,0026
29 - Fortaleza do Abunã-RO	7	9,689	27,446	0,0148
30 - Vila da Penha-RO	1	3,896	16,577	0,0037
	2	3,660	16,908	0,0098
	7	4,769	19,178	0,0074
	9	5,052	22,137	0,0011
	30	8,371	26,851	0,0049
	31	9,166	27,691	0,0122
	35	5,273	26,143	0,0049

Analisando a Figura 66 e a tabela 7 observa-se que do total de 1460 *spots* proteicos, em apenas 33 foram detectados a presença de Hg e as concentrações foram de 0,0011 $\mu\text{g L}^{-1}$ no *spot* 9 da lactante 30 localizada em Vila da Penha a 0,0208 $\mu\text{g L}^{-1}$ no *spot* 16 da lactante 28 localizada em Fortaleza do Abunã, ambas amostras do Rio Madeira. Com relação ao Rio Negro (comunidade Livramento)

a concentração de Hg variou entre 0,0030 a 0,0159 $\mu\text{g L}^{-1}$, ressalta-se que todas as análises foram feitas em triplicata.

Todos os *spots* proteicos com presença de mercúrio apresentam baixa massa molecular (abaixo de 27 kDa) e apresentaram uma ampla faixa de ponto isoelétrico variando de 3,6 a 9,8.

No trabalho de Santos et al. (2013), que trabalhou com a mesma comunidade de Fortaleza do Abunã, observa-se que os *spots* proteicos com presença de mercúrio apresentam massa molecular e ponto isoelétrico diferentes deste trabalho. Entretanto, observando-se a Figura 66 e comparando com os dados da Tabela 7, verifica-se semelhança entre esses *spots*, tanto em suas massas moleculares e pontos isoelétricos, quanto em suas localizações nos géis, podendo assim ser, a mesma proteína com a presença de mercúrio, sendo eles: Gel 7 *spot* 7; Gel 12 *spot* 10; Gel 28 *spot* 15; Gel 9 *spot* 5 e 6 e Gel 30 *spot* 30 e semelhanças entre os *spots* do Gel 7 *spot* 8; Gel 12 *spot* 21; Gel 21 *spot* 19 e Gel 30 *spot* 35. Com os dados de LC/ESI-MS/MS, foi possível confirmar essa informação, tornando-se essas proteínas possíveis candidatas a biomarcadoras de mercúrio em amostras de leite materno.

5.5 Caracterização das proteínas

Inicialmente, repetiu-se as corridas eletroforéticas nas mesmas condições, já otimizadas. Posteriormente os *spots* onde foram quantificados mercúrio, foram recortados do gel de poliacrilamida e cada um deles foi colocado em um pocinho de uma placa, denominada Zip Plate (Millipore), onde foi realizada a digestão trípica através de um kit específico (In-Gel DigestZP Kit) que, além de digerir a proteína, purifica os peptídeos obtidos.

A detecção dos peptídeos foi realizada de forma online pelo espectrômetro de massas, configurado para operar em modo de aquisição dependente de dados (DDA), contendo uma função de MS (fullscan de m/z 200 a 2000), três funções de MS/MS e uma função de padrão externo de calibração (lockmass). A busca em banco de dados gerou, no caso de alguns *spots*, a identificação de mais de uma proteína. Desse modo, selecionou-se a proteína que apresentou a maior pontuação (*score*). A Tabela 8 apresenta a sequência peptídicas, MM/PI experimentais e *access number* obtidos pela espectrometria

de massa (LC/ESI-MS/MS). Nos *spots*: lactante 21 – *spot* 13, lactante 28 – *spot* 3 e lactante 30 – *spots* 1, 2 e 7, não foram identificadas proteínas.

Com as informações obtidas no LC/ESI-MS/MS, foi possível identificar as proteínas utilizando o sistema UNIPROT (UNIPROT, [s.d.]), listadas na Tabela 8.

Tabela 8. Proteínas identificadas utilizando LC/ESI-MS/MS.

Lactante	Spot	Access number	PI/MM experimental	Sequência peptídica	Proteína	Score
7	6	P05814	6.56 / 254.389.201	SPTIPFFDPQIPK	Beta-casein OS	1.699.112
	7	P01834	7.17 / 119.361.291	VYACEVTHQGLSSPVTK	Immunoglobulin kappa constant OS	58.419.490
	8	P47710	3.96 / 218.996.532	LQNPSESSEPIPLESR	Alpha-S1-casein OS	57.349.530
9	5	P01834	4.07 / 119.361.291	TVAAPSVFIFPPSDEQLK	Immunoglobulin kappa constant OS	13.610.690
	6	P01834	4.07 / 119.361.291	TVAAPSVFIFPPSDEQLK	Immunoglobulin kappa constant OS	120.994.000
	17	P01591	3.49 / 185.548.268	SSEDPNEDIVER	Immunoglobulin J chain OS	5.917.811
12	10	P01834	7.17 / 119.361.291	VYACEVTHQGLSSPVTK	Immunoglobulin kappa constant OS	85.017.930
	21	P47710	3.96 / 218.996.532	LQNPSESSEPIPLESR	Alpha-S1-casein OS	49.582.910
21	2	P05814	6.56 / 254.389.201	SPTIPFFDPQIPK	Beta-casein OS	4.859.621
	5	P05814	6.56 / 254.389.201	SPTIPFFDPQIPK	Beta-casein OS	2.158.236
	11	P05814	6.56 / 254.389.201	SPTIPFFDPQIPK	Beta-casein OS	3.030.385
	19	P47710	3.96 / 218.996.532	LQNPSESSEPIPLESR	Alpha-S1-casein OS	128.116.300
28	1	P05814	6.56 / 254.389.201	SPTIPFFDPQIPK	Beta-casein OS	3.026.187
	5	P05814	6.56 / 254.389.201	SPTIPFFDPQIPK	Beta-casein OS	2.258.196
	9	P05814	6.56 / 254.389.201	SPTIPFFDPQIPK	Beta-casein OS	8.694.371
	15	P01834	7.17 / 119.361.291	VYACEVTHQGLSSPVTK	Immunoglobulin kappa constant OS	23.472.790

Lactante	Spot	Access number	PI/MM experimental	Sequência peptídica	Proteína	Score
	16	P05814	6.56 / 254.389.201	SPTIPFFDPQIPK	Beta-casein OS	8.207.046
	29	P47710	5.32 / 218.996.532	LNEYNQLQLQAAHAQEQIR	Alpha-S1-casein OS	3.330.745
29	7	P01834	7.17 / 119.361.291	VYACEVTHQGLSSPVTK	Immunoglobulin kappa constant OS	130.765.000
30	9	P47710	5.32 / 218.996.532	LNEYNQLQLQAAHAQEQIR	Alpha-S1-casein OS	42.953.250
	30	P01834	7.17 / 119.361.291	VYACEVTHQGLSSPVTK	Immunoglobulin kappa constant OS	518.633.300
	31	P01834	4.07 / 119.361.291	TVAAPSVFIFPPSDEQLK	Immunoglobulin kappa constant OS	205.651.100
	35	P47710	3.96 / 218.996.532	LQNPSESSEPIPLESR	Alpha-S1-casein OS	44.683.400

5.5.1 Proteínas de maior score identificadas

A tabela 9 e a Figura 33 trazem as proteínas de maior score identificadas nos *spots* proteicos nos quais foi quantificado mercúrio. A técnica utilizada foi LC/ESI-MS/MS.

Tabela 9. Proteínas de maior score identificadas nos *spots* proteicos por LC/ESI-MS/MS

Proteínas	Quantidade	Porcentagem
Beta-casein OS	8	35%
Immunoglobulin kappa constant OS	8	35%
Alpha-S1-casein OS	6	26%
Immunoglobulin J chain OS	1	4%
Total	23	100%

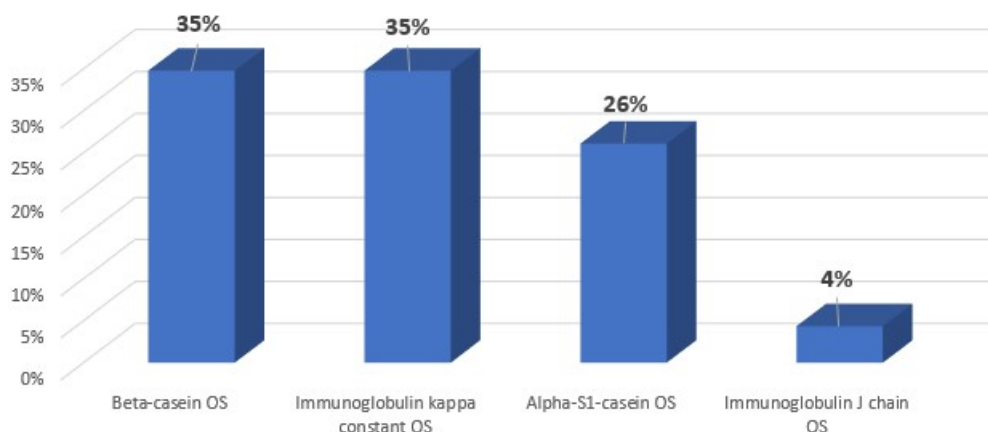


Figura 33. Proteínas de maior score identificadas nos *spots* proteicos por LC/ESI-MS/MS

As caseínas, que correspondem a 61% das proteínas identificadas nos *spots* proteicos nos quais foi quantificado mercúrio, são proteínas conjugadas que pertencem à classe das fosfoproteínas, tendo como grupo prostético os fosfatos e função biológica de nutrição e de reserva.

As imunoglobulinas, que correspondem a 39% das proteínas identificadas nos *spots* proteicos nos quais foi quantificado mercúrio, são proteínas conjugadas que pertencem à classe das glicoproteínas, tendo como grupo prostético os carboidratos e função biológica de anticorpos.

A Beta-Caseína, que tem entre 16-26 kDa, é a principal caseína identificada no leite materno. Processos biológicos atribuídos à β -caseína ou aos seus fragmentos incluem o transporte de íons cálcio, lactação, regulação negativa da atividade da endopeptidase do tipo cisteína e estímulo da síntese de DNA. Suas principais funções são ligação com íons de cálcio, atividade do inibidor da endopeptidase do tipo cisteína e inibidora de enzima (POZZI et al., 2015).

No trabalho de Pozzi (2011) essa proteína teve síntese baixa nos primeiros dias de lactação (leite colostro), porém nos períodos posteriores (leite de transição e maduro) foi uma das proteínas mais expressas do leite materno. Todas as subunidades das caseínas (α , β e κ) não apresentam pontes de dissulfetos e, como consequência, não formam estruturas globulares (estruturas secundárias e terciárias). Por apresentarem predominantemente estrutura primária, essas proteínas apresentam sítios de coordenação (grupos aminos e

carboxílicos) terminais, principalmente dos aminoácidos glutamina e prolina, que se apresentam em maiores proporções na sequência peptídica. Esses sítios de coordenação formam ligações preferencialmente com íons cálcio, mas, podem formar ligações com outros íons metálicos divalentes (GARCIA; MAGALHÃES; ARRUDA, 2006). No entanto, como essas proteínas apresentam grupos amino aromáticos da glutamina, com características de base intermediária e podem formar ligações com íons como Hg^{2+} (PEARSON, 1963). Essas ligações, mesmo não sendo específicas, caracterizam uma proteína metal ligante ao mercúrio, não configurando o mercúrio como um cofator metálico (GARCIA; MAGALHÃES; ARRUDA, 2006).

Estudo de Santos corroboram com os resultados deste trabalho, pois foi identificada essa proteína ligada ao mercúrio com uma relação estequiométrica de 4 moléculas de B-caseína para um átomo de mercúrio (SANTOS, 2013). Por não ter uma ligação específica com o mercúrio, trata-se de uma proteína *metal binding protein*. A Figura 34 ilustra a estrutura da proteína e sua expressão no gel da 2D-PAGE. Comparando o mesmo *spot* com e sem a presença de mercúrio, observa-se que quando o Hg está ligado ou fazendo parte da estrutura da proteína, essa apresenta uma maior intensidade no gel da 2D-PAGE.

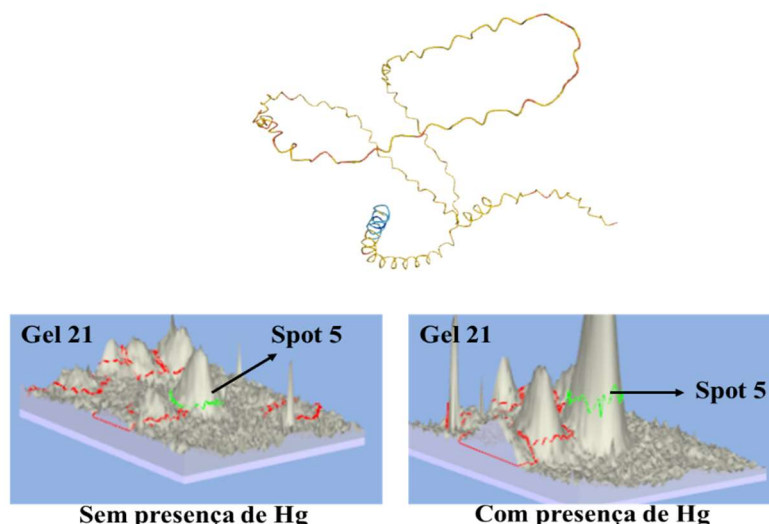


Figura 34. Estrutura molecular obtida pelo UniprotKB da Beta-caseína e sua expressão com e sem a presença do mercúrio.

