



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA - PGFAR
FÁRMACO MEDICAMENTOS E ANÁLISES CLÍNICAS

FABRÍCIO PAGANI POSSAMAI

ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO EM TRABALHADORES
EXPOSTOS À EMISSÃO DE CONTAMINANTES ATMOSFÉRICOS DE
INCINERADOR DE RESÍDUOS SÓLIDOS DE SERVIÇO DE SAÚDE,
ANTES E APÓS A SUPLEMENTAÇÃO ANTIOXIDANTE

Florianópolis, 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA - PGFAR
FÁRMACO MEDICAMENTOS E ANÁLISES CLÍNICAS

Fabricio Pagani Possamai

**Análise do estresse oxidativo em trabalhadores expostos à
emissão de contaminantes atmosféricos de incinerador de resíduos
sólidos de serviço de saúde, antes e após a suplementação
antioxidante**

Tese apresentada como requisito para obtenção do
Título de Doutor em Farmácia – Fármaco
Medicamento e Análises Clínicas na Universidade
Federal de Santa Catarina – UFSC.

Orientador: Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho

Co-orientador: Prof. Dr. Felipe Dal-Pizzol

Florianópolis, SC, Brasil

Outubro, 2009

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da
Universidade Federal de Santa Catarina

P856a Possamai, Fabricio Pagani
Análise do estresse oxidativo em trabalhadores expostos
à emissão de contaminantes atmosféricos de incinerador
de resíduos sólidos de serviço de saúde, antes e após
a suplementação antioxidante [tese] / Fabricio Pagani
Possamai ; orientador, Danilo Wilhelm Filho. -
Florianópolis, SC, 2009.
125 f.: il., grafs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de
Pós-Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Resíduos sólidos. 3. Metais pesados.
4. Estresse Oxidativo. 5. Incineração. 6. Contaminação
atmosférica. 7. Suplementação antioxidante. I. Wilhelm
Filho, Danilo. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

CDU 615.12

“Análise do estresse oxidativo em trabalhadores expostos à emissão de contaminantes atmosféricos de incinerador de resíduos sólidos de serviço de saúde, antes e após a suplementação antioxidante”

POR

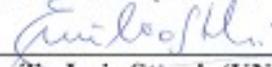
Fabício Pagani Possamai

Tese julgada e aprovada em sua forma final pela Orientadora e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:

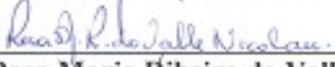
Banca Examinadora:


 Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira (UFRGS - Membro Titular)


 Prof. Dr. Fábio Klamt (UFRGS - Membro Titular)


 Prof. Dr. Emilio Luiz Streck (UNESC – Membro Titular)


 Prof. Dr. Alcir Luiz Dafre (UFSC – Membro Titular)


 Profa. Dra. Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau (UFSC – Membro Titular)


 Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho (UFSC – Orientador)

Profa. Dra. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna
 Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC

Florianópolis, 09 de outubro de 2009.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à guerreira
e missionária **Dorothy Stein** (*in memoriam*)
por sua incansável luta em defesa do meio ambiente,
motivo pelo qual culminou em sua morte, e por todos os seus discípulos,
que não cessam de lutar pela preservação dos recursos naturais brasileiros.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, e à minha companheira Fernanda, pelo amor, compreensão, apoio e carinho;

Ao querido Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho, pela paciência, compreensão, apoio, segurança e amizade conquistada;

Ao prestativo Prof. Dr. Felipe Dal-Pizzol, pelo incentivo e disposição permanente em colaborar com os estudos;

Aos colegas do Laboratório de Ecofisiologia Respiratória, Sílvio, Eduardo, Patrícia Budni, Patrícia Backes, Vivi, Ana Maria, Thais e Débora, pelo apoio e amizade;

Ao Prof. Dr. Pio Colepicollo Neto e colaboradores, que nos proporcionaram realizar as análises das vitaminas e perfil da glutatona no Laboratório de Bioquímica da USP/SP;

Ao Laboratório de Química da UFSC, pelo auxílio com as análises de metais pesados;

À Medicinallis e Vitalis Farmácia de Manipulação, pela contribuição no fornecimento das vitaminas para os participantes do estudo;

À UNESC e ESUCRI, pelo incentivo e apoio nos estudos;

Ao Governo do Estado de Santa Catarina e à Prefeitura Municipal de Içara, pela confiança e apoio desde o início dos estudos;

Aos familiares, Maria Madalena, Arcir, Mari Helen e Fernando;

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Alguma coisa está acontecendo no mundo, e nós somos os responsáveis por isso.
Porque no momento certo nós não soubemos cuidar adequadamente
e preservar aquilo que é importante para a própria vida humana.
Se a gente não cuidar agora, os nossos filhos irão
viver num mundo cada vez pior do que
aquele que a gente vivia
quando nasceu”.*

Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente da República

RESUMO

A atividade de incineração de Resíduos Sólidos de Serviço de Saúde (RSSS) produz vários contaminantes que são liberados no meio ambiente, tais como metais pesados, gases e material particulado (MP), assim como vários compostos orgânicos. Estes xenobióticos podem gerar estresse oxidativo em organismos aeróbicos e causar diferentes tipos de doenças, como o câncer. Os organismos aeróbicos dispõem de uma variedade de antioxidantes endógenos e exógenos, dos quais as vitaminas C e E são importantes compostos antioxidantes nutricionais. O objetivo do presente estudo foi investigar a concentração de metais pesados, como chumbo, cobre, ferro, manganês e zinco, na urina e biomarcadores enzimáticos e não enzimáticos de estresse oxidativo no sangue, como os níveis de lipoperoxidação (TBARS), proteína carbonilada (PC), tióis protéicos (TP), vitamina E (VE), glutatona reduzida (GSH), assim como as atividades das enzimas glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase (GR), glutatona S-transferase (GST), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e o teste cometa (TC) para avaliação da genotoxicidade, de três diferentes grupos de indivíduos (n=20 em cada grupo): trabalhadores, situados no município de Laguna (diretamente expostos), residentes, situados no município de Capivari de Baixo (indiretamente expostos, que residem ca. 5 km do equipamento de incineração), e controles, situados no município de Florianópolis (indivíduos não expostos, doadores de sangue HU/UFSC), antes e após a suplementação com vitamina E (800 mg/dia) e vitamina C (500 mg/dia) durante seis meses. A concentração de metais pesados mostrou-se elevada ($p<0,01$ e $p<0,05$) em todos os grupos quando comparados ao grupo controle, com exceção da concentração de ferro no grupo de residentes e do manganês nos grupos expostos. Antes da suplementação vitamínica, a concentração de TBARS nos grupos expostos e PC no grupo residentes estava aumentada ($p<0,01$), e os conteúdos de TP no grupo trabalhadores, VE e GSH, assim como a atividade da GPx estavam diminuídos ($p<0,01$ e $p<0,05$) em todos os grupos expostos. A atividade da GST mostrou aumento ($p<0,01$ e $p<0,05$) e a da GR, bem como o teste cometa=TC, não mostraram alterações em todos os grupos expostos, enquanto que a atividade da CAT foi aumentada ($p<0,01$) e a da SOD foi diminuída ($p<0,05$) no grupo dos trabalhadores. Após a intervenção vitamínica, os níveis de TBARS, PC e TP, bem como aqueles de VE e GSH foram revertidos a valores semelhantes aos

dos controles. A atividade da GPx e GST também alcançaram valores similares aos do grupo controle, a da CAT permaneceu inalterada, enquanto que as atividades da GR e SOD mostraram aumentos ($p < 0,01$) nos grupos expostos, quando comparados aos controles. Concluindo, os indivíduos diretamente e indiretamente expostos à incineração de RSSS estão enfrentando um quadro de estresse oxidativo e riscos à saúde pela exposição à contaminação atmosférica relacionada, pelo menos em parte, com a presença de metais pesados. A intervenção com vitaminas antioxidantes durante um período de seis meses foi efetiva em atenuar o insulto oxidativo possivelmente relacionado a este tipo de contaminação atmosférica.

Palavras chaves: Incineração, resíduos sólidos, contaminação atmosférica, metais pesados, estresse oxidativo, suplementação antioxidante.

ABSTRACT

Incineration of Solid Residues of Health Services (SRHS) generates several airborne contaminants that are discharged into the environment, such as heavy metals, gases and particulate matter (PM), as well as organic compounds. These xenobiotics can lead to oxidative stress in aerobic organisms and cause different kinds of pathologies, including cancer. Aerobic organisms bear a variety of endogenous and exogenous antioxidants, where vitamins C and E are very important nutritional antioxidant compounds. The aim of the present study was to investigate the concentrations of heavy metals such as lead, copper, iron, manganese and zinc in the urine and several enzymatic and non-enzymatic biomarkers of oxidative stress in the blood, such as levels of lipoperoxidation (TBARS), protein carbonyls (PC), protein thiols (PT), vitamin E (VE), reduced glutathione (GSH), as well as the enzymatic activities of glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and Comet assay (CA) to evaluate genotoxicity, in subjects from three different groups (n=20 each): workers, located in Laguna (directly exposed), residents, located in Capivari de Baixo (indirectly exposed, subjects living ca. 5 km from the incineration plant) and controls, located in Florianópolis (non-exposed subjects, blood donors), before and after vitamin E (800 mg/day) and vitamin C (500 mg/day) supplementation during six months. Heavy metal concentrations were elevated ($p < 0.01$ e $p < 0.05$) in all groups when compared to controls except for iron concentrations in residents group and of manganese in exposed groups. Before antioxidant supplementation, contents of TBARS in exposed groups and PC in the resident group were increased ($p < 0.01$), while those of PT in workers group, VE and GSH, as well as GPx activity were diminished ($p < 0.01$ e $p < 0.05$) in all exposed groups; GST showed increased activities ($p < 0.01$ e $p < 0.05$) and GR activities and the Comet assay showed no alterations in all exposed groups, while the activities of CAT were increased ($p < 0.01$) and SOD activities were decreased ($p < 0.05$) in the group of workers. After vitamin intervention, levels of TBARS, PC and PT, as well as those of VE and GSH were reverted to values similar to those of controls. The activities of GPx and GST also reached values similar to those of controls, CAT activity remained unchanged, while GR and SOD activity showed increased values ($p < 0.01$) in the exposed groups

compared to controls. In conclusion, subjects directly or indirectly exposed to SRHS incineration are facing an oxidative insult and in health risk regarding exposure to airborne contaminants, at least in part, due to the presence of heavy metals. Intervention with antioxidant vitamins during a period of six months was effective to attenuate the oxidative insult possibly related to such airborne contamination.

Keywords: Incineration, solid residues, airborne contamination, heavy metals, oxidative stress, antioxidant supplementation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 POLUIÇÃO AMBIENTAL	1
1.1.1 <i>Material particulado (MP)</i>	1
1.1.2 <i>Morbidade e mortalidade</i>	1
1.1.3 <i>Indicadores ambientais</i>	2
1.1.4 <i>Resíduos sólidos de serviço de saúde (RSSS)</i>	3
1.1.5 <i>A incineração de resíduos</i>	4
1.1.6 <i>Clima do sul do estado de Santa Catarina e a importância na dinâmica dos contaminantes atmosféricos</i>	5
1.1.7 <i>Estresse oxidativo e incineração de RSSS</i>	7
1.1.8 <i>Metais pesados</i>	9
1.1.8.1 Chumbo	10
1.1.8.2 Cobre e ferro	10
1.1.8.3 Manganês	11
1.1.8.4 Zinco	11
1.1.9 <i>Dioxinas e furanos</i>	11
1.2 ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO (ERO)	12
1.3 DANO OXIDATIVO E ESTRESSE OXIDATIVO	14
1.3.1 <i>Lipoperoxidação</i>	15
1.3.2 <i>Dano às proteínas</i>	15
1.3.3 <i>Dano ao DNA</i>	16
1.4 DEFESAS ANTIOXIDANTES	16
1.4.1 <i>Defesas antioxidantes enzimáticas</i>	18
1.4.1.1 Superóxido dismutase (SOD)	18
1.4.1.2 Catalase (CAT)	18
1.4.1.3 Glutaciona peroxidase (GPx)	18
1.4.1.4 Glutaciona redutase (GR)	19
1.4.1.5 Glutaciona S-transferase (GST)	19
1.4.2 <i>Defesas antioxidantes não enzimáticas</i>	19
1.4.2.1 Glutaciona reduzida (GSH)	19
1.4.2.2 Vitamina C	20
1.4.2.3 Vitamina E	20
1.4.3 <i>Suplementação vitamínica</i>	21
2 OBJETIVOS DO ESTUDO	24
2.1 OBJETIVO GERAL	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO	26
3.2 LOCAL DO ESTUDO	26
3.2.1 <i>Equipamento de incineração de RSSS</i>	26
3.2.2 <i>Aspectos epidemiológicos</i>	28
3.3 SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES	29
3.3.1 <i>Critérios de inclusão e exclusão</i>	31
3.3.2 <i>Questionário de pesquisa</i>	32
3.3.3 <i>Avaliação antropométrica</i>	32
3.4 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	33
3.4.1 <i>Equipamentos</i>	34

3.4.2 Reagentes	34
3.5 ANÁLISES LABORATORIAIS	34
3.5.1 Metais pesados	34
3.5.2 Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	34
3.5.3 Proteína carbonilada (PC)	35
3.5.4 Tióis protéicos (TP)	36
3.5.5 Teste cometa	36
3.5.6 Catalase (CAT)	37
3.5.7 Superóxido dismutase (SOD)	37
3.5.8 Glutaciona peroxidase (GPx)	38
3.5.9 Glutaciona redutase (GR)	38
3.5.10 Glutaciona S-transferase (GST)	39
3.5.11 Glutaciona reduzida (GSH, tióis não protéicos)	39
3.5.12 Vitamina E (VE)	40
3.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	41
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
4 RESULTADOS	42
4.1 MANUSCRITO 1	42
4.2 MANUSCRITO 2	43
4.3 RESULTADO DO TESTE COMETA	44
5 DISCUSSÃO	45
6 CONCLUSÕES	65
7 PERSPECTIVAS	66
REFERÊNCIAS	67
APÊNDICES	81
APÊNDICE I - MANUSCRITO 1	81
APÊNDICE II - MANUSCRITO 2	89
APÊNDICE III - QUESTIONÁRIO DE PESQUISA	110
APÊNDICE IV - TCLE	114
APÊNDICE V - TERMO DE COMPROMISSO	116
APÊNDICE VI - ORIENTAÇÃO DO PARTICIPANTE	117
ANEXOS	118
ANEXO I - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	118
ANEXO II - CERTIFICADO DO FORNECEDOR DA VIT. C	119
ANEXO III - CERTIFICADO DA FARMÁCIA DA VIT. C	120
ANEXO IV - CERTIFICADO DO FORNECEDOR DA VIT. E	121
ANEXO V - CERTIFICADO DA FARMÁCIA DA VIT. E	122
ANEXO VI - DATASUS (MORTALIDADE-MUNICÍPIO)	123
ANEXO VII - DATASUS (MORTALIDADE-BRASIL)	124
ANEXO VIII - DATASUS (MORBIDADE-MUNICÍPIO)	125

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Direção predominante dos ventos na região sul de SC durante a maior parte do ano	6
Figura 2	Oxidantes do metabolismo normal	13
Figura 3	Representação da formação de $\cdot\text{OH}$ através das reações de Haber-Weiss/Fenton	14
Figura 4	Esquema das defesas antioxidantes, mostrando a geração de espécies reativas	17
Figura 5	Planta baixa do incinerador com lavador de gases	28
Figura 6	Demonstração da seleção dos indivíduos	30
Figura 7	Demonstração da preparação das amostras	33
Figura 8	Níveis de dano - Teste Cometa	36
Figura 9	Índice de dano - Teste Cometa	44
Figura 10	Frequência de dano - Teste Cometa	44

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Representação dos resultados das análises dos metais pesados	64
Quadro 2	Representação dos resultados das análises dos biomarcadores	64

LISTA DE FOTOS

Foto 1	Instalações do incinerador de resíduos	27
Foto 2	Incinerador de resíduos – acesso restrito	27
Foto 3	Incinerador de resíduos – acesso principal	27
Foto 4	Lavador de gases	27
Foto 5	Câmara do incinerador e grelha	28
Foto 6	Chaminé do incinerador	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FATMA	Fundação do Meio Ambiente – SC
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
GR	Glutaciona redutase
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
GST	Glutaciona S-transferase
HO [•]	Radical hidroxil
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HPLC	Cromatografia Líquida de alta eficiência
LAO	Licença ambiental de operação
LOOH	Hidroperóxido lipídico
LPO	Lipoperoxidação
MDA	Malondialdeído
MP	Material particulado
MS	Ministério da Saúde
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo
O ₂	Oxigênio
O ₂ ^{•-}	Ânion radical superóxido

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
O_3	Ozônio
OPAS	Organização Panamericana de Saúde
ONOO^-	Peroxinitrito
PC	Proteína carbonilada
RL	Radicais livres
RSSS	Resíduos sólidos de serviço de saúde
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TP	Tióis protéicos
VE	Vitamina E

1 INTRODUÇÃO

1.1 POLUIÇÃO AMBIENTAL

1.1.1 Material particulado (MP)

Atualmente, a poluição do ar representa um dos maiores problemas de Saúde Pública, afetando a saúde dos seres humanos e de outros animais, plantas e demais organismos. O avanço tecnológico do mundo moderno trouxe um aumento na quantidade de contaminantes que são eliminados no meio ambiente, incluindo a atmosfera, prejudicando seriamente a qualidade de vida do nosso planeta (BRASIL, 2006; CASTRO et al., 2003).

Tais contaminantes atmosféricos são constituídos de materiais particulados (MP) que apresentam variação de tamanho entre 0,005 e 10 μm , sendo destarte, caracterizados em três diferentes tipos pelo tamanho: grosso (2,5-10 μm), fino (0,10-2,5 μm) e ultrafino (<0,10 μm). Tais partículas são constituídas de metais pesados e compostos orgânicos de carbono, que podem gerar espécies reativas de oxigênio (ERO) (HATZIS et al., 2006; TAO et al., 2003), através da reação de Fenton e Habber-Weiss, principal via de geração do radical hidroxil ($^{\circ}\text{OH}$; vide detalhamento adiante), ocasionando efeitos biológicos adversos (LI et al., 2008). A geração de estresse oxidativo pelos materiais particulados pode ser determinada, em princípio, através do padrão de inibição da atividade enzimática de certas enzimas, tais como a superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR) (HATZIS et al., 2006).

1.1.2 Morbidade e mortalidade

Diversos estudos foram desenvolvidos mostrando a relação entre morbimortalidade cardio-respiratória e os contaminantes do ar em diferentes concentrações, contribuindo para definir padrões de aceitabilidade nos níveis de concentração dos contaminantes mais comuns (BROOK et al., 2004; CASTRO et al., 2003). Alguns estudos mostraram o aumento de morbidade em ambientes com concentrações mínimas de contaminantes, causando principalmente agravos em indivíduos idosos e crianças (BRASIL, 2006; CASTRO et al., 2003; TAO et al., 2003).

Os eventos de saúde relacionados à contaminação atmosférica mais freqüentemente estudado, constituem a morbidade e mortalidade por doenças

respiratórias e cardiovasculares (ANDERSON et al., 1996; BALLESTER et al., 1996; POPE et al., 1995), câncer de pulmão (COHEN et al., 1997), diminuição da função respiratória (WARD e AYRES, 2004) e absenteísmo escolar (ROMIEU et al., 1992).

1.1.3 Indicadores ambientais

Um indicador ambiental é entendido como uma expressão da relação entre a saúde e o ambiente, e pode ser definido como “um valor agregado a partir de dados e estatísticos, transformados em informação para uso direto dos gestores, e, deste modo, contribuir para aprimorar o gerenciamento e a implementação de políticas” (MACIEL et al., 1999). Os indicadores são importantes para que o Ministério da Saúde, através da Vigilância Ambiental em Saúde, contribua para uma ação eficaz no controle dos contaminantes, inclusive aqueles de veiculação aérea, fornecendo elementos para a tomada de decisões (BRASIL, 2006; CASTRO et al., 2003).

O modelo de indicador de saúde ambiental proposto pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e que atualmente vem sendo utilizado pela Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) para o desenvolvimento da vigilância ambiental em saúde, é aquele no qual as forças motrizes geram pressões que modificam a situação do ambiente e, em última análise, a saúde humana, por meio das diversas formas de exposição, onde as pessoas entram em contato com o meio ambiente, causando os efeitos na saúde (MACIEL et al., 1999).

Atualmente, há dificuldades na implementação da Vigilância Ambiental em Saúde por parte da União, estados e municípios. No estado de Santa Catarina são poucos municípios que dispõem de estrutura para Vigilância Ambiental em Saúde, sendo que, na grande maioria, essas ações não são realizadas. Desta forma, não são gerados dados do impacto de contaminantes do ar sobre a saúde humana e, conseqüentemente, permite a omissão do estado sobre essa situação que gera danos à saúde humana.

Valle (1995) enumera quatro soluções para o problema dos resíduos industriais: utilização de tecnologias limpas, minimização de resíduos, valorização e reciclagem. Essas soluções visam reduzir riscos ao meio ambiente e ao ser humano, reduzir a geração de resíduos em uma instalação, reduzir os custos decorrentes da destinação desses resíduos, reduzir o volume dos resíduos urbanos a serem dispostos e tratados, recuperar os valores contidos nos resíduos urbanos, gerar

menor poluição ambiental e agressão visual, contribuir para a melhoria da qualidade de vida local e global, poupar recursos naturais, dentre outros.

1.1.4 Resíduos sólidos de serviço de saúde (RSSS)

Os Resíduos Sólidos de Serviços de Saúde (RSSS) apresentam-se como componentes representativos dos resíduos sólidos urbanos, não pela quantidade gerada, mas pelo potencial de risco que representam à saúde pública e ao meio ambiente (SCHNEIDER et al., 2001; STACHON e PINHEIRO, 2005). Estes riscos podem ser devido à presença de vírus e bactérias patogênicas, além da presença de produtos químicos ou radioativos, nocivos não só à saúde humana, como também ao meio ambiente (SCHNEIDER et al., 2001).

Os riscos inerentes aos RSSS exigem que sejam manejados com cuidado e apropriadamente, para evitar danos a quem o manuseia, como a todo um contexto ambiental e de saúde pública a eles relacionados. Estas exigências estão contidas no chamado Plano de Gerenciamento dos Resíduos de Serviço de Saúde (PGRSS), exigidas pela Resolução ANVISA nº 306/2004 (BRASIL, 2004), e pela Resolução CONAMA nº 358/2005 (BRASIL, 2005), que contém um conjunto articulado de ações normativas, operacionais, financeiras e de planejamento baseados em critérios sanitários, ambientais, sociais, políticos, técnicos, educacionais, culturais, estéticos e econômicos para geração, manejo, tratamento e disposição final dos resíduos sólidos.

Segundo a Resolução RDC-ANVISA nº 306/2004 acima mencionada, os resíduos sólidos provenientes de serviços de saúde possuem cinco classificações, sendo que a classe A, B e E são resíduos de serviço de saúde, considerados no presente trabalho:

- GRUPO A: Resíduos com a possível presença de agentes biológicos que, por suas características, podem apresentar risco de infecção;
- GRUPO B: Resíduos contendo substâncias químicas que podem apresentar risco à saúde pública ou ao meio ambiente, dependendo de suas características de inflamabilidade, corrosividade, reatividade e toxicidade;
- GRUPO C: Quaisquer materiais resultantes de atividades humanas que contenham radionuclídeos em quantidades superiores aos limites de isenção especificados nas normas do CNEN, e para os quais a sua reutilização é imprópria ou não prevista;

- GRUPO D: Resíduos que não apresentem risco biológico, químico ou radiológico à saúde ou ao meio ambiente, podendo ser equiparados aos resíduos domiciliares;
- GRUPO E: Materiais perfuro-cortantes ou escarificantes, tais como: agulhas, escalpes, ampolas de vidro, brocas, lâminas de bisturi, lancetas, todos os utensílios de vidro quebrados no laboratório e outros similares.

O CONAMA publicou normas importantes, dentre elas a Resolução CONAMA nº 5, de 15 de junho de 1988 (BRASIL, 1988), que exigem o licenciamento ambiental para atividade de coleta, transporte e disposição final de resíduos sólidos de origem hospitalar. Além disso, outra norma, a Resolução CONAMA nº 316, de 29 de outubro de 2002 (BRASIL, 2002), dispõe sobre procedimentos e critérios para o funcionamento de sistemas de tratamento térmico de resíduos. Essa norma determina que o tratamento térmico de resíduos constitui todo e qualquer processo cuja operação seja realizada acima da temperatura mínima de oitocentos graus Celsius (°C). A incineração de resíduos em baixas temperaturas (250-400°C), especialmente em 300°C, ocasiona a formação de dioxinas através da degradação do carbono de produtos clorados (KUO et al., 2008).

Mais recentemente, o CONAMA também determinou, através da Resolução CONAMA nº 358, de 29 de abril de 2005 (BRASIL, 2005), a qual dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos resíduos dos serviços de saúde, que os sistemas de tratamento e disposição final, inclusive por sistema térmico de incineração, para os resíduos de serviço de saúde, o equipamento deve estar devidamente licenciado para esse fim pelo órgão ambiental competente. Além disso, também deve ser submetidos a monitoramento, de acordo com parâmetros e periodicidade definidos no licenciamento ambiental.

1.1.5 A incineração de resíduos

A incineração é um processo de tratamento de resíduos através da oxidação a altas temperaturas. A incineração é uma forma de destino final adequado aos RSSS, desde que este sistema de tratamento térmico não ultrapasse os limites máximos de emissão de contaminantes atmosféricos, preconizados pela legislação, como materiais particulados (MP), substâncias orgânicas, tais como as dioxinas, substâncias inorgânicas e gases (BRASIL, 2002).

No entanto, o processo de incineração é contestado por diversos segmentos científicos, pela possibilidade de contaminação do ar, solo e água, bem como de animais, vegetais e demais organismos. Apesar destas desvantagens, este processo é muito utilizado pelos países industrializados (KUMAGAI et al., 2003; LEEM et al., 2003; MA et al., 2002; REIS et al., 2007; YOSHIDA et al., 2003).

Assim sendo, a incineração de resíduos sólidos, que foi muito utilizada na última década, tem sido pouco indicada atualmente, devido às fortes restrições contidas nas legislações de países da América do Norte, Europa e Ásia, pelos riscos de poluição ambiental inerentes. Conforme assinalado anteriormente, os incineradores geram diversos contaminantes que são lançados no meio ambiente, tais como, metais pesados, dibenzo-*p*-dioxinas policloradas (PCDDs), dibenzofuranos policlorados (PCDFs), hidrocarbonos poliaromáticos (PAHs), e outros materiais orgânicos tóxicos (KELLY, 2003; YOSHIDA et al., 2003), com graves conseqüências ambientais.

Esse método de tratamento converte materiais combustíveis transformando-os em escórias, cinzas, gases e material particulado (MP), estes dois últimos, eliminados para a atmosfera por meio de chaminés, enquanto as escórias e cinzas podem ser depositadas em aterros sanitários industriais. A incineração diminui o volume dos resíduos sólidos em cerca de 90%, sendo essa uma das principais vantagens, porém apresenta a desvantagem de concentrar metais pesados e outros compostos como dioxinas e furanos nas cinzas e MP derivadas do processo, sendo necessário garantir uma combustão completa para se evitar a emissão excessiva de contaminantes gasosos na atmosfera.

1.1.6 Clima do sul do estado de Santa Catarina e a importância na dinâmica dos contaminantes atmosféricos

No sul do estado de Santa Catarina a conformação do relevo, com abertura para o leste e sudeste, favorece o ingresso de umidade proveniente do Oceano Atlântico, podendo atuar de maneiras distintas (MONTEIRO e FURTADO, 1995). No verão, favorece a formação de nebulosidade nas costas mais altas, ou seja, o ar quente e úmido ascende as encostas, resfria e condensa e a incursão de umidade, na planície e nos vales, favorece a dispersão dos contaminantes. No inverno, ao

contrário, a umidade associada à estabilidade atmosférica, mais intensa neste período, condensa-se junto à superfície formando os nevoeiros à noite, concentrando os contaminantes aéreos em baixos níveis da atmosfera. Com relação à direção dos ventos, o nordeste é o dominante anualmente, enquanto o sul e o sudeste têm uma menor participação (MONTEIRO e FURTADO, 1995). Desta forma, o vento predominante faz com que os MP sejam direcionados preferencialmente, na direção do município de Laguna para os demais municípios do sul do estado, atingindo os centros urbanos (Figura 1).

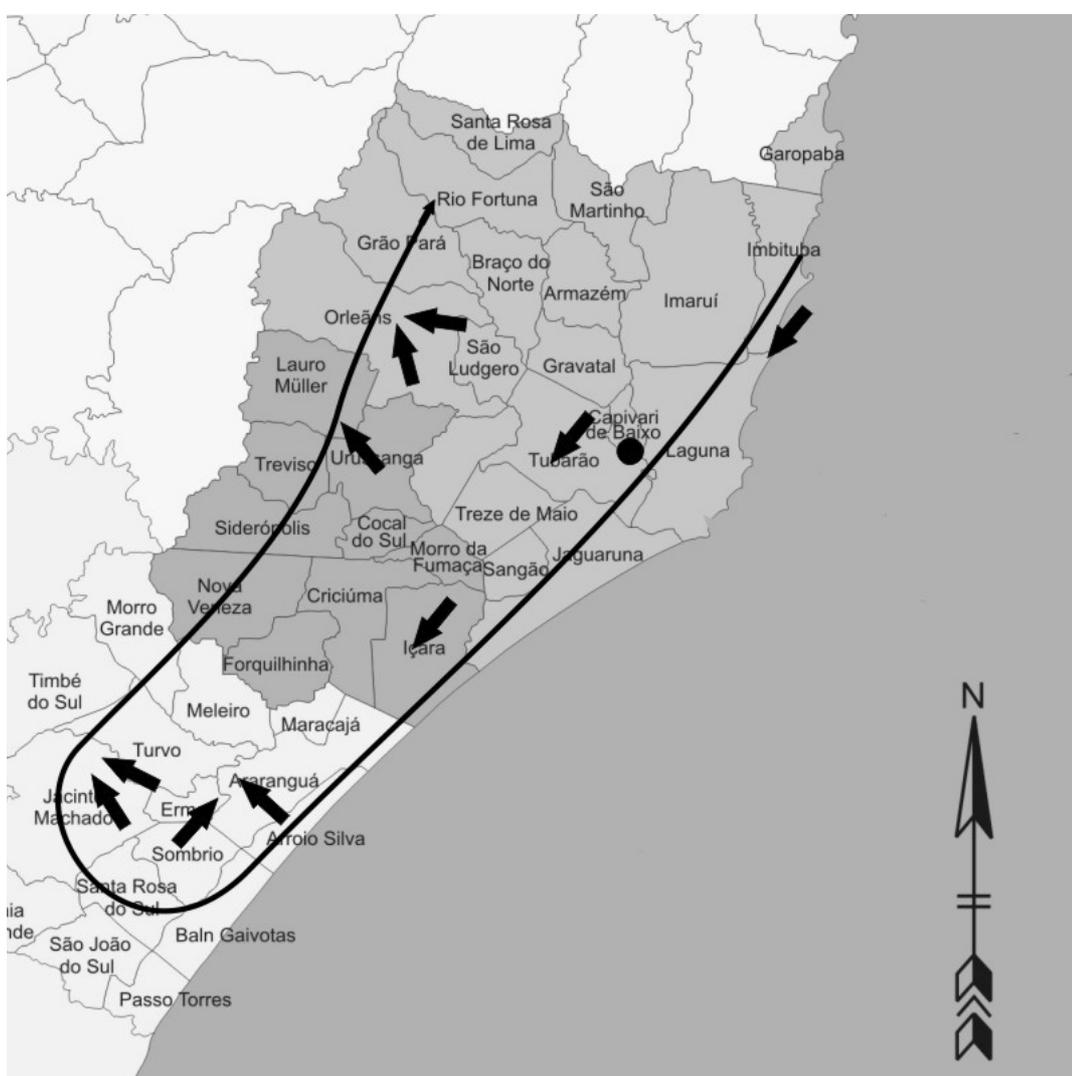


Figura 1 - Direção predominante dos ventos na região sul de Santa Catarina durante a maior parte do ano (adaptado de MONTEIRO e FURTADO, 1995).

1.1.7 Estresse oxidativo e incineração de RSSS

A geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas derivadas do nitrogênio (ERN) ocorre através do metabolismo dos organismos aeróbios e anaeróbios, sendo exacerbada em diversas condições fisiológicas. Quando a geração dessas espécies é exacerbada, o organismo dispõe de eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio. Desta forma, o estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante, com predomínio dos oxidantes, provocando dano celular (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; SIES, 1985). Por outro lado, as ERO e ERN têm importante função imunológica, como na fagocitose, fenômeno em que essas espécies são produzidas para eliminar o agente agressor (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; MAÇAO et al., 2007).

A formação de ERO no sangue de trabalhadores da incineração e residentes está diretamente relacionada à atividade de incineração de resíduos sólidos (LEEM et al., 2003; YOSHIDA e OGAWA, 2000; YOSHIDA et al., 2003). A avaliação dos efeitos tóxicos das dioxinas em humanos foi parcialmente realizada em trabalhadores de estabelecimentos de incineração (KIM et al., 2004a; YOSHIDA et al., 2003). Estudo recente observou elevada lipoperoxidação e alteração do *status* antioxidantes no sangue de trabalhadores expostos a gases de indústria de cobre e zinco (CHEN et al., 2006).

O processo de incineração não elimina a presença dos metais, os quais permanecem como resíduos no equipamento de incineração ou são dispersos no ar pela chaminé do incinerador (OLIE et al., 1998). Os materiais particulados geram a contaminação do ar e podem induzir a geração de estresse oxidativo em células de defesa no pulmão (BECKER et al., 2002). A exposição a metais pesados altera o *status* antioxidante e leva à geração de estresse oxidativo (GALHARDI et al., 2004; KORASHY e EL-KADI, 2006; 2008), pois os metais apresentam alta afinidade com os grupos tióis de enzimas e proteínas, que participam no mecanismo de defesa celular (FLORA et al., 2008).

Embora os mecanismos pato-fisiológicos dos efeitos da poluição atmosférica não sejam completamente conhecidos, a literatura sugere que há grupos mais susceptíveis, como trabalhadores expostos a substâncias tóxicas, crianças, idosos e portadores de doenças crônicas (JUNGER e PONCE DE LEON, 2007). Além disso, Braga e colaboradores (2007) estabeleceram a associação entre poluição

atmosférica e doenças respiratórias e cardiovasculares na cidade de Itabira-MG, onde ocorre lavra mecanizada a céu aberto de jazidas de minério de ferro. Outro estudo observou que as internações e óbitos nos períodos de 1993 a 1997 tinham relação com a poluição atmosférica na cidade de São Paulo, aumentando as taxas de morbidade e mortalidade nos grandes centros urbanos (FREITAS et al., 2004).

Os contaminantes do ar incluem materiais particulados e gases, potencialmente tóxicos que quando inalados podem causar doenças no organismo humano e de animais (RAABE, 1999). Tais contaminantes atmosféricos podem ser provenientes da incineração de resíduos, da extração ou queima de minérios, como o carvão, do tabagismo, da exaustão de veículos, entre outros (HATZIES et al., 2006; HOWARD et al., 1998; PINHO et al., 2004; 2005; VINEIS e HUSGAFVEL-PURSIANEIN, 2005).

O impacto das ERO e ERN sobre o pulmão é importante porque este órgão está exposto a grandes tensões de O_2 , comparativamente aos demais tecidos por área de contato, e esta exposição elevada ao O_2 , gera aumentos intracelulares de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , pela promoção de reações de auto-oxidação e fuga de elétrons das mitocôndrias e retículo endoplasmático, sendo que o H_2O_2 também pode ser gerado por oxidases neste órgão (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Há evidências que a exposição aguda de pó de carvão induz a ação do estresse oxidativo em ratos, gerando inflamação e fibrose pulmonar (ARMUTCU et al., 2007; PINHO et al., 2004; 2005). Em mineradores, o pó do carvão pode causar pneumoconiose e alteração na atividade de enzimas antioxidantes como a SOD e a GPx, além de aumentar a concentração de malondialdeído (MDA) no plasma (ALTIN et al., 2004). Outra fonte de ERO no pulmão é a ativação de monócitos e neutrófilos (BABIOR, 2000).

Estudo de Torres e colaboradores (2004) mostram que no pulmão de ratos submetidos a estresse oxidativo crônico houve aumento da concentração de TBARS, indicador de lipoperoxidação, sendo que na análise do TRAP (*total radical-trapping potential*), que representa a capacidade antioxidante total, houve alteração somente nas doses sub-crônicas, mostrando a ação compensadora das defesas antioxidantes nesta fase. Becker e colaboradores (2002) observaram em estudo com células de pulmão obtidas através de lavagem broncoalveolar, expostas a diferentes tipos de materiais particulados, indução de processo inflamatório, pelo aumento de neutrófilos

e macrófagos nos alvéolos. Vineis e Husgafvel-Pursiainen (2005) sugerem um aumento do risco de câncer no pulmão em indivíduos expostos ao ar poluído em áreas urbanas.

1.1.8 Metais pesados

A contaminação do ambiente por metais tóxicos são provenientes de atividades industriais, e entre os mais prejudiciais à saúde pública estão os metais pesados (CHEN et al., 2006; GALHARDI et al., 2004; REIS et al., 2007). Os metais pesados apresentam peso atômico relativamente alto e caracterizam-se pelo efeito bioacumulativo, sendo que em concentrações superiores às legalmente recomendadas, têm sido responsabilizados por causar agravos à saúde, incluindo uma série de neoplasias (HARRIS e SHI, 2003, KAKKAR e JAFFERY, 2005; VALKO et al., 2006). Os metais possuem a propensão em perder elétrons, formando íons com cargas positivas que tendem a ser solúveis em fluídos biológicos (VALKO et al., 2006). Enquanto íons metálicos apresentam-se deficientes de elétrons, biomoléculas tais como proteínas e DNA são ricas em elétrons, portanto, a atração entre estas oposições de cargas conduz a uma tendência geral de íons metálicos interagirem com moléculas biológicas. Desta forma, os compostos de coordenação formados a partir destas interações são extremamente estáveis (FLORA et al., 2008; KAKKAR e JAFFERY et al., 2005; VALKO et al., 2006). Metais pesados, como o ferro, chumbo e cobre podem induzir *in vitro* a atividade da glutathione S-transferase (GST) e diminuir a concentração de glutathione reduzida (GSH) (KORASHY e EL-KADI, 2006, 2008).

Os efeitos tóxicos causados por metais são geralmente resultado da ligação destes com aminoácidos, polipeptídios, proteínas e enzimas (FLORA et al., 2008; KAKKAR e JAFFERY, 2005). Muitos metais pesados ligam-se a grupos tióis, os quais freqüentemente constituem os sítios ativos de muitas enzimas, cruciais para fornecimento de energia ou transporte de oxigênio nas células. Evidências indicam que metais de transição atuam como catalisadores na deterioração oxidativa de macromoléculas biológicas e, portanto, a toxicidade associada a estes metais deve-se, em parte, também aos danos oxidativos inerentes (STOHS e BAGCHI, 1995).

Para o controle da absorção excessiva de metais os organismos contêm a metalotioneína, uma proteína rica em sulfidrilas que se liga com metais através de ligações mercaptídicas (BURTIS e ASHWOOD, 1998). As funções dessas proteínas são de armazenagem de metais tóxicos numa forma não tóxica e a regulação do

metabolismo do zinco e do cobre celular, além da regulação da absorção desses metais no intestino, diminuindo a sua absorção (De AZEVEDO e CHASIN, 2003).

1.1.8.1 Chumbo

O chumbo é um elemento tóxico não essencial que se acumula no organismo. Como este metal afeta virtualmente todos os órgãos e sistemas do organismo, os mecanismos de toxicidade propostos envolvem processos bioquímicos fundamentais, que incluem a capacidade do chumbo de inibir ou imitar a ação do cálcio e interagir com proteínas (FLORA et al., 2008). Em níveis de exposição moderada, um importante aspecto dos efeitos tóxicos deste metal é a reversibilidade das mudanças bioquímicas e funcionais induzidas. Esses efeitos são principalmente devidos à interferência do chumbo no funcionamento das membranas celulares e enzimas, formando complexos estáveis com ligantes contendo enxofre, fósforo, nitrogênio ou oxigênio (grupamentos -SH, -H₂PO₃, -NH₂, -OH), como doadores de elétrons. As interações bioquímicas do chumbo com grupamentos -SH são consideradas de grande significado toxicológico, visto que, ocorrendo em uma enzima, sua função pode ser inibida, resultando em efeitos tóxicos (FLORA et al., 2008; KAKKAR e JAFFERY, 2005; WANG e FOWLER, 2008). O chumbo também tem uma alta afinidade por aminas e aminoácidos simples (TSALEV e ZAPRIANOV, 1985).

1.1.8.2 Cobre e ferro

Tanto o ferro como o cobre, metais de transição de grande abundância e importância biológica são transportados e estocados, ligados a proteínas específicas (transferrina, ferritina e ceruloplasmina), as quais previnem ou minimizam as reações de oxidação catalisadas por estes minerais (KOSASHY e EL-KADI, 2006, 2008). Os íons ferro e cobre são muito ativos em reações de óxido-redução. O ciclo redox desses minerais pode promover a reação de Fenton (Figura 2), a qual libera um potente oxidante, radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), a partir do H₂O₂ (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). O $\cdot\text{OH}$ é capaz de retirar um átomo de hidrogênio de ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares e de organelas e iniciar a peroxidação lipídica (GAETKE e CHOW, 2003; GALHARDI et al., 2004). O resultado é o acúmulo de hidroperóxidos que destroem a estrutura e função da membrana (WELCH et al., 2002).

Muitos estudos têm mostrado que o ferro está envolvido na formação de alguns tipos de lesões no DNA em células de mamíferos (FLORA et al., 2008). Além disso, o ferro induz a troca de cromátides-irmãs e intervêm na mutagênese induzida por peróxido de hidrogênio e também na transformação celular (VALKO et al., 2006). O estresse oxidativo pode produzir eventos genotóxicos por causa do excesso de ferro nas células, inclusive estimulando a oncogênese (VALKO et al., 2006). De fato, estudos têm relatado o aumento do risco de câncer em condições de sobrecarga de ferro, como na hemocromatose (TOYOKUNI, 1996; VALKO et al., 2006).

1.1.8.3 Manganês

O excesso de manganês é neurotóxico e ocasiona uma síndrome semelhante à Doença de Parkinson (FLORA et al., 2008). Segundo Iregren (1999), trabalhadores de uma indústria química, na Suécia, expostos a altos níveis de pó de óxido de manganês apresentaram tal síndrome. Estudos de revisão descreveram que o dano no sistema nervoso central causado pelo manganês é irreversível (FLORA et al., 2008; KAKKAR e JAFFERY, 2005).

1.1.8.4 Zinco

Os compostos de zinco, se presentes em excesso, podem produzir irritação e corrosão do trato gastro intestinal, podendo ainda levar à necrose renal ou nefrite, nos casos mais severos (BARCELOUX, 1999). O zinco, assim como o cobre, ferro e manganês, participa do controle de várias sinalizações metabólicas, sendo que o excesso pode alterar mecanismo de transporte, homeostase, compartimentalização e ligação em constituintes celulares. Tal processo pode ocasionar disfunção e toxicidade celular, através da capacidade dos metais em interagir com proteínas nucleares e DNA causando danos biológicos em macromoléculas (FLORA et al., 2008). Recente estudo verificou em trabalhadores de indústria de zinco o aumento de malondialdeído no plasma, gerando a lipoperoxidação de membranas celulares e, conseqüentemente, dano celular (CHEN et al., 2006).

1.1.9 Dioxinas e furanos

Na lista de gases, as substâncias mais tóxicas são as dioxinas e furanos. O relatório da Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos EUA descreve as dioxinas

como uma séria ameaça à saúde pública, e que, aparentemente, não existe um nível seguro para exposição às mesmas (USA, 2008). Dioxinas constituem um grupo de centenas de substâncias químicas que são altamente persistentes no ambiente. A combinação mais tóxica é 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD), entre outros (SLEZAK et al., 2000).

Estudos de exposição de ratos ao TCDD resultaram em diversas alterações, tais como toxicidade dérmica, imunotoxicidade, hepatotoxicidade, carcinogenicidade, teratogenicidade, alterações de comportamento, regulação endócrina e numerosas alterações bioquímicas (LAWRENCE et al., 1999; SMITH et al., 1998).

De acordo com estudos *in vivo* e *in vitro*, os metais pesados e os PCDDs, PCDFs e PAHs poderiam ser responsáveis pelo estresse oxidativo (KIM et al., 2004b; YOSHIDA et al., 2003), e a exposição crônica ao estresse oxidativo provocado por estas substâncias químicas poderia estar associada com a ocorrência de câncer no pulmão (BABIOR et al., 2000; YOSHIDA et al., 2003) e isquemia no coração (LEFER e GRANGER, 2000).

1.2 ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO (ERO)

Com exceção de poucos organismos anaeróbios, unicelulares aeróbios tolerantes e alguns helmintos, todos os demais organismos necessitam de O₂ para produção de adenosina trifosfato (ATP) através do transporte de elétrons dependente de O₂ em mitocôndrias (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). No entanto, o O₂ é igualmente um agente tóxico devido à formação das ERO, sendo que os aeróbios sobrevivem graças a um complexo sistema de defesas antioxidantes para sua proteção (BLOKHINA et al., 2003; VALKO et al., 2006; WILHELM FILHO et al., 2000).

O desenvolvimento de defesas antioxidantes permitiu a evolução dos organismos através da oxidação eficaz dos alimentos, sendo que os efeitos danosos do O₂ são devido à oxidação de componentes celulares essenciais (BLOKHINA et al., 2003; ZWART et al., 1999). Esta oxidação reduz o O₂ até formas intermediárias, envolvendo espécies radicalares (RL) e não radicalares, denominadas de espécies reativas de oxigênio (ERO), além de espécies reativas derivadas do nitrogênio (ERN). Radicais livres são quaisquer espécies capazes, independente de sua

existência, de conter um ou mais elétrons não emparelhados em seu orbital mais externo, sendo espécies instáveis de reatividade elevada, sendo esta inversamente proporcional à sua meia-vida (FRIDOVICH, 1998; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; SAGARA et al., 1998).

As ERO é um termo utilizado para incluir não somente os radicais de oxigênio ($O_2^{\bullet-}$ e $\bullet OH$) mas também alguns derivados do O_2 que não são espécies radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio singlete (1O_2) e o ozônio (O_3). As ERO podem ser produzidas por fontes exógenas, xenobióticos como os agrotóxicos, medicamentos, tabagismo, raios X, radiação ultra-violeta, entre outros, ou por fontes endógenas (e.g. BLOKHINA et al., 2003; FARIAS, 2009; MAÇAO et al., 2007; PEDROSA et al., 2001; POSSAMAI et al., 2007; RIBEIRO, 2009; TORRES et al., 2002; VALKO et al., 2006). As ERO são produzidas principalmente como consequência do metabolismo celular oxidativo, ou seja, através da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (ZWART et al., 1999). Além disso, a degradação de ácidos graxos nos peroxissomas, os mecanismos de detoxificação mediados pelo complexo enzimático citocromo P-450, o processo de fagocitose e a oxidação de pequenas moléculas como hidroquinonas, ferredoxinas reduzidas e catecolaminas, são igualmente fontes de ERO (BLOKHINA et al., 2003; FRIDOVICH, 1998; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; SAGARA et al., 1998).

No transporte de elétrons ao longo da cadeia respiratória, as ERO podem ser geradas durante episódios colisionais aleatórios no processo de redução univalente do oxigênio, gerando seqüencialmente, o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\bullet OH$). A citocromo oxidase adiciona quatro elétrons para geração de ATP na mitocôndria (Figura 2), mas inevitavelmente são formados cerca de 2% desses intermediários tóxicos (BOVERIS e CHANCE, 1973; CHANCE et al., 1973).

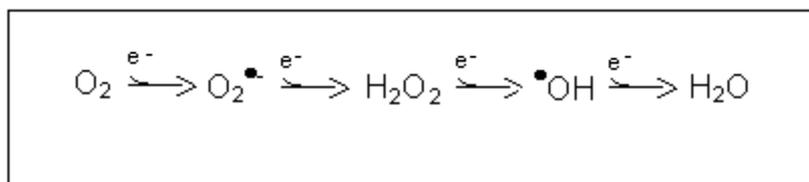


Figura 2 - Oxidantes do metabolismo normal (adaptado de CHANCE et al., 1973).

Nos organismos, o $O_2^{\bullet-}$ participa na reação de Haber-Weiss, gerando oxigênio e ferro reduzido, o qual catalisa a reação de Fenton, formando o radical hidroxila (Figura 3):

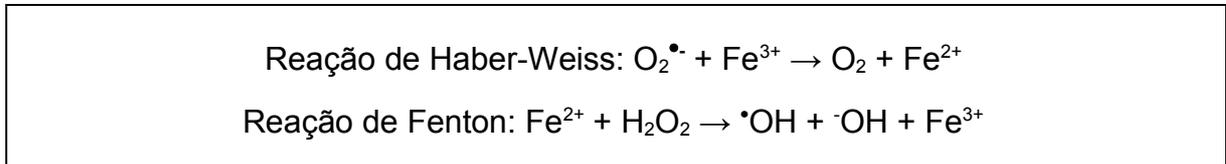


Figura 3 - Representação da formação de $\bullet OH$ através das reações de Haber-Weiss/Fenton (adaptado de HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

A reação do superóxido com peróxido de hidrogênio é acelerada *in vivo* na presença de metais de transição, particularmente de ferro e cobre, por meio da reação de Haber-Weiss/Fenton (BLOKHINA et al., 2003; VALKO et al., 2006). O radical hidroxil também pode ser gerado por radiações ionizantes (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

1.3 DANO OXIDATIVO E ESTRESSE OXIDATIVO

A excessiva produção de ERO induz o dano molecular ou morte celular, os quais podem ocasionar alterações fisiológicas e processos patológicos (SIES, 1985; VALKO et al., 2006). Em organismos aeróbios saudáveis, a produção de ERO e ERN estão balanceadas com as defesas antioxidantes, entretanto, este balanço continuamente é desfeito, e pode ocorrer dano em importantes biomoléculas, que podem ou não ser reparadas (BLOKHINA et al., 2003; SIES, 1985; VALKO et al., 2006). O estresse oxidativo é resultado da diminuição de defesas antioxidantes, aumento na produção de ERO, ou a combinação de ambos (SIES, 1985). O estresse oxidativo é, portanto, um distúrbio no balanço entre pro-oxidantes e antioxidantes, em favor do primeiro, gerando um dano em potencial (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). O alvo principal das ERO e ERN que levam ao quadro de estresse oxidativo pode variar, dependendo da célula, o tipo de exposição e a severidade do estresse (AMES et al., 1993; FRIDOVICH, 1998; KOUTSILIERI et al., 2002). O estresse oxidativo, gerado pelo excesso de ERO e ERN, em proteínas, pode causar dano aos receptores, enzimas, transdução de sinais, transporte de proteínas e de enzimas, além de danos em outras biomoléculas (KOUTSILIERI et al., 2002).

1.3.1 Lipoperoxidação

A lipoperoxidação (LPO) é um processo de oxidação de lipídios polinsaturados, pois membranas e organelas celulares contêm grande quantidade de lipídios polinsaturados, as quais, juntamente com as proteínas, compõem os maiores constituintes biológicos de membranas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). A peroxidação lipídica resulta em uma mistura complexa de hidroperóxidos e produtos de oxidação, incluindo peróxidos cíclicos como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxi-2-trans-nonenal (HNE) (SIES, 1999). O MDA é o componente mais importante (ca. 90%) na lipoperoxidação, sendo muito utilizado através da reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) na mensuração da lipoperoxidação *in vitro* (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; URSO e CLARKSON, 2003). A LPO está relacionada com efeitos tóxicos de diversas substâncias químicas, lesões nos tecidos e desenvolvimento de diversas doenças (VALKO et al., 2006; ZWART et al., 1999) e as lipoproteínas também são alvos da LPO (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

1.3.2 Dano às proteínas

Os aminoácidos são susceptíveis à oxidação, dentre eles, os aromáticos, que são os alvos preferidos das ERO (URSO e CLARKSON, 2003; ZWART et al., 1999). A oxidação direta de lisina, arginina, prolina e treonina, fornece derivados carbonílicos (VALKO et al., 2006). A oxidação de proteínas pode ativar o sistema imune, induzindo a formação de anticorpos e doenças auto-imunes (VICTOR e DE LA FUENTE, 2003). O dano em enzimas reparadoras do DNA (endonucleases, ligases, etc.) pode elevar os níveis de dano oxidativo no DNA e aumentar a frequência de mutações, e ocorrer dano nas proteínas envolvidas na manutenção essencial do gradiente iônico entre os fluídos extracelulares, tais como o Ca^{2+} -ATPase e $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

A detecção de grupos carbonil está sendo muito utilizada como um indicador de dano oxidativo em proteínas (POSSAMAI et al., 2007; URSO e CLARKSON, 2003). O aumento da concentração de proteínas carboniladas está associado a numerosos distúrbios patológicos, incluindo artrite reumatóide, doença de Alzheimer, síndrome do distúrbio respiratório, doença de Parkinson e aterosclerose (ZWART et al., 1999).

O grupo sulfidril (-SH) de aminoácidos são alvos de ERO em diferentes tecidos, que atua regulando o estado redox dos tióis das proteínas (HARRIS e SHI, 2003). Isto inclui proteínas de baixo peso molecular doadoras do grupo SH e enzimas das quais podem catalizar a redução do grupo SH de proteínas e detoxificar pro-oxidantes por conjugação com a glutatona (GSH) (AKSENOV e MARKESBERY, 2001).

1.3.3 Dano ao DNA

As ERO formadas no metabolismo celular produzem lesões no DNA e em outras estruturas celulares, fenômeno causador de doenças e, provavelmente, relacionado com o processo de envelhecimento celular. Um dos alvos importantes para o evento da senescência é o DNA, que, ao acumular lesões, desempenha menos eficientemente sua função informativa (FRIDOVICH, 1998). Há evidências que os ERO/ERN estão envolvidas no desenvolvimento do câncer, não somente por efeitos diretos no DNA, mas também na alteração de sinais de transdução, proliferação celular, morte celular e comunicação intercelular. O dano pode ser direto, através de ataque químico ao DNA, nas bases purina e pirimidina, ou na desoxirribose (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

As células possuem mecanismos de reparo ao dano no DNA, que podem não ser suficientes na presença de excesso de ERO. O estresse oxidativo pode ocasionar quebra na estrutura de elementos do DNA, modificando as bases e gerando efeitos mutagênicos (BECKMAN e AMES, 1997).

Para o monitoramento humano e ambiental, tanto *in vivo* como *in vitro*, pode ser utilizado o Teste Cometa, o qual detecta danos no DNA que foram induzidos por xenobióticos (MALUF e ERDTMANN, 2000). É importante ressaltar que o Teste Cometa não é um teste de mutagenicidade, já que o dano detectado (fragmentação do DNA) ainda pode ser recuperado, e, por isso deve ser usado apenas como indicador de risco (VILLELA et al, 2003).

1.4 DEFESAS ANTIOXIDANTES

Antioxidantes são substâncias que, quando presentes mesmo em baixas concentrações comparadas como o agente oxidante, diminuem e previnem a oxidação dos substratos correspondentes (ERO) e diferentes antioxidantes são

necessários para proteção contra o estresse oxidativo – vide Figura 4 (BLOKHINA et al., 2003; GRIENDLING e FITZGERALD, 2003; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Os mecanismos de defesa são formados por enzimas, tais como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona S-transferase (GST). Outras enzimas que não participam diretamente do processo, como as que fornecem suporte à GPx, como a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6DP) e a glutaciona redutase (GR), além destas, as enzimas glutaredoxina e tioredoxina, descobertas posteriormente, são igualmente fundamentais nos processos antioxidantes (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; JOSEPHY, 1997; URSO e CLARKSON, 2003). Além dessas defesas enzimáticas, existem ainda antioxidantes não-enzimáticos, como a própria glutaciona na forma reduzida (GSH), endógena, como ácido úrico e o estradiol, outras que são exógenas ou nutricionais, como o α -tocoferol, principal componente da vitamina E, ácido ascórbico (vitamina C), o β -caroteno, o licopeno (e outros carotenóides) e flavonóides (PALACE et al., 1999; RITTER et al., 2004).

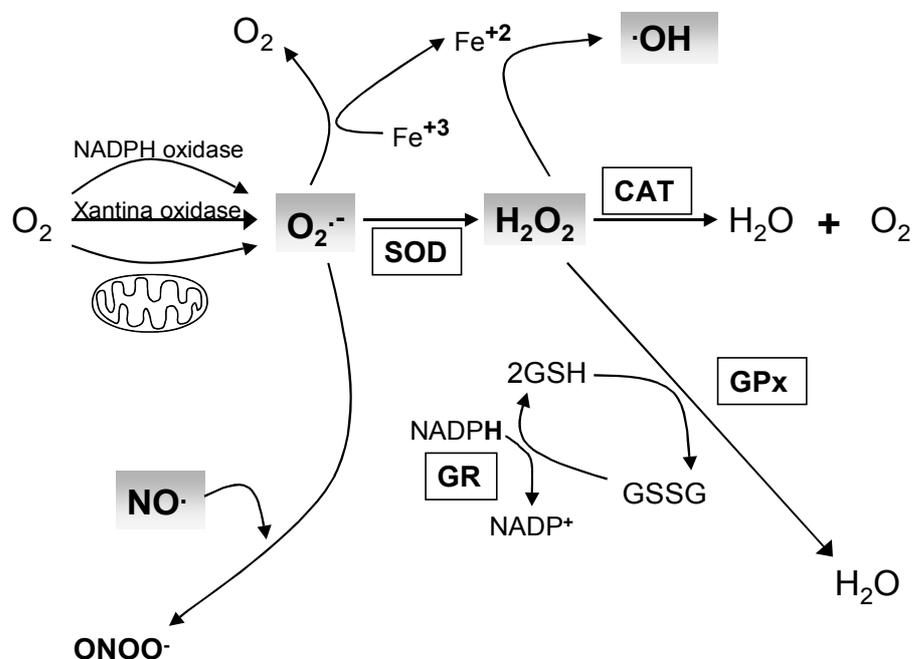


Figura 4 - Esquema das defesas antioxidantes, mostrando a geração de espécies reativas. Antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona reduzida (GSH), glutaciona redutase (GR). Espécies

reativas: radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($^{\bullet}OH$), óxido nítrico (NO^{\bullet}), peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$). (adaptado de GRIENGLING e FITZGERALD, 2003).

1.4.1 Defesas antioxidantes enzimáticas

1.4.1.1 Superóxido dismutase (SOD)

A SOD é uma importante enzima antioxidante, abundante em células aeróbias que agem sobre o radical $O_2^{\bullet-}$, dismutando-o a H_2O_2 (FRIDOVICH, 1998), que é menos reativo e pode ser metabolizado por outras enzimas, como a catalase e glutaciona peroxidase (BOVERIS e CADENAS, 1982; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

1.4.1.2 Catalase (CAT)

A enzima catalase tem como função principal transformar o peróxido de hidrogênio, em água e oxigênio molecular. A atividade da CAT nos tecidos humanos é maior no fígado, seguido do rim, pulmão e músculo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Em células eucarióticas, existem catalases citosólicas e perioxossomais, estando presentes principalmente nos peroxissomas. Por não possuírem peroxissomas, alguns órgãos estão mais expostos aos danos provocados pela produção de ERO, como o coração, os pulmões e o cérebro. Nesses órgãos, um mecanismo de defesa pode ser a difusão do peróxido de hidrogênio para o sangue, onde reagem com a CAT eritrocitária (BLOKHINA et al., 2003; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

1.4.1.3 Glutaciona peroxidase (GPx)

A GPx é uma selenoenzima cuja ação reside na oxidação de glutaciona (GSH) ao seu dissulfeto correspondente GSSG, removendo o H_2O_2 e gerando H_2O . A glutaciona peroxidase desempenha também um importante papel na detoxificação de xenobióticos, além de participar do metabolismo de vários compostos endógenos, como prostaglandinas, leucotrienos e hidroperóxidos orgânicos, por meio de reações mediadas pela glutaciona S-transferase (DICKINSON e FORMAN, 2002; SIES, 1999).

1.4.1.4 Glutathione redutase (GR)

A GR é uma flavoproteína dependente de NADPH e da integridade da via das pentoses. É a enzima necessária para manter a glutathione em sua forma reduzida e, possivelmente, para controlar o estado redox de NADP em tecidos onde GSSG está disponível. A recuperação de GSH pela GR é uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular, pois baixas concentrações de GSH estão associadas ao estresse oxidativo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

1.4.1.5 Glutathione S-transferase (GST)

A GST constitui um grupo de enzimas que catalisa a formação de tioésteres pela adição de GSH a um grande número de compostos que contém um carbono eletrofílico (SAGARA et al., 1998). As GSTs mostram uma capacidade peroxidásica contra os hidroperóxidos orgânicos e, principalmente, estão associadas à biotransformação de xenobióticos. Estas enzimas catalisam a reação de conjugação da glutathione em sua forma reduzida (GSH) a estes compostos, aumentando a sua solubilidade e, assim, facilitando a sua excreção na urina e bile (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; JOSEPHY, 1997).

1.4.2 Defesas antioxidantes não enzimáticas

1.4.2.1 Glutathione reduzida (GSH)

A GSH é o único tiol não protéico presente em espécies aeróbicas e seu papel intracelular antioxidante inclui a detoxificação de xenobióticos e de ERO (BLOKHINA et al., 2003; WILHELM FILHO et al., 2000). Depleção da GSH sanguínea resulta no aumento da formação de meta-hemoglobina e conseqüente incapacidade do eritrócito em transportar oxigênio, além de causar uma deformação do eritrócito, impedindo sua passagem a órgãos vitais (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Seu déficit acarreta diminuição da resistência às drogas e às radiações, da capacidade de reversão de tumores e da síntese do ascorbato em animais (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; VALKO et al., 2006).

1.4.2.2 Vitamina C

A vitamina C, ou ácido ascórbico, é uma vitamina hidrossolúvel e termolábil, essencial para os organismos vertebrados, pois participa de diversos processos metabólicos e fisiológicos, dentre eles a regeneração do α -tocoferol, a formação do colágeno, cicatrização, síntese de epinefrina, corticosteróides e ácidos biliares. Além de co-fator enzimático, participa dos processos de óxido-redução, reduzindo o Fe^{3+} em Fe^{2+} no trato gastrintestinal, para facilitar a sua absorção, e também está envolvida na transferência de ferro da transferrina plasmática para ferritina hepática (VALKO et al., 2006).

O ácido ascórbico é um dos antioxidantes mais importantes em tecidos de mamíferos (BÁNHEGYI et al., 1997), com a capacidade de neutralizar radicais como o $\text{O}_2^{\bullet-}$ e o $\bullet\text{OH}$ (VALKO et al., 2006). O ácido ascórbico é comumente encontrado no organismo na forma de ascorbato. Estudos observacionais epidemiológicos sugerem que vitaminas antioxidantes como a vitamina C, podem inibir doenças cardiovasculares e câncer (FLAGG et al., 1995; VILLACORTA et al., 2007). Alguns estudos têm mostrado uma significativa redução no risco de câncer de pulmão com um aumento na dieta de vitamina C (BANDERA et al., 1997; OCKÉ et al., 1997; YONG et al., 1997). Entretanto há controvérsia com relação ao efeito protetor da vitamina C e E na redução de riscos relacionados a eventos cardiovasculares em homens adultos e idosos (SESSO et al., 2008).

1.4.2.3 Vitamina E

O termo vitamina E é a designação comum de duas diferentes famílias de compostos que ocorrem na natureza: os tocoferóis e os tocotrienóis, que exibem, qualitativamente, a atividade biológica do α -tocoferol, que é o composto predominante. O tocoferol é o antioxidante lipossolúvel que atua bloqueando a etapa de propagação da peroxidação lipídica dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas e lipoproteínas, seqüestrando radicais peroxil (LO_2^{\bullet}) mais rapidamente do que esses radicais podem reagir com ácidos graxos adjacentes ou com membranas lipoprotéicas. Em adição, tocoferóis reagem e eliminam o oxigênio singlete e protegem a membrana contra essas espécies (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; VALKO et al., 2006).

A vitamina E é um *scavenger* de radicais peroxil, sendo o mais importante inibidor de ERO nas reações de lipoperoxidação em animais, podendo esta função estar limitada em situações de sobrecarga de ferro (ZINGG, 2007). Ratos induzidos à intoxicação por malation, com pré-tratamento de vitamina E, mostraram diminuição da lipoperoxidação em eritrócitos, em comparação ao grupo dos ratos sem pré-tratamento (JOHN et al., 2001).

1.4.3 Suplementação vitamínica

A vitamina C e a vitamina E são nutrientes essenciais para seres humanos e demais organismos aeróbios, pois atuam como antioxidantes, sendo eficientes agentes redutores de radicais livres (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; HALLIWELL, 2009). A perspectiva de que o consumo suplementar, tanto da vitamina C quanto da vitamina E, pode proporcionar efeitos terapêuticos benéficos contra o câncer e as doenças cardiovasculares renovaram o interesse no estudo dos antioxidantes (VALKO et al., 2006; ZINGG, 2007).

As doses dietéticas diárias de vitamina C recomendadas são de 90 mg para humanos (DRI, 2000). A vitamina C é absorvida no jejuno e no íleo, porções distais do intestino delgado, através de transporte ativo específico sódio-dependente. A capacidade de absorção do ácido ascórbico é limitada pela quantidade de transportadores presentes.

A atividade da vitamina E é avaliada pela concentração de alfa-tocoferol disponível naturalmente na forma (RRR-), ou através das três formas sintéticas (RSR-, RRS- e RSS-) (DRI, 2000). As doses diárias recomendadas para humanos é de 30 mg/dia de alfa-tocoferol, sendo que o limite tolerável para adultos é até 1000 mg/dia (DRI, 2000). Estas combinações são eficientemente absorvidas no lúmen intestinal e contidas em quilomicra remanescentes. Durante o catabolismo dos quilomicra, a vitamina E é distribuída na circulação pelas lipoproteínas (ZINGG, 2007).

A quantidade e biodisponibilidade de vitamina C tem grande variedade nas frutas e vegetais, destarte, uma ingestão regular de frutas e vegetais providenciaria um aporte adequado de vitamina C (BLOKHINA et al., 2003). Por outro lado, a presença de vitamina E reside principalmente em sementes oleaginosas e óleos vegetais, estando pouco presente na maioria dos alimentos (DRI, 2000). Na

impossibilidade de uma dieta balanceada destas vitaminas, a suplementação mostra-se igualmente eficaz na manutenção das propriedades antioxidantes associadas à dieta alimentar (DRI, 2000).

A suplementação de vitaminas e minerais é preconizada somente no caso de aporte insuficiente na alimentação, na prática de esportes de alta performance, ou em determinadas doenças (e.g. FARIAS, 2009; MAÇAO et al., 2007; RIBEIRO, 2009), excedendo desta forma, as quantidades recomendadas pela DRIs (Dietary Reference Intakes) em certas situações fisiológicas e em situações clínicas específicas (BLOCK et al., 2008; DRI, 2000; HALLIWELL, 2009).

A hipótese da oxidação na aterogênese é foco de muitas pesquisas nas últimas duas décadas. Muitos pesquisadores apresentaram ponderações sobre os benefícios da suplementação vitamínica sobre eventos cardiovasculares. Estudo randomizado em indivíduos durante longo tempo de suplementação diária com 400 UI de vitamina E e 500 mg de vitamina C, sintéticos, não diminuiu os riscos de eventos cardiovasculares, tais como infarto do miocárdio e mortes por doença cardiovascular (SESSO et al., 2008), bem como de riscos para câncer de próstata ou câncer em geral em homens de idade média e idosos (GAZIANO et al., 2009).

Segundo Pryor (2000), através de diferentes estudos clínicos foram estabelecidas diferentes indicações de doses diárias adequadas de vitamina E entre 400 a 800 UI/dia. Jialal e colaboradores (1995), após 8 (oito) semanas de suplementação em humanos, mostrou que concentrações acima de 400 UI/dia diminuíram significativamente a suscetibilidade da lipoproteína de baixa densidade (LDL) em sofrer oxidação, sendo que 800 ou 1200 UI/dia foram ligeiramente mais efetivas. Além disso, numerosas publicações sobre os usos profiláticos e terapêuticos da vitamina E, permitem afirmar que sua toxicidade é muito baixa, mesmo em altas doses de até 3200 UI/dia, não causando efeitos adversos consistentes (KAPPUS e DIPLOCK, 1992; ROBERTS II et al., 2007; ROBERTS II e TRABER, 2009).

De forma preventiva, Blumberg e Frei (2007) sugerem o uso regular de suplementação comercial com vitamina E sintética (*all-rac- α -tocoferol* ou *dl- α -tocoferol* sintético) na dose de 100 – 400 UI para a redução dos riscos de doenças cardiovasculares. No entanto, sugerem que mais estudos científicos experimentais e observacionais são necessários para avaliar as doses adequadas e o tempo de tratamento para testar a eficácia antioxidante.

Por outro lado, recente estudo caracterizou em pacientes com hipercolesterolemia poligênica, a relação dose-resposta no plasma entre vitamina E e F₂-isoprostanos, sendo um biomarcador válido para a lipoperoxidação, sugerindo o uso de doses maiores de vitamina E para efetivamente diminuir o estresse oxidativo. Mais especificamente, doses de 1600 UI/dia e 3200 UI/dia de vitamina E (*RRR*- α -tocoferol) por 15 semanas diminuíram a concentração de F₂-isoprostanos no plasma (ROBERTS II et al., 2007; ROBERTS II e TRABER, 2009). A forma natural de vitamina E administrada naquele estudo é duas vezes mais biodisponível quando comparada à forma sintética da vitamina E (*all-rac*- α -tocoferol) (BURTON et al., 1998).

De forma semelhante, Block e colaboradores (2008) mostraram ainda que o uso de 1000 mg/dia de vitamina C por dois meses diminuiu significativamente a concentração de F₂-isoprostanos, diminuindo assim, a lipoperoxidação.

2 OBJETIVOS DO ESTUDO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a concentração de metais pesados na urina e biomarcadores de estresse oxidativo no sangue de trabalhadores de equipamento de incineração, situado no município de Laguna, expostos aos contaminantes atmosféricos provenientes da queima dos resíduos sólidos de serviços de saúde (RSSS), comparativamente a moradores do entorno, localizados no município de Capivari de Baixo e indivíduos não expostos ao processo de incineração, localizados no município de Florianópolis, antes e após a suplementação de vitamina E (800 mg/dia) e vitamina C (500 mg/dia), durante um período de seis meses.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o perfil do *status* antioxidante no sangue dos indivíduos participantes: grupo residente (indiretamente expostos, que vivem nas proximidades do incinerador, cerca de 5 km) e grupo trabalhador (diretamente expostos, funcionários que realizam a incineração de RSSS a cerca de 100 m do incinerador);
- Avaliar a concentração de metais pesados (chumbo, cobre, ferro, manganês e zinco) na urina de indivíduos dos participantes;
- Verificar as eventuais diferenças nos níveis intraeritrocitários das defesas antioxidantes enzimáticas (CAT, SOD, GPx, GR e GST) presentes no sangue dos participantes, antes e depois da administração diária de vitamina E (800 mg) e C (500 mg) durante 6 meses;
- Verificar as eventuais diferenças das defesas antioxidantes não enzimáticas (conteúdos sanguíneos de GSH e plasmáticos de vitamina E) presentes no sangue destes participantes, antes e depois da administração de vitamina E e C;

- Verificar o comportamento dos indicadores de estresse oxidativo através dos níveis plasmáticos de TBARS e de proteína carbonilada e de dano no DNA (teste cometa) nestes participantes, antes e depois da administração de vitamina E e C.
- Verificar a eficácia da suplementação antioxidante relativamente à intoxicação ocupacional vinculada à incineração de RSSS, através da resposta dos biomarcadores de estresse oxidativo no sangue dos participantes após a intervenção antioxidante.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Este estudo consiste num ensaio clínico randomizado por idade e sexo, prospectivo, controlado, realizado em indivíduos que trabalham no incinerador de RSSS (diretamente expostos) e indivíduos que residem nas proximidades do incinerador (indiretamente expostos), antes e após a suplementação vitamínica por um período de seis meses.

3.2 LOCAL DO ESTUDO

O presente estudo foi realizado em uma empresa de reciclagem e incineração de RSSS, situada à Rodovia BR 101, no município de Laguna, que faz divisa com o município de Capivari de Baixo, no sul do Estado de Santa Catarina (latitude 28°26'5" S, longitude 48°54'21" O). Na região sul do estado é o único equipamento com autorização de órgãos competentes para a atividade de incineração de RSSS.

3.2.1 Equipamento de incineração de RSSS

A empresa realiza a atividade de "Tratamento de Resíduos de Serviço de Saúde", utilizando o processo de incineração, com Licença Ambiental de Operação LAO n° 054/2005, concedida pela FATMA. Está em funcionamento, desde 1996 segundo relatos de moradores da região, o equipamento da marca RGL-350 SE (Figura 5) utilizado para incineração de resíduos de serviços de saúde, com capacidade para 100 kg/h, sendo oficialmente instalado no ano de 2003 (FATMA, 2005).