Observa-se na Figura 68, que o *spot* 5 do Gel 21 (proteína Beta-casein), na presença do mercúrio está mais expressa no gel da 2D-PAGE, o que se

confirma quando analisamos os dados do desse *spot* em relação a intensidade e porcentagem de volume, onde o *spots* com presença do metal obtém resultados até 3 vezes maiores que o *spot* sem a presença do metal. Isto pode ocorrer devido a proteína estar apresentando alguma função ou processo na presença deste metal, porém são necessários mais estudos para detalhar ou entender qual a relação desta proteína com o mercúrio no organismo humano.

A Imunoglobulina Kappa constata OS, é de cadeia leve (23 kD) e possui a função de anticorpo. São glicoproteínas ligadas à membrana, secretadas ou produzidas por linfócitos B. Crianças que não se alimentam de leite materno, ficam deficientes dessa proteína até que comecem a produzir IgA secretora naturalmente, o que ocorre após algumas semanas ou meses após o nascimento (GARCIA; MAGALHÃES; ARRUDA, 2006, POLLARD; HULTMAN, 1997).

Suas cadeias leves são mantidas juntas por pontes dissulfeto intercadeia e por interações não covalentes. O número de pontes dissulfeto varia entre as diferentes moléculas de imunoglobulinas. Em sua sequência peptídica está presente o aminoácido cisteína, o qual possui grupamentos tiol (-SH) em sua cadeia lateral. Dois resíduos de cisteína podem, assim, interagir originando uma ligação -S-S-, característica da molécula de cistina (dipeptídeo da cisteína), o que explica sua ligação com o mercúrio, pois configura uma ligação mais estável desse íon com grupos sulfidrila dessa proteína (Figura 35), caracterizando assim essa proteína como uma possível biomarcadora de mercúrio (PÉREZ; SHAH; BUTLER, 2020).

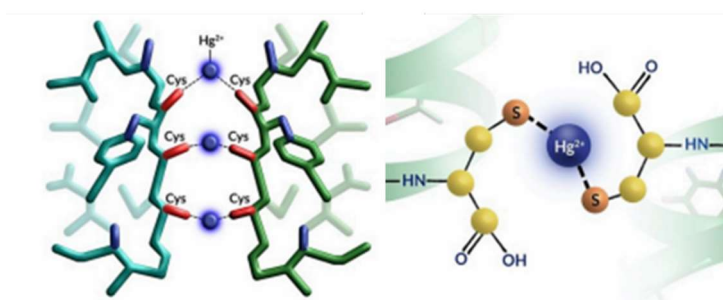


Figura 35. Ilustração que descreve as interações de ligação de alta afinidade entre íons mercúrio e grupos tiol eletrofílicos (ou seja, cisteína). Com ligações putativas do íon mercúrio a grupos de cisteína (Cys) (PÉREZ; SHAH; BUTLER, 2020).

Uma concentração alta de mercúrio provavelmente citotóxica e causará morte celular, enquanto concentrações subtóxicas em locais distantes após a

dispersão podem modular a produção de citocinas por células imunes. O desenvolvimento de autoimunidade induzida por mercúrio é caracterizado sequencialmente pelo desenvolvimento de uma reação inflamatória no local de exposição seguida pela ativação e expansão das células T CD4, início de uma resposta humoral caracterizada pelo aparecimento de novos centros germinativos e, finalmente, produção de Imunoglobulina (POLLARD; HULTMAN, 1997). Os dados epidemiológicos disponíveis sugerem que a exposição ao mercúrio provavelmente contribui para a patogênese da autoimunidade por meio de uma série de mecanismos diretos e indiretos em combinação com fatores ambientais e genéticos (HUANG et al., 2019). Fatos esses que caracterizam assim essa proteína como uma possível biomarcadora de mercúrio.

Como no exemplo da Beta-caseína, fez-se o mesmo para a Imunoglobulina Kappa constat. A Figura 36 ilustra em a estrutura da proteína e sua expressão no gel da 2D-PAGE, comparando o mesmo *spot* com e sem a presença de mercúrio, mostrando que quando o Hg ligado ou fazendo parte da estrutura da proteína apresenta uma maior intensidade no gel da 2D-PAGE.

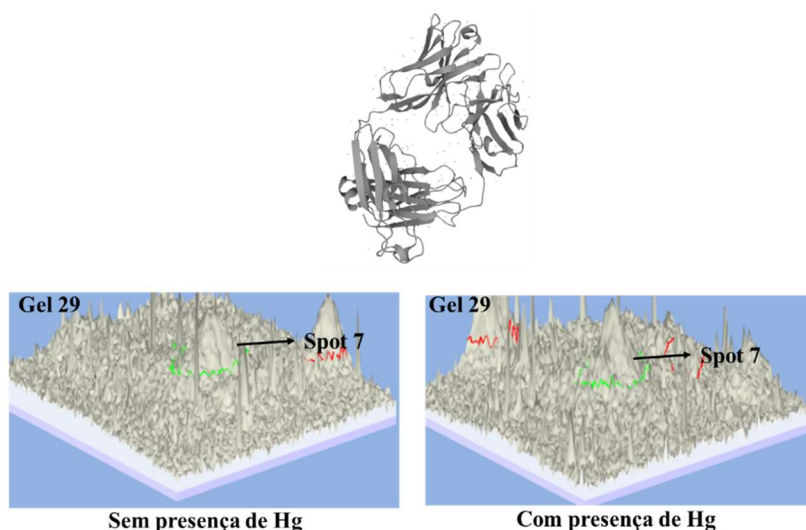


Figura 36. Estrutura molecular obtida pelo UniprotKB da Imunoglobulina Kappa constat e sua expressão com e sem a presença do mercúrio.

Quando comparados os *spots* com e sem a presença de metal, nos dados do programa Imagens Master, o *spot* com a presença de metal tem intensidade de 0,31 e saliência de 128,34 enquanto o *spot* sem a presença do metal apresenta intensidade de 0,22 e saliência de 73,26, mostrando assim que o *spot*

com a presença do metal está mais expresso. Ressalta-se que essa imagem é apenas um exemplo de um único *spot* onde obteve-se a presença de mercúrio ligado na Imunoglobulina Kappa constat. São necessários mais estudos para detalhar ou entender qual a relação dessa proteína com o mercúrio no organismo humano. Não foi encontrada na literatura dados sobre essa relação.

A Alfa S1 Caseína pertence à família da Alfa caseína e é expressa especificamente pela glândula mamária, sendo secretada pelo leite. Possui 185 aminoácidos, tem massa de 21 kD. No leite, as Caseínas Alfa S1 e Beta precipitam na presença de cálcio (as chamadas caseínas sensíveis ao cálcio). A kappa-caseína evita a precipitação das outras caseínas pelo cálcio por meio da formação de grandes partículas coloidais estáveis denominadas micelas (JOHNSEN et al., 1995).

Da mesma forma que a Beta-caseína, a Alfa-caseína apresenta sítios de coordenação formando ligações preferencialmente com íons cálcio, mas podem formar ligações com outros íons metálicos divalentes (GARCIA; MAGALHÃES; ARRUDA, 2006). No entanto, essas proteínas apresentam grupos amino aromáticos da glutamina, com características de base intermediária e podem formar ligações com íons como Hg^{2+} (POLLARD; HULTMAN, 1997). Essas ligações, mesmo não sendo específicas, caracterizam uma proteína metal ligante ao mercúrio, não configurando o mercúrio como um cofator metálico (GARCIA; MAGALHÃES; ARRUDA, 2006).

A Figura 37 ilustra a estrutura da proteína e sua expressão no gel da 2D-PAGE, comparando os mesmos *spots* com e sem a presença de mercúrio, mostrando que quando o Hg está ligado ou fazendo parte da estrutura da proteína, essa apresenta uma maior intensidade no gel da 2D-PAGE

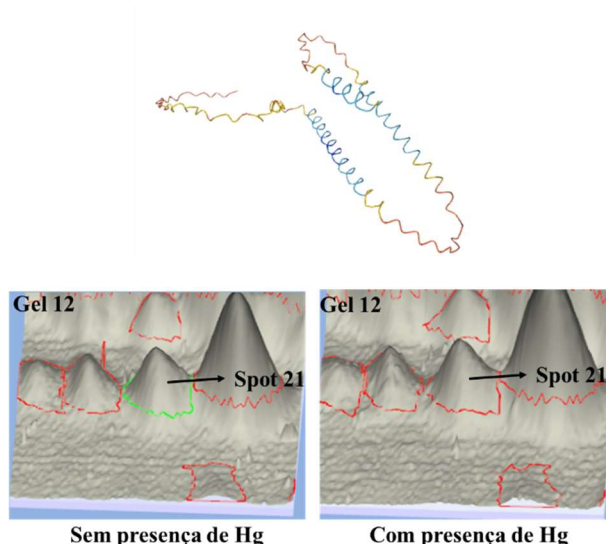


Figura 37. Estrutura molecular obtida pelo UniprotKB da Alfa-caseína e sua expressão com e sem a presença do mercúrio.

Apesar de baixa, a proteína Alfa-caseína também apresentou diferença de expressão quando comparado com e sem a presença de mercúrio. Com a presença de Hg, observou-se uma intensidade de 0,15 e saliência de 99,23 e sem a presença de Hg observou-se uma intensidade 0,10 e saliência de 95,12. Ressalta-se que essa imagem é apenas um exemplo de um único *spot* no qual foi identificada a presença de mercúrio ligado à Imunoglobulina J Chain, porém todas apresentaram o mesmo comportamento.

Assim como Imunoglobulina Kappa constat, a Imunoglobulina J Chain são proteínas de anticorpos e de cadeias leves (23 kD). Porém apresentam uma função diferente, ligam duas unidades monoméricas de IgM ou IgA. No caso de IgM, o dímero unido à cadeia J é uma unidade de nucleação para o pentâmero IgM e, no caso de IgA, induz dímeros e / ou polímeros maiores e ajudam a ligar essas imunoglobulinas ao componente secretor. A ligação dissulfeto na cadeia J humana se dá devido ao seu emparelhamento covalente com a imunoglobulina M, podendo assim coordenar íons com características de ácido mole, como o Hg^{2+} (POLLARD; HULTMAN, 1997), caracterizando assim essa proteína como uma possível biomarcadora de mercúrio.

A Figura 38 ilustra a estrutura da proteína e sua expressão no gel da 2D-PAGE, comparando os mesmos *spots* com e sem a presença de mercúrio, verifica-se que quando o Hg está ligado ou fazendo parte da estrutura da proteína, essa apresenta uma maior intensidade e saliência no gel da 2D-PAGE

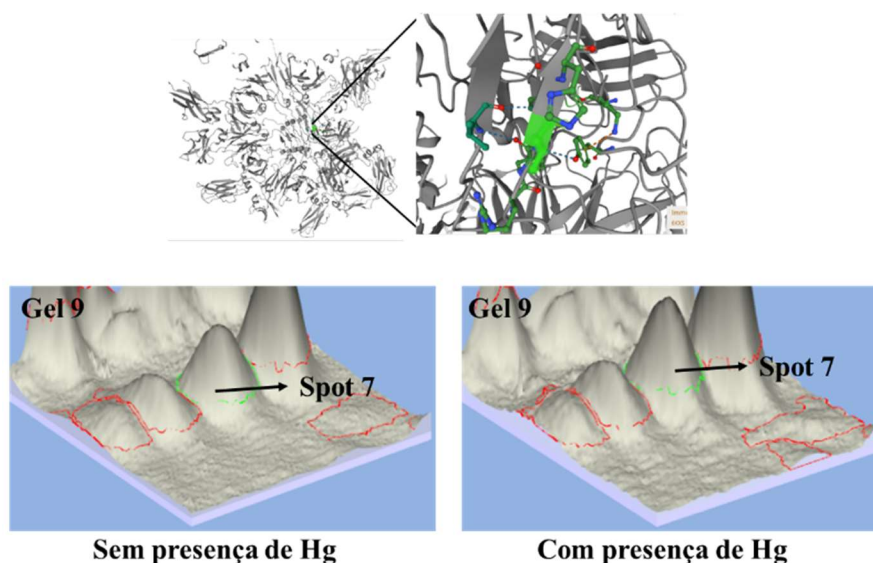


Figura 38. Estrutura molecular obtida pelo UniprotKB da Imunoglobulina J Chain, destacada cadeia leve, e sua expressão com e sem a presença do mercúrio.

A Figura 38 ilustra uma diferença significativa na expressão da proteína Imunoglobulina J Chain, com e sem a presença do mercúrio. Com a presença de Hg observou-se uma intensidade de 2,5 e saliência de 1135,28 e sem a presença de Hg observou-se uma intensidade 1,24 e saliência de 888,08.

6 CONCLUSÃO

As metodologias otimizadas para a quantificação de mercúrio total em amostras de cabelo e leite, quantificação de proteínas totais em leite materno e eletroforese bidimensional, foram capazes de fornecer resultados tecnicamente válidos.

Considerando que nenhuma das lactantes apresentou mercúrio total no cabelo acima do valor máximo permitido pela OMS e que todas elas apresentaram teores de mercúrio acima do permitido no leite, o cabelo não é um bom indicador para definir se as mães estão transferindo para os bebês, através do aleitamento, quantidades de mercúrio acima do permitido pela OMS.