Conforme relato do representante legal do estabelecimento, o dispositivo de incineração funciona em temperatura superior a 1.000°C e recebe manutenções periódicas, tais como, a limpeza do sistema de resfriamento semanalmente, revisão do motor e bomba mensalmente e substituição da grelha a cada 90 dias. Os funcionários em princípio, devem utilizar equipamentos de proteção individual (EPIs), como luvas, óculos, máscaras, calçados fechado e uniformes.

Os trabalhadores que manuseiam o equipamento de incineração, periodicamente necessitam retirar as cinzas para armazená-las em tonéis que, posteriormente, são encaminhados para um aterro industrial. O equipamento

também necessita de manutenção, com a substituição das grelhas do forno sempre que necessária. Portanto, o operador do equipamento, bem como os demais trabalhadores envolvidos com o processo e aqueles envolvidos com a triagem de lixo doméstico que operam a cerca de 100 m do incinerador, são potencialmente expostos ao MP emitido pela chaminé do incinerador. Neste particular, estudos epidemiológicos mostraram aumento da morbidade e mortalidade humanas devido ao aumento das concentrações de MP no ar (GUSTAVSSON, 1989), não necessariamente vinculadas à presença de dioxinas (DYE et al., 1997; GHIO et al., 2002; XIAO et al., 2003).

As fotos (1-6) ilustram as condições de funcionamento e dispositivos do equipamento de incineração.



Foto 1 - Instalações do incinerador de resíduos.



Foto 2 - Incinerador de resíduos – acesso restrito.



Foto 3 - Incinerador de resíduos – acesso principal.



Foto 4 - Lavador de gases.



Foto 5 - Câmera do incinerador e grelha.



Foto 6 - Chaminé do incinerador.

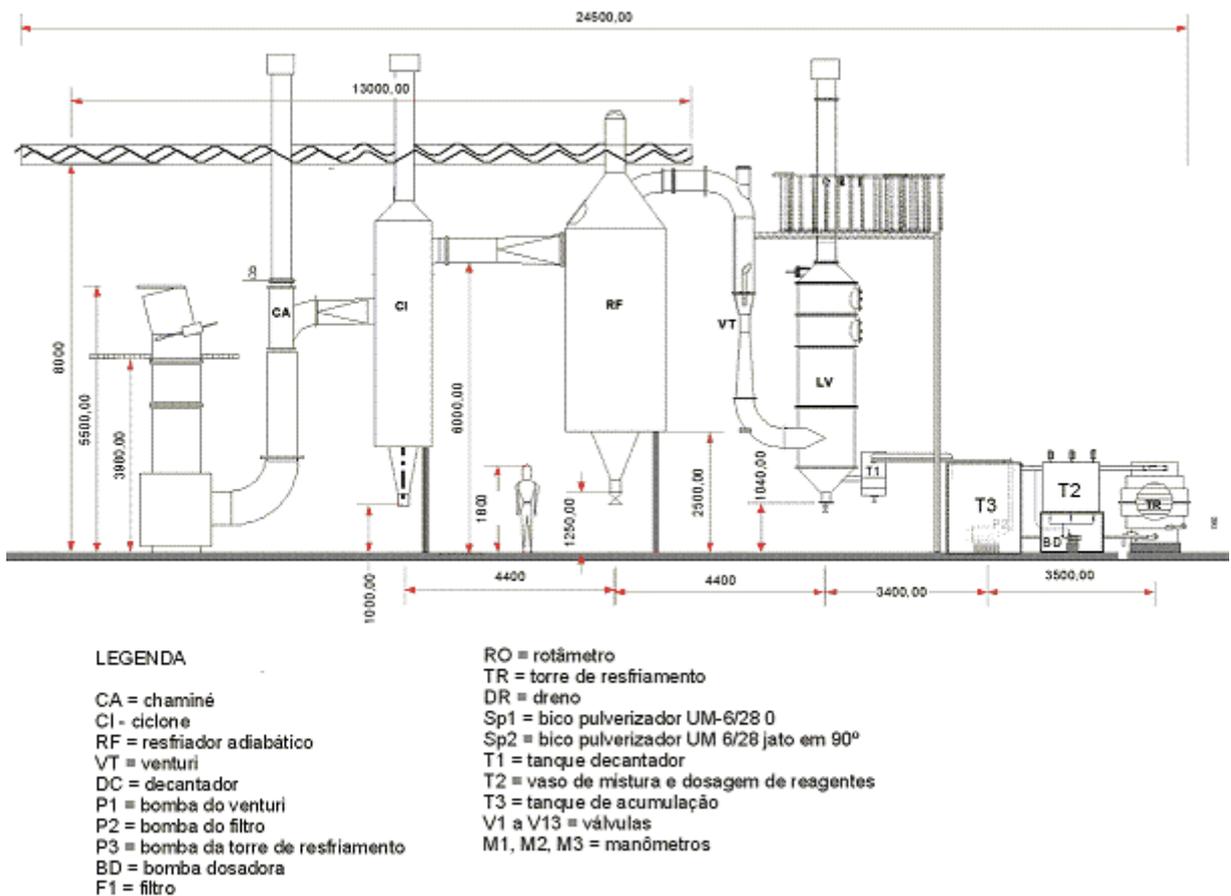


Figura 5 - Planta baixa do incinerador com lavador de gases (FATMA, 2005).

3.2.2 Aspectos epidemiológicos

Os Indicadores Municipais de Saúde do Ministério da Saúde mostram que as maiores causas de mortalidade no ano de 2002 no município de Capivari de Baixo, surpreendentemente, foram por “neoplasias (tumores)” com 27,5%, seguido por “doenças do sistema circulatório” com 20,9%. Dados congêneres da região sul do

Brasil mostram que as maiores causas de mortalidade no mesmo ano foram de “doenças do aparelho circulatório” com 33,6%, seguido de “neoplasias (tumores)” com 18,9%. Este mesmo levantamento, em nível nacional, revelou que as maiores causas de mortalidade em 2002 foram também por “doenças do aparelho circulatório” com 31,5%, seguido de “demais causas definidas” com 17,9%, e “neoplasias (tumores)” com 15,3%. Nos anos posteriores, o município de Capivari de Baixo, apresentou mortalidade por neoplasias ocupando em média a segunda posição (vide anexos VI e VII; DATASUS, 2009).

3.3 SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES

A população estudada foi composta por trabalhadores da incineração de RSSS, onde atuam aproximadamente 80 funcionários entre homens e mulheres e residentes do município de Capivari de Baixo. A amostra foi constituída por indivíduos do sexo masculino, sendo 25 trabalhadores e 25 residentes, que aceitaram participar da pesquisa e que se enquadravam nos critérios de inclusão e exclusão do estudo (vide abaixo). No entanto, devido à desistência de alguns participantes que não aderiram à terapia antioxidante e pela perda de algumas alíquotas no laboratório, a amostragem final de cada grupo foi constituída por 20 trabalhadores e 20 residentes.

O estudo foi realizado com a participação de 60 indivíduos distribuídos em três diferentes grupos: trabalhadores (diretamente expostos), residentes que vivem nas proximidades (ca. 5 km) do incinerador (indiretamente expostos) e doadores de sangue do Hospital Universitário da UFSC (não expostos, localizados a 100 km à nordeste do incinerador) – vide Figura 6.

O grupo “residentes” (indiretamente expostos) foi constituído por pessoas que residem no município de Capivari de Baixo e que estão expostos à emissão dos resíduos gerados pela incineração (ca. 5 km do incinerador). O grupo “trabalhadores” (diretamente expostos) foi constituído exclusivamente por funcionários da empresa que trabalham com o equipamento de incineração ou que estão muito próximos ao dispositivo (ca. 100 m), procedendo à triagem de lixo urbano comum. O grupo “controle” (não expostos) foi formado por doadores de sangue do HU/UFSC de Florianópolis (cerca de 100 km do incinerador), e que não possuíam nenhum tipo de

exposição com a incineração de RSSS. O grupo controle não recebeu suplementação antioxidante.

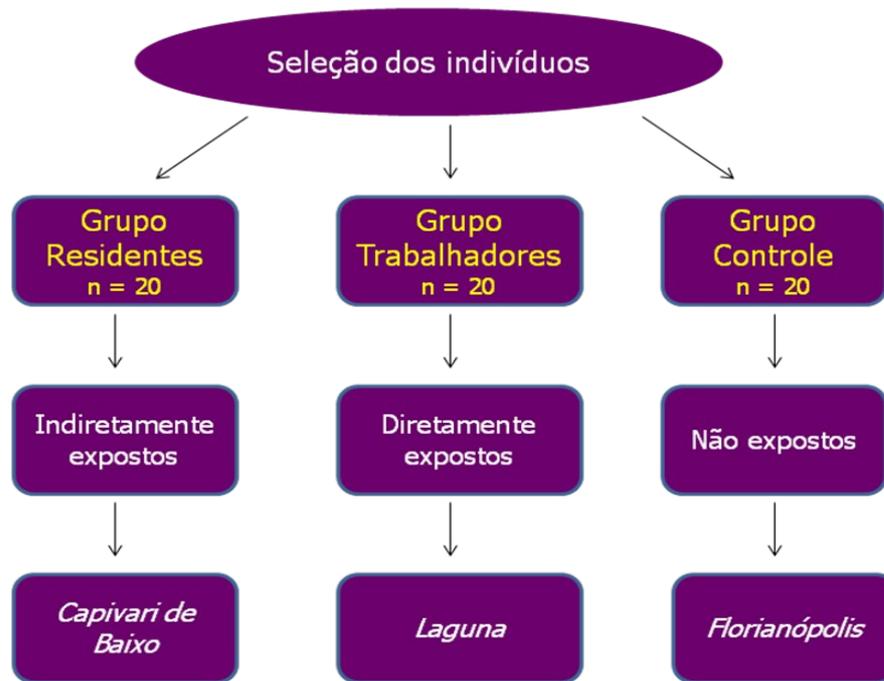


Figura 6 - Demonstração da seleção dos indivíduos.

O estudo foi desenvolvido em dois momentos, antes e após a suplementação vitamínica. Para a suplementação de vitamina C e E, utilizaram-se como referência as quantidades sugeridas por Nathens e colaboradores (2002). Roberts II e Traber (2009) descrevem que doses acima de 400 mg de vitamina E são necessárias para suprir o organismo humano contra elevados níveis de estresse oxidativo, relacionado com doenças cardiovasculares, sendo que doses abaixo de 400 mg de vitamina E podem não ser suficientes para prevenção, como constatado por Sesso e colaboradores (2008), onde a suplementação com doses diárias de 500 mg de vitamina C e 400 UI de vitamina E não foram suficientes para atenuar o dano celular relacionado também com doenças cardiovasculares.

Os participantes do estudo correspondentes ao “grupo residente” e o “grupo trabalhador”, após as coletas dos materiais biológicos, receberam frascos contendo vitamina C e vitamina E para suplementação vitamínica. A vitamina C foi elaborada pela Medicinallis® Farmácia de Manipulação, localizada em Içara-SC, sob a forma de vitamina C 500 mg revestida, cuja matéria-prima é da Galena® Química e

Farmacêutica Ltda, localizada em Campinas-SP (em anexo o laudo do controle de qualidade). A vitamina E foi elaborada pela Vitallis® Farmácia de Manipulação, localizada em Criciúma-SC, na forma de acetato de alfa-tocoferol 400 mg em cápsulas, cuja matéria-prima é da Deg® Importação de Produtos Químicos Ltda, localizada em São Paulo-SP (em anexo o laudo do controle de qualidade). Os participantes utilizaram diariamente 2 cápsulas de vitamina E e 1 cápsula de vitamina C, pela manhã, por um período de 6 meses.

A distribuição do suplemento vitamínico ocorreu em duas etapas. A primeira foi no dia da coleta do material biológico com o fornecimento de quantidade de vitaminas para um período de até 3 meses, seguida da segunda, por igual período de 3 meses. Juntamente com os frascos de vitaminas, foi fornecida uma tabela de orientação ao participante (documento em anexo) com a finalidade de mostrar ao participante a forma de uso da suplementação vitamínica.

3.3.1 Critérios de inclusão e exclusão

Como critérios de inclusão foram selecionados homens com a idade entre 20 a 50 anos com plena capacidade laboral. Já para os critérios de exclusão foram considerados:

- 1) Estados fisiológicos, condições médicas prévias e/ou concomitantes:
 - Presença de afecções patológicas sistêmica, tais como infecções ou neoplasias, desordens auto-imunes, desordens hormonais, doença neurodegenerativa, hepatites, doença venérea, HIV;
 - Pacientes agudamente doentes;
 - Doenças hematológicas prévias;
 - Dados clínicos ou biológicos sugestivos de doença renal grave ou hepática;
 - História prévia de doença pulmonar obstrutiva crônica - DPOC (bronquite crônica, enfisema e asma);
 - Alcoolismo crônico;
 - História de acidente vascular cerebral nos últimos 6 meses;
 - Pacientes com conhecida ou suspeita condição de hipersensibilidade a drogas;
 - Pacientes que estivessem participando de outros estudos.

2) Estado nutricional:

- Pacientes desnutridos (através da avaliação do IMC²);
- Pacientes que fizessem uso anterior de suplementação vitamínica.

3.3.2 Questionário de pesquisa

Os participantes foram previamente selecionados através de uma entrevista e da obtenção de dados pessoais por meio de um questionário de pesquisa adaptado de Sales e colaboradores (2006), onde constava:

- Dados demográficos: nome, endereço completo, número do telefone;
- Dados constitucionais: data de nascimento (idade), sexo, altura e peso corporal;
- Dados sócio-econômicos: profissão e ocupação, uso de medicamentos, uso de fumo e de bebidas alcoólicas, hábitos alimentares, uso de suplementação vitamínica, ingestão de água, de quais fontes e atividade física.
- Dados relacionados à saúde do trabalhador: carga horária de trabalho, utiliza equipamento de proteção individual ou coletivo, contato com produtos químicos;
- História patológica pregressa: outras doenças associadas.

Através deste levantamento, constatou-se que não houve diferenças estatisticamente significantes com relação ao consumo de diferentes tipos de alimentos, ingestão de álcool e fumo nos indivíduos entre os três grupos avaliados (vide apêndice I).

3.3.3 Avaliação antropométrica

Medidas antropométricas são os parâmetros mais utilizados na avaliação do estado nutricional e de saúde de indivíduos ou de populações (LOHMAN et al., 1998). A partir dos dados referentes ao peso e estatura, foi determinado o índice de massa corporal (IMC²) dos participantes, sendo que os resultados não apresentaram diferenças significativas entre os grupos (vide apêndice I).

3.4 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

O sangue e a urina foram obtidos dos participantes em jejum, antes da ingestão da primeira refeição matinal, em uma unidade de saúde no município de Capivari de Baixo para o grupo residente, no ambulatório da empresa para o grupo trabalhador, e no Banco de Sangue do HU/UFSC para o grupo controle. Todos os participantes, incluindo o grupo controle, deixaram de ingerir alimentos por 12 horas, antes da coleta dos materiais biológicos.

Foram coletados cerca de 10 ml de sangue, pré e pós-terapia antioxidante, em tubos com heparina, através de punção venosa de cada participante da pesquisa, e logo em seguida alíquotas de sangue foram precipitadas em ácido tricloroacético (TCA) 12% (1:5, v:v) e estocadas imediatamente em nitrogênio líquido (-170°C), até a realização da análise de GSH (Figura 7).

A separação dos eritrócitos e plasma, os quais foram utilizados para os ensaios dos marcadores de estresse oxidativo/defesas antioxidantes, foi realizada através de centrifugação rápida (3000 g durante 3 min) do sangue total, para obtenção da fração plasmática e eritrócitos, no Laboratório de Ecofisiologia Respiratória, CCB da UFSC. As amostras foram separadas em alíquotas, porção celular e o plasma, que foram armazenados a -170°C (nitrogênio líquido) para posterior análise. Foram observados os cuidados técnicos de coleta e conservação do material biológico até a análise laboratorial final.

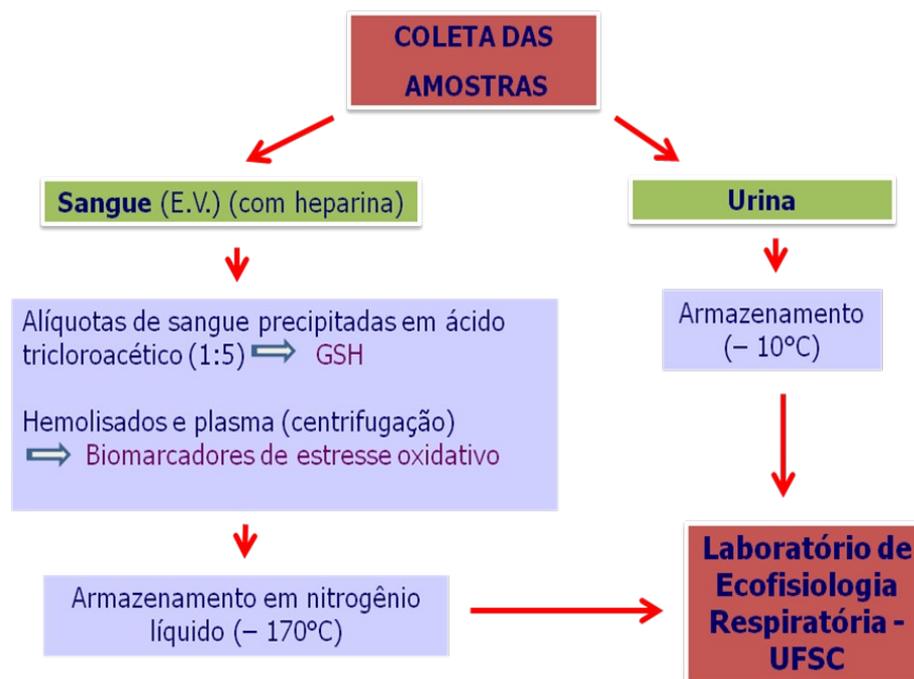


Figura 7 - Demonstração da preparação das amostras.

3.4.1 Equipamentos

As pesagens foram realizadas em balança analítica marca Ohaus modelo AR2140. Os valores de pH foram medidos com pH-metro marca Digimed, modelo DM20. A avaliação das defesas antioxidantes enzimáticas, conteúdos de GSH e outros marcadores de estresse oxidativo, foi realizada com o auxílio de um espectrofotômetro UV-visível duplo feixe, marca/modelo GBC 916, acoplado a um software apropriado. A avaliação da vitamina E foi realizada em aparelho HPLC SCL 10 AVP Shimadzu, detector SPD-M10AVP Shimadzu – Diode Array Detector, e as glutatonas foram analisadas em aparelho HPLC LC-10AD Shimadzu, detector ESA Coulochem III (eletroquímico). As análises de metais pesados foram realizadas através do uso de um espectrômetro de massa, com plasma indutivamente acoplado ICP-MS, marca Perkin Elmer SCIEX, modelo Elan 6000.

3.4.2 Reagentes

Os reagentes referentes às análises de biomarcadores de estresse oxidativo foram adquiridos da Merck e Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). O restante foi de grau analítico provenientes de empresas nacionais como a Vetec, Merk e Reagen.

3.5 ANÁLISES LABORATORIAIS

3.5.1 Metais pesados

As amostras foram diluídas em 100 vezes e acidificadas a 1% com ácido nítrico (HNO_3) bi-destilado, para um volume final de 10 mL e, posteriormente, foi realizada determinação dos metais, conforme descrito por Willis (1962).

A determinação dos metais foi desenvolvida com introdução da amostra por nebulizador pneumático. O equipamento utilizado para as determinações foi um Espectrômetro de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado ICP-MS.. Foi realizada a calibração externa do espectrômetro utilizando ródio (Rh) como padrão interno, e os resultados foram expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$. As análises foram realizadas no Laboratório de Química da UFSC.

3.5.2 Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Foi utilizado o método espectrofotométrico para a avaliação da peroxidação lipídica endógena, realizada em triplicata, através da detecção em A_{535} dos derivados

de seus produtos de oxidação, através de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), destacando-se o malondialdeído (MDA), produzindo um composto rosa, estável durante 15-20 horas (BIRD e DRAPER, 1984). O TBARS é uma metodologia relativamente barata, possui boa reprodutibilidade e está largamente difundida na literatura pertinente, para fins comparativos (HALLIWEL e GUTTERIDGE, 1999).

As frações do plasma foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) a 12% e agitadas vigorosamente. Em seguida, o sobrenadante foi incubado em tampão Tris-HCl 60 mM 7,4 (0,1 mM DPTA - ácido dietilenotriaminopentacético) e ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% durante 60 min a 100 °C, em banho-maria. Após, o material foi resfriado durante 30 min a 5 °C e centrifugado (5 min a 5000 g), e a absorbância do cromóforo de cor rósea medida em 535nm, contra o branco, sendo os valores expressos em nmol TBARS mL⁻¹, usando $\epsilon = 153 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.5.3 Proteína carbonilada (PC)

O dano oxidativo a proteínas por carbonilação foi determinado pelo método proposto por Levine e colaboradores (1990). Foram adicionados 200 μL do plasma em 800 μL de DPNH (2,4-dinitro fenil hidrazina). Incubou-se por 1 hora à temperatura ambiente no escuro, com agitação a cada 15 min. Adicionou-se 800 μL de TCA 20 %, agitadas vigorosamente, manteve-se em banho de gelo por 10 min e em seguida centrifugou-se por 5 min a 5000 g. Ao pellet foi adicionado 800 μL de TCA 10 %, seguida de agitação e centrifugação por 5 min a 5000 g. Foi adicionado 800 μL de etanol-acetato de etila, com agitação seguinte e centrifugação por 5 min a 14000 g, procedimento que foi repetido por 3 vezes, utilizando o pellet. Ao final, o excesso de etanol-acetato de etila foi retirado com auxílio de um cotonete, adicionou-se 600 μL de guanidina 6M, manteve-se em banho-maria a 37 °C por 10 min e procedeu-se à leitura a 360 nm. A concentração de proteínas totais foi determinada segundo o método de Lowry e colaboradores (1951), usando como padrão a albumina bovina. Todas as amostras foram analisadas em duplicata e a concentração de proteína carbonilada foi expressa em nmol mg⁻¹ proteína carbonilada, usando $\epsilon = 22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.5.4 Tióis protéicos (TP)

Para análise dos tióis protéicos, ou grupos sulfidrilas (-SH) de proteínas do plasma, foi empregado o Reagente de Ellman (5,5'-ditiobis 2-nitrobenzoato - DTNB), no ensaio descrito por Riddles e colaboradores (1983). Foram misturados 10 μL de plasma com 200 μL de 0,1 M de Tampão Tris, contendo 10 mM EDTA, pH 8,2. Depois de 30 minutos de incubação em temperatura ambiente, foi realizado a leitura da absorbância em 412 nm, obtida do plasma, que corresponde à quantidade de TNB formado (equivalente à quantidade de grupo sulfidril). O branco continha apenas DTNB. Os resultados obtidos da leitura dos tióis protéicos foram normalizados de acordo com o nível de proteínas, conforme a metodologia de Lowry e colaboradores (1951) e a concentração foi expressa em nmol mg^{-1} proteína, usando $\epsilon = 14,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.5.5 Teste cometa

O teste cometa foi realizado de acordo com a metodologia utilizada por Maluf e Erdtmann (2000). O índice de dano foi avaliado entre 0 e 4, sendo 0 a ausência de dano e 4 o dano máximo (Figura 8). Após a leitura, o número de núcleos correspondente a cada índice de dano foi multiplicado pelo seu respectivo índice e estes somados, obtendo-se um índice total de dano que pode variar entre 0 e 400. Além do índice, apresenta-se também a frequência de dano, a qual representa o número de células danificadas entre as observadas.

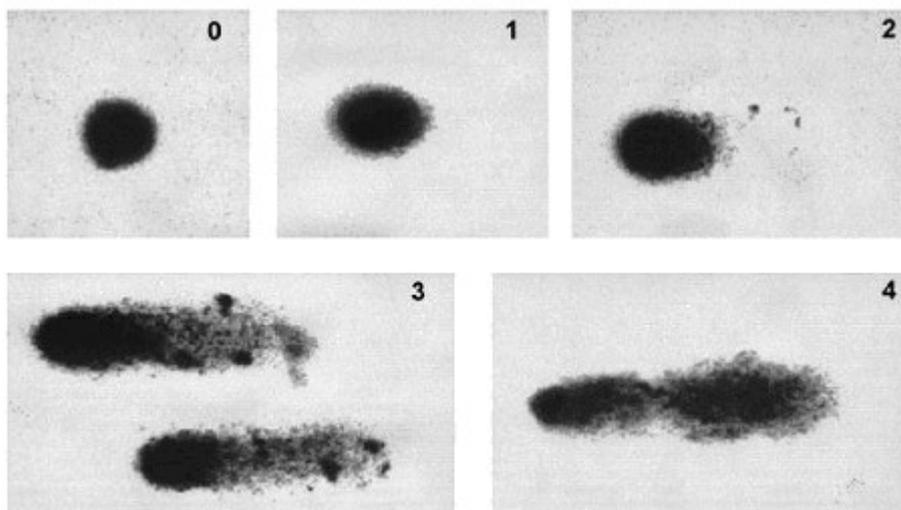


Figura 8 - Níveis de dano - Teste Cometa (MALUF e ERDTMANN, 2000).

Após a coleta de alíquotas de 5 mL de sangue dos participantes, centrifugou-se o sangue por 10 minutos a 2500 g a fim de separar o plasma, e transferiu-se o anel de leucócitos com pipeta Pasteur para eppendorf numerado contendo 1 mL de tampão PBS, homogeneizou-se e centrifugou-se por 3 minutos a 3000 g. Repetiu-se o procedimento. Do total da amostra, foram separados 5 μ L de leucócitos e a estes acrescentados 95 μ L de agarose *low melting* 0,5%. Homogeneizou-se e colocou-se sobre a lâmina numerada coberta com agarose *low melting* 1,5% (preparada anteriormente) e deixou-se secar. A eletroforese consistiu em colocar as lâminas na cuba de eletroforese com solução tampão em pH=13, preparada anteriormente, até cobrir as lâminas. Usou-se pH básico (13 - 13,5) porque nessa faixa são verificados maior variedade de danos: quebra simples, duplas e sítios apirínicos (falta de uma base). Colocou-se gelo ao redor da cuba por 20 minutos para controlar aumentos da temperatura devido ao campo elétrico, e ligou-se a cuba por 15 minutos, a 300 mA e 15V, para que o DNA pudesse migrar.

Após secarem na estufa a 37°C as lâminas foram coradas e a leitura foi feita utilizando microscópio óptico (400X). Todas as lâminas foram feitas em duplicata e os reagentes usados foram preparados imediatamente antes da realização do teste. Não foi possível realizar a análise do teste cometa no sangue dos indivíduos após a suplementação vitamínica devido a problemas técnicos.

3.5.6 Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi analisada segundo Aebi (1984), método que se baseia na velocidade de degradação do peróxido de hidrogênio solução de 10 mM em tampão fosfato 50 mM pH 7,0 preparada no dia da análise em 240 nm, durante 30 segundos. Todas as amostras foram analisadas em duplicatas e os valores expressos em $\text{mmol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$.

3.5.7 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi analisada em 480 nm, de acordo com o método de Misra e Fridovich (1972), mediante a oxidação da adrenalina 60 mM (mudança de pH 2,0 para pH 10,2) que produz o ânion superóxido e um cromóforo róseo, o adrenocromo. As amostras foram tratadas por uma mistura de clorofórmio:etanol (3:5 v:v), para retirar a hemoglobina presente e impedir a geração e interferência do ânion superóxido artefactual no ensaio. A velocidade inicial de formação do adrenocromo foi

monitorada durante cerca de 100 segundos do início da reação, com acréscimo de absorvância a cada intervalo de 15 segundos em torno de 0,013-0,015 unidades, para então adicionar a alíquota da amostra, geralmente em torno de 10 a 70 μL , dependendo da concentração e atividade da enzima presente nesta alíquota. O tempo total de monitoramento da reação foi de 3 minutos. Curvas de 4 ou 5 pontos permitiram avaliar indiretamente a atividade enzimática da SOD. Os valores da SOD foram expressos em termos de atividade relativa da enzima (U SOD mL^{-1}), sendo que uma unidade arbitrária de SOD é definida como a quantidade de SOD necessária para diminuir à metade a velocidade de formação do adrenocromo (MISRA e FRIDOVICH, 1972).

3.5.8 Glutaciona peroxidase (GP_x)

Para a determinação da atividade desta enzima foi utilizado o método de Flohé e Gunzler (1984) usando 10 μL de amostra e 10 μL de tert-butilhidroperóxido (*t*-BuOOH) (4,9 μL de *t*-BuOOH em 10 mL de tampão fosfato) colocados em 1 mL de meio de reação, que continha 25 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, 8,6 mg de NADPH para 50 mL de meio de reação, 10 mL de DPTA 5 mM pH 7,0 (19,6 mg de DTPA para 100 mL de solução), 15 mL de água destilada, 24 mg de GSH para 50 mL de meio de reação, e 5 U de GR (2500U/1,9 mL), colocada momentos antes do ensaio. O método baseia-se em dismutar o *t*BuOOH pela oxidação de GSH e formação de GSSG, catalisada pela GP_x, onde a oxidação do NADPH é medida em 340 nm. Todas as amostras foram analisadas em duplicatas e os valores foram expressos em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$, usando $\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (FLOHÉ e GUNZLER, 1984).

3.5.9 Glutaciona redutase (GR)

O método utilizado para a determinação da atividade da GR foi o de Calberg e Mannervick (1985), que verifica em 340 nm durante 30 segundos, a taxa de oxidação do NADPH devido à formação de glutaciona reduzida, a partir da glutaciona oxidada, pela ação da GR, em um meio de reação contendo tampão fosfato 0,1 M pH 7,0; 8,6 mg de NADPH para 50 mL de meio de reação; 30,6 mg de glutaciona oxidada para 50 mL de meio de reação e DPTA 5 mM (19,6 mg de DTPA para 100 mL de solução). Todas as amostras foram analisadas em duplicata e os valores da atividade desta

enzima foram expressos em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$ do hemolisado, usando $\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

3.5.10 Glutationa S-transferase (GST)

A atividade da GST foi medida em 340 nm, de acordo com Habig e colaboradores (1976), onde 10 μL da amostra era adicionada a um meio contendo 10 μL de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 0,1 M (CDNB), 10 μL de GSH 0,1 M e 970 μL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, sendo que na cubeta de referência utilizou-se 980 μL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, 10 μL de CDNB 0,1 M e 10 μL de GSH 0,1 M. Este ensaio tem como princípio o uso de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato para que a enzima GST, presente na amostra, conjugue a GSH ao CDNB e forme a substância detectável em 340 nm, atividade esta monitorada durante 60 segundos, sendo os valores expressos em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$ do hemolisado, usando $\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

3.5.11 Glutationa reduzida (GSH, tióis não protéicos)

As concentrações de GSH foram obtidas através de duas metodologias analíticas, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e absorvância (espectrofotometria). Devido a problemas analíticos, não foi possível obter os resultados pós-suplementação por HPLC, sendo, portanto apresentado com os resultados obtidos por espectrofotometria.

Para metodologia analítica por cromatografia foi utilizado um sistema cromatográfico de alta eficiência (Shimadzu® SCL 10A_VP) associado a um detector eletroquímico (ESA® Cuolochem III) foi obtido a detecção de GSH e GSSG. A separação, após injeção automática de 20 μL da amostra utilizou-se uma coluna e pré-coluna LUNA RP-18 de fase reversa 250 X 4,6 mm com diâmetro de partícula de 5 μm (Phenomenex®) com uma fase móvel tampão fosfato 50 mM pH 2,7 contendo 50 μM de ácido octanosulfônico e 2% de Acetonitrila a 1,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ sob fluxo isocrático (Shimadzu® LC10AT_VP). Um forno de coluna (WATERS/Millipore® TCM) foi ajustado em 44°C garantindo uma boa resolução nos picos de resposta. Todos os solventes utilizados na fase móvel tinham grau HPLC, sendo previamente filtrados (Membrana PVDF 0,45 μm - Millipore®) antes do uso (RODRIGUEZ-ARIZA et al.,

1994). Para preparação da curva de calibração (1,0 – 10 – 100 μM) foi utilizado uma solução-mãe 1 mM de GSH e GSSG.

Para metodologia analítica por absorvância, foi utilizado um espectrofotômetro UV-visível marca/modelo GBC, onde avaliou-se a concentração eritrocitária de pequenos tióis em precipitado ácido (TCA 12%, 1:4, v:v), empregando o método de Beutler e colaboradores (1963). A adição de 0,2 mL de ácido 2-nitrobenzóico 2,5 mM (DTNB) nas cubetas contendo 1,9 mL de tampão Tris-HCL 0,2M pH 8,0 e 0,1 mL da amostra, permitia, após cerca de 3 min e agitação da cubeta, a obtenção máxima de formação do ânion tiolato (TNB) de cor amarela, mensurável em A_{412} . As amostras foram analisadas em duplicata e os valores foram expressos em $\mu\text{mol mL}^{-1}$, usando $\epsilon = 14,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.5.12 Vitamina E (VE)

A detecção de alfa tocoferol foi feita em um sistema cromatográfico de alta eficiência (Shimadzu® SCL 10A_VP) associado a um detector *photodiode array* ajustado para uma melhor resposta em um $\lambda = 292 \text{ nm}$ (Shimadzu® PDA 10A_XL). A separação, após injeção automática de 20 μL (Shimadzu® SIL 10AD_VP), teve lugar utilizando-se uma coluna e pré-coluna LUNA RP-18 de fase reversa 250 X 4,6 mm com diâmetro de partícula de 5 μm (Phenomenex®) com uma fase móvel MetOH a 1,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ sob fluxo isocrático (Shimadzu® LC10AT_VP). Todos os solventes utilizados na fase móvel tinham grau HPLC, sendo previamente filtrados (Membrana PVDF 0,45 μm - Millipore®) antes do uso. Para a preparação da curva de calibração, partiu-se de uma solução de 10 mM de alfa tocoferol com sucessivas diluições em MetOH obtendo os pontos da curva padrão (5 – 10 – 25 – 100 μM). Para preparação das amostras, pipetou-se 300 μL da solução etanol/metanol 5% gelado, em um tubo com tampa, adicionou-se 100 μL do plasma, agitou-se em vortex por 12 segundos. Após colocou-se em banho de gelo por 10 minutos. Centrifugou-se a 12.000 g por 10 minutos. Aproximadamente 75 μL do sobrenadante (fase hexano) foi adicionado 1 mL de hexano, agitou-se em vortex por 30 segundos, centrifugou-se a 5000 g 10 minutos e transferiu-se alíquotas de aproximadamente 800 μL em tubos onde o hexano foi evaporado com nitrogênio. Adicionou-se, então, 800 μL de metanol para ressuspender e injetou-se este extrato ao sistema cromatográfico. As colunas foram eluidas isocraticamente com metanol e o fluxo foi de 1 mL/min . As amostras foram

analisadas em duplicata e a concentração plasmática de α -tocoferol foi determinada através de uma curva-padrão e expressa em $\mu\text{mol L}^{-1}$ (NICOLETTI et al., 2001).

3.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Para a realização deste ensaio clínico, o presente protocolo foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina, protocolo N°. 366/05-CEP (Anexo). O protocolo experimental atendeu ao que determina a Resolução n° 196/1996, do Conselho Nacional de Saúde, sobre pesquisas clínicas, bem como princípios éticos, científicos e técnicos consoantes com os padrões de aceitação internacional para ensaios clínicos. Cada paciente preencheu o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Comparações estatísticas dos biomarcadores de estresse oxidativo e metais pesados dentro dos diferentes grupos foram realizadas usando ANOVA (análise de variância), de uma via, complementada pelo teste de Dunnett. Para comparação pareada entre os grupos residentes e trabalhadores, antes e após a suplementação antioxidantes foi utilizado o teste *t* de Student. Na análise das correlações foi utilizado o teste de Correlação de Pearson. Para todas as análises estatísticas foi admitido um nível mínimo de significância de 5 % ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 MANUSCRITO 1

OCCUPATIONAL AIRBORNE CONTAMINATION IN SOUTH BRAZIL: 2. OXIDATIVE STRESS DETECTED IN THE BLOOD OF WORKERS OF INCINERATION OF HOSPITAL RESIDUES

Possamai, F. P.; Ávila Júnior, S.; Budni, P.; Backes, P.; Parisotto, E. B.; Rizelio, V. M.; Torres, M. A.; Colepicolo, P.; Wilhelm Filho, D.

Manuscrito publicado no periódico *ECOTOXICOLOGY*, fator de impacto=2,355 (JCR-2008). DOI 10.1007/s10646-009-0387-1. Vide apêndice I.

4.2 MANUSCRITO 2

ANTIOXIDANT THERAPY ATTENUATES OXIDATIVE STRESS IN THE BLOOD OF SUBJECTS EXPOSED TO OCCUPATIONAL AIRBORNE CONTAMINATION FROM COAL MINING EXTRACTION AND INCINERATION OF HOSPITAL RESIDUES

Wilhelm Filho, D.; Ávila Júnior, S.; Possamai, F. P.; Parisotto, E. B.; Moratelli, A. M.; Garlet, T. R.; Inácio, D. B.; Torres, M. A.; Colepicolo, P.; Dal-Pizzol, F.

Manuscrito aceito para publicação no periódico *ECOTOXICOLOGY*, fator de impacto=2,355 (*JCR-2008*). Número do manuscrito: ECTX 930. Vide apêndice II.

4.3 RESULTADOS DO TESTE COMETA

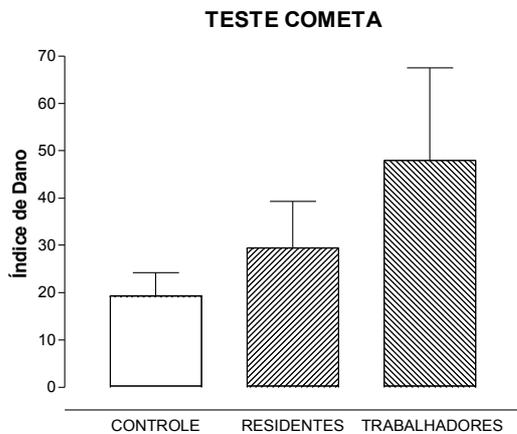


Figura 9 - Índice de dano - Teste Cometa. Análise do índice de dano através do Teste Cometa no sangue de indivíduos expostos à incineração de RSSS, comparados com o grupo controle, antes da suplementação vitamínica. Os Valores são expressos em média \pm erro padrão (n=20).

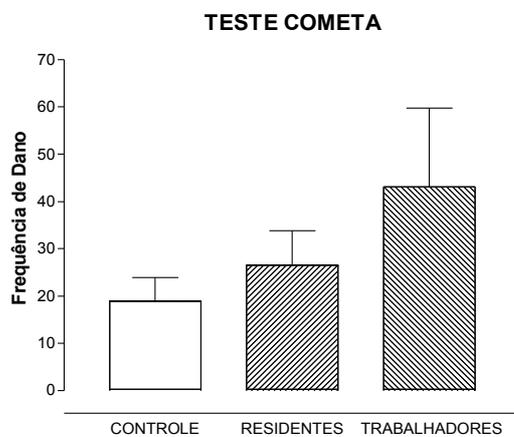


Figura 10 - Frequência de dano - Teste Cometa. Análise da frequência de dano através do Teste Cometa no sangue de indivíduos expostos à incineração de RSSS, comparados com o grupo controle, antes da suplementação vitamínica. Os Valores são expressos em média \pm erro padrão (n=20).

5 DISCUSSÃO

A principal motivação da elaboração do projeto inerente ao presente trabalho foi decorrente da constatação do aumento nos últimos anos da morbi-mortalidade na cidade de Capivari de Baixo, onde residem os indivíduos expostos à incineração de RSSS próximo a esta cidade (vide anexos VI, VII e VIII). Os Indicadores Municipais de Saúde do Ministério da Saúde locais mostram que a maior causa de mortalidade no ano de 2002 no município de Capivari de Baixo, incidiu sobre as “neoplasias (tumores)”, e o padrão de mortalidade por essa causa permaneceu elevado nos anos posteriores, geralmente ocupando a segunda colocação (vide anexo VI; DATASUS, 2009). Diversos processos e operações industriais tais como a emissão de gases provenientes de veículos automotores, queima de biomassa, queima de combustível da indústria, entre outros, são fontes de emissões de contaminantes atmosféricos. No entanto, em particular, a incineração de RSSS pode ser responsável pela emissão de substâncias de elevada toxicidade, como metais pesados, substâncias orgânicas, dentre elas as dioxinas, substâncias inorgânicas e gases (ATSDR, 2007b; BRASIL, 2002).

Os resultados do presente estudo foram divididos em duas publicações (apêndice I e II), sendo o primeiro constituído de dados obtidos antes da suplementação antioxidante e o segundo de dados obtidos após a suplementação e da análise da concentração de metais pesados na urina.

No estudo pós-suplementação antioxidante (vide apêndice II; WILHELM FILHO et al., *Ecotoxicology*, aceito para publicação), as análises de metais na urina dos participantes mostrou concentrações elevadas de chumbo, cobre, ferro e zinco, sendo que a concentração de ferro nos residentes não foi alterada em relação ao grupo controle e a concentração de manganês foi diminuída, tanto na urina de trabalhadores da incineração, como em residentes das proximidades da área do equipamento, quando comparados ao grupo controle (Quadro 1).

Mais especificamente, com relação às análises do chumbo, as concentrações na urina mostraram-se elevadas nos indivíduos trabalhadores da incineração ($3,20 \pm 0,23 \mu\text{g.L}^{-1}$) e nos residentes ($4,37 \pm 0,38 \mu\text{g.L}^{-1}$) que vivem nas proximidades do equipamento, comparados ao grupo controle ($2,20 \pm 0,52 \mu\text{g.L}^{-1}$). A mesma condição foi observada com os trabalhadores da extração de carvão, tanto em mineradores de subsolo ou de galerias ($5,69 \pm 0,10 \mu\text{g.L}^{-1}$), como em mineradores de

superfície ($9,38 \pm 0,22 \mu\text{g.L}^{-1}$) e residentes da área do entorno ($5,53 \pm 1,03 \mu\text{g.L}^{-1}$), quando comparados ao grupo controle ($2,20 \pm 0,52 \mu\text{g.L}^{-1}$), sendo este último grupo o mesmo controle do estudo envolvendo a incineração de RSSS (vide apêndice II; WILHELM FILHO et al., *Ecotoxicology*, aceito para publicação).

Diversos registros existem para definir valores de referência de metais em amostras biológicas de humanos, no entanto, não há valores definitivos devido aos diferentes fatores biológicos existentes entre as populações. Neste contexto, Apostoli (1992) descreve critérios para definição de valores de referência para a toxicidade dos metais. Dentre os diversos fatores biológicos interferentes citou-se a natureza dos elementos e o período ao qual o estudo é realizado, tendo em vista os fenômenos antropogênicos que influenciam o grau de exposição em humanos. Além disso, há outras variáveis como o sexo, idade e estilo de vida que também podem interferir na determinação desses valores (Apostoli, 1992). Estudos de diferentes populações no mundo determinaram distintos valores de referência para a concentração de chumbo na urina, os quais estão em uma ampla faixa de 0,6 a $17 \mu\text{g.L}^{-1}$ (ATSDR, 2007a; BENEŠ et al., 2002; BRASIL, 1994; IYENGAR e WOLTTIEZ, 1988; MINOIA et al., 1990; NIOSH, 1994).

Beneš e colaboradores (2002) determinaram valor médio para o chumbo na urina correspondente a $0,6 \mu\text{g.L}^{-1}$, na população da República Tcheca, por outro lado, amostras de urina de indivíduos de 55 países mostrou valores normais para o chumbo na urina de $11 \mu\text{g.L}^{-1}$ (IYENGAR e WOLTTIEZ, 1988), enquanto que, em italianos saudáveis e não expostos diretamente a metais, apresentou valores médios de chumbo na urina de $17 \mu\text{g.L}^{-1}$ (MINOIA et al., 1990). Dados do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos da América (EUA) informa que os valores normais de chumbo na urina deveriam estar entre 1,6 e $6 \mu\text{g.L}^{-1}$ para indivíduos com a função renal normal (NIOSH, 1994). Além disso, dados da Agência de Registro de Doenças e Substâncias Tóxicas (ATSDR) dos EUA mostraram que 90% da população americana apresenta na urina o valor de $1,90 \mu\text{g.L}^{-1}$ (ATSDR, 2007a), valor semelhante ao encontrado nos indivíduos do grupo controle no presente trabalho. É importante ressaltar que a ATSDR, em seu último estudo realizado no ano de 2007, coloca o chumbo como a segunda substância mais perigosa para a saúde humana (ATSDR, 2007b).

Surpreendentemente, no Brasil, os legisladores somente normatizaram valores de exposição ao chumbo para trabalhadores expostos a agentes químicos,

sendo que o valor de referência (VR) corresponde a $5 \mu\text{g.L}^{-1}$, e o índice biológico máximo permitido (IBMP) a $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ para indivíduos com a função renal normal (BRASIL, 1994). Desta forma, todos os valores médios verificados no presente estudo estiveram abaixo daquele índice. Os valores aceitáveis para o chumbo ainda não estão claramente definidos e não há registro de níveis seguros para a exposição ao chumbo no organismo humano (LIDSKY e SCHNEIDER, 2003). Além disso, o chumbo não participa de nenhum processo metabólico normal e possui uma cinética complexa quando presente no organismo humano, podendo mobilizar-se dos ossos para o plasma (de AZEVEDO e CHASIN, 2003). Para a exposição de trabalhadores a todos os demais agentes químicos, outros indicadores biológicos devem ser monitorados, dependendo de estudo prévio dos aspectos de validade toxicológica, analítica e de interpretação desses indicadores (BRASIL, 1994).

Em Portugal, foi comparada a concentração de chumbo, cádmio e mercúrio no sangue de indivíduos residentes em Lisboa e na Ilha de Madeira, os quais vivem próximos a incineradores de resíduos sólidos. Foi verificado que os indivíduos de Lisboa apresentaram maior concentração dos metais estudados no sangue em relação aos indivíduos residentes na Ilha de Madeira, sendo que a concentração desses metais foram, em média, acima dos valores de referência (REIS et al., 2007). Segundo Wang e Fowler (2008), em um estudo de revisão, a exposição crônica ao chumbo, cádmio e arsênio em local de trabalho, pode elevar o estresse oxidativo, por interromper atividade de enzimas antioxidantes através de sua ligação em seus sítios ativos, mais especificamente, aos grupos sulfidrilas ou aos metais essenciais dos seus grupos prostéticos. Outro estudo de revisão descreveu que a exposição em animais de laboratório ao chumbo aumentou a lipoperoxidação, diminuiu o mecanismo de defesa antioxidante (FLORA et al., 2008) e alterou a síntese do heme (FLORA et al., 2008; KAKKAR e JAFFERY, 2005). Estudo *in vitro* mostrou o efeito tóxico dos metais pesados (chumbo, mercúrio e cobre), induzindo a atividade da GST e diminuindo a concentração de GSH (FLORA et al., 2008; KORASHY e EL-KADI, 2006; 2008).

Diferente do chumbo, o cobre é um metal-traço, classificado como um elemento essencial para a vida da maioria dos organismos, mas em altas concentrações pode ser uma substância muito tóxica. Estudos *in vitro* mostraram que o acúmulo desse metal provoca aumento das ERO como H_2O_2 , $\text{O}_2^{\bullet-}$ e $\bullet\text{OH}$,

causando estresse oxidativo e alterando o sistema enzimático antioxidante (FLORA et al., 2008; GAETKE e CHOW, 2003; GALHARDI et al., 2004; KORASHY e EL-KADI, 2008). Vários mecanismos têm sido propostos na tentativa de explicar a toxicidade celular cobre-dependente. A hipótese mais freqüentemente citada, é a propensão do cobre em reagir na sua forma livre, induzindo a formação de espécies radicalares via reação de Fenton (BREMNER, 1998).

Foi observado no presente estudo que as concentrações de cobre na urina estiveram elevadas nos indivíduos trabalhadores da incineração ($50,25 \pm 2,08 \mu\text{g.L}^{-1}$) e dos residentes ($48,16 \pm 2,42 \mu\text{g.L}^{-1}$) do entorno do equipamento, comparados ao grupo controle ($43,42 \pm 1,27 \mu\text{g.L}^{-1}$) – vide Quadro 1. Semelhante condição foi verificada no estudo com os trabalhadores da extração de carvão em mineradores de subsolo ($60,84 \pm 2,82 \mu\text{g.L}^{-1}$), mineradores de superfície ($78,75 \pm 2,01 \mu\text{g.L}^{-1}$) e residentes ($50,96 \pm 1,24 \mu\text{g.L}^{-1}$), comparados ao grupo controle acima mencionado (vide apêndice II; WILHELM FILHO et al., *Ecotoxicology*, aceito para publicação).

Estudos congêneres realizados em diferentes países mostraram valores de referência para a concentração de cobre na urina na faixa entre 2 a $38 \mu\text{g.L}^{-1}$ (BENEŠ et al., 2002; FORTE et al., 2004; IUPAC, 1995; IYENGAR e WOLTTIEZ, 1988; MINOIA et al., 1990; OHASHI et al., 2006), ou seja, os valores médios verificados em todos os grupos analisados no presente estudo, incluindo o grupo controle foram acima dos valores de referência.

Com relação à monitoração biológica do cobre, nenhum biomarcador de exposição é reconhecido, quer pela NR-7, norma regulamentadora brasileira (BRASIL, 1994), quer pelas agências internacionais (ACGTH, 2001; de AZEVEDO e CHASIN, 2003). No entanto, dados da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) mostraram que os valores da concentração de cobre na urina são em média de 15 a $36 \mu\text{g.L}^{-1}$ em indivíduos sem comprometimento renal (IUPAC, 1995). Outros estudos mostraram valores normais da concentração de cobre na urina, com uma variação acentuada em média de $2,2 \mu\text{g.L}^{-1}$ (BENEŠ et al., 2002), $10,6 \mu\text{g.L}^{-1}$ (FORTE et al., 2004), $38 \mu\text{g.L}^{-1}$ (IYENGAR e WOLTTIEZ, 1988), $23,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ (MINOIA et al., 1990) e $13,4 \mu\text{g.L}^{-1}$ (OHASHI et al., 2006). De qualquer forma, os valores encontrados no presente trabalho indicam médias acima de todos os valores supra mencionados para a urina, tanto para os indivíduos expostos à incineração de RSSS ($50,2-48,1 \mu\text{g.L}^{-1}$), como aqueles expostos à atividade de mineração ($78,7-50,2 \mu\text{g.L}^{-1}$), como para os próprios controles ($43,42 \pm 1,27 \mu\text{g.L}^{-1}$).

Os dados obtidos neste estudo mostram a possível influência do cobre no aumento da lipoperoxidação verificado pelo aumento da concentração de TBARS no plasma de indivíduos expostos indireta e diretamente à queima de resíduos, em comparação ao grupo controle (Quadro 2). Como foi mencionado acima, o cobre assim como o chumbo, em estudos *in vitro*, altera o *status* antioxidante celular da GST e GSH (KORASHY e EL-KADI, 2006; 2008). Além disso, outro estudo *in vitro* mostrou que o aumento da concentração do cobre favorece a proliferação de células cancerosas (VALKO et al., 2006). Estudo de Galhardi e colaboradores (2004) em ratos, mostrou que o excesso de cobre altera os marcadores de estresse oxidativo, com aumento da atividade da SOD e diminuição da atividade da GPx. Níveis excessivos de cobre inibem a atividade de enzimas, através da ligação com os grupos sulfidril, assim como a inibição da glicose-6-fosfato desidrogenase, as quais são responsáveis por proteger o organismo contra os danos provocados pelas ERO (FLORA et al., 2008; KOSASHY e EL-KADI, 2006, 2008).

O ferro e o cobre são metais de transição essenciais aos organismos, mas, quando livres nos tecidos, participam ativamente da Reação de Fenton, gerando o radical hidroxil, desta forma participando da peroxidação de lipídios (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Tanto a incineração de resíduos como a combustão do carvão, além de provocar danos citogenéticos (CELIK et al., 2007; DONBAK et al., 2005), aumenta a formação de ERO devido à presença de metais de transição em MP oriundo da combustão do carvão (HATZIS et al., 2006; STOHS e BAGCHI, 1995; TAO et al., 2003; YOSHIDA et al., 2003).

Foi constatado no presente estudo que as concentrações de ferro na urina foram aumentadas somente nos indivíduos trabalhadores da incineração ($1208,99 \pm 50,13 \mu\text{g.L}^{-1}$) comparados ao grupo controle ($1032,74 \pm 60,05 \mu\text{g.L}^{-1}$) – vide Quadro 1. No estudo paralelo com os trabalhadores da extração de carvão, apenas os indivíduos diretamente expostos, ou seja, mineradores de subsolo ($1249,10 \pm 71,37 \mu\text{g.L}^{-1}$) e mineradores de superfície ($1245,24 \pm 19,26 \mu\text{g.L}^{-1}$), apresentaram valores elevados em relação ao grupo controle (vide apêndice II; WILHELM FILHO et al., *Ecotoxicology*, aceito para publicação).

Poucos estudos tratam dos valores de referência de ferro na urina, sendo que não existem procedimentos preconizados e em rotina para vigilância da contaminação ambiental por ferro (de AZEVEDO E CHASIN, 2003). Amostras de urina de indivíduos apresentaram valores normais para o ferro em torno de $129 \mu\text{g.L}^{-1}$

¹ (IYENGAR e WOLTTIEZ, 1988). Outros estudos apresentam valores inferiores de ferro na urina sendo que Forte e colaboradores (2004) encontraram valores médios em indivíduos saudáveis de $8 \mu\text{g.L}^{-1}$ e Bocca e colaboradores (2006) identificaram valores médios de $8,8 \mu\text{g.L}^{-1}$. No Brasil, não há parâmetros para o controle biológico da exposição ao ferro (BRASIL, 1994). Considerando os valores encontrados no presente trabalho, as médias estão muito acima de todos os valores supra mencionados para a urina, em todos os grupos, inclusive para o grupo controle, mostrando um quadro de intoxicação pela exposição ao metal.

Estudo de revisão mostrou que o aumento da concentração de ferro em animais e humanos aumenta os riscos de diversas doenças, incluindo doenças vasculares e neurológicas, além de câncer (VALKO et al., 2006). Além disso, o ferro favorece a formação de ERO que geram danos em lipídios e no DNA, apesar de ser importante no transporte de oxigênio aos tecidos (VALKO et al., 2006). Outro estudo de revisão já mencionado acima, mostrou que metais como ferro, cobre, cádmio, mercúrio, níquel, chumbo e arsênio, possuem a capacidade de gerar ERO, resultando em dano celular e inativação de enzimas antioxidantes, podendo causar neurotoxicidade, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade em humanos e animais de laboratório (FLORA et al., 2008).

Com relação às análises das concentrações de manganês na urina no presente estudo, mostraram-se diminuídas nos indivíduos trabalhadores da incineração ($2,53 \pm 0,15 \mu\text{g.L}^{-1}$) e nos residentes do entorno do equipamento ($4,62 \pm 0,11 \mu\text{g.L}^{-1}$), quando comparados ao grupo controle ($5,63 \pm 0,24 \mu\text{g.L}^{-1}$) – vide Quadro 1. A mesma condição foi observada no estudo com os trabalhadores da extração de carvão, os mineradores de subsolo ($3,21 \pm 0,30 \mu\text{g.L}^{-1}$), mineradores de superfície ($4,72 \pm 0,40 \mu\text{g.L}^{-1}$) e no grupo de residentes ($2,84 \pm 0,10 \mu\text{g.L}^{-1}$), em comparação ao grupo controle (vide apêndice II; WILHELM FILHO et al., *Ecotoxicology*, aceito para publicação).

Os valores de referência para a concentração de manganês na urina situam-se na faixa entre $0,5$ a $8 \mu\text{g.L}^{-1}$ (ATSDR, 2008; FORTE et al., 2004; IUPAC, 1995; IYENGAR e WOLTTIEZ, 1988; MINOIA et al., 1990), o que abrangeria todos os valores encontrados no presente trabalho. Dados da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) mostram que os valores da concentração de manganês na urina são, em média, de $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ (IUPAC, 1995). Outros estudos mostraram valores normais da concentração de manganês na urina de 1 a $8 \mu\text{g.L}^{-1}$ (ATSDR, 2008), $0,59$

$\mu\text{g.L}^{-1}$ (FORTE et al., 2004), $0,6 \mu\text{g.L}^{-1}$ (IYENGAR e WOLTTIEZ, 1988) e $1,02 \mu\text{g.L}^{-1}$ (MINOIA et al., 1990), remetendo os valores encontrado no presente trabalho à esta variação.

Quanto à toxicidade do manganês, Flora e colaboradores (2008) em um estudo de revisão, igualmente já mencionado acima, descreve que metais de transição como cobre, zinco, ferro e o manganês participam do controle e sinalização metabólica. Além disso, a deficiência de manganês influencia o metabolismo dos carboidratos, em ratos, sendo que pode resultar na diminuição da síntese de insulina (KLIMIS-TAVANTZIS e KLIMIS-ZACAS, 1994). O excesso de manganês é tóxico em humanos, pois interage com sítios de ligações de proteínas ocasionando em alterações no metabolismo celular (FLORA et al., 2008; KAKKAR e JAFFERY, 2005).

As análises das concentrações de zinco na urina dos indivíduos do presente estudo, verificaram-se elevadas nos indivíduos trabalhadores da incineração ($462,51 \pm 79,36 \mu\text{g.L}^{-1}$) e dos residentes ($540,58 \pm 43,88 \mu\text{g.L}^{-1}$) do entorno do equipamento, quando comparados ao grupo controle ($287,69 \pm 18,21 \mu\text{g.L}^{-1}$) – vide Quadro 1. Situação semelhante foi observada no estudo com os trabalhadores da extração de carvão, mineradores de subsolo ($1159,04 \pm 157,26 \mu\text{g.L}^{-1}$) e mineradores de superfície ($1064 \pm 53,69 \mu\text{g.L}^{-1}$), com exceção dos indivíduos residentes, que apresentaram valores semelhantes ao grupo controle (vide apêndice II; WILHELM FILHO et al., Ecotoxicology, aceito para publicação).

Valores de referência para a concentração de zinco na urina situam-se na faixa entre 50 e $456 \mu\text{g.L}^{-1}$ (ATSDR, 2005; BENEŠ et al., 2002; FORTE et al., 2004; IYENGAR e WOLTTIEZ, 1988; MINOIA et al., 1990). Dados da ATSDR apresentam valores normais de zinco na urina até $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ para indivíduos sadios (ATSDR, 2005). Beneš e colaboradores (2002) determinaram valores normais na urina de indivíduos sadios para o zinco na média de $71 \mu\text{g.L}^{-1}$, na população da República Tcheca. Estudo de Iyengar e Wolttiez (1988), mostrou valores normais de zinco na urina de $361 \mu\text{g.L}^{-1}$, enquanto que em italianos não expostos a metais apresentou valores médios normais de $456 \mu\text{g.L}^{-1}$ (MINOIA et al., 1990), Forte e colaboradores (2004) apresentaram valores normais da concentração de zinco na urina como sendo em média, de $270 \mu\text{g.L}^{-1}$. Desta forma apenas o grupo controle ($287,69 \pm 18,21 \mu\text{g.L}^{-1}$) apresentaria valores médios compatíveis com aqueles resultados, estando os grupos expostos, tanto da incineração de RSSS, como notadamente os expostos à atividade de mineração acima deles.

O zinco, além de ligar-se a sítios de proteínas, levando a alterações no metabolismo celular, também aumentou o estresse oxidativo no plasma de trabalhadores de uma indústria de zinco, quando comparados a trabalhadores de uma indústria de cobre (FLORA et al., 2008). Em trabalho similar envolvendo a indústria de zinco, a compensação do estresse oxidativo ocorreu provavelmente devido ao aumento da concentração de malondialdeído (MDA), GSH, e da atividade da SOD (CHEN et al., 2006). Outro estudo relacionou o aumento da atividade de enzimas como catalase, GPx e SOD em plantas localizadas em uma área de mineração abandonada em Portugal, devido à elevada concentração de metais pesados como o arsênio, cobre, chumbo e zinco no solo daquela região (SANTOS et al., 2009). Em ambientes poluídos como as áreas de mineração, os bioindicadores são importantes para avaliar e monitorar a contaminação ambiental decorrente da presença de metais pesados (GARCÍA-LORENZO et al., 2009).

Além dos metais pesados, os incineradores de resíduos de diferentes países geram outros contaminantes, tais como as dioxinas, que se acumulam no organismo (SOVOCOL et al., 1998), são geradoras de ERO e induzem carcinogênese (FIERENS et al., 2003). Neste sentido, indivíduos que residem próximo às áreas industriais que possuem incineradores acumulam mais dioxinas no soro do que os indivíduos que residem em áreas rurais (FIERENS et al., 2003). Leem e colaboradores (2003) relacionaram a presença de dioxinas em indivíduos que residem próximos à incineração de resíduos, com o aumento da concentração de MDA, desta forma promovendo aumento da lipoperoxidação. No presente estudo, não foi possível realizar as análises de dioxinas no sangue, impossibilitando a sua quantificação, por questões de ordem técnica e financeira. Apesar disso, se reconhece amplamente que as mesmas devem ter contribuído adicionalmente ao estabelecimento da condição de estresse oxidativo nos indivíduos direta e indiretamente expostos à incineração de RSSS.

Com relação ao tempo de exposição dos participantes do presente estudo, os indivíduos que residem nas proximidades do incinerador estão expostos às emissões há cerca de 5 anos, em média, enquanto os trabalhadores diretamente expostos há 3,4 anos, em média. Esta exposição é relativamente curta quando comparada a outros estudos, mas as dioxinas e os metais pesados são cumulativos, tanto no organismo quanto no meio ambiente, e ambos contaminantes aumentam os riscos de geração do estresse oxidativo e o desenvolvimento de doenças em relacionadas

em curto período de tempo (HAYS e AYLWARD, 2003). Por outro lado, a exposição por um longo tempo a xenobióticos induz o estresse oxidativo e doenças como neoplasias (ONG et al., 2002). Desta forma, o tempo de exposição é determinante, sendo que a exposição aguda geralmente promove o aumento do mecanismo de compensação das enzimas antioxidantes, enquanto que a exposição crônica pode ocasionar menor resposta do mecanismo enzimático de compensação antioxidante, (FLORA et al., 2008; GALHARDI et al., 2004; HARRIS e SHI, 2003; HATZIS et al., 2006; VALKO et al., 2006), ou até provocar uma resposta compensatória inadequada (WILHELM FILHO et al., 2001).

Para avaliação da genotoxicidade, no presente estudo foi realizada a análise do Teste Cometa (TC), onde se avaliou o índice e a frequência de dano ao DNA nas células leucocitárias dos indivíduos. Os resultados mostraram que não houve diferenças significativas nos grupos expostos em relação ao grupo controle (Quadro 2).

Observou-se neste trabalho que a concentração de TBARS no plasma aumentou, tanto nos indivíduos residentes como nos trabalhadores, em comparação ao grupo controle, antes da intervenção com vitaminas C e E (vide Quadro sinóptico 2). Conforme mencionado acima, estudo em trabalhadores e residentes que vivem próximos a um incinerador municipal de resíduos na Coréia do Sul mostrou valores elevados de MDA no sangue dos residentes em relação aos valores encontrados em trabalhadores do incinerador de lixo doméstico e industrial (LEEM et al., 2003). Recente estudo de Liu e colaboradores (2008) também observou aumento da concentração de MDA no plasma de trabalhadores de três incineradores de resíduos domésticos e industriais em Taiwan. Dalal e colaboradores (1995) observaram lipoperoxidação aumentada pela exposição ao pó do carvão em mineradores da extração de ferro. Adicionalmente, em outro estudo, a exposição crônica de mineradores mostrou persistência de elevadas concentrações de MDA plasmático e diminuiu a atividade da SOD e GPx (ALTIN et al., 2004). Resultados similares também foram encontrados por Pinho e colaboradores (2004), que igualmente mostraram aumento da concentração de TBARS plasmático em ratos, após 60 dias de exposição a MP relacionado ao pó de carvão. Estudo de Zhang e Huang (2002) realizado em cultura de células expostas ao pó do carvão, verificou que o ferro é capaz de gerar lipoperoxidação em comparação a células não expostas. O ferro

contido em MP pode levar à formação de radical hidroxil e causar dano no DNA, proteínas e lipídios (FUBINI e HUBBARD, 2003).

No presente estudo, após a suplementação vitamínica os valores de TBARS apresentaram-se semelhantes àqueles do grupo controle, provavelmente devido ao aporte exógeno destes antioxidantes nutricionais. Semelhantemente, nos outros dois trabalhos de nosso grupo de pesquisa, Ávila Júnior e colaboradores (2009) constataram aumento da concentração de TBARS em indivíduos que trabalham na extração de carvão de superfície e também em residentes do entorno da atividade de mineração, quando comparados ao grupo controle. De modo análogo, em outro estudo realizado em trabalhadores e moradores que vivem próximos de uma termoeletrica no sul do estado de Santa Catarina, também apresentou valores elevados de TBARS em comparação ao grupo controle (POSSAMAI et al., *Inhalation Toxicology*, submetido à publicação). Após a suplementação vitamínica em ambos os estudos, verificou-se diminuição da concentração de TBARS no plasma de indivíduos expostos.

No presente trabalho, as análises da concentração de proteínas carboniladas (PC) no plasma mostraram aumento somente no grupo de indivíduos residentes, indicando o dano oxidativo em proteínas no sangue dos mesmos (Quadro 2). O excesso de proteínas carboniladas sugere que as proteínas foram alteradas provavelmente devido ao aumento da geração de ERO e do conseqüente quadro de estresse oxidativo sistêmico (ZWART et al., 1999). Pinho e colaboradores (2004; 2005), em estudo com ratos expostos ao pó do carvão, mostrou aumento concomitante da lipoperoxidação e carbonilação de proteínas nestes animais. Coerentemente, metais como o cobre, zinco, ferro e manganês catalizam o dano às proteínas formando proteínas carboniladas pelo excesso de ERO (FLORA et al., 2008; VALKO et al., 2006). Os aumentos constatados nestes metais e nos níveis de PC em indivíduos expostos aos diferentes MP indicam que o estresse oxidativo detectado estaria relacionado a esses parâmetros.

Após a suplementação antioxidante realizada no presente estudo, os valores de PC plasmáticos diminuíram, tanto nos indivíduos residentes quanto nos trabalhadores. Neste sentido, no grupo trabalhador após a suplementação, foi verificada uma forte correlação negativa entre as concentrações de proteína carbonilada e as concentrações de ferro ($r = -0,85$; $p < 0,01$) e de zinco ($r = -0,61$; $p < 0,01$). Deste modo, os dados sugerem que a menor carbonilação de proteínas

ocorreu provavelmente devido à diminuição da geração de ERO através do aporte exógeno da suplementação vitamínica. Possamai e colaboradores (Inhalation Toxicology, submetido à publicação) e Wilhelm Filho e colaboradores (Ecotoxicology, aceito para publicação – vide apêndice II) também encontraram respostas semelhantes nos níveis de PC, tanto em indivíduos residentes, como também em trabalhadores da mineração e queima do carvão, que exibiram concentrações elevadas de TBARS em comparação ao grupo controle, os quais, após a suplementação vitamínica, foram diminuídas também a valores semelhantes aos do grupo controle.

Na avaliação da concentração dos tióis protéicos (TP), o presente estudo encontrou valores diminuídos no plasma de indivíduos trabalhadores, em comparação ao grupo controle, antes da suplementação com vitamina C e E. Após a suplementação antioxidante, os valores aumentaram em comparação ao grupo controle, indicando a proteção gerada com a suplementação vitamínica. No grupo trabalhador após a suplementação, foi observada uma fraca correlação positiva entre a concentração dos tióis protéicos e a atividade da GPx ($r = 0,45$; $p < 0,05$), sugerindo uma ação sinérgica entre ambos antioxidantes. Os resultados relativos à oxidação de proteínas reforçam o conceito de que a suplementação com as vitaminas C e E nos indivíduos promoveu maior proteção contra a excessiva produção de ERO. De forma similar ao que já havia sido constatado para os níveis de lipoperoxidação e oxidação às proteínas, Possamai e colaboradores (Inhalation Toxicology, submetido à publicação) e Wilhelm Filho e colaboradores (Ecotoxicology, aceito para publicação – vide apêndice II), também encontraram respostas semelhantes em indivíduos residentes e trabalhadores da mineração e queima de carvão, os quais apresentaram aumento dessa concentração após a suplementação vitamínica, em comparação ao grupo controle.

No presente estudo verificou-se que a atividade da GPx foi diminuída, tanto no grupo residentes quanto no grupo trabalhadores, acompanhando o perfil da GSH, que foi depletada nestes indivíduos, em comparação aos pertencentes ao grupo controle (Quadro 2). Essa dupla diminuição provavelmente deve-se ao excesso de ERO produzidos no sangue, que levou ao maior consumo de GSH e conseqüentemente, à diminuição da atividade da GPx. Coerentemente, Evelo e colaboradores (1993) também observaram diminuição da concentração de GSH no sangue de mineradores com pneumoconiose, após longo tempo de exposição à

atividade mineração. Trabalhadores expostos ao MP de pó do cimento também apresentaram diminuição da concentração de GSH (Orman et al., 2005). Altin e colaboradores (2004) encontraram uma diminuição da atividade da GPx no plasma de mineradores, com e sem pneumoconiose, expostos cronicamente (nove anos) ao ambiente de minas de carvão, quando comparados com indivíduos saudáveis. Outros estudos, como de Nadif e colaboradores (2001) também encontraram atividade da GPx diminuída no sangue de mineradores ativos, em comparação com mineradores aposentados. Por outro lado, Armutcu e colaboradores (2007), encontraram aumento da atividade de GPx no tecido pulmonar de ratos expostos a uma semana no ambiente de mina de carvão, porém os valores diminuíram na segunda semana de exposição, caracterizando uma perda de resposta compensatória após exposição mais prolongada, de modo semelhante ao comportamento da SOD (vide abaixo). Aparentemente, em um curto período de exposição a xenobióticos a atividade da GPx tende a aumentar para promover a detoxificação do excesso de peróxido de hidrogênio, porém em uma exposição crônica ocorre a diminuição da atividade da GPx devido à menor concentração de GSH, tornando a quantidade de NADPH insuficiente para converter o excesso de GSSG em GSH (WILHELM FILHO et al., 2001). Adicionalmente, o aumento da concentração de GSSG verificado nos indivíduos expostos no presente estudo, reforça a condição de um quadro de estresse oxidativo apresentado nos grupos expostos (Quadro 2). No presente estudo, após a suplementação vitamínica, a atividade da GPx e a concentração de GSH foram restabelecidas, de modo análogo aos outros biomarcadores de estresse oxidativo já comentados acima, novamente reforçando que o aporte nutricional obtido na intervenção antioxidante promoveu maior proteção nos tecidos analisados e, conseqüentemente, menor geração de ERO. Resultados semelhantes da atividade da GPx e da concentração de GSH foram novamente encontrados no estudo em trabalhadores da queima de carvão e residentes que vivem ao entorno da queima, sendo que após a intervenção antioxidante os valores da GPx e do GSH foram restabelecidos (POSSAMAI et al., *Inhalation Toxicology*, submetido à publicação). No estudo em trabalhadores da extração de carvão e residentes foi observado que a concentração de GSH também foi restabelecida após a suplementação, no entanto, a atividade da GPx somente diminuiu nos mineradores que trabalham no subsolo e, que, após a suplementação,

houve um aumento da sua atividade (WILHELM FILHO et al., *Ecotoxicology*, aceito para publicação – vide apêndice II).

A atividade da GR não apresentou diferenças significativas entre os diferentes grupos analisados no presente estudo, antes da suplementação vitamínica (Quadro 2). Isso poderia ser consequência da intoxicação com metais pesados, em indivíduos que apresentaram níveis elevados na urina, como aqueles pertencentes aos grupos direta e indiretamente expostos à incineração de RSSS. Segundo Hatzies e colaboradores (2006), a presença de diferentes contaminantes no material particulado incluindo metais pesados, diminuiu *in vitro* a atividade da SOD, GPx e GR. Além disso, o excesso da concentração tecidual de metais, como o ferro, cobre, cromo e vanádio diminuiu a concentração de glutatona e tióis protéicos, ocasionando a lipoperoxidação, danos ao DNA, às proteínas e provendo alteração na homeostase do cálcio (STOHS e BAGCHI, 1995). Korashy e colaboradores (2008) também verificaram que níveis excessivos de cobre bloqueiam os grupos sulfidrilas de enzimas e também do tripeptídeo GSH. Todos esses efeitos supra mencionados contribuem para acentuar o quadro de insulto oxidativo no sangue de indivíduos expostos a xenobióticos, podendo inclusive impedir uma melhor resposta antioxidante. Após a suplementação realizada no presente estudo, a atividade da GR mostrou-se aumentada, tanto no grupo residente quanto no grupo trabalhadores da incineração em relação ao grupo controle, reforçando a inferência sobre a eficácia da intervenção antioxidante nos grupos expostos à incineração de RSSS, no sentido de reverter aquele quadro. No estudo realizado em mineradores e residentes da extração do carvão a atividade da GR permaneceu igualmente inalterada antes e após a intervenção antioxidante (WILHELM FILHO et al., *Ecotoxicology*, aceito para publicação – vide apêndice II). Por outro lado, no estudo envolvendo os trabalhadores da queima de carvão e residentes do entorno, foi observada diminuição da atividade da GR somente nos trabalhadores diretamente expostos à queima do carvão. Após a suplementação antioxidante, nos residentes (grupo indiretamente exposto), a atividade da GR aumentou e os demais grupos apresentaram valores semelhantes ao grupo controle, reforçando a proteção antioxidante através da conversão de GSSG em GSH (POSSAMAI et al., *Inhalation Toxicology*, submetido à publicação).