As participantes das comunidades do Rio Negro, que declararam em sua maioria terem o peixe como maior fonte de proteínas apresentaram teores maiores de mercúrio tanto no cabelo ($1,97 \pm 1,71$) quanto no leite ($35,03 \pm 3,38$), quando comparados com a comunidade do Rio Madeira.

As proteínas Beta-casein OS, Immunoglobulin kappa constant OS, Alpha-S1-casein OS e Immunoglobulin J chain OS foram as mais expressas quando em contato com o mercúrio, podendo ser possíveis biomarcadoras do mercúrio no leite materno.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRES, G. **Distribuição do Mercúrio nas Águas Superficiais do Rio Madeira**. [s.l: s.n.].

ALMEIDA, A. The colonization of the Amazon. **University of Texas**, 2010.

AL-SALEH, I. et al. Mercury (Hg) exposure in breast-fed infants and their mothers and the evidence of oxidative stress. **Biological Trace Element Research**, p. v. 153, nn. 1–3, pages 145–154, jun. 2013.

AMORIM, M. et al. Cytogenetic damage related to low levels of methyl mercury contamination in the Brazilian Amazon. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 72, n. 4, p. 496–507, 2000.

ANEEL. **Banco de informações de geração**. Disponível em: <<http://www.aneel.gov.br>>. Acesso em: 1 maio. 2020.

ANEEL. **Aneel - Matriz por origem de combustível**. Disponível em: <<https://app.powerbi.com/view?r=eyJrljoiNjc4OGYyYjQtYWM2ZC00YjllLWJlYmEtYzdkNTQ1MTc1NjM2liwidCI6IjQwZDZmOWI4LWVjYTctNDZhMi05MmQ0LWVhNGU5YzAxNzBIMSIsImMiOiR9>>. Acesso em: 4 set. 2021.

BARBOSA, A.; DÓREA, J. Indices of mercury contamination during breast feeding in the Amazon Basin. **Envir. Toxic. and Pharm**, v. 6, p. 71–79, 1998.

BASTOS, W. et al. A description of mercury in fishes from the Madeira River Basin, Amazon, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 38, n. 3, p. 431–437, 2008.

BOISCHIO, A.; BARBOSA, A. Exposure to organic mercury in riparian populations on the Upper Madeira River, Rondonia, Brazil, 1991: preliminary results. **Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v. 9, n. 2, p. 155–160, 1993.

BROOKS RAND INSTRUMENTS. **Sistemas Automatizados de Mercúrio - MERX-T**. Disponível em: <<http://www.brooksrandinc.com/products/automated-mercury-systems/merx-total-hg-system-for-epa-1631/>>. Acesso em: 7 dez. 2021.

BUSTILHOS, O. A técnica de ionização por Electrospray na espectrometria de massas. **Revista Analytica**, [s.d.].

CARVALHO, T.; DOMINGUES, E. Projeção de um cenário econômico e de desmatamento para a Amazônia Legal brasileira entre 2006 e 2030. **Nova Economia**, v. 26, p. 585–621, 2016.

CAVECCI, B. **Caracterização por espectrometria de massas de metaloproteínas em amostras de tilápia do Nilo**. Botucatu: [s.n.].

CEMADEN. **Previsão de vazão para bacia do Rio Madeira**. Disponível em: <<http://www2.cemaden.gov.br/13042018-previsao-de-vazao-para-bacia-do-rio-madeira/>>. Acesso em: 17 ago. 2021.

COELHO, L.; AMORIM, A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais Biomarkers for evaluating exposure to chemical agents present in the environment. **Rev. Bras. Epidemiol**, v. 6, 2003.

CRUZ, H.; FABRIZY, N. Impactos ambientais de reservatórios e perspectivas de uso múltiplo. **Rev. Bras. Energ**, 1995.

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

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO - SEÇÃO 1 - 23/11/2018, P. 47 (PUBLICAÇÃO O. Decreto Nº 9.578, de 22 de novembro de 2018, 2018.

ESBR. **Programa de Monitoramento Hidrobiogeoquímico da Usina Hidrelétrica (UHE) Jirau.** Disponível em: <http://sig.esbrsig.com.br/jirau_2011/>. Acesso em: 9 set. 2019.

FADINI, P.; JARDIM, W. Is the Negro River Basin (Amazon) impacted by naturally occurring mercury? **Science of The Total Environment**, v. 275, n. 1–3, p. 71–82, jul. 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. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, 2014.

FLUIDIC ANALYTICS. **Who is Berzelius.** Disponível em: <<https://www.fluidic.com/resources/who-is-berzelius/>>. Acesso em: 16 nov. 2021.

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

GREENWOOD, M. et al. Blood clearance half-times in lactating and nonlactating members of a population exposed to methylmercury. **Environmental Research**, v. 16, p. 48–54, 1978.

HARAGUCHI, H. Metallomics as integrated biometal science. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, p. 19: 5–14, 2004.

HAUSER-DAVIS, R. A. et al. Bile and liver metallothionein behavior in copper-exposed fish. **J Trace Elem Med Biol**, 2014.

HUANG, L. et al. A metabolomic investigation into the temperature-dependent virulence of *Pseudomonas plecoglossicida* from large yellow croaker

Pseudosciaena crocea. **Journal of Fish Diseases**, v. 42, n. 3, p. 431–446, mar. 2019.

INPE. **PRODES (Desmatamento)**. Disponível em: <http://terrabrasilis.dpi.inpe.br/app/dashboard/deforestation/biomes/legal_amazon/rates>. Acesso em: 14 ago. 2021.

JABUR, M. Rio Madeira. **Santo Antônio Energia**, p. 7–9, 2016.

JEDRYCHOWSKI, W. et al. Effects of Prenatal Exposure to Mercury on Cognitive and Psychomotor Function in One-Year-Old Infants: Epidemiologic Cohort Study in Poland. **Annals of Epidemiology**, v. 16, n. 6, p. 439–447, 2006.

JOHNSEN, L. B. et al. Characterization of three types of human s1-casein mRNA transcripts. **Biochemical Journal**, v. 309, n. 1, p. 237–242, 1 jul. 1995.

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

LACERDA, L.; SOLOMONS, W. **Mercúrio na Amazônia - uma bomba relógio química?** Rio de Janeiro-JR: CETEM/CNPq, 1992.

LINK, V.; ROSA, S. Plano diretor de uso de reservatórios de aproveitamentos hidráulicos e seus entornos. **OCTA**, 2000.

MEIRELLES, J. A. **O Livro de Ouro da Amazônia: mitos e verdades sobre a região mais cobiçada do planeta**. 1. ed. [s.l.: s.n.].

MICAROLI, R.; BUENO, M.; JARDIM, W. Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. **Química Nova**, 2000.

MOLINA-VILLALBA, I. et al. Biomonitoring of arsenic, cadmium, lead, manganese and mercury in urine and hair of children living near mining and industrial areas. *Chemosphere*. **Chemosphere**, p. v. 124, 83-91, abr. 2015.

MORAES, P. GFAAS determination of mercury in muscle samples of fish from Amazon. **Food Chemistry**, p. 2614–2617, 2013.

MOURÃO, D. **Avaliação da exposição ao mercúrio em comunidades ribeirinhas de Porto Velho, Rondônia**. [s.l.: s.n.].

NILADRI BASU et al. Mercury levels in pregnant women, children, and seafood from Mexico City. **Environmental Research**, 2014.

NORDBERG, M. Metallothioneins: historical review and state of knowledge. **Talanta**, p. 46(2): 243-254, 1998.

OPAS; OMS. **Cooperação técnica entre Brasil, Bolívia e Colômbia: Teoria e Prática para o Fortalecimento da Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Mercúrio**, 2011.

PEARSON, R. Hard and Soft Acids and Bases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 22, p. 3533–3539, 1 nov. 1963.

PÉREZ, C.; SHAH, E.; BUTLER, I. Mercury-induced autoimmunity: Report of two adolescent siblings with Morvan syndrome “plus” and review of the literature. **Journal of Neuroimmunology**, v. 342, p. 577197, maio 2020.

PERKIN ELMER. **Atomic Spectroscopy - A Guide to Selecting the Appropriate Technique and System**, 2008.

PERKIN ELMER. **SMS 100 MERCURY ANALYZER**. Disponível em: <https://resources.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/BRO_sms100mercuryalyzer.pdf>. Acesso em: 7 dez. 2021.

PFEIFFER, W. et al. Mercury concentrations in inland waters of Rondônia, Amazon Brazil. **Science of The Total Environment**, p. Volumes 87–88-233-240, 1989.

POLLARD, K.; HULTMAN, P. Effects of Mercury on the Immune System. **Metal ions in biological systems**, v. 34, p. 421–440, 1997.

Portal de Periódicos Capes/MEC. Disponível em: <<https://www-periodicos-capes-gov-br.ez51.periodicos.capes.gov.br/>>. Acesso em: 18 ago. 2021.

POZZI, C. et al. Metal ions bound to the human milk immunoglobulin A: Metalloproteomic approach. **Food Chemistry**, v. 166, p. 492–497, jan. 2015.

PRADO, R. Manejo integrado de reservatórios destinados a uso múltiplo como perspectiva de recuperação da qualidade da água. **Recursos hidroenergéticos: usos, impactos e planejamento integrado**, p. 193–208, 2002.

QUADROS, T.; ZANLORENSSI, G.; MAIA, G. **30 anos de desmatamento da Amazônia, em mapas e gráficos**. Disponível em: <<https://www.nexojornal.com.br/grafico/2019/08/15/30-anos-de-desmatamento-da-Amazônia-em-mapas-e-gráficos>>. Acesso em: 25 set. 2021.

ROSATO, A.; VALASATAVA, A.; ANDREINI, C. Minimal Functional Sites in Metalloproteins and Their Usage in Structural Bioinformatics. **International Journal of Molecular Sciences**, 2016.

ROULET, M. et al. Methylmercury in water, seston, and epiphyton of an Amazonian river and its floodplain, Tapajós River, Brazil. **Science of The Total Environment**, p. 43–59, 16 out. 2000.

SALZANO, F. **Genética e Genômica: 135 anos de investigação científica**. Disponível em: <<https://revistapesquisa.fapesp.br/genetica-e-genomica-135-anos-de-investigacao-cientifica/>>. Acesso em: 28 set. 2021.

SANTOS, F. **Estudo metalômico do mercúrio em leite materno coletado da população ribeirinha da área de influência do AHE Jirau-Bacia do Rio Madeira**. Botucatu-SP: [s.n.].

SUGIMOTO, L. **Grupo do IQ é pioneiro em metalômica**. Disponível em: <https://www.unicamp.br/unicamp_hoje/ju/novembro2007/ju380pag04.html>. Acesso em: 29 set. 2021.

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

TUNDISI, J. Ecologia, limnologia e aspectos socioeconômicos da construção de hidrelétricas nos trópicos. **Desafio amazônico: o futuro das civilizações nos Trópicos**, p. 47–85, 1999.

UNIPROT. **UNIPROT - Mapeamento de recuperação / ID**. Disponível em: <<https://www.uniprot.org/uploadlists/>>. Acesso em: 4 jun. 2021.

VASCONCELLOS, A. et al. Burden of Mild Mental Retardation attributed to prenatal methylmercury exposure in Amazon: local and regional estimates. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 23, p. 3535–3545, 2018.

VASCONCELOS, R. **Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para quantificação de mercúrio total e metilmercúrio em água utilizando a técnica de fluorescência atômica do vapor frio**. São Carlos-SP: [s.n.].

VIEIRA, J. **Investigação de metaloproteínas em peixes da região de Jirau - Bacia do Rio Madeira-Rondônia**. Botucatu-SP: [s.n.].

WHO. **Methylmercury - environmental health criteria 101**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://wedocs.unep.org/20.500.11822/29413>>.

WWF-BRASIL; FIOCRUZ; CINCIA. **Observatório do Mercúrio**. Disponível em: <https://panda.maps.arcgis.com/apps/Cascade/index.html?appid=e74f4fc219b3428b8e4bce4d7295f210&_ga=2.243594113.58978540.1629644424-857634892.1629644424>. Acesso em: 22 ago. 2021.

ZHANG, L.; WONG, M. Environmental mercury contamination in China: Sources and impacts. **Environment International**, v. 33, p. 108–121, 2007.