A catalase apresentou atividade aumentada apenas no grupo diretamente exposto, em comparação ao grupo controle, sugerindo um mecanismo de

compensação antioxidante contra as ERO, mais especificamente contra níveis aumentados de peróxido de hidrogênio (Quadro 2). Howard e colaboradores (1998) também observaram aumento da atividade da catalase em indivíduos expostos a ambientes de fumo de cigarros, e Armutcu e colaboradores (2007) observaram o aumento da atividade da catalase em plasma de ratos expostos por uma semana em ambiente de mina de carvão. No presente estudo, antes da suplementação antioxidante foi verificado no grupo residente uma correlação negativa entre a concentração de GSH e a atividade da catalase ($r = -0,54$; $p < 0,05$), reforçando a indicação de um quadro de estresse oxidativo. Após a suplementação vitamínica, não houve alteração nos valores da catalase em relação ao grupo controle. Adicionalmente, estudo paralelo desenvolvido em nosso laboratório, constatou aumento da atividade da catalase em trabalhadores de uma termoelétrica direta e indiretamente expostos à queima do carvão para geração de energia elétrica (POSSAMAI et al., *Inhalation Toxicology*, submetido à publicação). De modo similar, em outro estudo paralelo em trabalhadores de minas de carvão no município de Lauro Müller, também apresentaram valores elevados da atividade da catalase, tanto em mineradores de subsolo como aqueles que atuam na superfície (ÁVILA JÚNIOR et al., 2009). Em ambos os estudos, ou seja, tanto os trabalhadores que atuam na queima do carvão quanto aqueles da extração do carvão, após a suplementação antioxidante apresentaram valores da atividade da catalase semelhantes aos do grupo controle, indicando que, provavelmente, houve diminuição na geração de peróxido de hidrogênio no tecido analisado (WILHELM FILHO et al., *Ecotoxicology*, aceito para publicação – vide apêndice II; POSSAMAI et al., *Inhalation Toxicology*, submetido à publicação).

De modo similar, a atividade da SOD apresentou-se diminuída em indivíduos do grupo diretamente exposto, podendo levar à dificuldade de uma adequada dismutação do radical superóxido no sangue desses trabalhadores (Quadro 2). No grupo trabalhador antes da suplementação, foi observada uma correlação positiva entre as atividades diminuídas da SOD e GR ($r = 0,66$; $p < 0,01$), reforçando a constatação de um quadro de estresse oxidativo. A SOD, a GPx e a CAT constituem as primeiras linhas de defesa antioxidante contra a toxicidade das ERO, sendo que a indução destas enzimas está relacionada à exposição aguda, ou seja, de curto período de exposição (GALHARDI et al., 2004). Estas três enzimas se encontram em todos os organismos aeróbios em concentrações muito superiores aos seus

substratos (WILHELM FILHO et al., 2000), no sentido de mantê-los os mais baixos possíveis, para evitar a geração do radical hidroxil e suas conseqüências deletérias. Antes da suplementação antioxidante, os grupos residentes e trabalhadores apresentaram diminuição na concentração de GSH, na atividade da GPx e da SOD, sendo nesta última apenas no grupo trabalhador (Quadro 2). Apenas a atividade da catalase, no grupo trabalhador, apresentou-se elevada na tentativa de eliminar o excesso de peróxido de hidrogênio (Quadro 2). A GPx, assim como as enzimas antioxidantes, catalase e SOD, apresentam uma relação de interdependência entre si (FLORA et al., 2008; VALKO et al., 2006), aparentemente em todos grupos animais (WILHELM FILHO et al., 2000). Conforme a figura 4, a SOD converte o O_2^{\bullet} em H_2O_2 , a catalase converte o H_2O_2 a H_2O e O_2 , enquanto a GPx converte o H_2O_2 , ou outros hidroperóxidos, até H_2O , com oxidação da glutathiona reduzida (GSH) formando a glutathiona oxidada (GSSG) (BOVERIS e CHANCE et al., 1973). Os dados obtidos revelam que as defesas antioxidantes, que constituem a primeira linha de defesa, estão diminuídas em decorrência do excesso de ERO pela exposição a contaminantes atmosféricos nos grupos expostos. Após a suplementação antioxidante, a atividade da SOD aumentou em todos os grupos expostos em comparação ao grupo controle, sugerindo uma maior dismutação do radical superóxido (WILHELM FILHO et al., *Ecotoxicology*, aceito para publicação – vide apêndice II). Ainda, após a suplementação, foi observado nos grupos expostos, o aumento da atividade da SOD, a normalização da GPx, e, o aumento da concentração de GSH, combinado com a permanência do aumento da atividade da catalase (grupo trabalhador), ou seja, um importante aumento das defesas antioxidantes devido ao aporte nutricional, que diminuiu a injúria caracterizada pelo quadro de estresse oxidativo. Estudos em trabalhadores da queima e extração do carvão e seus respectivos grupos residentes (indivíduos em vivem ao entorno da atividade), apresentaram resultados convergentes quanto à atividade da SOD, antes e após a intervenção antioxidante (WILHELM FILHO et al., *Ecotoxicology*, aceito para publicação – vide apêndice II; POSSAMAI et al., *Inhalation Toxicology*, submetido à publicação).

No entanto, Schins e colaboradores (1997) observaram aumento da atividade da SOD no sangue de mineradores com pneumoconiose, em comparação com outros trabalhadores sem a doença. Armutcu e colaboradores (2007) também verificaram aumento da atividade da SOD em tecido pulmonar de ratos expostos

durante uma semana a ambiente de mina de carvão; no entanto, após a segunda semana de exposição, a atividade diminuiu, atingindo valores abaixo do grupo controle. Isto indica que exposições muito prolongadas tende a diminuir a resposta da SOD aos contaminantes atmosféricos caracterizando uma perda gradativa da compensação antioxidante.

Por outro lado, Altin e colaboradores (2004) verificaram uma progressiva perda das atividades da SOD e GPx no plasma de mineradores, que foi paralela aos danos pulmonares, avaliados através de tomografia de alta resolução. Conforme mencionado acima, o chumbo é capaz de inibir a atividade de enzimas, como a SOD e a GPx, que resultam na diminuição das defesas celulares antioxidantes, tornando a célula mais vulnerável ao ataque oxidativo (FLORA et al., 2008). Do mesmo modo, Hatzies e colaboradores (2006) também observaram que materiais particulados que contêm diversos agentes tóxicos, são capazes de inibir *in vitro* a atividade de importantes enzimas antioxidantes, como a SOD, a GPx e a GR.

Diferentemente do perfil das demais enzimas antioxidantes, a atividade da GST apresentou-se marcadamente aumentada, tanto no grupo dos trabalhadores como dos residentes (Quadro 2). Isso ocorreu provavelmente porque a GST é um biomarcador da presença de xenobiontes e importante componente das enzimas de fase II do processo de biotransformação de xenobiontes, onde a conjugação da GSH com os xenobióticos favorece a excreção dos produtos desta biotransformação (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). A principal rota de biotransformação de xenobiontes ocorre através da indução da fase I das enzimas da superfamília citocromo P450 (NIMS e LUBET, 1996). Korashy e El-Kadi (2006) observaram aumento da atividade da GST em células expostas a metais pesados como o mercúrio, chumbo e cobre. No entanto, em mineradores com pneumoconiose após longo tempo de exposição, foi observada uma diminuição da atividade da GST no sangue (EVELO et al., 1993). Desta forma, aparentemente a GST não é capaz de compensar o dano oxidativo decorrente de crônica exposição a diferentes contaminantes (WILHELM FILHO et al., 2001), o que poderia explicar aquela diminuição. Após a suplementação antioxidante a atividade da GST apresentou valores semelhantes ao grupo controle, novamente exibindo um comportamento similar aos demais biomarcadores de estresse oxidativo examinados neste trabalho. Novamente de acordo com os outros parâmetros analisados, resultados semelhantes da atividade da GST foram observados no sangue de trabalhadores da queima e

extração de carvão, assim como em seus respectivos grupos residentes em estudos paralelos (WILHELM FILHO et al., *Ecotoxicology*, aceito para publicação – vide apêndice II; POSSAMAI et al., *Inhalation Toxicology*, submetido à publicação).

Antes da intervenção vitamínica as concentrações de α -tocoferol mostraram-se diminuídas nos grupos de residentes e de trabalhadores, em comparação ao grupo controle (Quadro 2), sugerindo que a maior susceptibilidade a danos celulares poderia ser decorrente da menor concentração deste antioxidante exógeno naqueles indivíduos. O α -tocoferol atua interceptando o radical peróxil (RO_2^*), resultando na formação do radical tocoferoxil, que é regenerado até α -tocoferol pela vitamina C (BRIGELIUS-FLOHÉ, 2009). Além disso, a vitamina E, onde o α -tocoferol é o seu principal constituinte, pode atuar diretamente nas membranas celulares, impedindo que seja iniciado ou continuado o processo de lipoperoxidação (TRABER e ATKINSON, 2007; VILLACORTA et al., 2007; ZINGG, 2007).

A concentração de ácido ascórbico não foi avaliada neste estudo. No entanto, o uso da Vitamina C como antioxidante possui importante papel, especialmente como fornecedor de equivalentes redutores para os sistemas de detoxificação redox (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). A suplementação com vitamina C, combinada com a vitamina E, tem sido utilizada principalmente devido à ação sinérgica desses dois antioxidantes (BLOCK et al., 2008), sendo que a vitamina C e E protegem as membranas celulares contra a oxidação (HALLIWELL, 2009). Além disso, o uso de suplementação vitamínica em modelos animais, mostra a possível ação protetora da suplementação contra as ERO gerados pela exposição a metais pesados, sendo que a vitamina C poderia ainda atuar como um possível quelante do chumbo, mostrando uma ação similar ao EDTA (FLORA et al., 2008).

Após a suplementação com vitamina C e vitamina E, observou-se que a concentração de α -tocoferol apresentou-se elevada em relação ao grupo controle (Quadro 2). Esse aporte exógeno de vitamina promoveu uma diminuição do dano oxidativo (lipoperoxidação e carbonilação de proteínas) no sangue dos indivíduos expostos aos contaminantes atmosféricos oriundos da queima de RSSS. De forma semelhante, em estudos paralelos Possamai e colaboradores (*Inhalation Toxicology*, submetido à publicação) e Wilhelm Filho e colaboradores (*Ecotoxicology*, aceito para publicação – vide apêndice II), também observaram o aumento da concentração de α -tocoferol no sangue de trabalhadores expostos à queima e extração do carvão, respectivamente, após a intervenção antioxidante por período de 6 meses. De forma

análoga, Pinho e colaboradores (2005) mostraram uma diminuição do estresse oxidativo em ratos expostos ao pó do carvão, utilizando a N-acetilcisteína e a deferoxamina como antioxidantes suplementados.

Trabalhos recentes envolvendo análise da efetividade de doses vitamínicas em pacientes hipercolesterolêmicos mostraram que as doses mínimas de vitamina E foram de 800 mg/dia para compensar a produção de isoprostanos (ROBERTS II et al., 2007; ROBERTS II e TRABER, 2009), coerentemente com as doses utilizadas no presente estudo.

Sugere-se neste trabalho que um dos mecanismos decorrente do dano à exposição de MP incluindo emissões do processo de incineração de resíduos sólidos e do pó de carvão, que contém metais pesados, poderia estar relacionado à ativação de macrófagos e polimorfonucleares existentes no pulmão, liberando mediadores da resposta inflamatória, incluindo ERO (BARGAGLI et al., 2009; BECKER et al., 2002; TAO et al., 2003). Além disso, um pulmão inflamado está mais propenso a aumentar o dano oxidativo oriundo da maior exposição aos MP (BECKER et al., 2002; TAO et al., 2003), os quais contém variados contaminantes na sua composição (HATZIES et al., 2006). As partículas com diâmetro inferior a 1 µm podem atingir tecidos mais profundos, sendo absorvidas no pulmão. Na região alveolar, parte do material depositado é removida, principalmente pelos macrófagos, para o epitélio ciliado de bronquíolos de onde, pelo movimento mucociliar, atingem a faringe. Dessa forma, grande parte do MP introduzido pela via respiratória pode atingir a mucosa gastrointestinal, como consequência da deglutição do material removido até a faringe, sendo assim absorvido pelo organismo (De AZEVEDO e CHASIN, 2003).

Deve ser ressaltada que a detecção prévia de marcadores de estresse oxidativo em locais onde há incineração de resíduos sólidos poderia atenuar o risco relacionado às doenças ocupacionais crônicas, e que o uso de antioxidantes poderia diminuir a geração de estresse oxidativo inerente a esta exposição a xenobióticos, evitando ou atenuando diversos tipos de doenças relacionadas, incluindo câncer. Além disso, o uso adequado das normas regulamentares e o monitoramento da emissão de contaminantes de incineradores poderiam prevenir a inalação de xenobióticos proveniente da queima de seus resíduos. Diante do exposto, é possível recomendar a suplementação vitamínica para indivíduos expostos a materiais particulados, tais como trabalhadores da incineração de RSSS. Considerando os estudos paralelos com MP oriundo de trabalhadores da queima de carvão para

produção de energia (POSSAMAI et al., *Inhalation Toxicology*, submetido à publicação) como da extração de carvão (WILHELM FILHO et al., *Ecotoxicology*, aceito para publicação), esta recomendação poderia ser também estendida a estas outras atividades ocupacionais.

Quadro 1 - Representação dos resultados das análises dos metais pesados.

METAIS PESADOS	Residentes	Trabalhadores
Chumbo	↑↑	↑
Cobre	↑	↑↑
Ferro	VN	↑
Manganês	↓↓	↓↓
Zinco	↑↑	↑

↑ = aumento ($p < 0,05$); ↑↑ = aumento, sendo $p < 0,01$; ↓↓ = diminuição, sendo $p < 0,01$; VN = valores normais (similares ao grupo controle).

Quadro 2 - Representação dos resultados das análises dos biomarcadores.

BIOMARCADORES*	Residentes		Trabalhadores	
	PRÉ	PÓS	PRÉ	PÓS
TC	VN	NR	VN	NR
TBARS	↑↑	VN	↑↑	VN
PC	↑↑	↓	VN	↓↓
TP	VN	↑↑	↓	↑
GSH	↓↓	↑	↓↓	↑↑
GPx	↓↓	VN	↓↓	VN
GSSG	↑	NR	↑	NR
GR	VN	↑↑	VN	↑↑
CAT	VN	VN	↑↑	↑↑
SOD	VN	↑↑	↓	↑↑
GST	↑↑	VN	↑	VN
VE	↓↓	↑	↓↓	↑

↑ = aumento, sendo $p < 0,05$; ↑↑ = aumento, sendo $p < 0,01$; ↓ = diminuição, sendo $p < 0,05$; ↓↓ = diminuição ($p < 0,01$); VN = valores normais (similares ao grupo controle); NR = análise não realizada. *Abreviações: TC = teste cometa; TBARS = substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; PC = proteína carbonilada; TP = tióis protéicos; GSH = glutationa reduzida; GPx = glutationa peroxidase; GSSG = glutationa oxidada; GR = glutationa redutase; CAT = catalase; SOD = superóxido dismutase; GST = glutationa S-transferase; VE = vitamina E.

6 CONCLUSÕES

- A concentração de metais na urina como o chumbo, cobre, ferro e zinco, de indivíduos trabalhadores da incineração de RSSS e residentes apresentaram-se aumentadas em relação ao grupo controle, sendo que para o cobre, ferro e zinco os valores estavam acima da faixa de valores de referência da literatura pesquisada, caracterizando a intoxicação destes indivíduos por metais pesados;
- A exposição, tanto de indivíduos direta como indiretamente expostos aos MP originados da incineração de RSSS, alterou o perfil dos marcadores de estresse oxidativo (TBARS, PC e TP) e o *status* antioxidante (VE, GSH, GPx, GR, GST, CAT e SOD) do sangue, caracterizando um quadro de estresse oxidativo;
- A suplementação antioxidante com vitaminas C e E durante o período de 6 meses, atenuou significativamente este quadro de estresse oxidativo, aumentando o poder redutor do sangue, diminuindo os processos de lipoperoxidação e oxidação de proteínas, restabelecendo o *status* antioxidante neste tecido;
- Os resultados acima permitem recomendar o uso de suplementação antioxidante, no sentido de atenuar o quadro de estresse oxidativo resultante da contaminação associada à atividade ocupacional relacionada com o processo de incineração de RSSS;
- Considerando que o perfil do *status* antioxidante e da intoxicação por metais pesados foi muito semelhante àquele obtido junto a estudos similares executados paralelamente, em indivíduos expostos direta ou indiretamente aos MP originados tanto pela extração como pela queima de carvão, a recomendação do uso de suplementação antioxidante poderia igualmente abranger estas outras atividades ocupacionais.

7 PERSPECTIVAS

- Os resultados obtidos neste trabalho indicam possibilidades futuras de ampliar o uso de antioxidantes em trabalhadores expostos a contaminantes atmosféricos, avaliando a possibilidade de uso terapêutico da vitamina E e vitamina C em atividades ocupacionais congêneres;
- Suplementar um grupo controle e adicionar um grupo placebo em projetos similares no futuro;
- Realizar análises de dioxinas no sangue dos trabalhadores, a fim de identificar a presença destes agentes devido à exposição aos gases gerados pelo incinerador de RSSS;
- Desenvolver um programa de monitoramento ambiental fazendo uso de outros indicadores biológicos (plantas e animais de laboratório) para avaliar o impacto de medidas mitigadoras sobre geração de contaminantes relacionados com MP proveniente do incinerador;
- O presente instrumento poderá ser utilizado para alertar autoridades de fiscalização em saúde e meio ambiente do impacto da incineração de RSSS e demais atividades ocupacionais relacionadas com a exposição aos MP;
- Particularmente ao setor industrial, seria necessário melhorar o controle da geração de contaminantes atmosféricos, atuando no princípio da precaução e profilaxia, no sentido de reduzir os efeitos deletérios à saúde dos trabalhadores e moradores expostos aos MP;
- Os presentes resultados poderão servir de ferramenta para o gerenciamento e implementação de políticas públicas para o controle da poluição do ar em cidades expostas à contaminação por MP.

REFERÊNCIAS

ACGTH - American Conference of Governmental Industrial Hygienists. **2001 TLVs e BEIs**: limites de exposição (TLVs) para substâncias químicas e agentes físicos e índice biológicos de exposição (BEIs). Trad. Associação Brasileira de Higienistas Ocupacionais. São Paulo.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzimol.** v. 105, p. 121-126, 1984.

AKSENOV, M. Y., MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neurosci. Lett.** v. 302, p. 141-145, 2001.

ALTIN, R., ARMUTCU, F., KART, L. *et al.* Antioxidant response at early stages and low grades of simple coal worker's pneumoconiosis diagnosed by high resolution computed tomography. **Int. J. Hyg. Environ. Health** v. 207, p. 455-462, 2004.

AMES, B. N., SHIGENAGA, M. K., HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** v. 90, p. 7915-7922, 1993.

ANDERSON, H. R., PONCE DE LEON, A., BLAND, J. M. *et al.* Air pollution and daily mortality in London: 1987-92. **Br. Med. J.** v. 312, p. 665-669, 1996.

APOSTOLI, P. Criteria for the definition of reference values for toxic metals. **Sci. Total Environ.** v. 120, p. 23-37, 1992.

ARMUTCU, F., GUN, B. D., ALTIN, R. *et al.* Examination of lung toxicity, oxidant/antioxidant status and effect of erdosteine in rats kept in coal mine ambience. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** v. 24, p. 106-113, 2007.

ATSDR- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Toxicological Profile for Zinc**, Public Health Service - US Department of Health and Human Services, 2005. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/>>. Acesso em: 24 jun. 2009.

_____. **Toxicological Profile for Lead, Public Health Service** - US Department of Health and Human Services, 2007a. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/>>. Acesso em: 24 jun. 2009.

_____. **Priority List of Hazardous Substances**, 2007b. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/07list.html>>. Acesso em: 24 jun. 2009.

_____. **Toxicological Profile for Manganese, Public Health Service** - US Department of Health and Human Services, 2008. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/>>. Acesso em: 24 jun. 2009.

ÁVILA JÚNIOR, S., POSSAMAI, F. P., BUDNI, P. *et al.* Occupational airborne contamination in south Brazil: 1. Oxidative stress detected in the blood of coal miners. **Ecotoxicology** v. 18, p. 1150-1157, 2009.

- BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. **Am. J. Med.** v. 109, p. 33-44, 2000.
- BALLESTER, F., CORELLA, D., PEREZ-HOYOS, S. *et al.* Air pollution and mortality in Valencia, Spain: a study using the APHEA methodology. **J. Epidemiol. Community Health.** v. 50, p. 527-533, 1996.
- BANDERA, E. V., FREUDENHEIM, J. L., MARSHALL, J. R. *et al.* Diet and alcohol consumption and lung cancer risk in the New York State Cohort (United States). **Cancer Causes Control.** v. 8, p. 828-840, 1997.
- BÁNHEGYI, G., BRAUN, L., CSALA, M., PUSKÁS, F., MANDL, J. Ascorbate metabolism and its regulation in animals. **Free Radic. Biol. Med.** v. 23, p. 793-803, 1997.
- BARCELOUX, D. G. Zinc. **J. Toxicol. Clin. Toxicol.** v. 37, n.2, p. 279-292, 1999.
- BARGAGLI, E., OLIVIERI, C., BENNETT, D. *et al.* Oxidative stress in the pathogenesis of diffuse lung diseases: A review. **Respir. Med.** Em impressão, 2009.
- BECKER, S., SOUKUP, J. M., GALLAGHER, J. E. Differential particulate air pollution induced oxidant stress in human granulocytes, monocytes and alveolar macrophages. **Toxicol In Vitro.** v. 16, p. 209-218, 2002.
- BECKMAN, K. B., AMES, B. N. Oxidative decay of DNA. **J. Biol. Chem.** v. 272, n. 32, p. 19633-19636, 1997.
- BENEŠ, B., SPĚVÁČKOVÁ, V., ŠMÍD, J. *et al.* Determination of normal concentration levels of Cd, Pb, Hg, Cu, Zn and Se in urine of the population in the Czech Republic. **Cent. Eur. J. public. Health** v. 10, n. 1-2, p. 3-5, 2002.
- BEUTLER, E., DURON, O., KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **J. Lab. Clin. Med.** v. 61, p. 882-890, 1963.
- BIRD, R. P., DRAPER, A. H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. **Methods Enzymol.** v 90, p.105-110, 1984.
- BLOCK, G., JENSEN, C. D., MORROW, J. D. *et al.* The effect of vitamins C and E on biomarkers of oxidative stress depends on baseline level. **Free Radic. Biol. Med.** v. 45, p. 377-384, 2008.
- BLOKHINA, O., VIROLAINEN, E., FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Ann. Bot.** v. 91, p. 179-194, 2003.
- BLUMBERG, J. B., FREI, B. Why clinical trials of vitamin E and cardiovascular diseases may be fatally flawed. Comentary on "The relationship between dose of vitamin E and suppression of oxidative stress in humans". **Free Radic. Biol. Med.** v. 43, p. 1374-1376, 2007.

BOCCA, B., ALIMONTI, A., SENOFONTE, O. *et al.* Metal changes in CSF and peripheral compartments of parkinsonian patients. **J. Neurol. Sci.** v. 248, p. 23-30, 2006.

BOVERIS, A., CADENAS, E. Production of superoxide dismutase radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. In: OBERLEY, L.W. **Superoxide dismutase**, CRC:Boca Raton, v. 2, p. 159-168, 1982.

BOVERIS, A., CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide – General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochem. J.** v. 134, p. 707-716, 1973.

BRAGA, A. L. F., PEREIRA, L. A. A., PROCÓPIO, M. *et al.* Associação entre poluição atmosférica e doenças respiratórias e cardiovasculares na cidade de Itabira, Minas Gerais, Brasil. **Cad. Saúde Pú.** v. 23, n. 4, p. 570-578, 2007.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. **Resolução nº 5, de 15 de junho de 1988**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/>>. Acesso em: 01 jun. 2009.

_____. Ministério do Trabalho – Secretaria de Segurança e Saúde no Trabalho. **Portaria nº 24, de 29 de dezembro de 1994**. Disponível em: <<http://www.mte.gov.br/legislacao/>>. Acesso em: 24 jun. 2009.

_____. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. **Resolução nº 316, de 29 de outubro de 2002**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/>>. Acesso em: 01 jun. 2009.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Resolução RDC nº 306, de 7 de dezembro de 2004**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis/index.htm>>. Acesso em: 01 jun. 2009.

_____. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. **Resolução nº 358, de 29 de abril de 2005**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/>>. Acesso em: 01 jun. 2009.

_____. Ministério da Saúde. **Saúde Brasil 2006: Uma análise da desigualdade em saúde**. Brasília, Ministério da Saúde, 2006.

BREMMER, I. Manifestations of copper excess. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 67, p. 1069-1073, 1998.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Vitamin E: The shrew waiting to be tamed. **Free Radic. Biol. Med.** v. 46, p. 543-554, 2009.

BROOK, R. D., FRANKLIN, B., CASCIO, W. *et al.* Air pollution and cardiovascular disease - A statement for healthcare professionals from the expert panel on population and prevention science of the American Heart Association. **Circulation.** v. 109, p. 2655-2671, 2004.

- BURTIS, C. A., ASHWOOD, E. R. Tietz Fundamentos de Química Clínica. In: Milne, D. B. **Oligoelementos**, 4 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 469-480, 1998.
- BURTON, G. W., TRABER, M. G., ACUFF, R. V. *et al.* Human plasma and tissue α -tocopherol concentrations in response to supplementation with deuterated natural and synthetic vitamin E. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 67, p. 669-684, 1998.
- CALBERG, I., MANNERVIK, B. Glutathione reductase from rat liver. **Methods Enzymol.** v. 113, p. 484-490, 1985.
- CASTRO, H. A., GOUVEIA, N., ESCAMILLA-CEJUDO, J. A. Questões metodológicas para a investigação dos efeitos da poluição do ar na saúde. **Rev. Bras. Epidemiol.** v. 6, n. 2, 2003.
- CELIK, M., DONBAK, L., UNAL, F. *et al.* Cytogenetic damage in workers from a coal-fired power plant. **Mutat. Res.** v. 627, n. 2, p. 158-163, 2007.
- CHANCE, B., OSHINO, N., SUGANO, T. *et al.* Basic principles of tissue oxygen determination from mitochondrial signals. **Adv. Exp. Med. Biol.** v. 37A, p. 277-292, 1973.
- CHEN, H. L., HSU, C. Y., HUNG, D. Z. *et al.* Lipid peroxidation and antioxidants status in workers exposed to PCDD/Fs of metal recovery plants. **Sci. Total Environ.** v. 372, p. 12-19, 2006.
- COHEN, A., POPE, C., SPEIZER, F. Ambient air pollution as a risk factor for lung cancer. **Salud Pública Méx.** v. 39, p. 346-355, 1997.
- DALAL, N. S., NEWMAN, J., PACK, D. *et al.* Hydroxyl radical generation by coal mine dust: possible implication to coal workers' pneumoconiosis (CWP). **Free Radic. Biol. Med.** v. 18, p. 11-20, 1995.
- DATASUS – **Caderno de Informações de Saúde**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/cadernos/cadernosmap.htm>>. Acesso em: 09 jun. 2009.
- De AZEVEDO, F. A., CHASIN, A. A. M. **Metais - Gerenciamento da Toxicidade**. São Paulo, Ed. Atheneu, 2003.
- DICKINSON, D. A., FORMAN, H. J. Cellular glutathione and thiols metabolism. **Biochem. Pharmacol.** v. 64, p. 1019-1026, 2002.
- DONBAK, L., RENCUZOGULLARI, E., YAVUZ, A. *et al.* The genotoxic risk of underground coal miners from Turkey. **Mutat. Res.** v. 588, n. 2, p. 82-87, 2005.
- DRI. **Dietary Reference Intakes**: for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids, 2000. Disponível em: <<http://www.nap.edu/>>. Acesso em: 31 maio 2009.

DYE, J. A., ADLER, K. B., RICHARDS, J. H. *et al.* Epithelial injury induced by exposure to residual oil fly-ash particles: role of reactive oxygen species. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.** v. 17, p. 625-633, 1997.

EVELO, C. T., BOS, R. P., BORM, P. J. Decreased glutathione content and glutathione S-transferase activity in red blood cells of coal miners with early stages of pneumoconiosis. **Br. J. Ind. Med.** v. 50, n. 7, p. 633-636, 1993.

FARIAS, M. S. **Avaliação da intervenção nutricional com vitaminas E e C, e o mineral zinco no estresse oxidativo de pacientes com hepatite C em tratamento com interferon associado à ribavirina.** Dissertação. (Mestrado em Farmácia). Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

FATMA - Fundação do Meio Ambiente do Estado de Santa Catarina. **Processo de Licenciamento Ambiental da empresa de incineração de RSSS - Laguna, 2005.**

FIERENS, S., MAIRESSE, H., HERMANS, C. *et al.* Dioxin accumulation in residents around incinerators. **J. Toxicol. Environ. Health A.** v. 66, n. 14, p. 1287-1293, 2003.

FLAGG, E.W., COATES, R.J., GREENBERG, R.S. Epidemiologic studies of antioxidants and cancer in humans. **J. Am. Coll. Nutr.** v. 14, p. 419-427, 1995.

FLOHÉ, L., GUNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol.** v. 105, p. 114-121, 1984.

FLORA, S. J. S., MITTAL, M., MEHTA, A. Heavy metal induced oxidative stress and its possible reversal by chelation therapy. **Indian J. Med. Res.** v. 128, p. 501-523, 2008.

FORTE, G., BOCCA, B., SENOFONTE, O. *et al.* Trace and major elements in whole blood, serum, cerebrospinal fluid and urine of patients with Parkinson's disease. **J. Neural. Transm.** v. 111, p. 1031-1040, 2004.

FREITAS, C., BREMNER, S. A., GOUVEIA, N. *et al.* Internações e óbitos e sua relação com a poluição atmosférica em São Paulo, 1993 a 1997. **Rev. Saúde Públ.** v. 38, n. 6, p. 751-757, 2004.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **J. Exp. Biol.** v. 201, p. 1203-1209, 1998.

FUBINI, B., HUBBARD, A. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. **Free Radic. Biol. Med.** v. 34, p. 1507-1516, 2003.

GAETKE, L. M., CHOW, C. K. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. **Toxicology** v. 189, n. 1-2, p. 147-163, 2003.

GALHARDI, C. M., DINIZ, Y. S., FAINE, L. A. *et al.* Toxicity of copper intake: lipid profile, oxidative stress and susceptibility to renal dysfunction. **Food Chem. Toxicol.** v. 42, p. 2053-2060, 2004.

GARCÍA-LORENZO, M. L., MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, M. L., PÉREZ-SIRVENT, C. *et al.* Ecotoxicological evaluation for the screening of areas polluted by mining activities. **Ecotoxicology**. Em impressão, 2009.

GAZIANO, J. M., GLYNN, R. J., CHRISTEN, W. G. *et al.* Vitamins E and C in the prevention of prostate and total cancer in men. **JAMA** v. 301, n. 1, p. 52-62, 2009.

GHIO, A. J., SILBAJORIS, R., CARSON, J. L. *et al.* Biologic effects of oil fly ash. **Environ. Health Perspect.** v. 110, p. 89-94, 2002.

GRIENDLING, K. K., FITZGERALD, G. A. Oxidative stress and cardiovascular injury, Part I: Basic mechanisms and *in vivo* monitoring of ROS. **Circulation.** v. 108, p. 1912-1916, 2003.

GUSTAVSSON, P. Mortality among workers at a municipal waste incinerator. **Am. J. Ind. Med.** v. 15, p. 245-253, 1989.

HABIG, W. H., PABST, M. J., JACOBY, W. B. Glutathione-S-transferase: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J. Biol. Chem.** v. 249, p. 7130-7139, 1976.

HALLIWELL, B. The wanderings of a free radical. **Free Radic. Biol. Med.** v. 46, p. 531-542, 2009.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine.** 4th ed., New York, Oxford University Press, 2007.

HARRIS, G. K., SHI, X. Signaling by carcinogenic metals and metal-induced reactive oxygen species. **Mutat. Res.** v. 533, p. 183-200, 2003.

HATZIS, C., GODLESKI, J. J., GONZÁLEZ-FLECHA, B. *et al.* Ambient particulate matter exhibits direct inhibitory effects on oxidative stress enzymes. **Environ. Sci. Technol.** v. 40, p. 2805-2811, 2006.

HAYS, S. M., AYLWARD, L. L. Dioxin risks in perspective: past, present, and future. **Regul. Toxicol. Pharmacol.** v. 37, p. 202-217, 2003.

HOWARD, D. J., OTA, R. B., BRIGGS, L. A. *et al.* Oxidative stress induced by environmental tobacco smoke in the workplace is mitigated by antioxidant supplementation. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.** v. 7, p. 981-988, 1998.

IREGREN, A. Manganese neurotoxicity in industrial exposures: proof of effects, critical exposure level, and sensitive tests. **Neurotoxicology.** v. 20, n. 2-3, p. 315-323, 1999.

IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry. Sample collection guidelines for trace elements in blood and urine. **Pure Appl. Chem.** v. 67 n. 8/9, p. 1575-1608, 1995.

IYENGAR, V., WOLTTIEZ, J. Trace elements in human clinical specimens: evaluation of literature data to identify reference values. **Clin. Chem.** v. 34, n. 3, p. 474-481, 1988.

JIALAL, I., FULLER, C. J., HUET, B. A. The effect of tocopherol supplementation in LDL oxidation. A dose-response study. **Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.** v. 15, p. 190-198, 1995.

JOHN, S., KALE, M., RATHORE, N. *et al.* Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. **J. Nutr. Biochem.** v. 12, p. 500-504, 2001.

JOSEPHY, P. D. **Molecular Toxicology**. Oxford: Oxford University Press, 1997.

JUNGER, W. L., PONCE DE LEON, A. Poluição do ar e baixo peso ao nascer no Município do Rio de Janeiro, Brasil, 2002. **Cad. Saúde Púb.** v. 23, n. 4, p. 588-598, 2007.

KAKKAR, P., JAFFERY, F. N. Biological markers for metal toxicity. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** v. 19, p. 335-349, 2005.

KAPPUS, H., DIPLOCK, A. T. Tolerance and safety of vitamin E: a toxicological position report. **Free Radic. Biol. Med.** v. 13, p. 55-74, 1992.

KELLY, F. J. Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects. **Occup. Environ. Med.** v. 60, p. 612-616, 2003.

KIM, M. K., OH, S., LEE, J. H. *et al.* Evaluation of biological monitoring markers using genomic and proteomic analysis for automobile emission inspectors and waste incinerating workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons or 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxins. **Exp. Mol. Med.** v. 36, n. 5, p. 396-410, 2004a.

KIM, J. Y., MUKHERJEE, S., NGO, L. *et al.* Urinary 8-hydroxy-2-deoxyguanosine as a biomarker of oxidative DNA damage in workers exposure to fine particulates. **Environ. Health Perspect.** v. 112, n. 6, p. 666-671, 2004b.

KLIMIS-TAVANTZIS, D. J., KLIMIS-ZACAS, D. **Manganese in health and disease**. CRC Press, 1994.

KORASHY, H. M., EL-KADI, A. O. S. The role of aryl hydrocarbon receptor and the reactive oxygen species in the modulation of glutathione transferase by heavy metals in murine hepatoma cell lines. **Chem. Biol. Interact.** v. 162, p. 237-248, 2006.

KORASHY, H. M., EL-KADI, A. O. S. The role of redox-sensitive transcription factors NF- κ B and AP-1 in the modulation of the Cyp1a1 gene by mercury, lead, and copper. **Free Radic. Biol. Med.** v. 44, p. 795-806, 2008.

- KOUTSILIERI, E., SCHELLER, C., TRIBL, F. *et al.* Degeneration of neuronal cells due to oxidative stress - microglial contribution. **Parkinsonism Relat. Disord.** v. 8, p. 401-406, 2002.
- KUMAGAI, S., KODA, S., ODA, H. Exposure evaluation of dioxins in municipal waste incinerator workers. **Ind. Health.** v. 41, p. 167-174, 2003.
- KUO, J. H., TSENG, H. H., RAO, P. S. *et al.* The prospect and development of incinerators for municipal solid waste treatment and characteristics of their pollutants in Taiwan. **Appl. Therm. Eng.** v. 28, p. 2305-2314, 2008
- LAWRENCE, B. P., MEYER, M., REED, D. J. *et al.* Role of glutathione and reactive oxygen intermediates in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced immune suppression in C57Bl/6 mice. **Toxicol. Sci.** v. 52, p. 50-60, 1999.
- LEEM, J. H., HONG, Y. C., LEE, K. H. *et al.* Health survey on workers and residents near the municipal waste and industrial waste incinerators in Korea. **Ind. Health.** v. 41, p. 181-188, 2003.
- LEFER, D. J., GRANGER, D. N. Oxidative stress and cardiac disease. **Am. J. Med.** v. 109, p. 315-323, 2000.
- LEVINE, R. L., GARLAND, D., OLIVER, C. N. *et al.* Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol.** v. 186, p. 464-478, 1990.
- LI, N., XIA, T., NEL, A.E. The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles. **Free Radic. Biol. Med.** v. 44, p. 1689-1699, 2008.
- LIDSKY, T. I., SCHNEIDER, J. S. Lead neurotoxicity in children: basic mechanisms and clinical correlates. **Brain.** v. 126, p. 5-19, 2003.
- LIU, H. H., SHIH, T. S., CHEN, I. J. *et al.* Lipid peroxidation and oxidative status compared in workers at a bottom ash recovery plant and fly ash treatment plants. **J. Occup. Health.** v. 50, p. 492-497, 2008.
- LOHMAN, T. G., ROCHE, A. F., MARTORELL, R. **Anthropometric Standardization Reference Manual.** Human Kinetics Books. Illinois, 1998.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, A. L., RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** v. 193, p. 265-275, 1951.
- MA, H. W., LAI, Y. L., CHAN, C. C. Transfer of dioxin risk between nine major municipal waste incinerators in Taiwan. **Environ. Int.** v. 28, p. 103-110, 2002.
- MAÇAO, L. B., WILHELM FILHO, D., PEDROSA, R. C. *et al.* Antioxidant therapy attenuates oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chaga's disease. **Int. J. Cardiol.** v. 123, p. 43-49, 2007.

MACIEL, A. A., GÓES, C. D., CÂNCIO, J. A. *et al.* Indicadores de Vigilância Ambiental em Saúde. **Informe Epidemiol. SUS**. v. 8, n. 3, p. 59-66, 1999.

MALUF, S. W., ERDTMANN, B. Follow-up study of the genetic damage in lymphocytes of pharmacist and nurses handling antineoplastic drugs evaluated by citokinesis-block micronuclei analysis and single cell gel electrophoresis assay. **Mutat. Res.** v. 471, p. 21-27, 2000.

MINOIA, C., SABBIONI, E., APOSTOLI, P. *et al.* Trace element reference values in tissues from inhabitants of the European Community 1. A study of 46 elements in urine, blood and serum of Italian subjects. **Sci. Total Environ.** v. 95, p. 89-105, 1990.

MISRA, H. P., FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J. Biol. Chem.** v. 247, p. 188-192, 1972.

MONTEIRO, M. A., FURTADO, S. M. A. O clima do trecho Florianópolis – Porto Alegre: uma abordagem dinâmica. **Geosul**. v. 19/20, p. 117-133, 1995.

NADIF, R., ORYSZCZYN, M. P., FRADIER-DUSCH, M. *et al.* Cross sectional and longitudinal study on selenium, glutathione peroxidase, smoking, and occupational exposure in coal miners. **Occup. Environ. Med.** v. 58, p. 239-245, 2001.

NATHENS, A. V., NEFF, M. J., JURKOVICH, G. J. Randomized, prospective trial of antioxidant supplementation in critically ill surgical patients. **Ann. Surg.** v. 236, n. 6, p. 814-822, 2002.

NICOLETTI, G., CRESCIBENE, L., SCORNAIENCHI, M. *et al.* Plasma levels of vitamin E in Parkinson's disease. **Arch. Gerontol. Geriat.** v. 33, p. 7-12, 2001.

NIMS, R. W., LUBET, R. A. The CYP2B subfamily. In: Ioannides C (ed), **Cytochromes P450: Metabolic and toxicological aspects**. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 135-160, 1996.

NIOSH - The National Institute for Occupational Safety and Health. **Manual of Analytical Methods (NMAM)**, 4th ed., 1994. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/NIOSH/>>. Acesso em: 24 jun. 2009.

OCKÉ, M.C., BUENO DE MESQUITA, H. B., FESKENS, E. J. *et al.* Repeated measurements of vegetables, fruits, beta-carotene and vitamins C and E in relation to lung cancer. **Am. J. Epidemiol.** v. 145, p. 358, 1997.

OHASHI, F., FUKUI, Y., TAKADA, S. *et al.* Reference values for cobalt, copper, manganese, and nickel in urine among women of the general population in Japan. **Int. Arch. Occup. Environ. Health** v. 80, p. 117-126, 2006.

OLIE, K., ADDINK, R., SCHOONENBOOM, M. Metals as catalysts during the formation and decomposition of chlorinated dioxins and furans in incineration processes. **J. Air & Waste Manage. Assoc.** v. 48, p. 101-105, 1998.

ONG, C. N., SHEN, H. M., CHIA, S. E. Biomarkers for male reproductive health hazards: are they available? **Toxicol. Lett.** v. 134, p. 17-30, 2002.

ORMAN, A., KAHRAMAN, A., CAKAR, H. *et al.* Plasma malondialdehyde and erythrocyte levels in workers with cement dust-exposure silicoses. **Toxicology.** v. 207, p. 15-20, 2005.

PALACE, V. P., KHAPER, N., QIN, Q. *et al.* Antioxidant potentials of vitamin a and carotenoids and their relevance to heart disease. **Free Radic. Biol. Med.** v. 26, p. 746-761, 1999.

PEDROSA, R. C., DE BEM, A. F., LOCATELLI, C. *et al.* Time-dependent oxidative stress caused by benzimidazole. **Redox Rep.** v. 6, n. 4, p. 265-270, 2001.

PINHO, R. A., BONATTO, F., ANDRADES, M. *et al.* Lung oxidative response after acute coal dust exposure. **Environ. Res.** v. 96, p. 290-297, 2004.

PINHO, R. A., SILVEIRA, P. C. L., SILVA, L. A. *et al.* N-Acetylcysteine and deferoxamine reduce pulmonary oxidative stress and inflammation in rats after coal dust exposure. **Environ. Res.** v. 99, p. 355-360, 2005.

POPE, C. A. 3rd, THUN, M. J., NAMBOODIRI, M. M. *et al.* Particulate air pollutions as a predictor of mortality in a prospective study of U.S. adults. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** v. 151, p. 669-674, 1995.

POSSAMAI, F. P., ÁVILA JÚNIOR, S., BUDNI, P. *et al.* Occupational airborne contamination in South Brazil: 2. Oxidative stress detected in the blood of workers of incineration of hospital residues. **Ecotoxicology** v. 18, p. 1158-1164, 2009.

POSSAMAI, F. P., ÁVILA JÚNIOR, S., PARISOTTO, E. B. *et al.* Antioxidant intervention compensates oxidative stress in blood of subjects exposed to emissions from a coal electric-power plant in south Brazil. **Inhal. Toxicol.** (submetido à publicação).

POSSAMAI, F. P., FORTUNATO, J. J., FEIER, G. *et al.* Oxidative stress after acute and sub-chronic malathion intoxication in Wistar rats. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** v. 23, p. 198-204, 2007.

PRYOR, W. A. Vitamin E and heart disease: Basic science to clinical intervention trials. **Free Radic. Biol. Med.** v. 28, p. 141-164, 2000.

RAABE, O. G. Respiratory exposure to air pollutants. In: Swift D. L., Foster, W. M. editors. **Air pollutants and the respiratory.** New York: Marcel Dekker, 1999 (Lung Biology in Health and Disease, v. 128).

REIS, M. F., SAMPAIO, C., BRANTES, A. *et al.* Human exposure to heavy metals in the vicinity of Portuguese solid waste incinerators – Part 1: Biomonitoring of Pb, Cd and Hg in blood of the general population. **Int. J. Hyg. Environ. Health.** v. 210, p. 439-446, 2007.

- RIBEIRO, C. M. **Efeito do tratamento do benzonidazol e da terapia antioxidante na cardiopatia chagásica crônica**. Dissertação. (Mestrado em Farmácia). Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.
- RIDDLES, P. W., BLAKELEY, R. L., ZERNER, B. Reassessment of Ellman's reagent, **Methods Enzymol.** v. 91, p. 49-60, 1983.
- RITTER, C., ANDRADES, M. E., REINKE, A. *et al.* Treatment with N-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves survival in sepsis. **Crit. Care Med.** v. 32, n. 2, p. 342-349, 2004.
- ROBERTS II, L. J., OATES, J. A., LINTON, M. F. *et al.* The relationship between dose of vitamin E and suppression of oxidative stress in humans. **Free Radic. Biol. Med.** v. 43, p. 1388-1393, 2007.
- ROBERTS II, L. J., TRABER, M. G. Vitamins E and C in the prevention of cardiovascular disease and cancer in men. **Free Radic. Biol. Med.** v. 46, p. 1558, 2009.
- RODRIGUEZ-ARIZA, A., TORIBIO, F., LÓPEZ-BAREA, J. Rapid determination of glutathione status in fish liver using high-performance liquid chromatography and electrochemical detection. **J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.** v. 656, n. 2, p. 311-318, 1994.
- ROMIEU, I., LUGO, M., VELASCO, S. *et al.* Air pollution and school absenteeism among children in Mexico City. **Am. J. Epidemiol.** v. 136, p. 1524-1531, 1992.
- SAGARA, Y., DARGUSCH, R., CHAMBERS, D. *et al.* Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress. **Free Radic. Biol. Med.** v. 24, n. 9, p. 1375-1389, 1998.
- SALES, R. L., SILVA, M. M. S., COSTA, N. M. B. *et al.* Desenvolvimento de um inquérito para avaliação da ingestão alimentar de grupos populacionais. **Rev. Nutr.** v. 19, n. 5, p. 539-552, 2006.
- SANTOS, E. S., ABREU, M. M., NABAIS, C. *et al.* Trace elements and activity of antioxidative enzymes in *Cistus ladanifer* L. growing on an abandoned mine area. **Ecotoxicology**. Em impressão, 2009.
- SCHINS, R. P. F., KEMAN, S., BORM, P. J. A. Blood antioxidant status in coal dust induced respiratory disorders: a longitudinal evaluation of multiple biomarkers. **Biomarkers** v. 2, p. 45-50, 1997.
- SCHNEIDER, V. E., RÊGO, R. C. E., CALDART, V. *et al.* **Manual de gerenciamento de resíduos sólidos de serviço de saúde**. São Paulo: CLR Balieiro, 2001.
- SESSO, H. D., BURING, J. E., CHRISTEN, W. G. *et al.* Vitamins E and C in the prevention of cardiovascular disease in men. **JAMA** v. 300, p. 2123-2133, 2008.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radic. Biol. Med.** v. 27, p. 916-921, 1999.

SIES, H. Oxidative stress: introductory remarks. In: SIES, H. **Oxidative Stress**, Ed. Academic press, USA, p. 1-7, 1985.

SLEZAK, B. P., HATCH, G. E., DEVITO, M. J. *et al.* Oxidative stress in female B6C3F1 mice following acute and subchronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). **Toxicol. Sci.** v. 54, p. 390-398, 2000.

SMITH, A. G., CLOTHIER, B., ROBINSON, S. *et al.* Interaction between iron metabolism and 2,3,7,8-p-dioxin in mice with variants of the Ahr gene: a hepatic oxidative mechanism. **Mol. Pharmacol.** v. 53, p. 52-61, 1998.

SOVOCOL, G. W., MITCHUM, R. K., TONDEUR, Y. *et al.* Bromo- and bromochloro-polynuclear aromatic hydrocarbons, dioxins and dibenzofurans in municipal incinerator fly ash. **Biomed. Environ. Mass Spectrom.** v. 15, p. 669-676, 1988.

STACHON, E., PINHEIRO, A. Quantificação de resíduos perigosos em serviços de saúde. **Rev.San. Amb.** v. 112, p. 38-43, 2005.

STOHS, S. J., BAGCHI, D., 1995. Mechanisms in the toxicity of metal ions. **Free Radic. Biol. Med.** v. 18, n. 2, p. 321-336, 1995.

TAO, F., GONZALEZ-FLECHA, B., KOBZIK, L. Reactive oxygen species in pulmonary inflammation by ambient particulates. **Free Radic. Biol. Med.** v. 35, n. 4, p. 327-340, 2003.

TORRES, M. A., TESTA, C. P., GASPARI, C. *et al.* Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. **Mar. Pollut. Bull.** v. 44, p. 923-932, 2002.

TORRES, R. L., TORRES, I. L. S., GAMARO, G. D. *et al.* Lipid peroxidation and total radical-trapping potential of the lungs of rats submitted to chronic and sub-chronic stress. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 37, p. 185-192, 2004.

TOYOKUNI, S. Iron-induced carcinogenesis: the role of redox regulation. **Free Radic. Biol. Med.** v. 20, p. 553-566, 1996.

TRABER, M. G., ATKINSON, J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. **Free Radic. Biol. Med.** v. 43, p. 4-15, 2007.

TSALEV, D. L., ZAPRIANOV, Z. K. **Atomic absorption spectrometry in occupational and environmental health practice**, 2nd ed., CRC Press: Boca Raton, 1985, vol. I.

URSO, M. L., CLARKSON, P. M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology** v. 189, p. 41-54, 2003.

USA - Environmental Protection Agency. **Exposure and human health reassessment of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related compounds**. Parte III, Washington, 2000. Disponível em: <<http://www.epa.gov/ncea>>. Acesso em: 17 jun. 2008.

VALKO, M., RHODES, C. J., MONCOL, J. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem. Biol. Interac.** v. 160, p. 1-40, 2006.

VALLE, C. E. **Qualidade ambiental: o desafio de ser competitivo projetando o meio ambiente (como se preparar para as normas ISO 14.000)**. São Paulo: Pioneira, 1995.

VICTOR, V. M., DE LA FUENTE, M. Immune cells redox state from mice with endotoxin-induced oxidative stress. Involvement of NF- κ B. **Free Radic. Res.** v. 37, n. 1, p. 19-27, 2003.

VILLACORTA, L., AZZI, A., ZINGG, J. M. Regulatory role of vitamins E and C on extracellular matrix components of the vascular system. **Mol. Aspects Med.** v. 28, p. 507-537, 2007.

VILLELA, I. V., LAU, A., SILVEIRA, J. et al. Bioensaios para o monitoramento de genotoxicidade ambiental. In: SILVA, J., ERDTMANN, B., HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

VINEIS, P., HUSGAFVEL-PURSIANEN, K. Air pollution and cancer: biomarker studies in human populations. **Carcinogenesis**. v. 26, p. 1846-1855, 2005.

XIAO, G. G., WANG, M., LI, N. et al. Use of proteomics to demonstrate a hierarchical oxidative stress response to diesel exhaust particle chemicals in a macrophage cell line. **J. Biol. Chem.** v. 278, p. 50781-50790, 2003.

YONG, L. C., BROWN, C. C., SCHATZKIN, A. et al. Intake of vitamins E, C and A and risk of lung cancer. The NHANES I epidemiologic followup study. **Am. J. Epidemiol.** v. 146, p. 231, 1997.

YOSHIDA, R., OGAWA, Y. Oxidative stress induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: an application of oxidative stress markers to cancer risk assessment of dioxins. **Ind. Health.** v. 38, p. 5-4, 2000.

YOSHIDA, R., OGAWA, Y., MORI, I. et al. Associations between oxidative stress levels and total duration of engagement in jobs with exposure to fly ash among workers at municipal solid waste incinerators. **Mutagenesis**. v. 18, n. 6, p. 533-537, 2003.

WANG, G., FOWLER, B. A. Roles of biomarkers in evaluating interactions among mixtures of lead, cadmium and arsenic. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v. 233, n. 1, p. 92-99, 2008.

WARD, D. J., AYRES, J. G., Particulate air pollution and panel studies in children: a systematic review. **Occup. Environ. Med.** v. 61, p. 4-13, 2004.

WELCH, K. D., DAVIS, T. Z., VAN EDEN, M. E. *et al.* Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. **Free Radic. Biol. Med.** v. 32, p. 577-583, 2002.

WILHELM FILHO, D., ÁVILA JÚNIOR, S., POSSAMAI, F. P. *et al.* Antioxidant therapy attenuates oxidative stress in the blood of subjects exposed to occupational airborne contamination from coal mining extraction and incineration of hospital residues. **Ecotoxicology** (aceito para publicação).

WILHELM FILHO, D., TORRES, M. A., MARCON, J. L. *et al.* Comparative antioxidant defenses in vertebrates - emphasis on fish and mammals. **Trends Comp. Biochem. Physiol.** v. 7, p. 33-45, 2000.

WILHELM FILHO, D., TORRES, M. A., TRIBESS, T. B. *et al.* Influence of season and pollution on the antioxidant defenses of the cichlid fish acará (*Geophagus brasiliensis*). **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 34, p. 719-726, 2001.

WILLIS, J. B. Determination of lead and other heavy metals in urine by atomic absorption spectroscopy. **Anal. Chem.** v. 34, n. 6, p. 614-617, 1962.

ZINGG, J. M. Vitamin E: An overview of major research directions. **Mol. Aspects Med.** v. 28, p. 400-422, 2007.

ZHANG, Q., HUANG, X. Induction of ferritin and lipid peroxidation by coal samples with different prevalence of coal workers' pneumoconiosis: role of iron in the coals. **Am. J. Ind. Med.** v. 42, p. 171-179, 2002.

ZWART, L. L., MEERMAN, J. H. N., COMMANDEUR, J. N. M. *et al.* Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. **Free Radic. Biol. Med.** v. 26, p. 202-226, 1999.

APÊNDICES

APÊNDICE I - MANUSCRITO 1

OCCUPATIONAL AIRBORNE CONTAMINATION IN SOUTH BRAZIL: 2. OXIDATIVE STRESS DETECTED IN THE BLOOD OF WORKERS OF INCINERATION OF HOSPITAL RESIDUES

Possamai, F. P.; Ávila Júnior, S.; Budni, P.; Backes, P.; Parisotto, E. B.; Rizelio, V. M.; Torres, M. A.; Colepicolo, P.; Wilhelm Filho, D.

Manuscrito publicado no periódico *ECOTOXICOLOGY*, fator de impacto=2,355 (JCR-2008). DOI 10.1007/s10646-009-0387-1.

Occupational airborne contamination in South Brazil: 2. Oxidative stress detected in the blood of workers of incineration of hospital residues

F. P. Possamai · S. Ávila Jr · P. Budni · P. Backes ·
 E. B. Parisotto · V. M. Rizelio · M. A. Torres ·
 P. Colepicolo · D. Wilhelm Filho

Accepted: 4 July 2009 / Published online: 22 July 2009
 © Springer Science+Business Media, LLC 2009

Abstract One of the most useful methods for elimination of solid residues of health services (SRHS) is incineration. However, it also provokes the emission of several hazardous air pollutants such as heavy metals, furans and dioxins, which produce reactive oxygen species and oxidative stress. The present study, which is parallel to an accompanied paper (Ávila Jr. et al., this issue), investigated several enzymatic and non-enzymatic biomarkers of oxidative stress in the blood (contents of vitamin E, lipoperoxidation = TBARS, reduced glutathione = GSH, oxidized glutathione = GSSG, and activities of glutathione *S*-transferase = GST, glutathione reductase = GR, glutathione peroxidase = GPx, catalase = CAT and superoxide dismutase = SOD), in three different groups ($n = 20$ each) exposed to airborne contamination associated with incineration of SRHS: workers directly (ca. 100 m from the incinerator) and indirectly exposed (residents living ca. 5 km the incineration site), and controls (non-exposed subjects). TBARS and GSSG levels were increased whilst GSH, TG and α -tocopherol contents were decreased in workers and residents compared to controls. Increased GST and CAT activities and decreased GPx activities were detected in exposed subjects compared to controls, while

GR did not show any difference among the groups. In conclusion, subjects directly or indirectly exposed to SRHS are facing an oxidative insult and health risk regarding fly ashes contamination from SRHS incineration.

Keywords Solid residues · Incineration · Airborne contaminants · Oxidative stress · Antioxidants

Introduction

Although some controversy (Kayajanian 2002; Cole et al. 2003) based on studies that showed no correlations between health hazard, especially carcinogenesis, and dioxin emissions from solid waste incineration (Deml et al. 1996; Evans et al. 2000; Gonzalez et al. 2000), chronic exposure to such contamination seems to represent risk to public health as well to the surrounding environment (Leem et al. 2003; Yoshida et al. 2003; Kuo et al. 2008). Incineration is considered the appropriate fate for SHRS, despite the fact that it generates atmospheric pollution, including heavy metals, polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofuranes (PCDFs), polyaromatic hydrocarbons (PAHs), acid gases, and other deleterious organic materials (Sovocool et al. 1988; Hong et al. 2000; Kuo et al. 2008).

Indeed, the soil, air and food near the incineration plants are contaminated with relatively high levels of dioxins and heavy metals, causing concern among the population living in such areas (Fierens et al. 2003; Augusto et al. 2004, 2007; Masuda et al. 2005; Huang et al. 2006). In addition, exposure to the emission from solid waste incinerators seems to be the main cause of oxidative stress measured both in vivo and in vitro (Yoshida and Ogawa 2000; Leem et al. 2003; Yoshida et al. 2003).

F. P. Possamai · S. Ávila Jr
 Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Universidade do
 Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil

P. Budni · P. Backes · E. B. Parisotto · V. M. Rizelio ·
 D. Wilhelm Filho (✉)
 Laboratório de Ecofisiologia Respiratória, Universidade Federal
 de Santa Catarina, Florianópolis, SC CEP 88040-900, Brazil
 e-mail: dawifi@ccb.ufsc.br

M. A. Torres · P. Colepicolo
 Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo,
 São Paulo, SP, Brazil

Exposure to certain metal species is associated with an increased risk of cancer (EPA 1981). Carcinogenic metals such as arsenic, chromium, nickel, beryllium, and cadmium elicit the production of reactive oxygen species (ROS) and consequently lipoperoxidation, DNA and protein damage (Halliwell and Gutteridge 1999; Hartwig et al. 2002; Hengstler et al. 2003). Therefore, biomarkers of oxidative stress are very useful tools to characterize environmental contamination (Torres et al. 2002) as well as to monitor human diseases (Halliwell and Gutteridge 1999). However, little information is currently available regarding ROS generation and oxidative insult related to the emission of solid waste incinerators (Yoshida and Ogawa 2000; Leem et al. 2003; Yoshida et al. 2003). In addition, as far as we know, no specific study on oxidative stress was already published regarding the incineration of solid residues of health services (SRHS).

The city of Capivari de Baixo is located in an area ca. 5 km from the SRHS incinerator, in which the main wind direction (northeast) prevails over the year favoring the exposure of fly ashes on this city. Not surprisingly, the most important cause of death in the year of 2002 in Capivari de Baixo is cancer (27.5%) followed by cardiovascular diseases (20.9%), numbers that contrast with other regions from Brazil, where circulatory diseases (31.5%) prevailed over undefined causes (17.9%) and tumors (15.3%) (DATASUS 2008).

Taken into account the above considerations, the present study was carried out to measure the levels of several oxidative stress biomarkers in the blood from incineration

workers (directly exposed) and subjects living near the incineration plant (indirectly exposed, residents from Capivari de Baixo), compared to non-exposed subjects (blood donors from a hospital localized far away from the incineration plant).

Materials and methods

Study area

Capivari de Baixo is localized in the south part of the Santa Catarina state, and possess around 20,000 thousand inhabitants. Most part of the year the wind flows from northeast in a relatively constant rate (Monteiro and Furtado 1995). The incinerator start to function in 1996, therefore the exposure of the subjects, both workers and residents, is at most 5 years. The incinerator is localized ca. 5 km northeast from Capivari de Baixo, and the pattern of the dominant wind (around 8 months a year) favors the exposure of residents of this city to the fly ashes derived from the incinerator (Fig. 1).

Subjects

Total number of subjects examined were 60 ($n = 20$ each group), consisted of age and sex-matched individuals who were divided in three different groups: directly exposed (workers; roughly 100 m away from the incinerator), indirectly exposed (residents; about 5 km from the

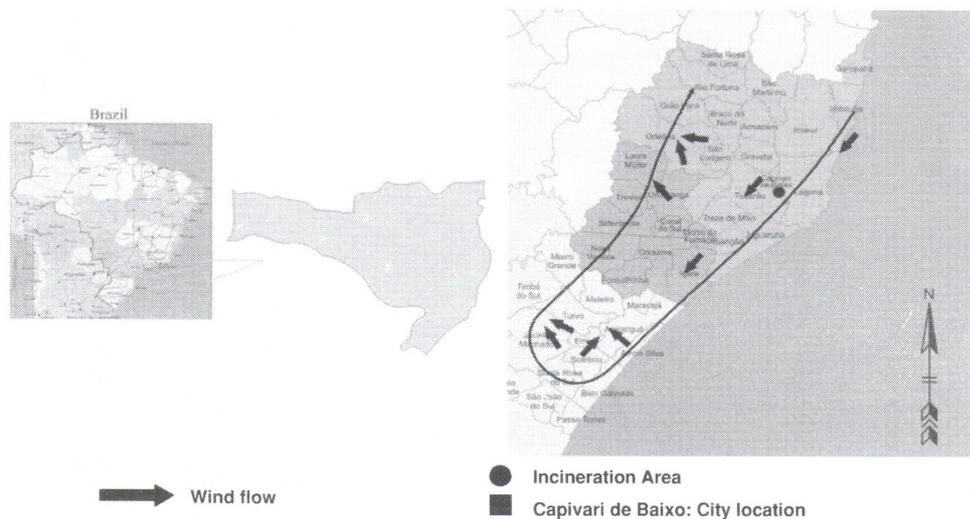


Fig. 1 Prevalent direction of the wind where the city of Capivari de Baixo (Residents) and the incinerator (Workers) are localized, south part of the state of SC, Brazil (adapted from Monteiro and Furtado 1995)

incinerator plant), and non-exposed subjects (controls) who were randomly selected from subjects recruited from a blood bank of the University Hospital (HU/UFSC), localized ca. 130 km northeast from the incineration plant. People living in Capivari de Baixo is exposed to airborne contaminants since the start of the incineration plant in 1996, while the workers directly exposed are so as long as they were employed and working at the incineration plant (in average 3.4 years) (Table 1).

The inclusion criteria for these groups included absence of any infectious disease such as hepatitis B and C virus, venereal disease research laboratory slide test (VDRL), human immunodeficiency virus (HIV), among others. Furthermore, subjects included in the control group could not have any previous contact with incineration activities. The diet of the subjects in the present study was considered poor regarding the more important nutritional antioxidants and therefore, the ingestion of vitamins C and E was considered negligible. None of them were using extra antioxidant supplementation. The nutritional profile of all subjects showed no significant differences among the different groups (Table 2). This study was approved by the Ethic Committee of the Universidade Federal de Santa Catarina (protocol number 366/2005).

Sample preparation and measurement of antioxidants

All the detailed procedures regarding sample preparation and the different assays for the analysis of the biomarkers of oxidative stress (contents of vitamin E, TBARS, GSH, GSSG, and the activities of GST, GR, GPx, CAT and

SOD), and also the statistics used are published elsewhere (Ávila Jr. et al., this issue).

Results and discussion

Municipal solid waste incinerators (MSWI) of different countries revealed a similar pattern of dioxin generation, implying that such airborne contaminants are produced through the same mechanism, regardless the composition of solid wastes and the incinerator design (Tong and Karasek 1986). Considering such similarity among MSWI regarding dioxin production, it is reasonable to assume that the incineration of SHRS probably behave in a similar way to validate comparisons between data from MSWI and SHRS. Nevertheless, the industrial incinerator seems to be more harmful compared to MSWI, because the dioxin contents and MDA (malondialdehyde, the major end-product of the lipoperoxidation process) contents in subjects living near an industrial waste incinerator were higher compared to subjects living near a MSWI (Leem et al. 2003). In addition, people living near an industrial area containing incinerators seem to accumulate more dioxin in their sera compared to subjects residing in a rural area from Belgium (Fierens et al. 2003). The late authors argued that such difference was probably related to the high consumption of animal fat from the people of the rural area, regardless the distance from the incinerator.

Materials included in fly ashes from SHRS, such as heavy metals, PCDDs, PCDFs and probably PAHs (Sovocool et al. 1988; Hong et al. 2000) are prone to accumulate, and accumulation will increase proportionally to the duration of the exposure to fly ashes both in subjects directly and also indirectly exposed, such as the population living near the incinerator (Yoshida et al. 2003). In this regard, residents from our study are exposed for around 5 years in average, whilst the workers are being exposed 3.4 years in average (Table 1). This exposure period to the incinerator is relatively short compared to other related studies, but considering the fact that dioxins are very persistent both in the environment and also in animal tissues (Hays and Aylward 2003), they consequently increases the risk of oxidative stress and the development of several diseases even during short exposure periods.

In the present study people directly and indirectly exposed to SHRS showed a similar oxidative stress profile, indicating a correlation between the exposure to the incineration of SRHS and the response obtained from different biomarkers of oxidative stress. Except GR activity (Fig. 2a), the other antioxidants here examined were altered both in residents and workers after exposure to SRHS (Figs. 2b–d, 3a–d). Interestingly, a very similar profile was obtained in an accompanied paper related to

Table 1 Demographic characteristics of subjects exposed to incinerator residues and control groups

Groups	Age (years)	IMC ²	Exposure (years)
Controls	33.1 ± 7.4	25.2 ± 2.6	–
Residents	37.1 ± 7.7	26.1 ± 3.3	4.9 ± 0.2
Workers	34.3 ± 13.7	25.2 ± 3.3	3.4 ± 1.6

Values are expressed as mean ± SE (*n* = 20 each group)

Table 2 Nutritional profile of subjects exposed to incinerator residues and control group

Groups	Fat meat	Milk	Green vegetables	Eggs
Controls	1.4 ± 0.7	1.7 ± 0.9	2.0 ± 0.8	1.6 ± 0.7
Residents	1.2 ± 1.0	1.6 ± 0.9	2.0 ± 0.7	1.2 ± 0.5
Workers	1.8 ± 0.5	1.5 ± 0.9	1.6 ± 0.9	1.8 ± 0.9

All values given as mean ± SE (*n* = 20 each group). 0 = no consume of foods; 1 = low consume of foods; 2 = medium consume of foods; 3 = high consume of foods

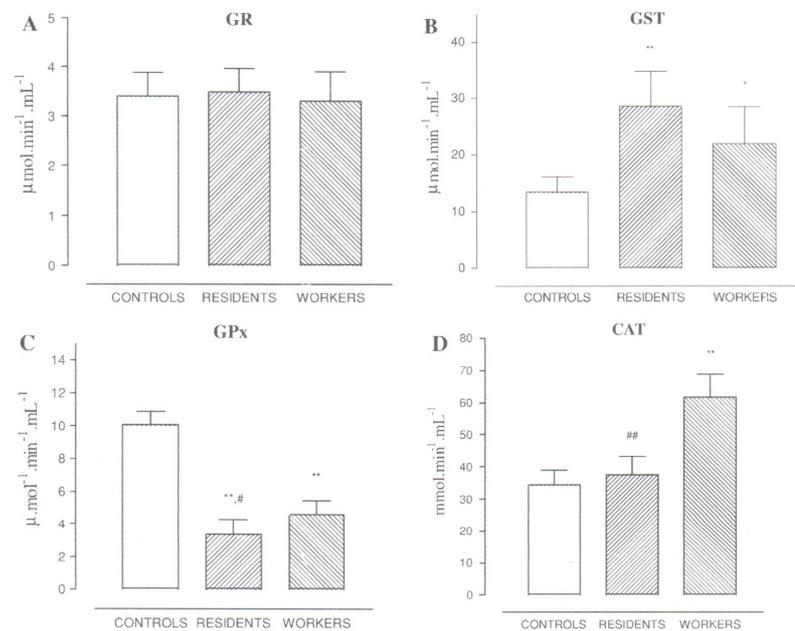


Fig. 2 **a** Glutathione reductase (*GR*) activities in the blood of subjects exposed to incineration residues and controls. Values are expressed as means \pm SE ($n = 20$). **b** Glutathione *S*-transferase (*GST*) activities ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$) in the blood of subjects exposed to incineration residues and controls. Values are expressed as means \pm SE ($n = 20$). ** $P < 0.01$ and * $P < 0.05$ in relation to controls. **c** Glutathione peroxidase (*GPx*) activities ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$) in the blood of subjects

exposed to incineration residues and controls. Values are expressed as means \pm SE ($n = 20$). ** $P < 0.01$ in relation to controls; # $P < 0.05$ comparing exposed groups. **d** Catalase (*CAT*) activities ($\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$) in the blood of subjects exposed to incineration residues and controls. Values are expressed as means \pm SE ($n = 20$). ** $P < 0.01$ in relation to controls; ## $P < 0.01$ comparing exposed groups

oxidative stress in mine workers from a mine area in South Brazil (Ávila Jr. et al., this issue). GST activity was increased and GPx was decreased in both exposed groups, whilst CAT activity was increased (Figs. 2b–d) and SOD activity was decreased only in workers (Fig. 3a). The contents of vitamin E and GSH were depleted and TBARS showed significantly increased values in the plasma of both workers and residents compared to the control group (Figs. 3b–d).

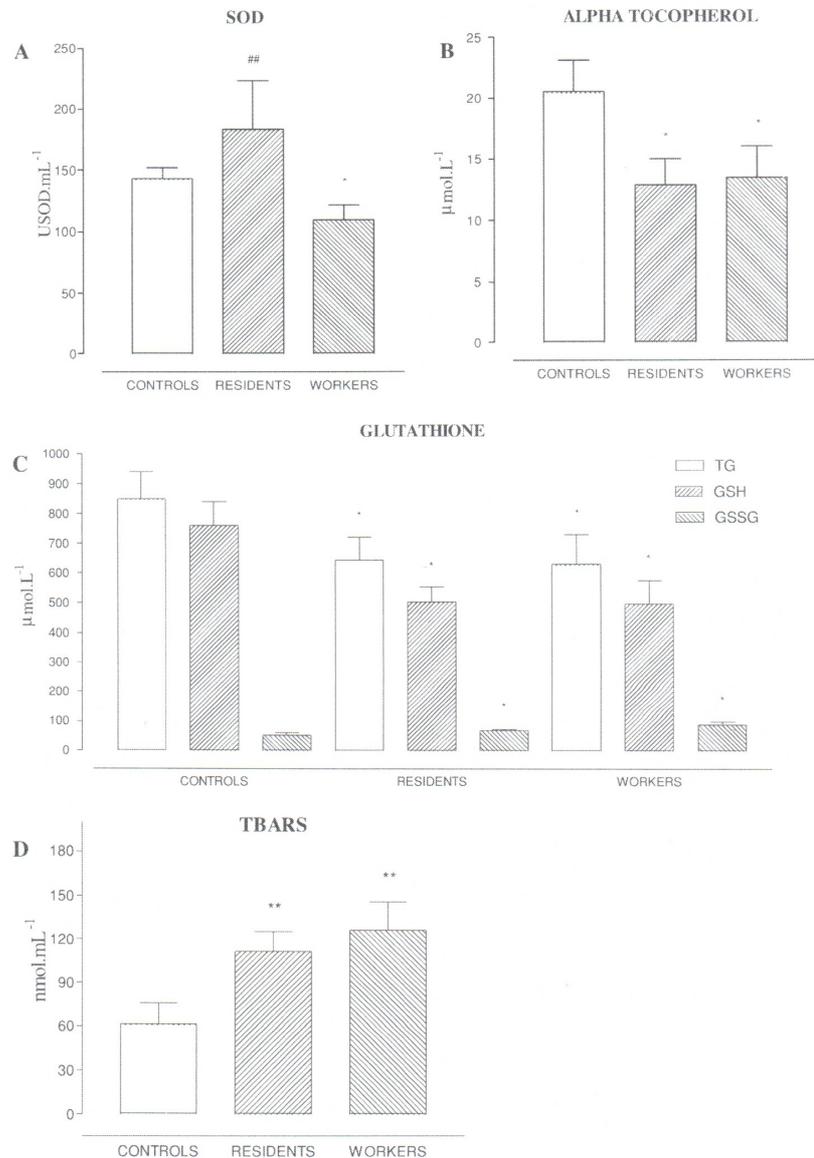
Dioxins are able to directly or indirectly generate ROS and to induce carcinogenesis, and the main route of ROS generation is probably via biotransformation of xenobiotics through the induction of the phase I super-family of CYP450 enzymes (Nims and Lubet 1996; Yoshida and Ogawa 2000). In this regard, GST activity was increased both in workers and residents. GST is an important component of phase II enzymes of the process of xenobiotic biotransformation, conjugating GSH to metabolites derived from the phase I thereby favoring their excretion (Halliwell and Gutteridge 1999). It is important to note that, despite the depletion of GSH in the two exposed groups, it seems that all these subjects are apparently able to compensate the

xenobiotic insult, keeping sustained high GST activities. A similar profile was obtained in residents and workers from a mine plant in South Brazil (Ávila Jr. et al., this issue).