8 ANEXO 1 – Géis obtidos nas corridas eletroforéticas

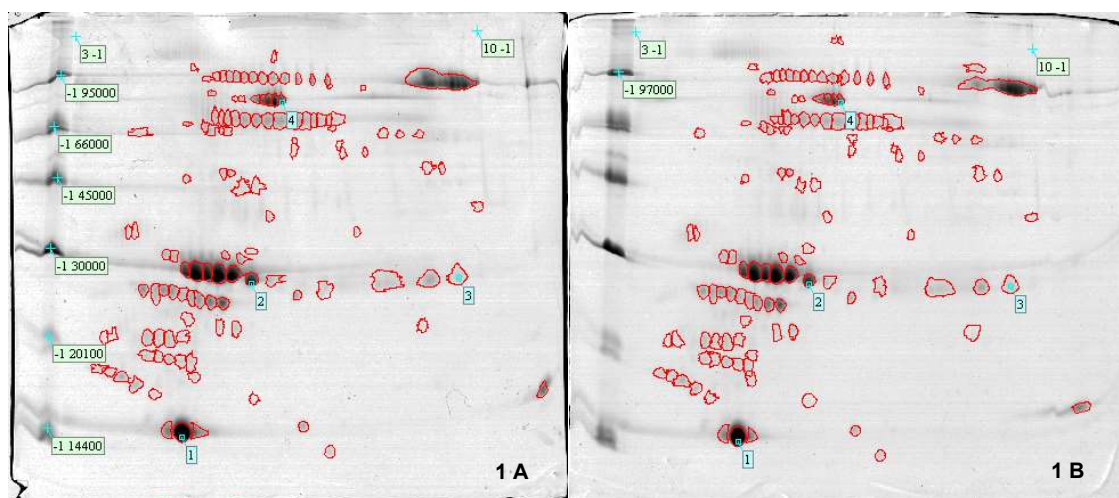


Figura 39. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 1

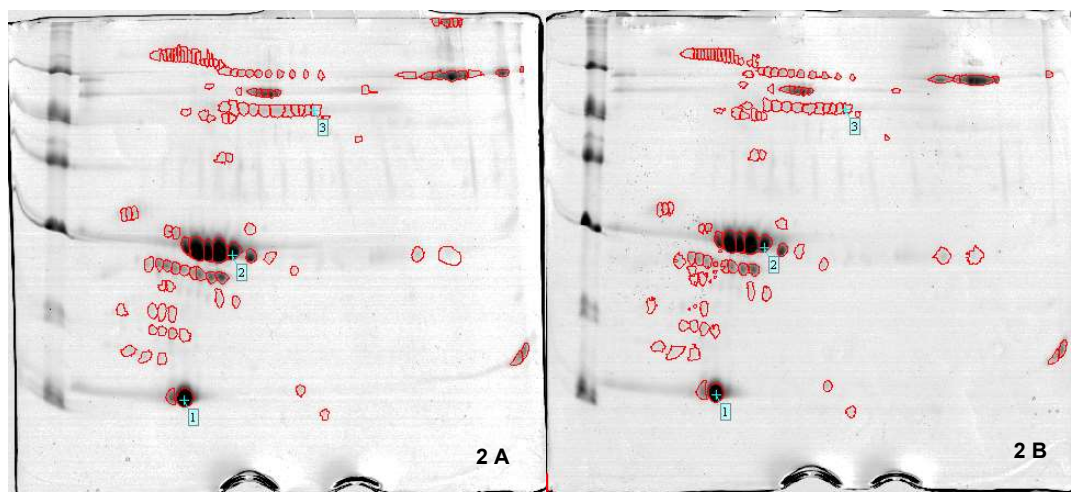


Figura 40. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 2

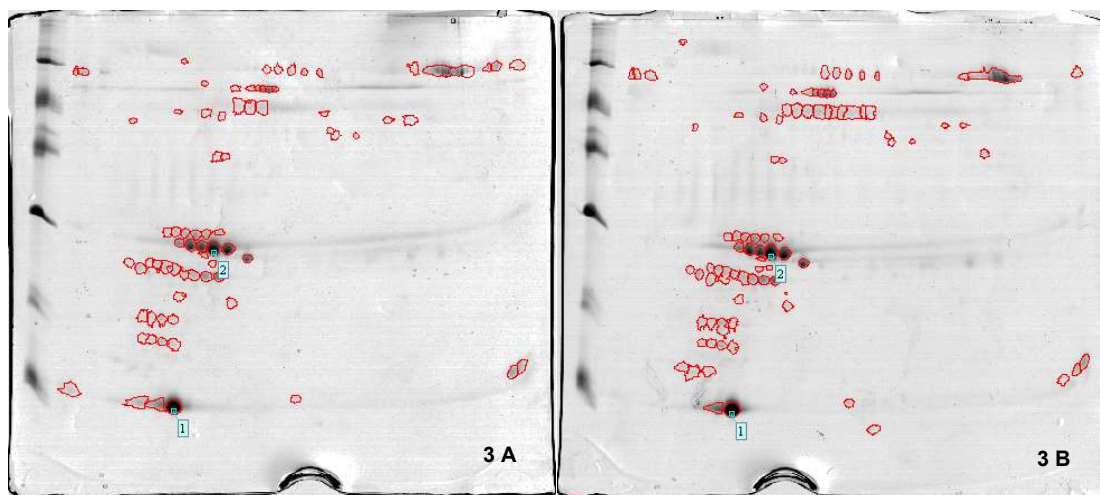


Figura 41. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 3

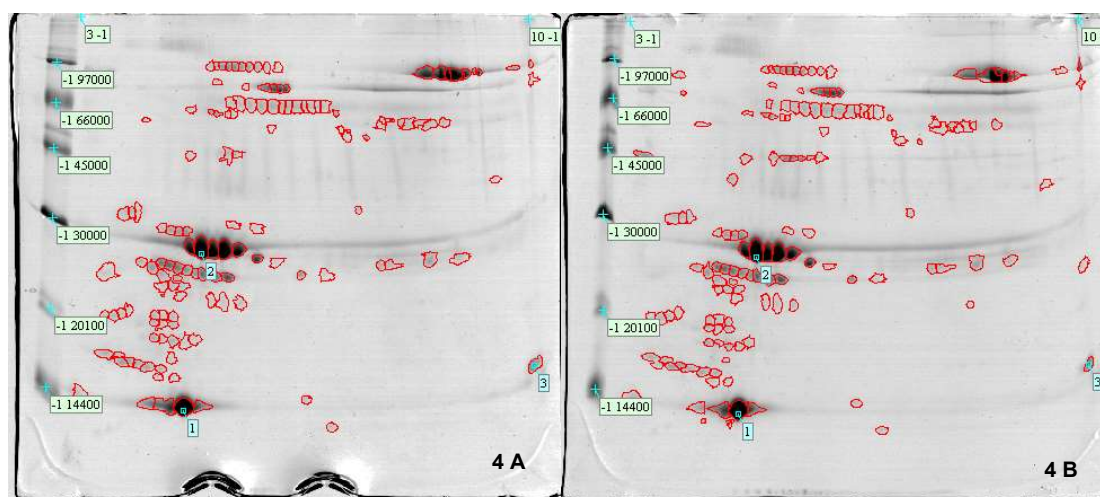


Figura 42. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 4

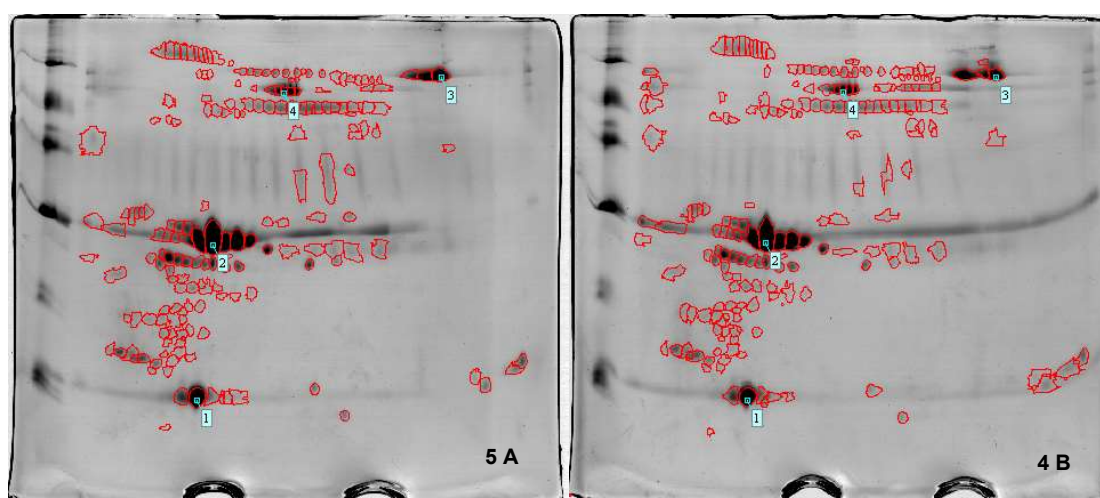


Figura 43. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 5

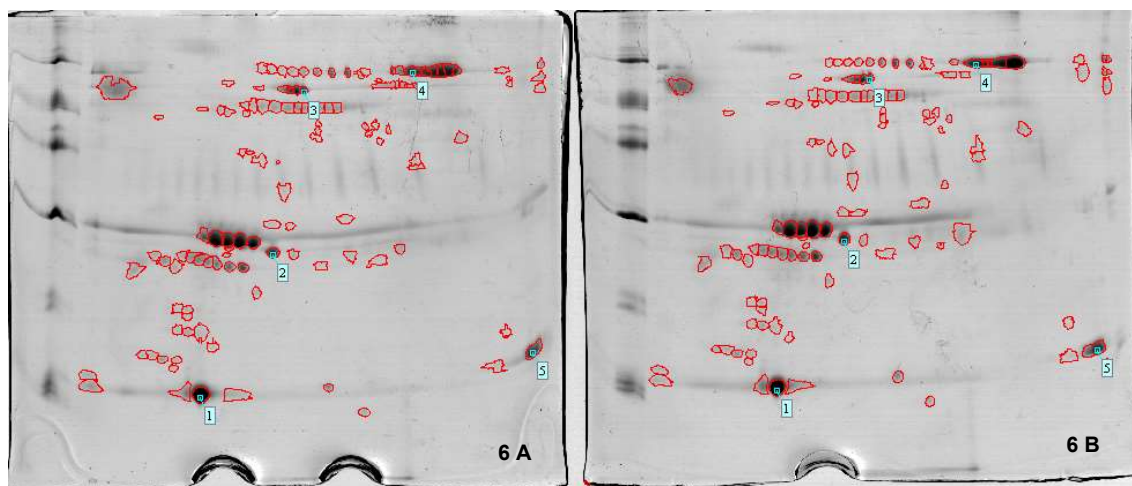


Figura 44. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 6

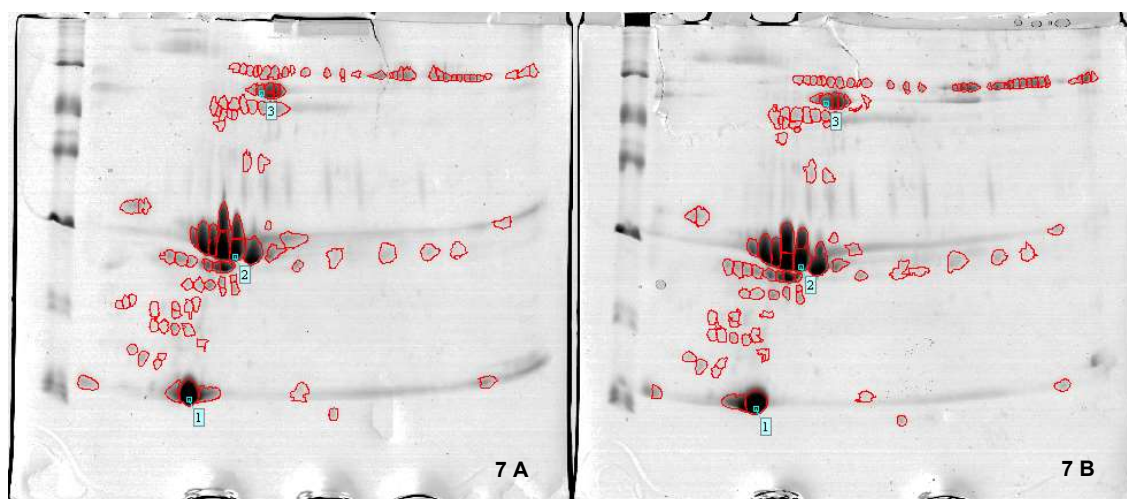


Figura 45. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 7

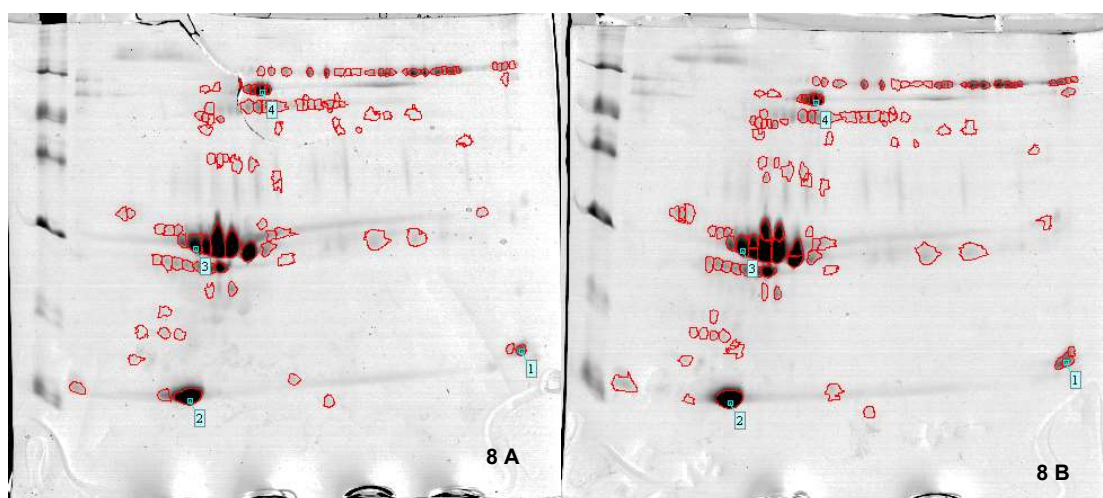