Also, the enhanced TBARS contents found in the plasma of both groups exposed to SHRS are well in line with the results found in workers and residents exposed to mining activity (Ávila Jr. et al., this issue). Moreover, again a similar profile was obtained regarding the plasma contents of GSH and vitamin E in both groups in the two studies (Ávila Jr. et al., this issue). The depletion of these two non-enzymatic antioxidants together with the persistent high lipoperoxidation levels found in both studies strongly suggests a condition of severe oxidative insult in exposed subjects. In addition, the increase of GSSG levels in exposed subjects reinforces such stress condition, because the oxidized form of glutathione is an excellent biomarker of oxidative stress (Boveris and Cadenas 1997; Halliwell and Gutteridge 1999).

In a similar study, increased peroxidation (MDA levels) in workers and residents were also found, and the authors also suggested that the effect was related to hazardous substances such as PCCD/Fs emitted by the incinerator

Fig. 3 **a** Superoxide dismutase (SOD) activities (U SOD ml⁻¹) in the blood of subjects exposed to incineration residues and controls. Values are expressed as means \pm SE ($n = 20$). * $P < 0.05$ in relation to controls; ## $P < 0.01$ comparing exposed groups. **b** vitamin E (α -tocopherol) contents ($\mu\text{mol l}^{-1}$) in plasma of subjects exposed to incineration residues and controls. Values are expressed as means \pm SE ($n = 20$). * $P < 0.05$ in relation to controls. **c** Total, reduced and oxidized glutathione (TG, GSH and GSSG, respectively) contents in whole blood of subjects exposed to incineration residues and controls. Values are expressed as means \pm SE ($n = 20$). * $P < 0.05$ in relation to controls. **d** Lipoperoxidation (TBARS contents) in the plasma of subjects exposed to incineration residues and controls. Values are expressed as means \pm SE ($n = 20$). ** $P < 0.01$ in relation to controls



(Leem et al. 2003). Under long-term exposure, the oxidative damage may inhibit cell-mediated immunity, cause DNA damage, and induce the development of tumors (Ong et al. 2002).

Superoxide dismutase, GPx and CAT are the main enzymatic antioxidant defenses (Halliwell and Gutteridge 1999), and these defenses are generally up-regulated in acute or short-term oxidative stress. Surprisingly, while SOD activities were decreased, CAT activities were enhanced in SHRS workers, and the same response was

also obtained in workers exposed to mine ambience (Ávila Jr. et al., this issue). Interestingly, comparing such response to the influence of mining activity, rats exposed sub-chronically to mine ambience showed SOD and GPx induction at the first week followed by SOD inhibition at the fourth week of exposure (Armutcu et al. 2007). Accordingly, coal miners showed a progressive loss of an adequate antioxidant compensation regarding SOD and GPx activities in plasma (Altin et al. 2004). Taken all these data into consideration, it is possibly to suggest that

irrespective to the kind of airborne contamination, time of exposure is determinant, while acute exposure elicits an apparent antioxidant enzymatic compensation, chronic exposure seems to reflect some loss of such compensation.

Considering that the process of incineration is growing in many countries (Leem et al. 2003; Kuo et al. 2008), and despite that in the last two decades a decline in dioxin levels was detected in some countries (Hays and Aylward 2003; Fierens et al. 2003; Augusto et al. 2004), this industrial activity is still a matter of public concern. In this regard, an important increase in morbidity and mortality in the city of Capivari de Baixo occurred in 2002, the mortality numbers were closely related to tumors, different from data of the whole country where tumors are the third cause of mortality (DATASUS 2008).

The early detection of biochemical markers such as the oxidative stress biomarkers used in related studies involving the contamination of incineration of solid waste residues (Yoshida and Ogawa 2000), might attenuate the human risk of related occupational diseases. The use of appropriate guidelines to monitor the emission from incinerators, adequate equipment to prevent inhalation of fly ashes and other prophylactic procedures, and the better understanding of the relations between dioxin levels, ROS production, and related diseases, including carcinogenesis, are urgently needed. In addition, the value of an antioxidant supplementation to eventually attenuate the associated oxidative insult might also be of importance. This study is currently in course in our laboratory.

Conclusions

Incineration is one of the most useful methods to eliminate hospital residues in some countries, however this process usually expose people who work or live near the incinerator to airborne contamination, leading to tissue oxidative stress. Irrespective to the controversy involved with health risks related to dioxin exposure, in the present study we were able to demonstrate a severe oxidative insult in the blood not only of workers directly exposed, but also in residents near a SRHS incineration plant. Non-enzymatic antioxidants such as total and reduced glutathione were depleted whilst lipoperoxidation measured through TBARS levels were persistently enhanced in both exposed groups compared to controls. Some antioxidant enzymes were also modified, GPx showed decreased values whilst GST and CAT showed increased values in exposed subjects. The possible relationship that this oxidative stress could be connected with the numbers of cancer epidemiology in the region of Capivari de Baixo is here addressed. Local authorities should establish further studies on the risks involved with incineration emissions from SRHS and

propose urgent solutions in relation to a public health policy in the region regarding such environmental contamination.

Acknowledgments This research was supported by grants from CNPq/MCT-Brazil and UNESC-Brazil. DWF is a recipient of a CNPq scholarship (proc. 305018/2006-0). EBP, PB and RVM were recipients of PIBIC scholarships from CNPq (procs. 100195/2008-3; 116679/2005-0; 110774/2007-8, respectively).

References

- Altin R, Armutcu F, Kart L, Gurel A, Savranlar A, Özdemir H (2004) Antioxidant response at early stages and low grades of simple coal worker's pneumoconiosis diagnosed by high resolution computed tomography. *Int J Hyg Environ Health* 207:455–462
- Armutcu F, Gun BD, Altin R, Gurel A (2007) Examination of lung toxicity, oxidant/antioxidant status and effect of erdosteine in rats kept in coal mine ambience. *Environ Toxicol Pharmacol* 24(2):106–113
- Augusto S, Pinho P, Branquinho C, Pereira MJ, Soares A, Catarino F (2004) Atmospheric dioxin and furan deposition in relation to land-use and other pollutants: a survey with lichens. *J Atmos Chem* 49:53–65
- Augusto S, Pereira MJ, Soares A, Branquinho C (2007) The contribution of environmental biomonitoring with lichens to assess human exposure to dioxins. *Int J Hyg Environ Health* 210:433–438
- Ávila S Jr, Possamai FP, Budni P, Backes P, Parisotto EB, Rizelio VM, Torres MA, Colepicolo P, Wilhelm Filho D (this issue) Occupational airborne contamination in South Brazil: I. Oxidative stress detected in the blood of coal miners. *Ecotoxicology*. doi:10.1007/s10646-009-0364-8
- Boveris A, Cadenas E (1997) Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species. In: Clerck L, Massaro D (eds) *Oxygen, gene expression and cellular*, vol 105. Marcel Dekker, New York, pp 1–25
- Cole P, Trichopoulos D, Pastides H, Starr T, Mandel JS (2003) Dioxin and cancer: a critical review. *Reg Toxicol Pharmacol* 38:378–388
- DATASUS (2008) Caderno de Informações de Saúde. Available via DIALOG. <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/cadernos/cadernosmap.htm> of subordinate document. Accessed 15 May 2008
- Deml E, Mangelsdorf I, Greim H (1996) Chlorinated dibenzodioxins and dibenzofurans (PCDD/F) in blood and human milk of non occupationally exposed persons living in the vicinity of a municipal waste incinerator. *Chemosphere* 33(10):1941–1950
- EPA (1981) Health assessment document for cadmium. US Environmental Protection Agency, Washington, DC
- Evans RG, Shadel BN, Roberts DW, Clardy S, Jordan-Izaguirre D, Patterson DG, Needham LL (2000) Dioxin incinerator emissions exposure study Times Beach, Missouri. *Chemosphere* 40:1063–1074
- Fierens S, Mairesse H, Hermans C, Bernard A, Eppe G, Focant JF, Pauw ED (2003) Dioxin accumulation in residents around incinerators. *J Toxicol Environ Health A* 66(14):1287–1293
- Gonzalez CA, Kogevinas M, Gadea E, Huici A, Bosh A, Bleda MJ, Pápke O (2000) Biomonitoring study of people living near or working at a municipal solid-waste incinerator before and after two years of operation. *Arch Environ Health* 55(4):259–267
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1999) *Free radicals in biology and medicine*. Oxford, Oxford
- Hartwig A, Asmuss M, Ehleben I, Herzer U, Kostelac D, Pelzer A, Schwerdtle T, Burkle A (2002) Interference by toxic metal ions

- with DNA repair processes and cell cycle control: molecular mechanisms. *Environ Health Perspect* 110(5):797–799
- Hays SM, Aylward LL (2003) Dioxins risks in perspective: past, present, and future. *Reg Toxicol Pharmacol* 37:202–217
- Hengstler JG, Bolm-Audorff U, Faldum A, Janssen K, Reifenrath M, Gotte W, Jung D, Mayer-Popken O, Fuchs J, Gebhard S, Bienfait HG, Schlink K, Dietrich C, Faust D, Epe B, Oesch F (2003) Occupational exposure to heavy metals: DNA damage induction and DNA repair inhibition prove co-exposures to cadmium, cobalt and lead as more dangerous than hitherto expected. *Carcinogenesis* 24:63–73
- Hong KJ, Tokunaga S, Kajiuichi T (2000) Extraction of heavy metals from MSW incineration fly ashes by chelating agents. *J Hazard Mater* 75:57–73
- Huang HY, Jeng TY, Lin YC, Ma YC, Kuo CP, Sung FC (2006) Serum dioxin levels in residents living in the vicinity of municipal waste incinerators in Taiwan. *Arch Environ Occup Health* 61(3):115–121
- Kayajanian GM (2002) The J-shaped dioxin dose response curve. *Ecotoxicol Environ Saf* 51:1–4
- Kuo JH, Tseng HH, Rao PS, Wey MY (2008) The prospect and development of incinerators for municipal solid waste treatment and characteristics of their pollutants in Taiwan. *Appl Therm Eng* 28(17–18):2305–2314
- Leem JH, Hong YC, Lee KH, Kwon HJ, Chang YS, Jang JY (2003) Health survey on workers and residents near the municipal waste and industrial waste incinerators in Korea. *Ind Health* 41:181–188
- Masuda Y, Haraguchi K, Kono S, Tsuji H, Pöpke O (2005) Concentrations of dioxins and related compounds in the blood of Fukuoka residents. *Chemosphere* 58:329–344
- Monteiro MA, Furtado SMA (1995) O clima do trecho Florianópolis–Porto Alegre: uma abordagem dinâmica. *Geosul* 19(20):117–133
- Nims RW, Lubet RA (1996) The CYP2B subfamily. In: Ioannides C (ed) *Cytochromes P450: metabolic and toxicological aspects*. CRC, Boca Raton, pp 135–160
- Ong CN, Shen HM, Chia SE (2002) Biomarkers for male reproductive health hazards: are they available? *Toxicol Lett* 134:17–30
- Sovocool GW, Mitchum RK, Tondeur Y, Munslow WD, Vonnahme TL, Donnelly JR (1988) Bromo- and bromochloro-polynuclear aromatic hydrocarbons, dioxins and dibenzofurans in municipal incinerator fly ash. *Biomed Environ Mass Spectrom* 15:669–676
- Tong HY, Karasek FW (1986) Comparison of PCDF in fly ash collected from municipal incinerators of different countries. *Chemosphere* 15:9–12
- Torres M, Testa CP, Gaspari C, Masutti MB, Panitz CMN, Pedrosa RC, Almeida EA, Di Mascio P, Wilhelm Filho D (2002) Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. *Mar Poll Bull* 44:923–932
- Yoshida R, Ogawa Y (2000) Oxidative stress induced by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: an application of oxidative stress markers to cancer risk assessment of dioxins. *Ind Health* 38:5–14
- Yoshida R, Ogawa Y, Mori I, Nakata A, Wang R, Ueno S, Shioji I, Hisanaga N (2003) Associations between oxidative stress levels and total duration of engagement in jobs with exposure to fly ash among workers at municipal solid waste incinerators. *Mutagenesis* 18(6):533–537

APÊNDICE II - MANUSCRITO 2

ANTIOXIDANT THERAPY ATTENUATES OXIDATIVE STRESS IN THE BLOOD OF SUBJECTS EXPOSED TO OCCUPATIONAL AIRBORNE CONTAMINATION FROM COAL MINING EXTRACTION AND INCINERATION OF HOSPITAL RESIDUES

Wilhelm Filho, D.; Ávila Júnior, S.; Possamai, F. P.; Parisotto, E. B.; Moratelli, A. M.; Garlet, T. R.; Inácio, D. B.; Torres, M. A.; Colepicolo, P.; Dal-Pizzol, F.

Manuscrito aceito para publicação no periódico *ECOTOXICOLOGY*, fator de impacto=2,355 (*JCR-2008*). Número do manuscrito: ECTX 930.

Editorial Manager(tm) for Ecotoxicology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: ANTIOXIDANT THERAPY ATTENUATES OXIDATIVE STRESS IN THE BLOOD OF SUBJECTS EXPOSED TO OCCUPATIONAL AIRBORNE CONTAMINATION FROM COAL MINING EXTRACTION AND INCINERATION OF HOSPITAL RESIDUES

Article Type: Original Research Article

Keywords: Coal mining; incineration; airborne contamination; oxidative stress; antioxidant supplementation.

Corresponding Author: Professor Danilo Wilhelm Filho, Professor

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Santa Catarina

First Author: Danilo Wilhelm Filho, Professor

Order of Authors: Danilo Wilhelm Filho, Professor; Silvio Ávila Júnior, MSc.; Fabricio P Possamai, MSc.; Eduardo B Parisotto, Bch.; Ana M Moratelli, Bch.; Thais R Garlet, Bch.; Deborah B Inácio, Bch.; Moacir A Torres, PhD.; Pio Colepicolo, PhD; Felipe Dal-Pizzol, PhD

Abstract: Coal mining and incineration of solid residues of health services (SRHS) generate several contaminants that are delivered into the environment, such as heavy metals and dioxins. These xenobiotics can lead to oxidative stress overgeneration in organisms and cause different kinds of pathologies, including cancer. In the present study the concentrations of heavy metals such as lead, copper, iron, manganese and zinc in the urine, as well as several enzymatic and non-enzymatic biomarkers of oxidative stress in the blood (contents of lipoperoxidation=TBARS, protein carbonyls=PC, protein thiols=PT, α -tocopherol=AT, reduced glutathione=GSH, and the activities of glutathione S-transferase=GST, glutathione reductase=GR, glutathione peroxidase=GPx, catalase=CAT and superoxide dismutase=SOD), in the blood of six different groups (n=20 each) of subjects exposed to airborne contamination related to coal mining as well as incineration of solid residues of health services (SRHS) after vitamin E (800mg/day) and vitamin C (500mg/day) supplementation during six months, which were compared to the situation before the antioxidant intervention (Ávila Jr. et al.; Possamai et al. *Ecotoxicology*, in press). Except for the decreased manganese contents, heavy metal concentrations were elevated in all groups exposed to both sources of airborne contamination when compared to controls. TBARS and PC concentrations, which were elevated before the antioxidant intervention decreased after the antioxidant supplementation. Similarly, the contents of PC, AT and GSH, which were decreased before the antioxidant intervention, reached values near those found in controls, GPx activity was reestablished in underground miners, and SOD, CAT and GST activities were reestablished in all groups. The results showed that the oxidative stress condition detected previously to the antioxidant supplementation in both directly and indirectly subjects exposed to the airborne contamination from coal dusts and SRHS incineration, was attenuated after the antioxidant intervention.

**ANTIOXIDANT THERAPY ATTENUATES OXIDATIVE STRESS IN THE BLOOD OF
SUBJECTS EXPOSED TO OCCUPATIONAL AIRBORNE CONTAMINATION FROM COAL
MINING EXTRACTION AND INCINERATION OF HOSPITAL RESIDUES**

⁽¹⁾Wilhelm Filho, D.*; ⁽³⁾Ávila Júnior, S.; ⁽³⁾Possamai, F.P.; ⁽¹⁾Parisotto, E.B.; ⁽¹⁾Moratelli, A.M.; ⁽¹⁾Garlet,
T.R.; ⁽¹⁾Inácio, D.B.; ⁽²⁾Torres, M.A.; ⁽²⁾Colepicolo, P.; ⁽³⁾Dal-Pizzol, F.

⁽¹⁾*Lab. Ecofisiologia Respiratória, ECZ, CCB, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis;*

⁽²⁾*Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo, São Paulo;*

⁽³⁾*Lab. de Fisiopatologia Experimental, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil.*

*Correspondence: Prof. Danilo Wilhelm Filho - Laboratório de Ecofisiologia Respiratória, Universidade Federal de Santa Catarina, CEP 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil. Phone: +55 48 37216917. E-mail address: dawifi@ccb.ufsc.br

Abstract

Coal mining and incineration of solid residues of health services (SRHS) generate several contaminants that are delivered into the environment, such as heavy metals and dioxins. These xenobiotics can lead to oxidative stress overgeneration in organisms and cause different kinds of pathologies, including cancer. In the present study the concentrations of heavy metals such as lead, copper, iron, manganese and zinc in the urine, as well as several enzymatic and non-enzymatic biomarkers of oxidative stress in the blood (contents of lipoperoxidation=TBARS, protein carbonyls=PC, protein thiols=PT, α -tocopherol=AT, reduced glutathione=GSH, and the activities of glutathione S-transferase=GST, glutathione reductase=GR, glutathione peroxidase=GPx, catalase=CAT and superoxide dismutase=SOD), in the blood of six different groups (n=20 each) of subjects exposed to airborne contamination related to coal mining as well as incineration of solid residues of health services (SRHS) after vitamin E (800mg/day) and vitamin C (500mg/day) supplementation during six months, which were compared to the situation before the antioxidant intervention (Ávila Jr. et al.; Possamai et al. *Ecotoxicology*, in press). Except for the decreased manganese contents, heavy metal concentrations were elevated in all groups exposed to both sources of airborne contamination when compared to controls. TBARS and PC concentrations, which were elevated before the antioxidant intervention decreased after the antioxidant supplementation. Similarly, the contents of PC, AT and GSH, which were decreased before the antioxidant intervention, reached values near those found in controls, GPx activity was reestablished in underground miners, and SOD, CAT and GST activities were reestablished in all groups. The results showed that the oxidative stress condition detected previously to the antioxidant supplementation in both directly and indirectly subjects exposed to the airborne contamination from coal dusts and SRHS incineration, was attenuated after the antioxidant intervention.

Keywords: Coal mining; incineration; airborne contamination; oxidative stress; antioxidant supplementation.

Introduction

Environmental pollution of industrialized countries by non-essential heavy metals such as lead, cadmium and mercury, as well as by other metals such as zinc, copper, iron and the metalloid arsenic, is largely the consequence of industrial activities (Burbure et al. 2006). Although stringent measures and controls have been put into place during the last decades, high levels of these pollutants still persist in the air, as well as in aquatic environments, soils and sediments, and consequently in the food chain, with hazardous consequences related to chronic environmental exposure of the populations living in contaminated areas (Aslibekian et al. 2003; Burbure et al. 2006). In addition, several chemical substances from the environment or xenobiotics induce oxidative stress, such as the pesticide malathion (Possamai et al. 2007), different particulate air pollutants (Becker et al. 2002), and also heavy metals (Korashy and El-Kadi 2008).

Two important industrial processes are involved in the release of airborne contaminants in the state of Santa Catarina, South Brazil. On one hand, mining activity gives rise to environmental contamination by generating related wastes during the extraction, beneficiation, combustion, and processing of minerals (Schins and Borm 1999). On the other hand, incineration of solid residues of health services (SRHS) produces environmental contamination by heavy metals, dioxins, furans, poliaromatic hydrocarbons and other organic materials (Sovocool et al. 1988; Gonzalez et al. 2000; Yoshida et al. 2003). Heavy metals can be carcinogenic to humans and many of the toxic effects of metals might be modified by concurrent exposure to other metals (Harris and Shi 2003; Valko et al. 2006; Flora et al. 2008). Furthermore, excess occupational exposure to metals is considered to be a major cause of metal-related cancer (Steenland et al. 1996).

Occupational contamination related to coal mining extraction and SRHS incineration is capable to induce oxidative stress in the blood of subjects exposed to such activities, as well as in people indirectly exposed to airborne contamination derived from these activities, as detected recently by our research group in an accompanied study (Ávila Jr. et al.; Possamai et al.; *Ecotoxicology* in press).

The aim of the present study was to analyze the concentrations of heavy metals in the urine and the antioxidant profile in the blood of subjects directly or indirectly exposed to SRHS incineration and to mining activity after six months of antioxidant supplementation with vitamins E and C, compared to the profile obtained before such antioxidant intervention, in which biomarkers of oxidative stress were evaluated in the blood of the same subjects, using the same protocol of the present investigation.

Materials and Methods

In an accompanied papers by Avila Jr. and collaborators and by Possamai and collaborators (Ecotoxicology, in press), biomarkers of oxidative stress were evaluated in blood samples collected from subjects involved respectively, in the occupational activities of coal mining and of incineration of solid hospital residues. After the first sample collection of blood and urine from directly and indirectly exposed subjects involved in those studies, supplementation of vitamins C (500 mg per day) and vitamin E (800 mg per day) were administered to the same exposed subjects during a period of six months. At the end of six months of antioxidant supplementation, a second sample collection was performed and again the same oxidative stress biomarkers were evaluated to verify the possible beneficial effect of vitamins C and E supplementation. The studied population, exclusion and inclusion criteria, and assays related to other biomarkers of oxidative stress beside those mentioned below are described elsewhere (Ávila Jr. et al.; Ecotoxicology in press).

Oxidative protein damage by carbonilation was determined as described by Levine and collaborators (1994). Protein concentrations were determined by Lowry and collaborators (1951), using albumin as standard. Total protein thiol contents were determined in plasma using the Ellman's reagent (5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoic acid; DTNB), as described by Riddles and collaborators (1983). Results were normalized with protein levels also according to the method of Lowry and collaborators (1951). Reduced glutathione (GSH) was measured at 412 nm according to Beutler and collaborators (1963), using the Elmann's reagent (DTNB: 2-dithionitrobenzoic acid).

Determination of heavy metal contents were carried out in urine samples, which were maintained frozen until the analyses, and were collected together with the first blood samples, as mentioned above. Atomic mass spectroscopy was used according to the method of Willis (1962), and all values were expressed in $\mu\text{g L}^{-1}$. This study was approved by the local Ethic Committee (UFSC protocols numbers 366/2005 and 166/2007).

Statistical analyses

Results were expressed as mean values \pm standard error (SE). Differences between multiple groups were compared using One Way Analysis of Variance (ANOVA), using a post-hoc test of Dunnet. Minimal significance value was assumed at $p < 0.05$. All determinations were performed in duplicate, excepting TBARS measurements, which were performed in triplicate.

Results and Discussion

Lead concentrations in the urine of underground (159.0%) and surface mine workers (326.4%), and also in subjects living at the vicinity of the mines (151.4%; resident group) were higher compared to values found in controls (Table 1A). A similar profile for lead concentrations was found in the urine of workers of incineration of solid residues of health services (45.5%) and also in subjects from the resident group (98.6%) when compared to controls (Table 1B). Similarly, Reis and collaborators (2007) showed increased levels of Cd, Hg and Pb in subjects indirectly exposed to solid waste incineration in Portugal. According to Wang and Fowler (2008), chronic exposure to Pb, Cd and As induced oxidative stress by inhibition of important antioxidant enzymes, probably by an interactive effect in the active site of these enzymes. Also, the *in vitro* inhibition of GPx, SOD and GR were already demonstrated by Hatzis and collaborators (2006) after exposure to three different particulate materials. Epidemiologic studies have shown that chronic exposition to atmospheric contaminants, which includes heavy metals, are correlated to increased number of cancer cases, especially lung cancer (Sorensen et al. 2005).

Copper concentrations were also elevated in the urine of both exposed groups of coal extraction workers, surface and underground miners, as well as in the urine of subjects living near from mining plant (Table 1A). A similar profile regarding heavy metals in the urine was detected in workers exposed to SRHS incineration process when compared to controls, and also in subjects living near the incineration plant (Table 1B). Accumulation of this metal in humans increases ROS production such as hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide radical ($O_2^{\bullet-}$) and hydroxyl radical ($\bullet OH$), consequently causing oxidative stress that alters the cellular enzymatic system (Gaetke and Chow 2003; Korashy and El-Kadi 2008). In addition, *in vitro* studies have shown that a high copper cellular environment favor cancer cells to proliferate into tumors (Valko et al. 2006).

On the other hand, iron concentrations were significantly increased only in the blood of SRHS incineration workers but not in residents when compared to controls (Table 1B), while iron contents were elevated in the urine of coal mining workers (surface and underground), but not in the group of residents (Table 1A).

Enhanced zinc concentrations were also found in incineration workers (60.8%) and residents (87.9%) when compared to controls, however the contents found in the urine of coal mining workers were higher (270.3%; 303.8% surface and underground workers, respectively) (Table 1A-B). Chen and

collaborators (2006) observed a high oxidative stress in workers of a zinc recovery industrial plant as well as in workers of a secondary copper smelting plant in Taiwan.

Surprisingly, manganese showed decreased concentrations in the urine of all exposed groups, both mining workers and SRHS incineration workers compared to controls group (Table 1A-B). Apparently, no plausible explanation exists for such finding.

After the antioxidant supplementation with vitamins C and E essentially all biomarkers of oxidative stress were changed in the exposed groups here examined (Tables 2A-B), again indicating the efficacy of the protective effect of the antioxidant supplementation against the oxidative insult derived from the exposure to airborne contaminants related to mining activity and to SRHS incineration. Before the antioxidant supplementation, the concomitant enhancement of TBARS and protein carbonyl contents, together with the decrease found in the content of protein thiols, were all reversed after the antioxidant intervention in subjects from both activities (Tables 2A-B).

The decreased values found in TBARS and PC levels after supplementation are probably due to the quenching ability of the liposoluble antioxidant α -tocopherol, which acts blocking the propagation of lipoperoxidation in cell membranes (Halliwell and Gutteridge 1999). The interception of the peroxy radical (RO_2^{\cdot}) by α -tocopherol results in the formation of the tocopheroxyl radical, which is regenerated back to α -tocopherol by ascorbate, reduced glutathione or ubiquinol (Halliwell and Gutteridge 1999). In fact, ascorbate can act either directly in cellular membranes by blocking the beginning of the lipoperoxidation process, or indirectly by regeneration of tocopheroxyl radical to vitamin E (Traber and Atkinson 2007; Zingg 2007). In addition, vitamin C might act as a possible lead chelator showing a similar capacity of that of EDTA (Flora et al. 2008). In this regard, excess lipid oxidation induced by inflammatory processes causes massive DNA damage (Nair et al. 2007), and the use of antioxidants such as vitamin E succinate and ellagic acid in mice provided protection against oxidative damage by decreasing lipid peroxidation (Hassoun et al. 1997).

On the other hand, before supplementation, contents of protein thiols were decreased in both exposed groups compared to controls. After the antioxidant supplementation these values were apparently compensated, both in residents and workers of mine and SRHS incineration, when compared to controls (Table 2A-B), indicating a protective effect of the antioxidant intervention.

After vitamin supplementation the activities of most of the antioxidant enzymes were changed to values near those found in controls, irrespective of the occupational contamination. Before

supplementation, GR activity did not show any difference among the groups related to SRHS incineration, however after vitamin supplementation those activities were increased both in residents (53.2%) and workers (47.6%) when compared to controls (Table 3B). As found for the other biomarkers of oxidative stress used in the present study, these results reinforce the concept of efficiency of using exogenous antioxidants against oxidative stress promoted by airborne contaminants related to such occupational toxicity. Similar results were obtained in subjects exposed to environmental tobacco smoke in their workplace (Howard et al. 1998) measured by increased levels of lipid oxidation (TBARS) and by CAT and GPx activities, which were normalized after a two months period of antioxidant supplementation. Furthermore, Pinho and collaborators (2005) showed decreased pulmonary oxidative stress biomarkers in rats exposed to coal dust using N-acetylcysteine and deferoxamine as antioxidants. In this regard, the *in vitro* inhibition of GPx was already demonstrated by Hatzis and collaborators (2006) after exposure to three different particulate materials, i.e., fly ashes from residual oil combustion, urban particulate matter and volcanic particulate ashes.

After the antioxidant supplementation, remarkable increased SOD activities were detected in subjects exposed to coal mining extraction compared to the decreased values found before supplementation (Table 3A). An opposite response was found by Howard and collaborators (1998) after antioxidant supplementation in subjects exposed by environmental tobacco smoke. As already mentioned, exposure to PM and heavy metals induces oxidative stress by inhibition of important antioxidant enzymes (Hatzis et al. 2006; Wang and Fowler 2008), an effect that may explain the decreased SOD activities found in the group of residents near the mining areas and also in the group directly exposed to SRHS incineration, as well as the decreased GPx activity found in the group of residents and workers of SRHS incineration and in the group of underground mine workers (Tables 3A-B).

Before the antioxidant intervention GST activities increased in all groups when compared to controls (Table 3A-B). This enzyme is an important component of phase II of xenobiotic biotransformation/excretion process by conjugating the corresponding adducts with GSH (Halliwell and Guteridge 1999). After supplementation the profile of GST activities was similar to that of GPx activities (Table 3A-B). In this regard, Korashy and El-Kadi (2006) observed a concomitant increase of GST activity and depletion of GSH contents in cell cultures exposed to heavy metals that elicit oxidative stress.

In relation to non-enzymatic antioxidants, significant increased concentrations of plasma α -tocopherol and of whole blood GSH were detected in all groups after the antioxidant intervention,

confirming that the antioxidant supplementation was beneficial to recover the reductive power of the blood in all exposed groups (Tables 3A-B). A positive effect of antioxidant supplementation was already described in a related study (Pinho et al. 2005), which showed that supplementation with N-acetylcysteine in rats exposed to coal dust was able to counteract the increases found in TBARS and protein carbonyl contents, as well as the decreases found in the CAT and SOD activities in alveolar cells when compared to controls. Excepting the profile found for CAT activity, which was increased before the antioxidant intervention (Table 3A), the behavior of the other oxidative stress biomarkers confirmed the results found in the present study.

Despite that some reviews and meta-analyses studies point out that antioxidant interventions with ascorbate, β -carotene and α -tocopherol in different human diseases failed to show positive effects (e.g. Rice-Evans and Diplock 1993; Halliwell et al. 2005; Hercberg 2006; Block et al. 2008; Brigelius-Flohé, 2009; Halliwell, 2009), in the present study the antioxidant therapy with vitamins E and C was effective in attenuating the blood oxidative insult associated with exposure to coal mining extraction and SRHS incineration, and that such nutritional intervention might be recommended for subjects exposed to these airborne contaminations.

Interestingly, a recent report showed that doses above 400 IU of vitamin E are necessary to counteract elevated systemic oxidative stress in humans measured through isoprostanes in hypercholesterolemic patients (Roberts II et al. 2007). This antioxidant efficacy was already demonstrated by our research group in patients with cardiopathy associated with chronic Chaga's disease under the same protocol (Maçao et al. 2007; Ribeiro et al. 2009), as well in other diseases (e.g. Roberts II and Traber 2009).

Acknowledgements

This research was supported by grants from CNPq/MCT-Brazil and UNESC-Brazil. DWF is a recipient of a CNPq scholarship (proc. 305018/2006-0). EBP, AMM and DBI were recipients of PIBIC scholarships from CNPq (procs. 100195/2008-3; 113975/2008-2; 119304/2008-2, respectively).

References

Aslibekian O, Moles R (2003) Environmental risk assessment of metals contaminated soils at silver mines abandoned mine site, co tipperary, Ireland. *Environ Geochem Health* 25(2):247–266

Ávila Jr. S, Possamai FP, Budni P, Backes P, Parisotto EB, Rizelio VM, Torres MA, Colepicolo P, Wilhelm Filho D (2009) Occupational airborne contamination in south Brazil: 1. Oxidative stress detected in the blood of coal miners. *Ecotoxicology* (in press)

Becker S, Soukup JM, Gallagher JE (2002) Differential particulate air pollution induced oxidant stress in human granulocytes, monocytes and alveolar macrophages. *Toxicol In Vitro* 16:209–218

Beutler E, Duron O, Kelly BM (1963) Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 61:882–90

Block G, Jensen CD, Morrow JD, Holland N, Norkus E, Milne GL, Hudes M, Dalvi TB, Crawford PB, Fung EB, Schumacher L, Harmatz P (2008) The effect of vitamins C and E on biomarkers of oxidative stress depends on baseline level. *Free Radic Biol Med* 45:377–384

Brigelius-Flohé, R (2009) Vitamin E: The shrew waiting to be tamed. *Free Radic Biol Med* 46:543–554

Burbure C, Buchet JP, Leroyer A, Nisse C, Haguenoer JM, Mutti A, Smerhovský Z, Cikrt M, Trzcinka-Ochocka M, Razniewska G, Jakubowski M, Bernard A (2006) Renal and neurologic effects of cadmium, lead, mercury, and arsenic in children: Evidence of early effects and multiple interactions at environmental exposure levels. *Environ Health Perspec* 114(4):584–590

Chen HL, Hsu CY, Hung DZ, Hu ML (2006) Lipid peroxidation and antioxidants status in workers exposed to PCDD/Fs of metal recovery plants. *Sci Total Environ* 372:12–19

Flora SJS, Mittal M, Mehta A (2008) Heavy metal induced oxidative stress and its possible reversal by chelation therapy. *Indian J Med Res* 128:501–523

Gaetke LM, Chow CK (2003) Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* 189(1–2):147–163

Gonzalez CA, Kogevinas M, Gadea E, Huici A, Bosh A, Bleda MJ, Pöpke O (2000) Biomonitoring study of people living near or working at a municipal solid-waste incinerator before and after two years of operation. *Arch Environ Health* 55(4):259–267

Halliwell B, Gutteridge JMC (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford Science Publications, Oxford

Halliwell B, Rafter J, Jenner A (2005) Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? *Am J Clin Nutr* 81:268–276

Halliwell B (2009) The wanderings of a free radical. *Free Radic Biol Med* 46:531–542

Harris GK, Shi X (2003) Signaling by carcinogenic metals and metal-induced reactive oxygen species. *Mutat Res* 533:183–200

Hassoun EA, Walter AC, Alsharif NZ, Stohs SJ (1997) Modulation of TCDD-induced fetotoxicity and oxidative stress in embryonic and placental tissues of C57BL/6J mice by vitamin E succinate and ellagic acid. *Toxicology* 124:27–37

Hatzis C, Godleski JJ, González-Flecha B, Wolfson JM, Koutrakis P (2006) Ambient particulate matter exhibits direct inhibitory on oxidative stress enzymes. *Environ Sci Technol* 40:2805–2811

Hercberg S (2006) The SU.VI.MAX study, a randomized, placebo-controlled trial on the effects of antioxidant vitamins and minerals on health. *Ann Pharm Fr* 64:397–401

Howard DJ, Ota RB, Briggs LA, Hampton M, Pritsos CA (1998) Oxidative stress induced by environmental tobacco smoke in the workplace is mitigated by antioxidant supplementation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7:981–988

Korashy HM, El-Kadi AOS (2006) The role of aryl hydrocarbon receptor and the reactive oxygen species in the modulation of glutathione transferase by heavy metals in murine hepatoma cell lines. *Chem Biol Interact* 162:237–248

Korashy HM, El-Kadi AOS (2008) The role of redox-sensitive transcription factors NF- κ B and AP-1 in the modulation of the *Cyp1a1* gene by mercury, lead, and copper. *Free Radic Biol Med* 44:795–806

Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E (1994) Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 233:346–357

Lowry OH, Rosebrough AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275

Maçao LB, Wilhelm Filho D, Pedrosa RC, Pereira A, Backes P, Torres MA, Fröde TS (2007) Antioxidant therapy attenuates oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chaga's disease. *Int J Cardiol* 123:43–49

Nair U, Bartsch H, Nair J (2007) Lipid peroxidation-induced DNA damage in cancer-prone inflammatory diseases: A review of published adduct types and levels in humans. *Free Radic Biol Med* 43:1109–1120

Pinho RA, Silveira PCL, Silva LA, Streck EL, Dal-Pizzol F, Moreira JCF (2005) N-Acetylcysteine and deferoxamine reduce pulmonary oxidative stress and inflammation in rats after coal dust exposure. *Environ Res* 99(3):355–360

Possamai FP, Fortunato JJ, Feier G, Agostinho FR, Quevedo J, Wilhelm Filho D, Dal-Pizzol F (2007) Oxidative stress after acute and sub-chronic malathion intoxication in Wistar rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 23:198–204

Possamai FP, Ávila Jr. S, Budni P, Backes P, Parisotto EB, Rizelio VM, Torres MA, Colepicolo P, Wilhelm Filho D (2009) Occupational airborne contamination in South Brazil: 2. Oxidative stress detected in the blood of workers of incineration of hospital residues. *Ecotoxicology* (in press)

Reis MF, Sampaio C, Brantes A, Aniceto P, Melim M, Cardoso L, Gabriel C, Simão F, Miguel JP (2007) Human exposure to heavy metals in the vicinity of Portuguese solid waste incinerators—Part 1: Biomonitoring of Pb, Cd and Hg in blood of the general population. *Int J Hyg Environ Health* 210:439–446

Ribeiro CM, Budni P, Pedrosa RC, Farias MS, Parisotto EB, Dalmarco EM, Fröde TS, Oliveira-Silva D, Colepicolo P, Wilhelm Filho D. Antioxidant therapy attenuates oxidative insult caused by benzonidazole in chronic Chagas heart disease. *Int J Cardiol* (in press).