Figura 46. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 8

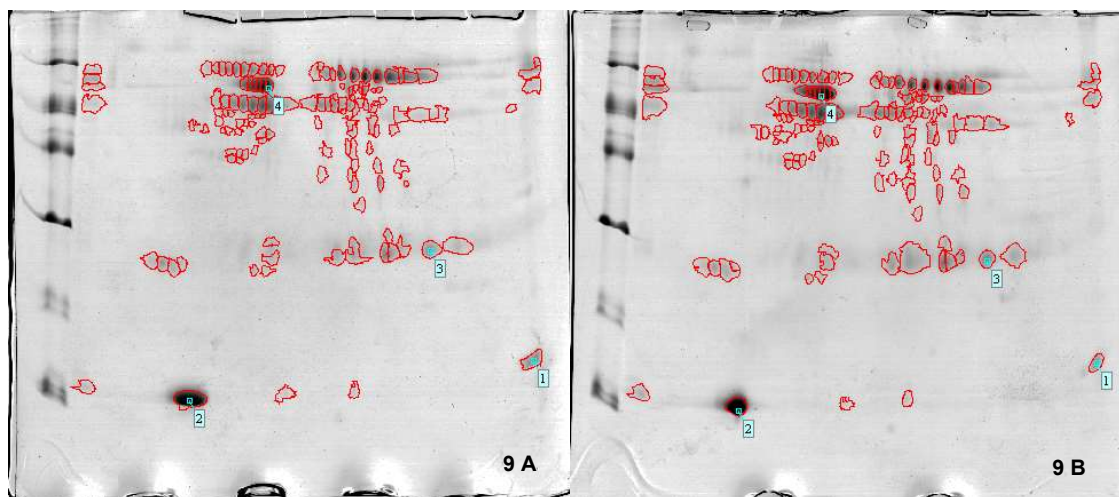


Figura 47. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 9

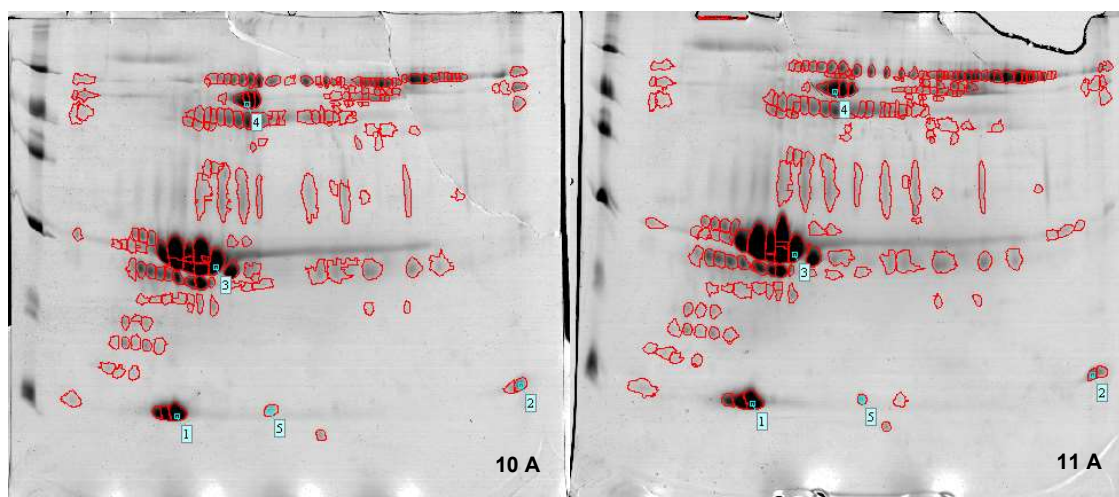


Figura 48. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 10

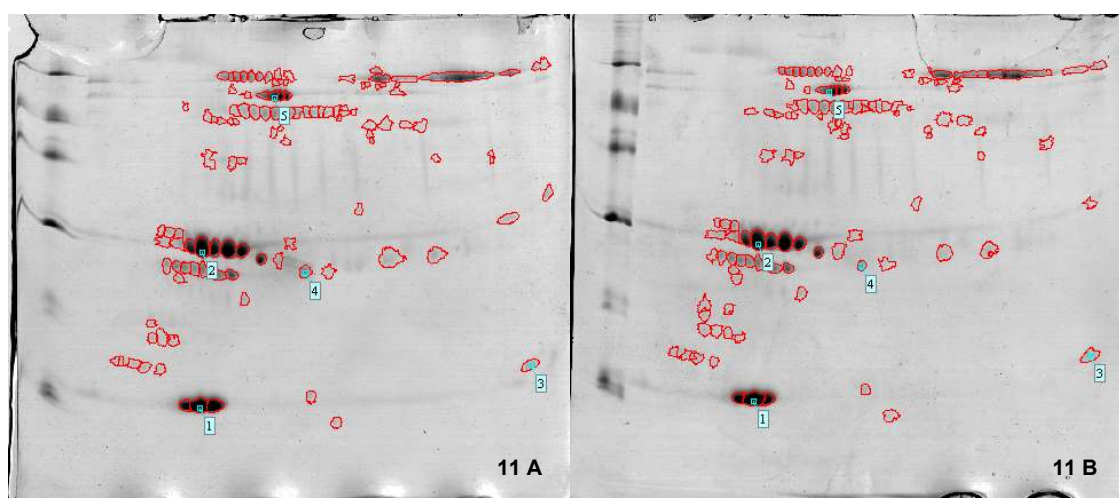


Figura 49. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 11

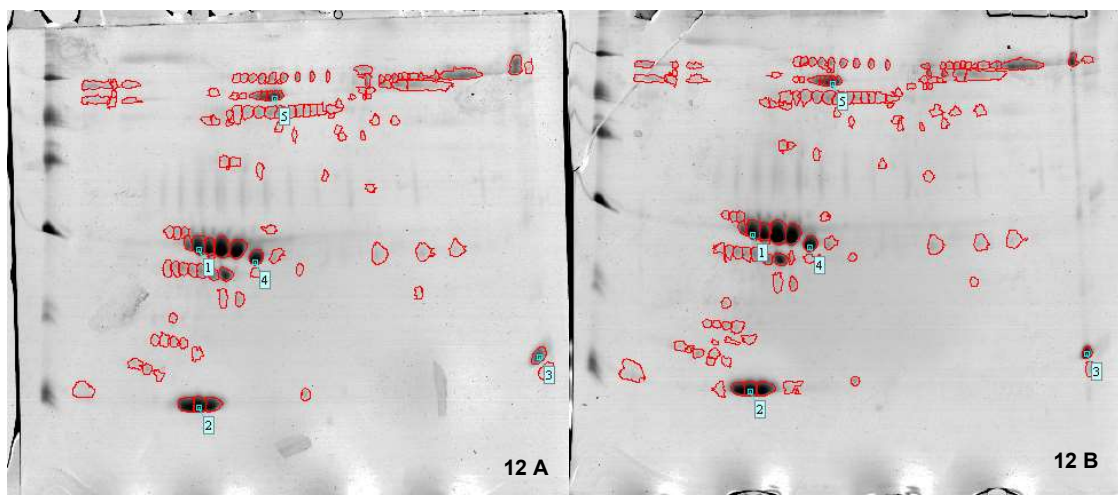


Figura 50. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 12

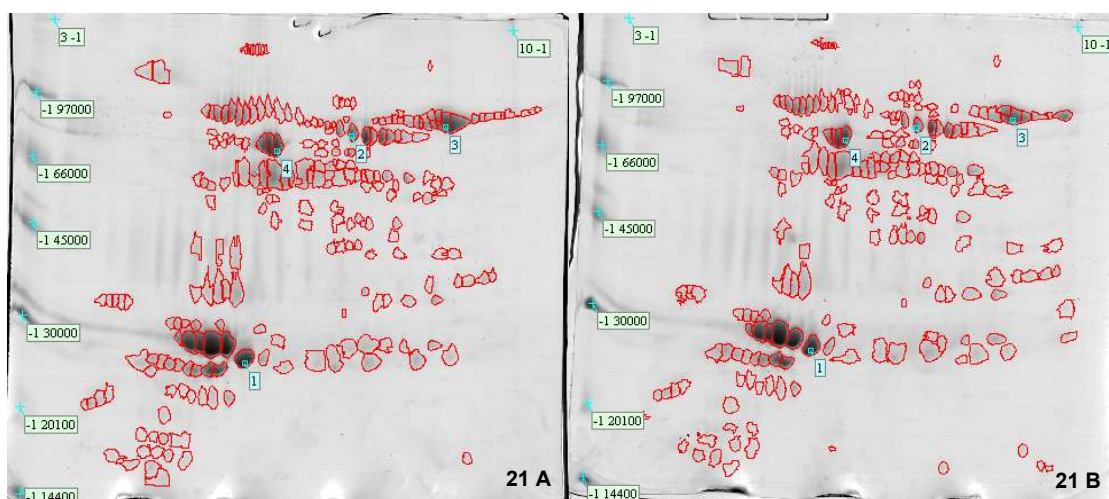


Figura 51. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 21

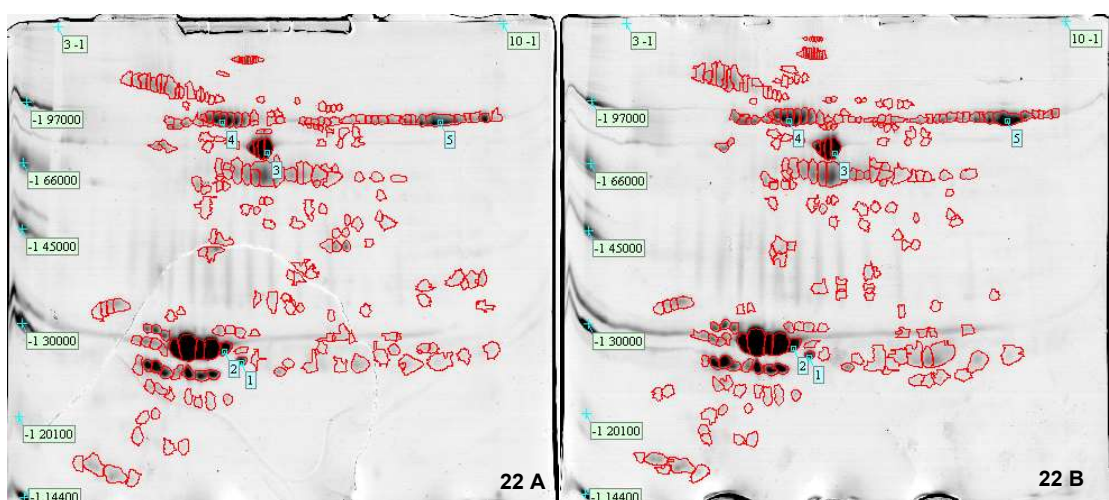


Figura 52. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 22

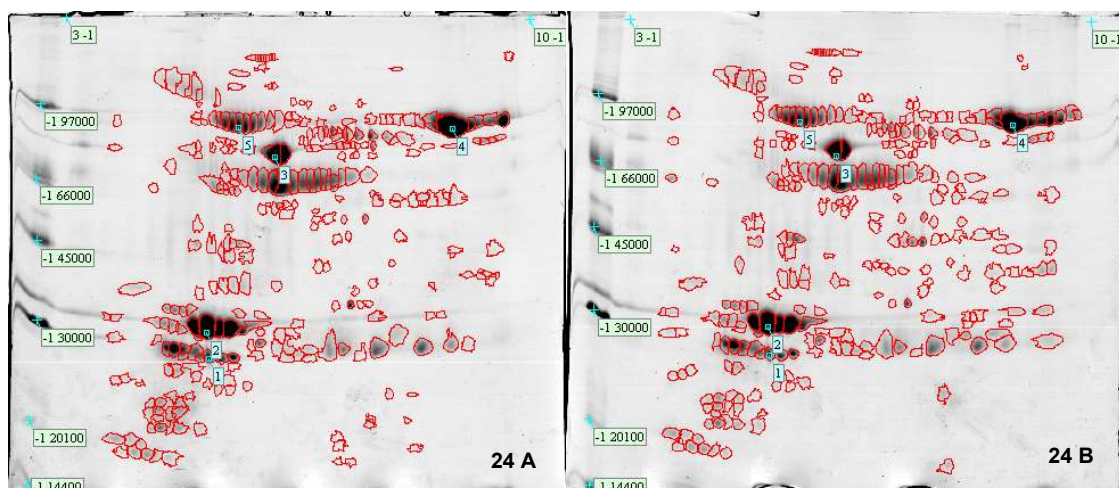


Figura 53. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 24

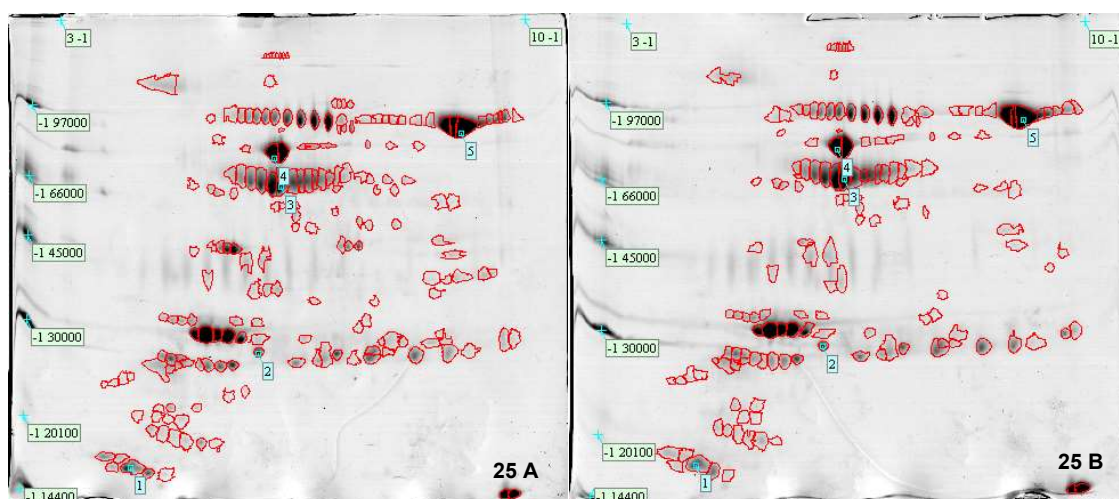