Rice-Evans CA, Diplock AT (1993) Current status of antioxidant therapy. *Free Radic Biol Med* 15:77–96

Riddles PW, Blakeley RL, Zerner B (1983) Reassessment of Ellman's reagent. *Methods Enzymol* 91:49–60

Roberts II LJ, Oates JA, Linton MF, Fazio S, Meador BP, Gross MD, Shyr Y, Morrow JD (2007) The relationship between dose of vitamin E and suppression of oxidative stress in humans. *Free Radic Biol Med* 43:1388–1393

Roberts II LJ, Traber MG (2009) Vitamins E and C in the prevention of cardiovascular disease and cancer in men. *Free Radic Biol Med* 46:1558-1567

Schins RP, Borm PJ (1999) Mechanisms and mediators in coal dust induced toxicity: a review. *Ann Occup Hyg* 43:7–33

Sorensen M, Schins RPF, Hertel O, Loft S (2005) Transition metals in personal samples of PM_{2.5} and oxidative stress in human volunteers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14(5):1340–1343

Sovocool GW, Mitchum RK, Tondeur Y, Munslow WD, Vonnahme TL, Donnelly JR (1988) Bromo- and bromochloro-polynuclear aromatic hydrocarbons, dioxins and dibenzofurans in municipal incinerator fly ash. *Biomed Environ Mass Spectrom* 15:669–676

Steenland K, Loomis D, Shy C, Simonsen N (1996) Review of occupational lung carcinogens. *Am J Ind Med* 29:474–490

Traber MG, Atkinson J (2007) Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med* 43:4–15

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interac* 160:1–40

Wang G, Fowler BA (2008) Roles of biomarkers in evaluating interactions among mixtures of lead, cadmium and arsenic. *Toxicol Appl Pharmacol* 233(1):92–99

Willis JB (1962) Determination of lead and other heavy metals in urine by atomic absorption spectroscopy. *Anal Chem* 34(6):614–617

Yoshida R, Ogawa Y, Mori I, Nakata A, Wang R, Ueno S, Shioji I, Hisanaga N (2003) Associations between oxidative stress levels and total duration of engagement in jobs with exposure to fly ash among workers at municipal solid waste incinerators. *Mutagenesis* 18(6):533–537.

Zingg JM (2007) Vitamin E: An overview of major research directions. *Mol Aspects Med* 28:400–422

Legends and footnotes to tables

Table 1A. Heavy metal concentrations in the urine of subjects from the residents LM (Lauro Müller) group, surface and underground mining workers and from controls.

Footnote: Values are expressed as means \pm SE (n=20). (**) p<0.01 and (*) p<0.05 in relation to controls; (ª) Values represent the percentage difference between the exposed groups and controls.

Table 1B. Heavy metal concentrations in the urine of subjects from the residents CB (Capivari de Baixo) group, workers exposed to incineration of residues and from controls.

Footnote: Values are expressed as means \pm SE (n=20). (**) p<0.01 and (*) p<0.05 in relation to controls; (ª) Values represent the percentage difference between the exposed groups and controls.

Table 2A. Damage biomarkers concentrations (TBARS, PC and PT) in the plasma of subjects from the residents LM (Lauro Müller) group, surface and underground mining workers groups and from controls, before (pre) and after (post) antioxidant supplementation.

Footnote: Values are expressed as means \pm SE (n=20). (**) p<0.01 and (*) p<0.05 in relation to controls; (##) p<0.01 and (#) p<0.05 in relation to pre-supplementation; (ª) Values represent the percentage difference between the exposed groups and controls.

Table 2B. Damage biomarkers concentrations (TBARS, PC and PT) in the plasma of subjects from the residents CB (Capivari de Baixo) group, workers exposed to incineration of residues and from controls, before (pre) and after (post) antioxidant supplementation.

Footnote: Values are expressed as means \pm SE (n=20). (**) p<0.01 and (*) p<0.05 in relation to controls; (##) p<0.01 and (#) p<0.05 in relation to pre pre-supplementation; (ª) Values represent the percentage difference between the exposed groups and controls.

Table 3A. Antioxidants (AT contents in plasma, GSH contents in blood and enzymatic activities of GPx, GR, GST, CAT, SOD in blood) of subjects from the residents LM (Lauro Müller) group, surface and underground mining workers groups and from controls, before (pre) and after (post) antioxidant supplementation.

Footnote: Values are expressed as means \pm SE (n=20). (**) p<0.01 and (*) p<0.05 in relation to controls; (##) p<0.01 and (#) p<0.05 in relation to pre-supplementation; (ª) Values represent the percentage difference between the exposed groups and controls.

Table 3B. Antioxidants (AT contents in plasma, GSH contents in blood and enzymatic activities of GPx, GR, GST, CAT, SOD in blood) of subjects from the residents CB (Capivari de Baixo) group, workers exposed to incineration of residues and from controls, before (pre) and after (post) antioxidant supplementation.

Footnote: Values are expressed as means \pm SE (n=20). (**) p<0.01 and (*) p<0.05 in relation to controls; (##) p<0.01 in relation to pre-supplementation; (ª) Values represent the percentage difference between the exposed groups and controls.

Table 1A

Heavy metals	Controls	Residents LM	% ^a	Surface	% ^a	Underground	% ^a
Lead ($\mu\text{g L}^{-1}$)	2.20 \pm 0.52	5.53 \pm 1.03*	151.4	9.38 \pm 0.22**	326.4	5.69 \pm 0.10**	159.0
Copper ($\mu\text{g L}^{-1}$)	43.42 \pm 1.27	50.96 \pm 1.24**	17.4	78.75 \pm 2.01**	81.4	60.84 \pm 2.82**	40.6
Iron ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1032.74 \pm 60.05	1116.00 \pm 39.57	8.2	1245.24 \pm 19.26**	21.5	1249.10 \pm 71.37**	21.1
Manganese ($\mu\text{g L}^{-1}$)	5.63 \pm 0.24	2.84 \pm 0.10**	-50.1	4.72 \pm 0.40*	-16.7	3.21 \pm 0.30**	-43.2
Zinc ($\mu\text{g L}^{-1}$)	287.69 \pm 18.21	321.93 \pm 23.99	12.0	1064.00 \pm 53.69**	270.3	1159.04 \pm 157.26**	303.8

Table 1B

Heavy metals	Controls	Residents CB	% ^a	Workers	% ^a
Lead ($\mu\text{g L}^{-1}$)	2.20 \pm 0.52	4.37 \pm 0.38**	98.6	3.20 \pm 0.23*	45.5
Copper ($\mu\text{g L}^{-1}$)	43.42 \pm 1.27	48.16 \pm 2.42*	10.9	50.25 \pm 2.08**	15.7
Iron ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1032.74 \pm 60.05	881.41 \pm 94.38	-14.7	1208.99 \pm 50.13*	17.1
Manganese ($\mu\text{g L}^{-1}$)	5.63 \pm 0.24	4.62 \pm 0.11**	-17.9	2.53 \pm 0.15**	-55.1
Zinc ($\mu\text{g L}^{-1}$)	287.69 \pm 18.21	540.58 \pm 43.88**	87.9	462.51 \pm 79.36*	60.8

Table 2A

Damage biomarkers	Controls	Residents LM			Surface			Underground					
		Pre	% ^a	Post	% ^a	Pre	% ^a	Post	% ^a	Pre	% ^a	Post	% ^a
TBARS (nmol mL ⁻¹)	61.60±14.67	163.75±39.26**	166.2	96.73±6.70 [#]	57.3	172.38±53.87**	180.3	93.88±15.05 [#]	52.4	116.15±15.64	89.1	98.76±13.96	60.3
PC (nmol mg ⁻¹ prot.)	1.94±0.24	4.91±0.27**	153.5	0.82±0.13** ^{##}	-58.1	4.46±0.86**	130.1	1.37±0.41 ^{##}	-29.3	3.59±0.51**	85.7	0.87±0.15** ^{##}	-55.1
PT (nmol mg ⁻¹ prot.)	219.61±20.25	191.42±13.63	-13.1	300.96±37.99* ^{##}	37.1	120.33±12.74**	-45.2	390.29±52.76* ^{##}	78.4	112.86±12.97**	-49.0	367.76±25.86* ^{##}	67.4

Table 2B

Damage biomarkers	Controls	Residents CB			Workers				
		Pre	% ^a	Post	% ^a	Pre	% ^a	Post	% ^a
TBARS (nmol mL ⁻¹)	61.60±14.67	112.09±13.21**	83.6	84.27±11.23 [#]	37.7	126.91±18.96**	108.2	47.38±5.80 ^{##}	-22.9
PC (nmol mg ⁻¹ prot.)	1.94±0.24	3.84±0.37**	97.9	1.22±0.19* ^{##}	-37.1	2.04±0.15	5.2	0.48±0.06* ^{##}	-75.3
PT (nmol mg ⁻¹ prot.)	219.61±20.25	177.47±18.37	-19.2	401.57±43.30* ^{##}	82.9	145.99±12.44*	-33.5	301.84±19.75* ^{##}	37.4

Table 3A

Antioxidants	Controls	Residents LM						Surface						Underground											
		Pre		Post		% ^a		Pre		Post		% ^a		Pre		Post		% ^a							
		Pre	% ^a	Post	% ^a	Pre	% ^a	Post	% ^a	Pre	% ^a	Post	% ^a	Pre	% ^a	Post	% ^a	Pre	% ^a	Post	% ^a				
AT ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	20.50±2.60	-27.0	25.08±2.45	22.3	15.00±4.50*	-27.0	36.07±7.19*	76.3	12.00±4.00*	-41.4	36.42±7.12**	78.4	0.90±0.09	0.63±0.07**	-29.2	0.98±0.08 ^{##}	10.1	0.64±0.09**	-28.7	1.04±0.12* ^{##}	17.2	0.47±0.09**	-47.1	1.07±0.08* ^{##}	20.3
GSH ($\mu\text{mol mL}^{-1}$)	10.09±0.82	-4.0	9.49±0.59	-6.0	9.73±0.40	-4.0	9.57±1.42	-5.1	3.30±0.59**	-67.3	8.16±0.72* ^{##}	-19.1	3.40±0.47	2.81±0.84	-17.3	2.93±0.85	-14.3	3.11±0.60	-9.1	2.79±0.30	-18.7	3.69±1.00	9.8	2.84±0.36	-16.5
GPx ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$)	13.47±2.64	157.0	9.53±3.33 ^{##}	-29.2	34.60±8.63**	157.0	7.02±1.82 ^{##}	-48.1	21.28±2.26*	58.3	7.14±3.56 ^{##}	-47.0	34.47±4.53	39.18±7.24	14.0	37.13±5.86	8.3	49.80±6.06**	44.5	32.18±1.76 ^{##}	-7.0	50.95±7.03**	48.3	34.67±3.23 ^{##}	1.0
CAT ($\text{mmol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$)	143.29±8.99	-54.3	522.79±27.62* ^{##}	265.1	65.47±6.53**	-54.3	522.79±27.62* ^{##}	265.1	104.14±8.68	-27.3	520.69±53.10* ^{##}	263.4	531.87±41.75* ^{##}	271.1											

Table 3B

Antioxidants	Controls	Residents CB				Workers			
		Pre	% ^a	Post	% ^a	Pre	% ^a	Post	% ^a
AT ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	20.50 \pm 2.60	12.90 \pm 2.10**	-37.1	22.93 \pm 1.85*##	11.9	13.50 \pm 2.50**	-34.1	26.34 \pm 2.20*##	28.5
GSH ($\mu\text{mol mL}^{-1}$)	0.90 \pm 0.09	0.68 \pm 0.09**	-24.2	1.08 \pm 0.13*##	20.1	0.66 \pm 0.08**	-26.9	1.13 \pm 0.17*##	25.7
GPx ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$)	10.09 \pm 0.82	3.40 \pm 0.90**	-66.3	10.42 \pm 1.13##	3.3	4.60 \pm 0.84**	-54.4	11.13 \pm 0.88##	10.3
GR ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$)	3.40 \pm 0.47	3.48 \pm 0.47	2.4	5.21 \pm 0.80**##	53.2	3.30 \pm 0.60	-2.9	5.02 \pm 0.71*##	47.6
GST ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$)	13.47 \pm 2.64	28.54 \pm 6.29**	111.9	17.18 \pm 2.95##	27.5	21.91 \pm 6.57*	62.7	14.72 \pm 2.87	9.3
CAT ($\text{mmol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$)	34.47 \pm 4.53	37.59 \pm 5.62	9.1	37.51 \pm 4.29	8.8	61.67 \pm 7.14**	78.9	56.93 \pm 9.04**	65.2
SOD (USOD mL^{-1})	143.29 \pm 8.99	183.46 \pm 39.86	28.0	221.21 \pm 37.19**	54.4	109.85 \pm 11.91*	-23.3	211.91 \pm 41.61*##	47.9

APÊNDICE III - QUESTIONÁRIO DE PESQUISA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA
CAMPUS UNIVERSITÁRIO TRINDADE
CEP 88040-970 FLORIANÓPOLIS –SC

QUESTIONÁRIO DE PESQUISA

Nome:

Endereço: Nº:

Bairro: Cidade: UF:

Há quanto tempo reside neste local?

Qual é a distância em **km** de sua residência até seu local de trabalho?

Telefone Res.: Telefone Celular:

Sexo: Data de Nascimento: / / Idade:anos

Peso (Kg): Altura (m):

É fumante? () Sim () Não. Qual a frequência?

Faz uso de bebidas alcoólicas? () Sim () Não. Qual a frequência?

Possui problemas de saúde? () Sim () Não (Exemplo: hipertensão, diabetes, problemas de pulmão/fígado/rim, artrite/artrose, labirintite, etc).

Quais?.....

.....

Qual é a periodicidade de suas consultas médicas? (semestral, anual, outro)

.

Faz uso de algum medicamento? Quais?

.....

.....

Quais são seus hábitos de vida? Pratica quais esportes?.....

.....

.....

Empresa onde trabalha:

.....

Cargo:

Breve descrição das atividades do cargo:

.....

Carga horária de trabalho:

Há quanto tempo está no mesmo cargo?

Você utiliza algum tipo de equipamento de proteção para o cargo que ocupa?

Quais?

.....

Você tem contato a algum produto químico? Quais? Qual a frequência de exposição?

.....

Hábitos Alimentares:

Substancia	Muito	Médio	Pouco	Nada
Carne gorda				
Leite				
Verdura				
Ovos				
Bebidas Alcoólicas				
Usa alguma vitamina (suplemento)				

Fontes de Vit C: (deve ser pergunta de que forma: suco ou fruta propriamente dita)

Alimento	Quantidade (ex. 1 por dia)	Quantas vezes por semana
Goiaba		
Caju		
Pimentão cru		
Manga		
Laranja		
Morango		
Abacaxi		
Mamão papaya		
Limao		

Você bebe água de quais fontes listadas abaixo:

- CASAN
- SAMAE
- Água mineral
- Água de poço ou ponteira
- Outro. Especificar:

APÊNDICE IV - TCLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA

Título da pesquisa:

Análise do estresse oxidativo em trabalhadores expostos à emissão de poluentes atmosféricos de incinerador de resíduos sólidos de serviço de saúde.

Instituição promotora:

Universidade Federal de Santa Catarina e Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Patrocinador:

Laboratório de Ecofisiologia Respiratória, ECZ, CCB, UFSC e Laboratório de Fisiopatologia Experimental, UNESC.

Coordenador:

Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho

Telefone para contato: (48) 3331-6917 ou 9969-7146 – E-mail: dawifi@ccb.ufsc.br

1- Objetivo:

O objetivo do estudo é avaliar os níveis de estresse oxidativo em trabalhadores de equipamento de incineração expostos aos poluentes atmosféricos provenientes da queima dos resíduos sólidos de serviços de saúde (RSSS), comparativamente a trabalhadores indiretamente expostos e indivíduos não expostos ao processo.

2- Metodologia/procedimentos:

O presente trabalho será desenvolvido no incinerador de RSSS existente no município de Laguna, divisa com o município de Capivari de Baixo, conforme as seguintes etapas: obtenção de consentimento junto ao participante; coleta das amostras biológicas (sangue e urina); análises bioquímicas e tratamento estatístico dos dados.

3- Justificativa:

Os Resíduos Sólidos de Serviços de Saúde (RSSS) são componentes representativos dos resíduos sólidos urbanos, apresentando grandes riscos à saúde pública e ao meio ambiente. Estes riscos podem ser devido à presença de vírus e bactérias patogênicas, além da presença de produtos químicos ou radioativos, nocivos aos seres humanos, como também ao meio ambiente. A incineração é uma forma de destino final adequado aos RSSS, no entanto geram diversos poluentes que são lançados no meio ambiente, tais como, metais pesados, dibenzo-*p*-dioxinas policloradas (PCDDs), dibenzofuranos policlorados (PCDFs), hidrocarbonos poliaromáticos (PAHs), e outros materiais orgânicos tóxicos. É importante, portanto, avaliar o impacto deste processo na saúde da população.

4- Benefícios:

Avaliar o impacto do processo de incineração de RSSS na saúde dos trabalhadores expostos ao processo.

5- Desconfortos e riscos:

Coleta do sangue através de punção venosa, mas sem risco a saúde do participante.

6- Danos:

A pesquisa não irá proporcionar danos à saúde do participante.

APÊNDICE V - TERMO DE COMPROMISSO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA
CAMPUS UNIVERSITÁRIO TRINDADE
CEP 88040-970 FLORIANÓPOLIS –SC

TERMO DE COMPROMISSO

RELAÇÃO DOS PARTICIPANTES - SUPLEMENTAÇÃO VITAMÍNICA

Consentimento: Informo que aceitei participar do estudo sobre a “análise do estresse oxidativo em trabalhadores expostos à emissão de poluentes atmosféricos de incinerador de resíduos sólidos de serviço de saúde” promovido pela UFSC, com a suplementação de vitaminas E e C, via oral, na dose de 800 UI de Vit. E por dia e 500 mg de Vit. C por dia, por um período de 6 (seis) meses. Informo que recebi a quantidade de vitamina em comprimido para a suplementação vitamínica que será utilizada EXCLUSIVAMENTE por mim durante 6 (seis) meses. Após a suplementação será realizada coleta de sangue e urina para análise laboratorial. Este termo está sendo assinado voluntariamente por mim, indicando o meu consentimento para participar desta pesquisa.

- 01- Assinatura:
- 02- Assinatura:
- 03- Assinatura:
- 04- Assinatura:
- 05- Assinatura:
- 06- Assinatura:
- 07- Assinatura:
- 08- Assinatura:
- 09- Assinatura:
- 10- Assinatura:
- 11- Assinatura:
- 12- Assinatura:
- 13- Assinatura:
- 14- Assinatura:
- 15- Assinatura:
- 16- Assinatura:
- 17- Assinatura:
- 18- Assinatura:
- 19- Assinatura:
- 20- Assinatura:

Florianópolis, 24 de agosto de 2007.

APÊNDICE VI - ORIENTAÇÃO AO PARTICIPANTE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

**ORIENTAÇÃO AO PARTICIPANTE
(COMO TOMAR A SUA VITAMINA)**

NOME DO PARTICIPANTE:

VITAMINA	QUANTIDADE	HORÁRIO	COMO VOCÊ DEVE TOMAR
VITAMINA C 500 MG	01	08:00 h	Após o café da manhã
VITAMINA E 400 UI	02	08:00 h	Após o café da manhã

DURAÇÃO DO TRATAMENTO: 6 MESES

PARA TIRAR DÚVIDAS COM RELAÇÃO AO TRATAMENTO: 9124-6995 (FABRÍCIO) ou 9979-8800 (SILVIO)

Obs.: Após 3 meses será realizado uma entrevista e fornecido mais vitamina E

ANEXOS

ANEXO I - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARNA
 CAMPUS UNIVERSITÁRIO - TRINDADE CEP: 88040-900 - FLORIANÓPOLIS - SC
 TELEFONE (048) 234-1755 - FAX (048) 234-4069

PARECER CONSUBSTANCIADO - PROJETO Nº 366/2005

I – IDENTIFICAÇÃO

Título do projeto: “Análise do estresse oxidativo em trabalhadores expostos a emissão de poluentes atmosféricos de incinerador de resíduos sólidos de serviços de saúde”.

Área: Centro da Saúde – Farmácia - UFSC

Pesquisador Responsável: Prof. Danilo Wilhelm Filho

Co-Orientador: Prof. Felipe Dal-Pizzol

Pesquisador Principal: Fabrício Pagani Possamai

Data da coleta dos dados: janeiro a fevereiro de 2006

Instituição em que será realizado o estudo: queima dos resíduos sólidos de serviços de saúde de Laguna.

II – Objetivos

Gerais: Avaliar os níveis de estresse oxidativo em trabalhadores de equipamento de incineração expostos aos poluentes atmosféricos provenientes da queima dos resíduos sólidos de serviços de saúde (RSSS), comparativamente a trabalhadores indiretamente expostos e indivíduos não expostos ao processo.

Específicos

Analisar os níveis de estresse oxidativo no sangue e urina de trabalhadores expostos diretamente, indiretamente e daqueles não expostos à emissão de poluentes atmosféricos de equipamentos incineração; Analisar os níveis de dioxinas no sangue de trabalhadores expostos diretamente, indiretamente e daqueles não expostos à emissão de poluentes atmosféricos de equipamentos incineração; Determinar a relação entre os diferentes graus de exposição dos poluentes atmosféricos, tais como as dioxinas, provenientes da incineração do RSSS e os níveis de estresse oxidativo encontrados no sangue e urina.

III – SUMÁRIO DO PROJETO: Trata-se de um projeto de doutorado na área da Farmácia. Serão retiradas amostras sanguíneas e de urina de trabalhadores de incinerador de resíduos sólidos de serviço de saúde (RSSS) do município de Laguna para avaliar o estresse oxidativo causado pela exposição às cinzas da incineração. Serão 3 grupos sendo o primeiro por trabalhadores que operam o equipamento de incineração, o segundo pelos que estão em torno do equipamento e o terceiro por trabalhadores que não estão expostos as cinzas da incineração. Também será realizada uma entrevista para verificar sintomas de doenças respiratórias, suplementação de antioxidantes e outros hábitos de vida. O sangue será coletado em uma unidade de saúde ainda não identificada.

IV – COMENTÁRIO: A pesquisa proposta tem relevância científica e social. O protocolo da pesquisa contém os documentos necessários para sua análise e exigidos pela legislação. Os pesquisadores listados no projeto possuem currículo condizente com o tema. O processo apresenta uma declaração da secretaria de saúde e promoção social de Laguna enquanto que no projeto o autor coloca que o incinerador é de propriedade particular, portanto há necessidade de anexar ao projeto a declaração do proprietário responsável pelo incinerador.

(X) com pendência (detalhes da pendência abaixo citados)

Pendência: Anexar o termo de consentimento do proprietário do incinerador ou justificar a declaração que foi anexada. Apresentar o TCLE em uma linguagem mais acessível aos trabalhadores.

As pendências foram sanadas. O projeto foi:

(X) aprovado

Informamos que o parecer dos relatores foi aprovado, em reunião deste Comitê na data de 06 de março de 2006.


 Vera Lucia Bosco
 Coordenadora do CEPESH

Fonte: CONEP/ANVS - Resoluções 196/96 e 251/97 do CNS.

ANEXO II - CERTIFICADO DO FORNECEDOR DA VIT. C

Análises/Componentes		Especificações	Resultados das análises
PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS			
• Descrição (0)		Pó granular branco a amarelado	Pó granular amarelado.
• Doseamento * (0)		Min. 98,0% (calculada sobre a base seca)	97,4%
• pH (5%) (0)		2,0 a 3,0	2,4
• Perda por dessecação (1g, 105°C, 3horas) (0)		Não mais que 0,4%	0,4%
• Metais pesados (0)		Não mais que 20ppm	<20ppm
• Cinzas sulfatadas (0)		Não mais que 0,1%	0,03%
• Arsênio * (0)		Não mais que 3ppm	<3ppm
• Densidade aparente (3)		Informativo	0,84 g/mL
IDENTIFICAÇÃO			
• Identificação * (0)		Positivo	Positivo

* - Análises em acordo com o certificado de análise do fornecedor.
As demais análises foram realizadas no Laboratório de Controle da Qualidade Galena.
Referências: (0) Conforme literatura do fornecedor.; (1) Farmacopéia Britânica, Edição 2002.; (2) Farmacopéia Americana, 28ª Edição.; (3) Conforme metodologia interna Galena.; (4) Farmacopéia Chinesa, Edição 2000..

Resultado: () **Aprovado** Data da Análise: **24/11/2006** Nr.Ctrl.: 012528G0011/3706


Roberto T. Yoshida
 Farmacêutico Responsável
 CRF-SP: 18.441

ANEXO III - CERTIFICADO DA FARMÁCIA DA VIT. C

 medicinallis <small>(Farmácia de Manipulação e Controle de Qualidade)</small>		CONTROLE DE QUALIDADE
Matéria prima: Vitamina C revestida		
Origem/Procedência: China	Data da análise: 12/09/2007	
Lote fornecedor: 0611039002	NF: 0804313	
Lote de Fabricação: 0604631203	DCB: 00081.01-9	
Data de Fabricação: 24/04/2006	Fornecedor: Galena	
Data de Validade: 23/04/2008		
TESTES		RESULTADO DAS ANÁLISES
Características Organolépticas:	Pó amarelado granular	
Densidade/peso médio:	0,79 g/mL	
Ponto de Fusão:	-----	
pH:	2,5	
Solubilidade:	-----	
Armazenamento e observações:	Temperatura ambiente, protegido da luz. Produto fotossensível.	
Fator de Correção:	Não	
Responsável Técnico:	Scheila V. Cechinel	
Resultado:	Aprovado	
Referência:	Farmacopéia Brasileira	
	 _____ Scheila Visitim Cechinel Farmacêutica Resp. – CRF 6709	

ANEXO IV - CERTIFICADO DO FORNECEDOR DA VIT. E

CERTIFICADO DE ANÁLISES DO CONTROLE DE QUALIDADE

Autorização de Funcionamento M.S.: 1.01284-7 Autorização Especial de Funcionamento M.S.: 1.20182-2

Insumo : VITAMINA E ACETATO PO 50%

NF 525.979 26/07/2007

Lote : 10609011 #7

Origem: China
Procedencia: KoreaiaFabric.: 09/2006
Validade: 09/2009

Formula: C31 H52 O3 (Vitamina E Acetato)

PM: 472,75

Frac: 536829-2 25/06/2007

DCB : 08717

CAS: 58-95-7

Categoria Terapeutica: TRATAMENTO DE DEFICIÊNCIA DE VITAMINA E

Ensaio	Especificacao	Resultado
*DESCRICOÃO	PÓ QUASE BRANCO OU AMARELADO	DE ACORDO
*IDENTIFICACÃO	REACÃO CARACTERÍSTICA	DE ACORDO
*PERDA P/SECAGEM	NO MÁXIMO 5,0% EM 1,0g À 105°C	1,49%
*DOSEAMENTO	ENTRE 50 E 55% (BASE SECA)	53,09%
*DENSIDADE	APARENTE	0,5880 g/mL

Monografia : METODO DO FABRICANTE

LAUDO ORIGINAL DO FABRICANTE

Nomenclatura : DL-ALPHA-TOCOPHERYL ACETATE /

Parecer Técnico : DENTRO DOS ITENS PESQUISADOS, O LOTE CUMPRE COM AS ESPECIFICACOES

OBS: (*) Os ensaios assinalados foram realizados no Laboratorio de Controle de Qualidade DEG e os demais estão em conformidade c/o Certif. de Análise do Fabric


Dra. Cintia Mesquita Lima
Farmacêutica Responsável
CRF-SP: 25.721

Dra. Patricia Dornellas Giarreta
Farmacêutica Co-Responsável
CRF-SP: 31.746

As assinaturas são validas somente quando acompanhadas de nota fiscal



DEG IMPORTAÇÃO DE PRODUTOS QUÍMICOS LTDA.
Rua Junipari 775 / 779 / 803 - Cep 04348.070 - Jd. Oriental - São Paulo - SP
Tel: 11 5033.3700 - Fax: 11 5033.3711 - deg@deg.com.br - www.deg.com.br



ATIVANDO PRINCÍPIOS
L.A.B.O.R.A.TÓ.R.I.O.S

ANEXO V - CERTIFICADO DA FARMÁCIA DA VIT. E

VITALIS Farmácia de Manipulação		GARANTIA DE QUALIDADE		Número: I37972/07
NÚMERO: COQ-06/2		NOME: PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA REGISTRO DAS ANÁLISES DO CONTROLE DE QUALIDADE		
1. Matéria-prima		1.1 N. Genérico: Vitamina E Pó 50%		
		1.2 N. comercial:		
2 Teor padrão:		3 Teor atual: 53,09 %		4. N. Fiscal 523929
5. Fornecedor: B.E.G.		6. Origem: China		7. Procedência: Korea
8. Qtdade recebida: 16kg		9. Qtdade amostrada: 0,1g		10. N° lote: 10609011
11. Data Fab.: 09/06		12. Data val.: 09/09		13. Data frac. forn.:
14. Condições de transporte e embalagens: de acordo				
15. Ensaios realizados:				
Características organolépticas:				
Aspecto:		Pó microgranular		Resultados OK
Cor:		Branco a creme		OK
Odor:		Sem referência		Inodoro
Solubilidade:				
Água deionizada		Praticamente insolúvel		Resultados Pouco solúvel (turvação)
Alcool		Insolúvel		OK
Éter		Solúvel		NR
Clorofórmio		Sem referência		
Acetona		Sem referência		
Outros				
Determinação do Ponto Fusão:				
Padrão		Resultados		
Sem referência		PF = NR		
Determinação do pH:				
Padrão		Resultados		
Sem referência		pH = 5,5		
Determinação da densidade:				
Padrão		Resultados		
0,952 - 0,966		d = 0,99 g/ml		
Observações: Aplicar fator de correção.		PHI% = +6,04		
Fórmula molecular: C ₂₉ H ₅₀ O ₂				
Peso molecular: 472,7				
16. Data Fraç. 01/08/07		17. Resp. Fracionamento: Vanessa		
18. N° Certificado 2918		19. Quantidade a ser Fracionada 16 x 100g		
20. Informe final:		Aprovado <input checked="" type="checkbox"/>		Reprovado <input type="checkbox"/>
21. Destino do material:		Reanálise <input type="checkbox"/>		Devolução <input type="checkbox"/> Descarte <input type="checkbox"/>
22. Referência Bibliográfica:				
23. Data: 01/08/07		24. Farm. Responsável: CONTROLE DE QUALIDADE VITALIS  LETICIA MACARINI MAGAGNIN - CRF 6026		

ANEXO VI – DATASUS (MORTALIDADE-MUNICÍPIO)

Informações de Saúde - DATASUS

Mortalidade - Santa Catarina

Óbitos p/Residênc por Capítulo CID-10 e Ano do Óbito

Município: Capivari de Baixo

Período:2000-2006

Capítulo CID-10	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
I. Algumas doenças infecciosas e parasitárias	4	5	3	6	2	1	2
II. Neoplasias (tumores)	13	8	25	15	16	16	14
III. Doenças sangue órgãos hemat e transt imunitár	1	0	0	0	0	0	0
IV. Doenças endócrinas nutricionais e metabólicas	3	9	8	8	8	12	9
V. Transtornos mentais e comportamentais	1	1	0	0	1	1	2
VI. Doenças do sistema nervoso	2	2	2	1	2	1	1
IX. Doenças do aparelho circulatório	29	20	19	41	40	34	29
X. Doenças do aparelho respiratório	9	10	10	12	14	7	7
XI. Doenças do aparelho digestivo	5	3	6	1	7	5	1
XII. Doenças da pele e do tecido subcutâneo	1	0	0	0	0	1	0
XIII. Doenças sist osteomuscular e tec conjuntivo	0	1	0	2	0	1	1
XIV. Doenças do aparelho geniturinário	2	2	2	3	1	4	0
XV. Gravidez parto e puerpério	0	1	0	0	0	0	0
XVI. Algumas afec originadas no período perinatal	1	5	2	3	4	5	1
XVII. Malf cong deformid e anomalias cromossômicas	0	2	1	0	2	0	0
XVIII. Sint sinais e achad anorm ex clín e laborat	11	16	18	7	4	5	1
XX. Causas externas de morbidade e mortalidade	9	5	13	13	13	16	18
Total	91	90	109	112	114	109	86

Fonte: MS/SVS/DASIS - Sistema de Informações sobre Mortalidade – SIM, disponível em:

<http://www.datasus.gov.br>

ANEXO VII – DATASUS (MORTALIDADE-BRASIL)

Informações de Saúde - DATASUS

Mortalidade por grupos de causas - Brasil

Número de óbitos por Grupo de Causas e Ano

Período:2000-2005

Grupo de Causas	2000	2001	2002	2003	2004	2005
Doenças infecciosas e parasitárias	44515	45032	45175	46533	46067	46628
Neoplasias	120517	125348	129923	134691	140801	147418
Doenças do aparelho circulatório	260603	263417	267496	274068	285543	283927
Doenças do aparelho respiratório	88370	90288	94754	97656	102168	97397
Afecções originadas no período perinatal	36618	34274	33136	32040	31011	29799
Causas externas	118397	120954	126550	126657	127470	127633
Demais causas definidas	141917	146413	151597	157261	164091	169570
Total	810937	825726	848631	868906	897151	902372

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informações sobre Mortalidade – SIM, disponível em:

<http://www.datasus.gov.br>

ANEXO VIII – DATASUS (MORBIDADE-MUNICÍPIO)

Informações de Saúde - DATASUS

Morbidade Hospitalar do SUS - por local de residência - Santa Catarina

Internações por Capítulo CID-10 e Ano competência

Município: Capivari de Baixo

Período:2000-2007

Capítulo CID-10	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
I. Algumas doenças infecciosas e parasitárias	81	91	102	79	77	55	66	47
II. Neoplasias (tumores)	78	63	89	61	60	41	67	98
III. Doenças sangue órgãos hemat e transt imunitár	12	5	7	6	6	4	13	8
IV. Doenças endócrinas nutricionais e metabólicas	34	41	47	46	38	17	17	21
V. Transtornos mentais e comportamentais	59	57	46	49	39	52	57	82
VI. Doenças do sistema nervoso	73	84	55	75	59	61	49	41
VII. Doenças do olho e anexos	9	4	18	11	11	10	8	5
VIII. Doenças do ouvido e da apófise mastóide	2	4	3	7	1	4	0	0
IX. Doenças do aparelho circulatório	217	233	288	191	209	229	205	199
X. Doenças do aparelho respiratório	185	214	233	185	140	125	142	154
XI. Doenças do aparelho digestivo	149	99	153	88	97	124	119	142
XII. Doenças da pele e do tecido subcutâneo	6	17	18	35	41	37	25	21
XIII. Doenças sist osteomuscular e tec conjuntivo	37	36	79	68	75	98	69	99
XIV. Doenças do aparelho geniturinário	95	63	63	70	106	73	100	82
XV. Gravidez parto e puerpério	282	320	225	220	248	270	240	270
XVI. Algumas afec originadas no período perinatal	67	85	27	15	11	15	11	15
XVII. Malf cong deformid e anomalias cromossômicas	7	10	17	8	15	9	12	8
XVIII. Sint sinais e achad anorm ex clín e laborat	18	12	20	12	15	3	10	16
XIX. Lesões enven e alg out conseq causas externas	72	55	145	106	113	139	93	105
XX. Causas externas de morbidade e mortalidade	0	0	0	0	0	0	0	1
XXI. Contatos com serviços de saúde	22	23	18	14	7	15	5	16
Total	1505	1516	1653	1346	1368	1381	1308	1430

Fonte: Ministério da Saúde - Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS), disponível em:

<http://www.datasus.gov.br>