Figura 54. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 25

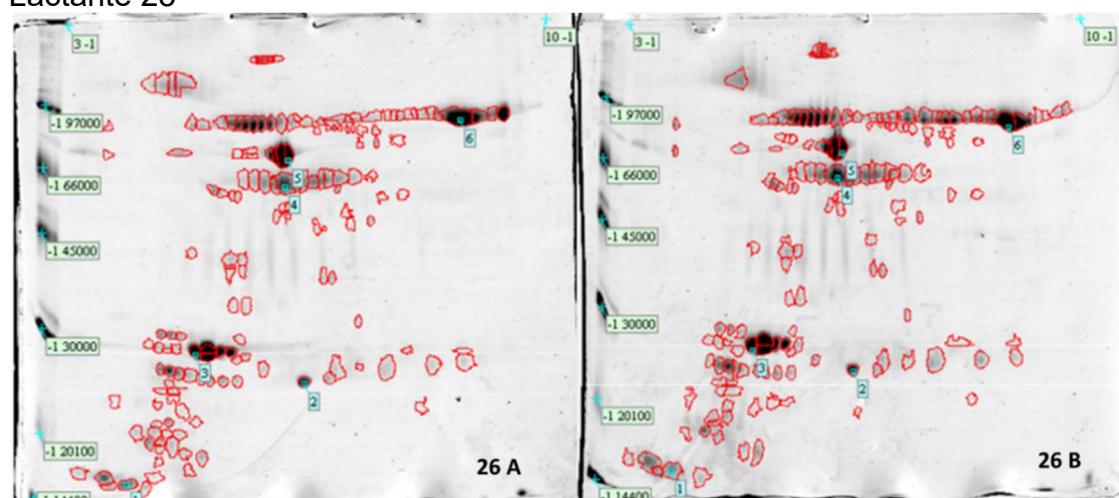


Figura 55. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 26

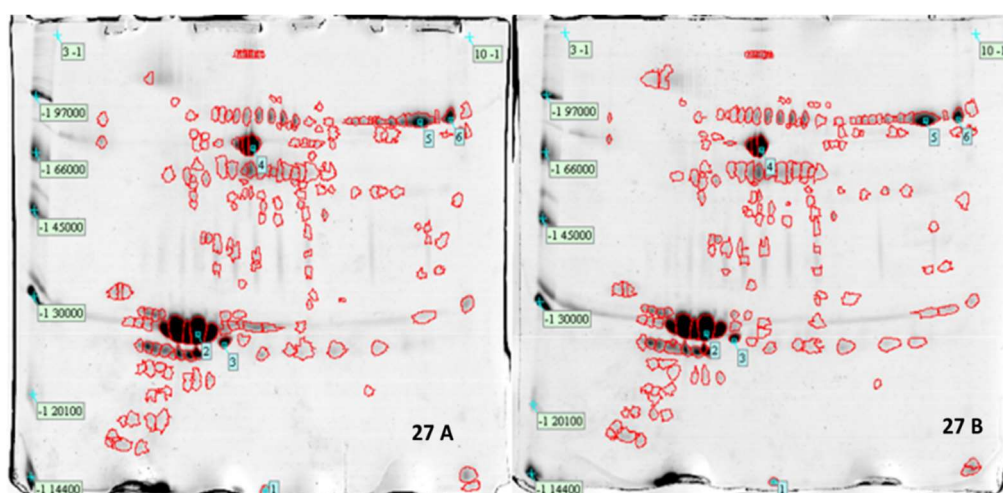


Figura 56. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 27

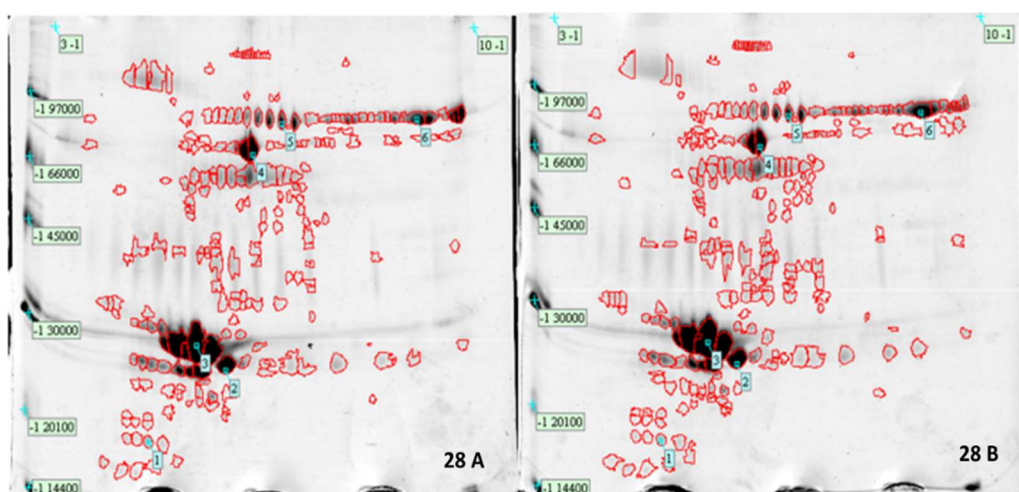


Figura 57. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 28

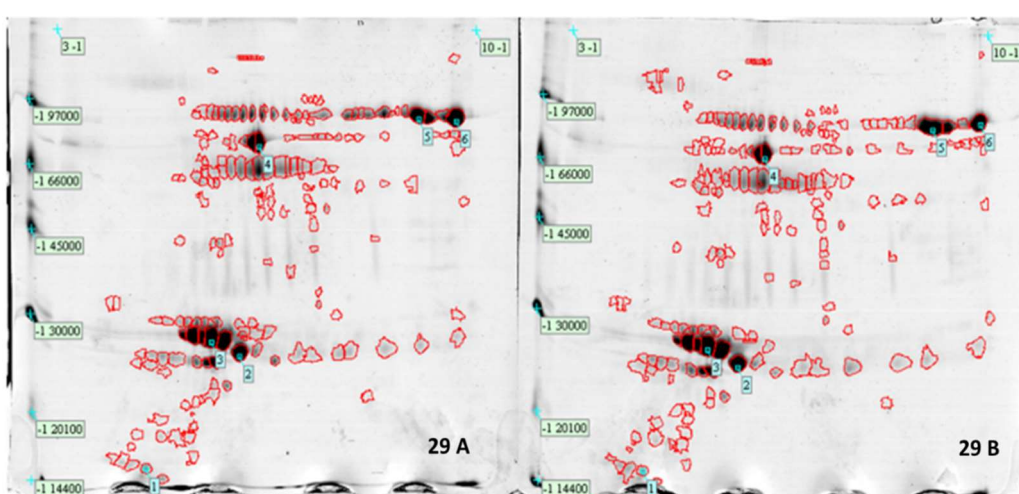


Figura 58. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 29

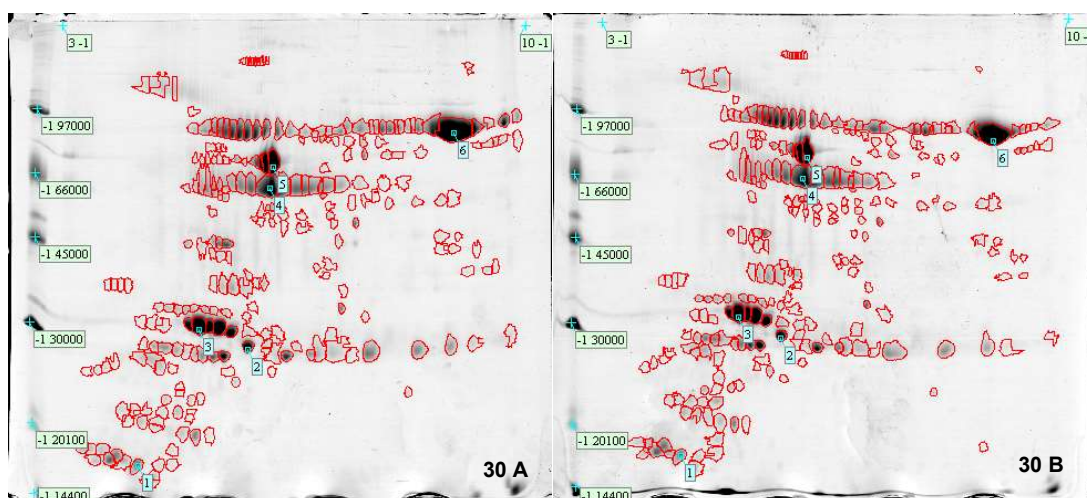


Figura 59. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 30

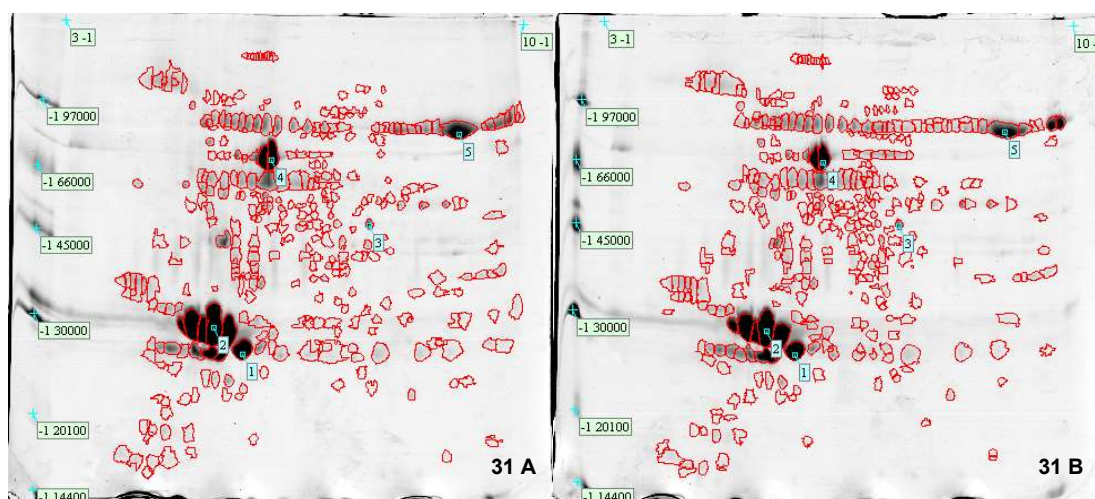


Figura 60. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 31

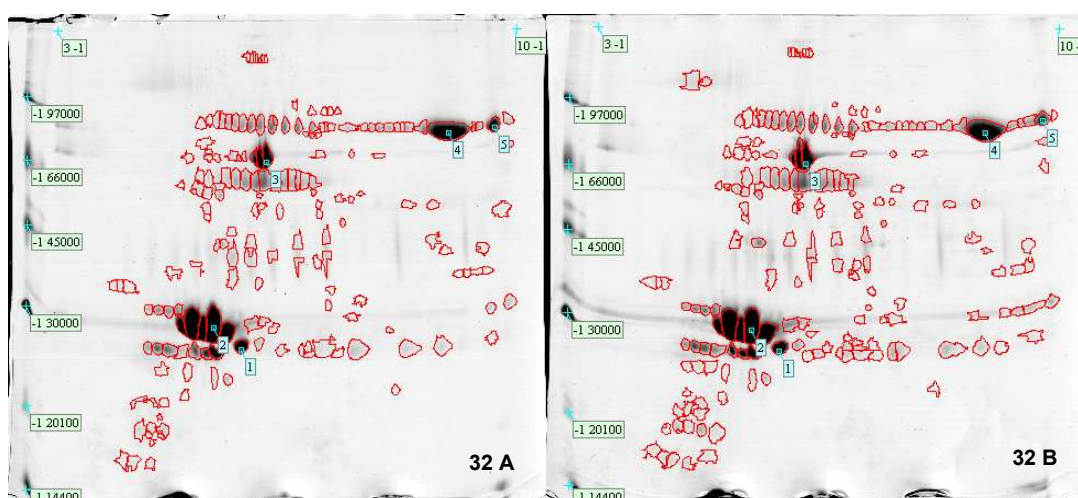


Figura 61. Gel obtido na corrida eletroforética da amostra de leite materno da Lactante 32

9 ANEXO 2 – Correlações das repetições dos géis

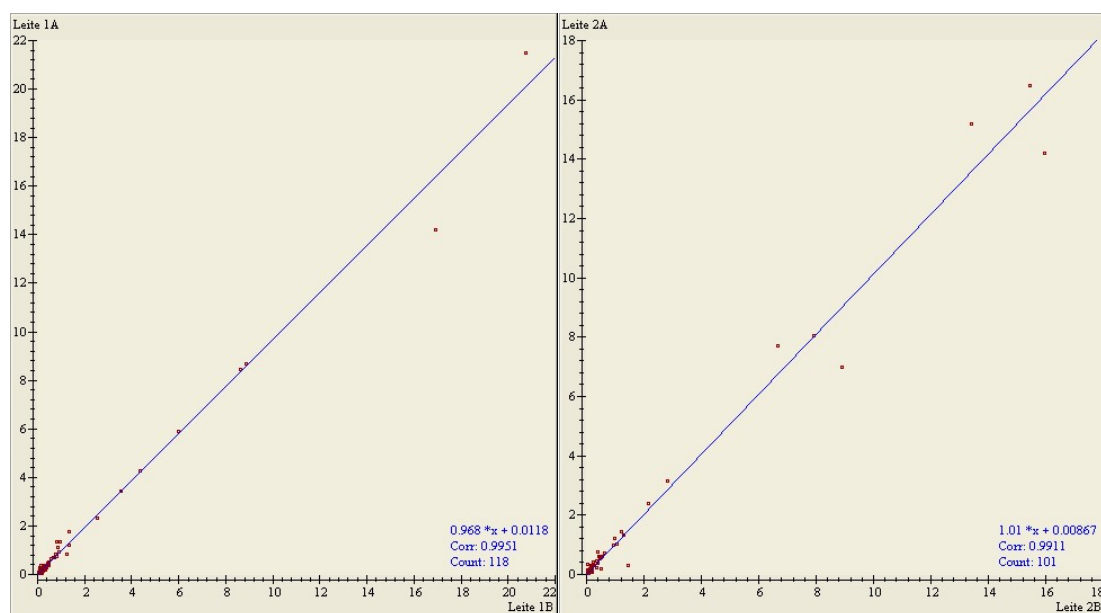


Figura 62. Correlações das repetições dos géis entre o volume normalizado (%V) dos *spots* dos pares do gel da amostra da lactante 1 (à esquerda) e 2 (à direita)

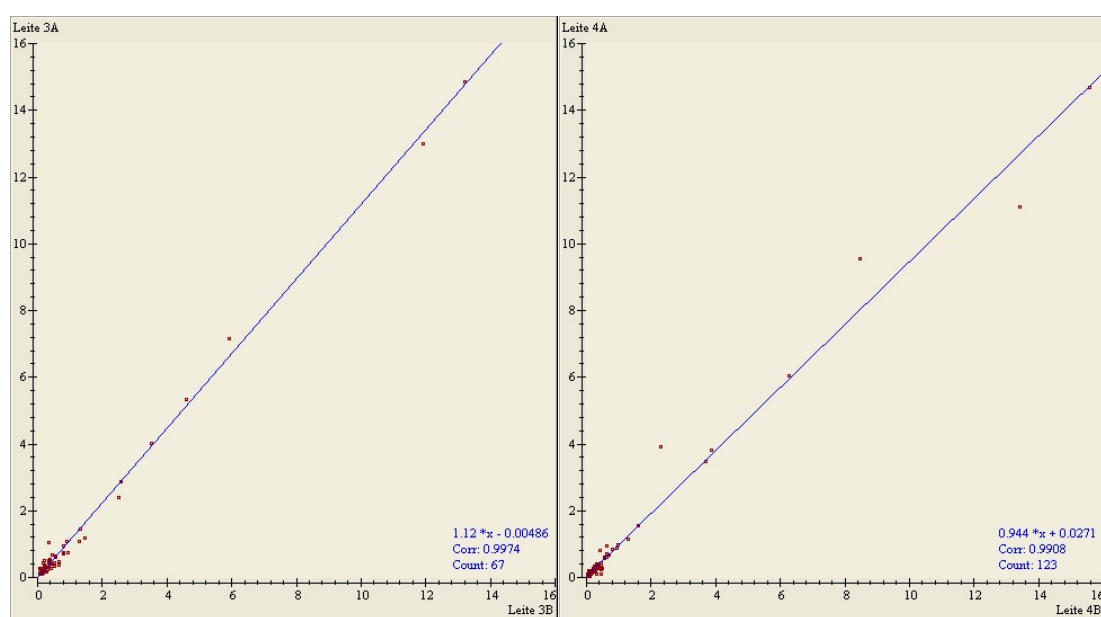


Figura 63. Correlações das repetições dos géis entre o volume normalizado (%V) dos *spots* dos pares do gel da amostra da lactante 3 (à esquerda) e 4 (à direita)

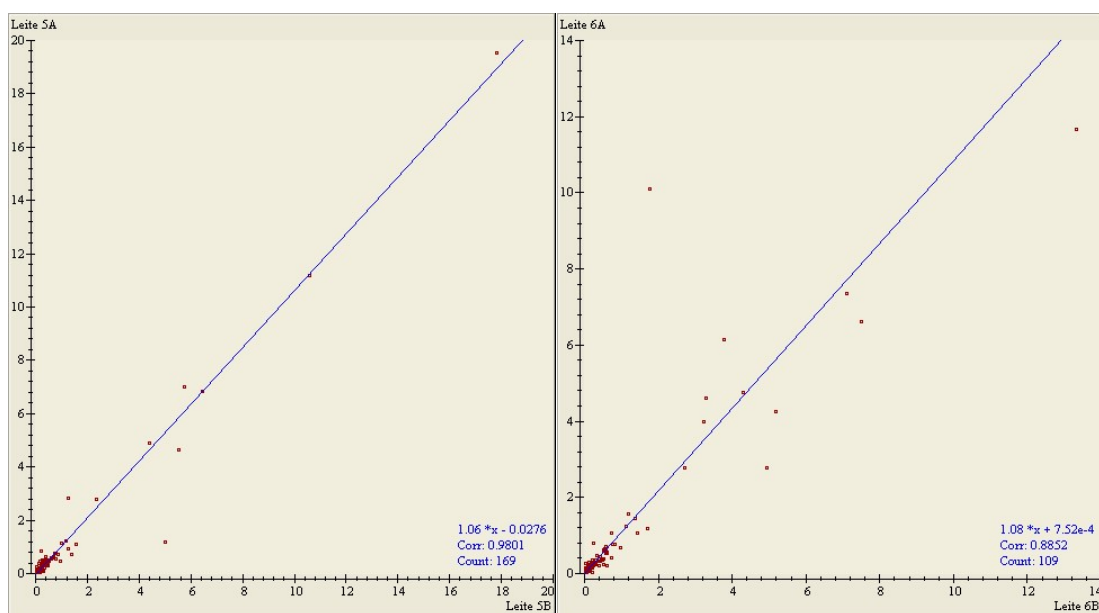


Figura 64. Correlações das repetições dos géis entre o volume normalizado (%V) dos *spots* dos pares do gel da amostra da lactante 5 (à esquerda) e 6 (à direita)

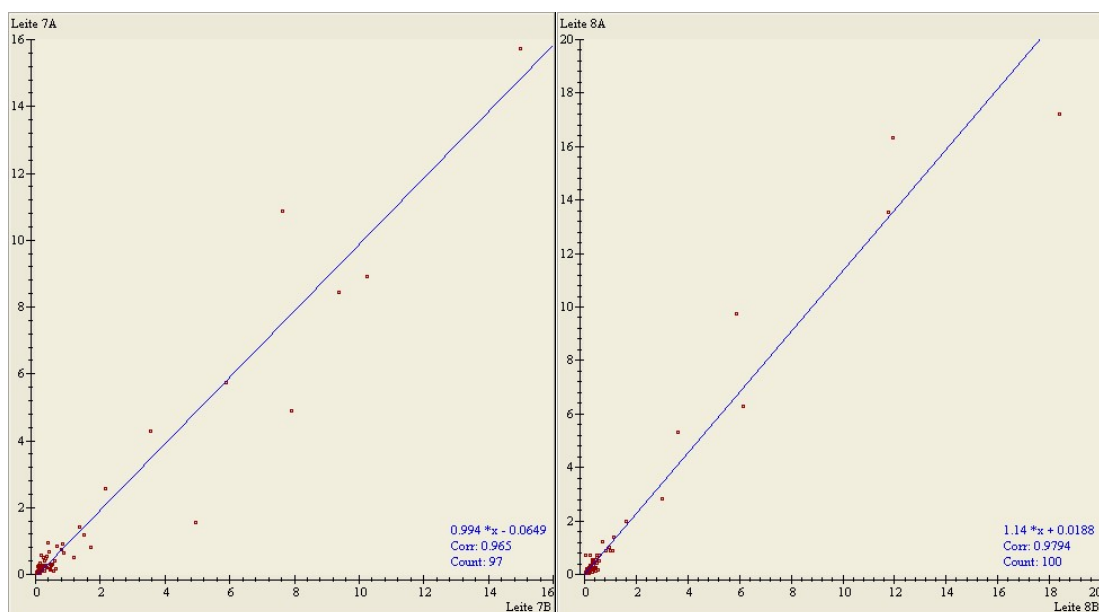


Figura 65. Correlações das repetições dos géis entre o volume normalizado (%V) dos *spots* dos pares do gel da amostra da lactante 7 (à esquerda) e 8 (à direita)

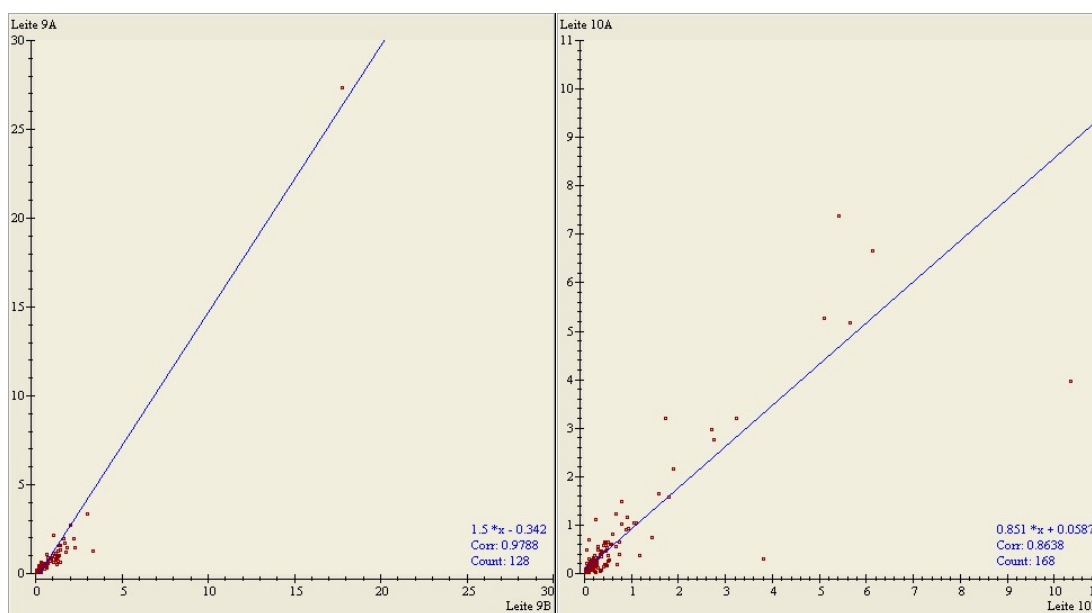


Figura 66. Correlações das repetições dos géis entre o volume normalizado (%V) dos *spots* dos pares do gel da amostra da lactante 9 (à esquerda) e 10 (à direita)

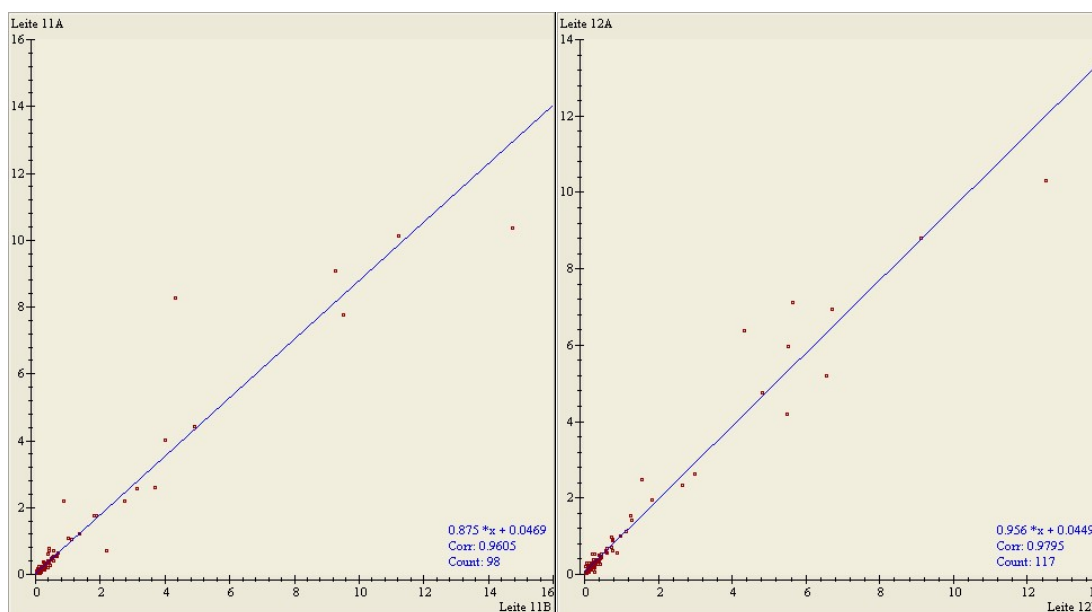


Figura 67. Correlações das repetições dos géis entre o volume normalizado (%V) dos *spots* dos pares do gel da amostra da lactante 11 (à esquerda) e 12 (à direita)

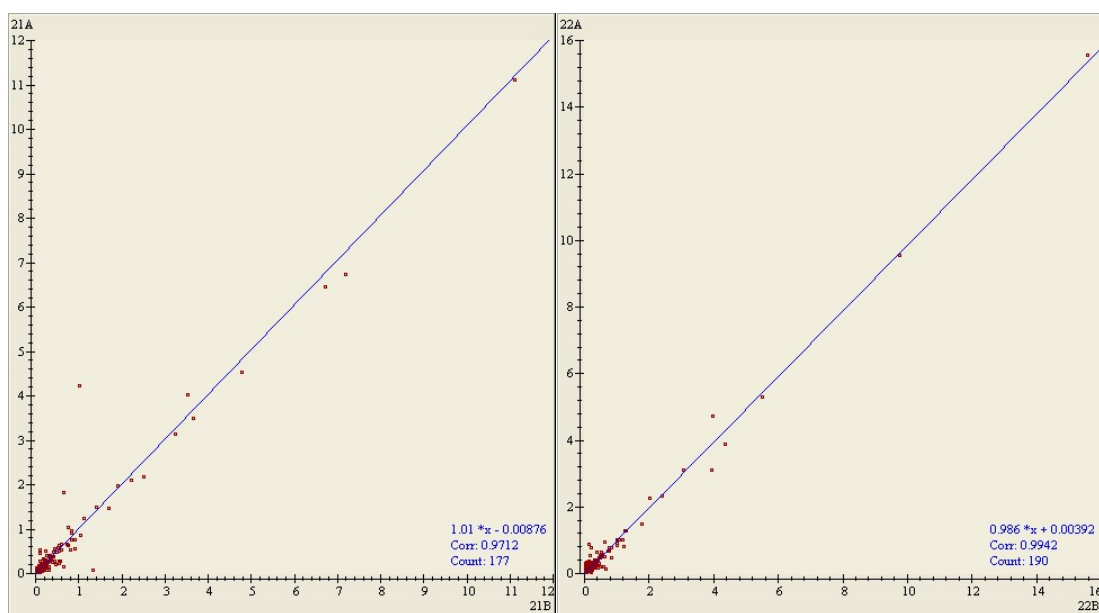


Figura 68. Correlações das repetições dos géis entre o volume normalizado (%V) dos *spots* dos pares do gel da amostra da lactante 21 (à esquerda) e 22 (à direita)

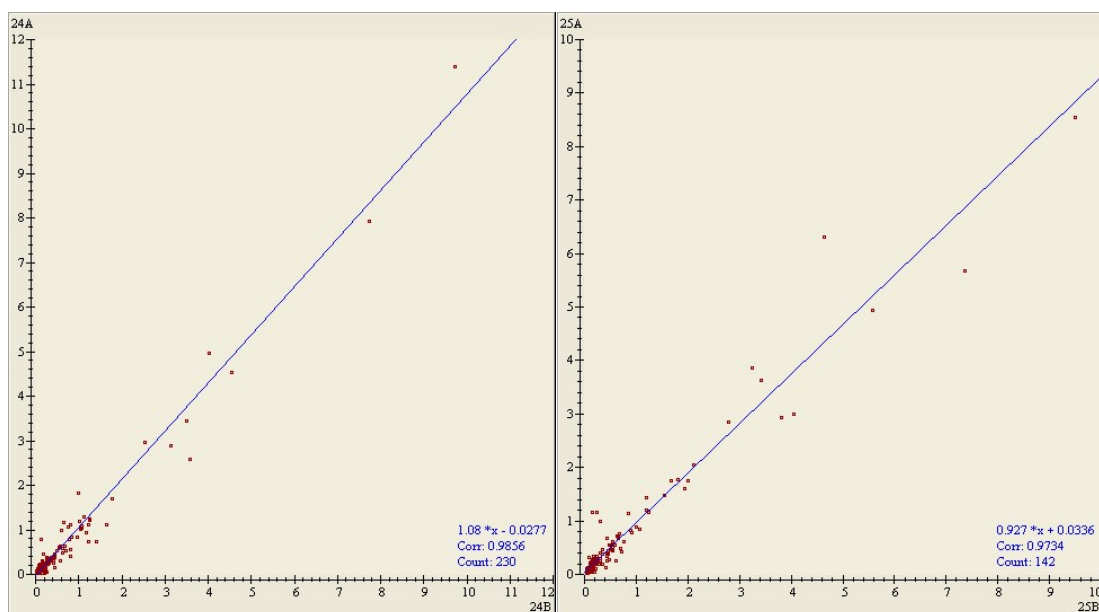


Figura 69. Correlações das repetições dos géis entre o volume normalizado (%V) dos *spots* dos pares do gel da amostra da lactante 24 (à esquerda) e 25 (à direita)

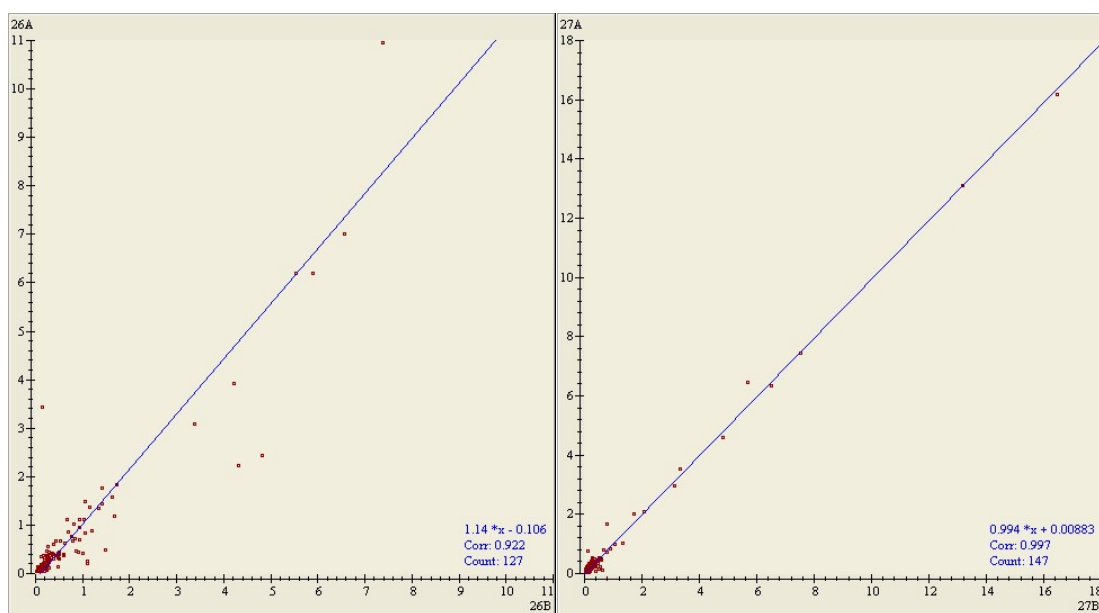


Figura 70. Correlações das repetições dos géis entre o volume normalizado (%V) dos *spots* dos pares do gel da amostra da lactante 26 (à esquerda) e 27 (à direita)

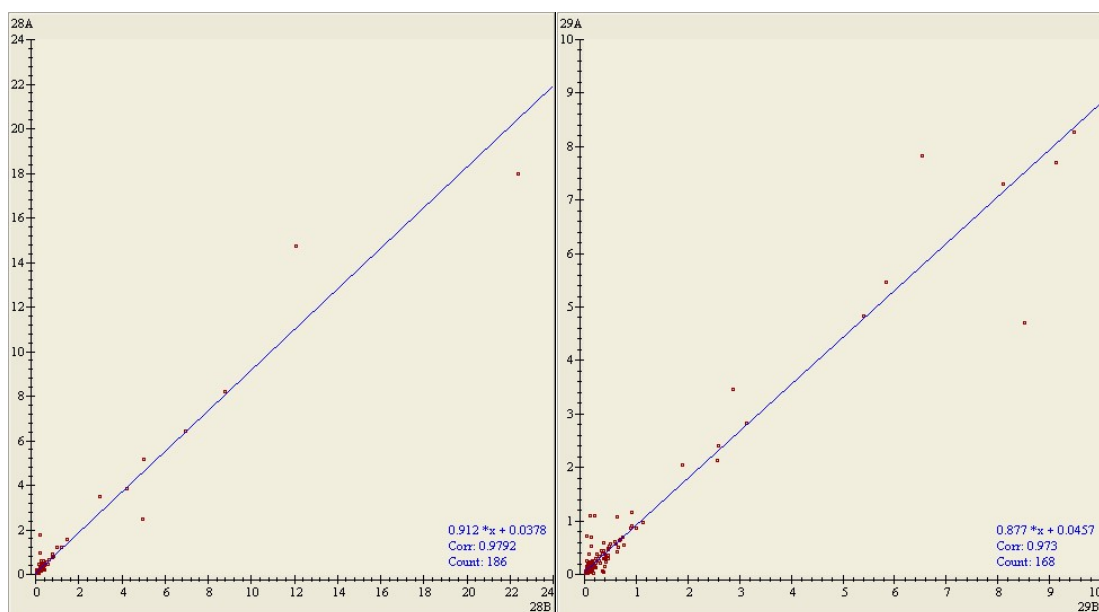


Figura 71. Correlações das repetições dos géis entre o volume normalizado (%V) dos *spots* dos pares do gel da amostra da lactante 28 (à esquerda) e 29 (à direita)

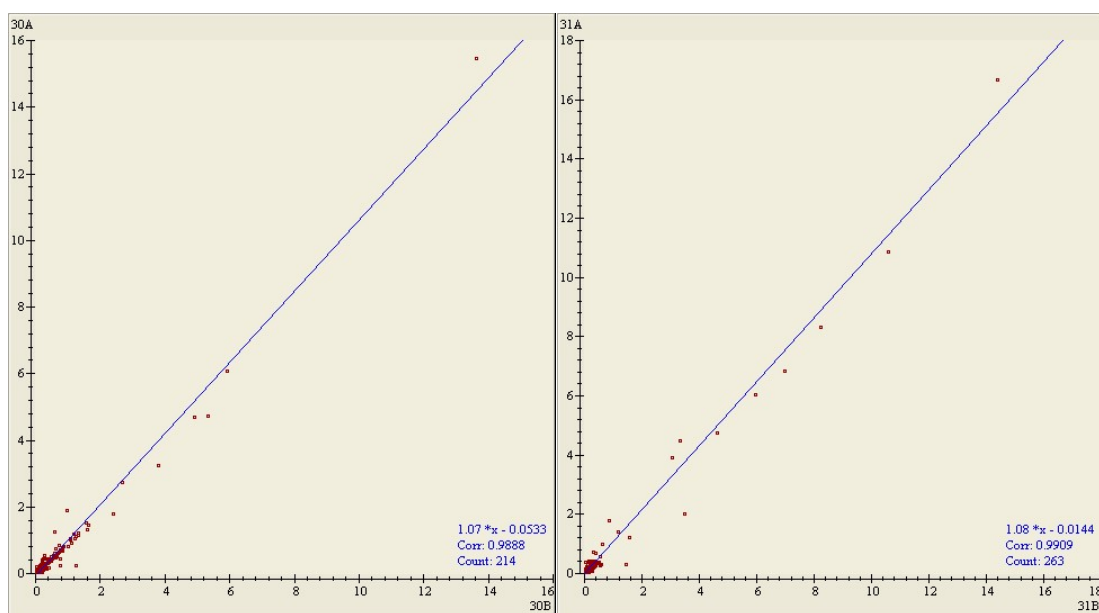


Figura 72. Correlações das repetições dos géis entre o volume normalizado (%V) dos *spots* dos pares do gel da amostra da lactante 30 (à esquerda) e 31 (à direita)

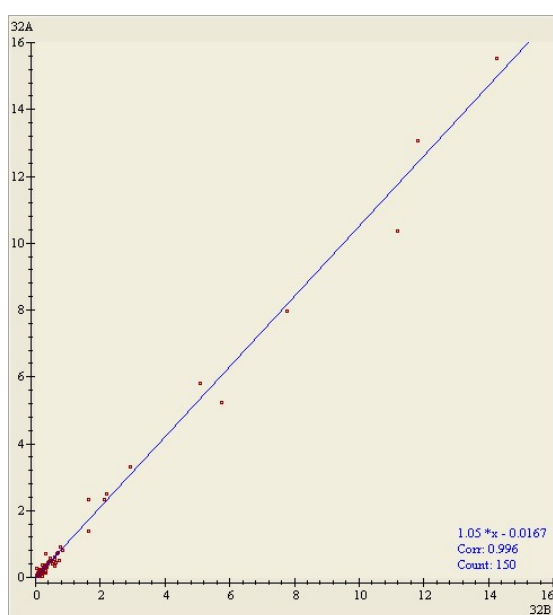


Figura 73. Correlações das repetições dos géis entre o volume normalizado (%V) dos *spots* dos pares do gel da amostra da lactante 32