



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

SILVIO AVILA JUNIOR

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM INDIVÍDUOS
EXPOSTOS DIRETA E INDIRETAMENTE À ATIVIDADE DE
MINERAÇÃO DO CARVÃO, ANTES E APÓS SUPLEMENTAÇÃO
COM VITAMINAS “C” E “E”**

**FLORIANÓPOLIS, SC, BRASIL
NOVEMBRO, 2009**

SILVIO AVILA JUNIOR

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM INDIVÍDUOS
EXPOSTOS DIRETA E INDIRETAMENTE À ATIVIDADE DE
MINERAÇÃO DO CARVÃO, ANTES E APÓS SUPLEMENTAÇÃO
COM VITAMINAS “C” E “E”**

Qualificação apresentada como requisito para defesa de Tese e 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

FLORIANÓPOLIS, SC, BRASIL

NOVEMBRO, 2009

SILVIO AVILA JUNIOR

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM INDIVÍDUOS
EXPOSTOS DIRETA E INDIRETAMENTE À ATIVIDADE DE
MINERAÇÃO DO CARVÃO, ANTES E APÓS SUPLEMENTAÇÃO
COM VITAMINAS “C” E “E”**

Tese apresentada ao Curso de Pós Graduação em Farmácia – PGFAR Fármaco Medicamento e Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção de grau de **Doutor**.

Aprovado pela Banca Examinadora em 9 de outubro de 2009.

Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho – UFSC Orientador

Prof. Dr. Alcir Luiz Dafré – UFSC

Prof. Dr. Celso Spada – UFSC

Prof. Dr. Emílio Luiz Streck – UNESC

Prof. Dr. Fábio Klamt – UFRGS

Prof. Dra. Tania Silvia Fröde– UFSC

**FLORIANÓPOLIS, SC, BRASIL
NOVEMBRO, 2009**

À família que me foi permitida escolher e à que me foi permitida formar, meus agradecimentos e gratidão infinitos.

AGRADECIMENTO

À equipe do Laboratório pelo suporte, e em especial ao meu mentor e orientador, Prof Dr. Danilo Wilhelm Filho, pela paciência, dedicação e exemplo de como se deve ser, proceder e conduzir.

**“Ninguém ignora tudo, ninguém sabe tudo. Por
isso, aprendemos sempre”**

Paulo Freire

RESUMO

Espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) têm sido implicadas na patogênese da toxicidade induzida pelo material particulado (MP) do carvão. O presente estudo avaliou os biomarcadores de estresse oxidativo (conteúdos de lipoperoxidação (TBARS), proteína carbonilada (PC), tióis protéicos (PT), α -tocoferol (AT), glutathiona reduzida (GSH), e as atividades da glutathiona S-transferase (GST), glutathiona redutase (GR), glutathiona peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), no sangue de quatro diferentes grupos de indivíduos expostos à contaminação ambiental relacionada com a mineração do carvão (n=20 em cada grupo), após a suplementação com vitamina E (800mg/dia) e vitamina C (500mg/dia) durante seis meses, comparadas ao momento antes da intervenção antioxidante: trabalhadores de subterrâneo (grupo SUB), trabalhadores de superfície (grupo sup) diretamente expostos, residentes indiretamente expostos (grupo residentes; formado por indivíduos que residem a cerca de 15 km da área de mineração), e os controles (grupo controle; doadores de sangue que residem em região a cerca de 100 km da área de mineração). Antes da suplementação, os conteúdos de chumbo ($p>0,05$), cobre ($p>0,01$), ferro ($p>0,05$) e zinco ($p>0,01$), mostraram-se aumentados na urina de indivíduos expostos direta e indiretamente à atividade de mineração. Além disso, os conteúdos de TBARS ($p>0,01$) e PC ($p>0,01$) mostraram-se aumentados enquanto os PT ($p>0,01$) e níveis de GSH ($p>0,01$) mostraram-se diminuídos em todos os grupos, os conteúdos plasmáticos de AT ($p>0,05$) apresentaram-se diminuídos em aproximadamente 50 % no grupo SUB, a atividade da GST foi aumentada tanto nos trabalhadores quanto nos residentes, enquanto a CAT ($p>0,01$) apresentou-se aumentada apenas nos trabalhadores da mineração. Após a suplementação, as concentrações de TBARS ($p>0,01$) e PC ($p>0,01$) foram diminuídas apenas no grupo SUB, os níveis de AT ($p>0,01$) e GSH ($p>0,01$) foram recuperados, chegando a concentrações próximas daquelas encontradas no grupo controle, a atividade da GPx ($p>0,01$) foi restabelecida no grupo de trabalhadores SUB, enquanto que as atividades da SOD ($p>0,01$), CAT ($p>0,01$) e GST ($p>0,05$) foram restabelecidas em todos os grupos na comparação com o momento pré suplementação. Os resultados indicam que a condição de estresse oxidativo detectada anteriormente à suplementação tanto nos grupos direta e indiretamente expostos ao MP do carvão, foi revertido após a intervenção com a suplementação por seis meses.

Palavras-chave: mineração do carvão, contaminação atmosférica, estresse oxidativo, antioxidantes, suplementação vitamínica.

ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS) and nitrogen species (RNS) have been implicated in the pathogenesis of particulate material (PM) of coal dust-induced toxicity. The present study measured several oxidative stress biomarkers (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 four different groups of subjects exposed to airborne contamination related to coal mining activity (n=20 each group), before and after vitamin E (800mg/day) and vitamin C (500mg/day) supplementation during six months, which were compared to the situation before the antioxidant intervention: underground (group under), surface workers directly exposed (group surface), residents indirectly exposed (group residents; subjects living *ca.* 15 km from the mining area), and controls (control group; blood donors living *ca.* 100 km from the mining area). Before supplementation, the contents of lead ($p>0.05$), copper ($p>0.01$), iron ($p>0.05$) and zinc ($p>0.01$) were increased in subjects directly and indirectly exposed to mining activities, plasma TBARS ($p>0.01$) and PC ($p>0.01$) levels were increased while plasma PT ($p>0.01$) and GSH levels ($p>0.01$) were decreased in all groups compared to controls, plasma AT ($p>0.05$) contents showed approximately half the values in underground workers compared to controls, GST activity was increased in both workers and also in residents, whilst CAT ($p>0.01$) activity was increased only in mine workers. After antioxidant supplementation, TBARS ($p>0.01$) and PC ($p>0.01$) concentrations were decreased while the contents of PC, AT and GSH were recovered to values similar to controls, GPx activity was reestablished in underground miners ($p>0.01$), and SOD ($p>0.01$), CAT ($p>0.01$) and GST ($p>0.01$) activities were reestablished in all groups when compared to pre-supplementation situation. The results showed that the oxidative stress condition detected before supplementation in both directly and indirectly subjects exposed to PM from coal dusts, was reverted after the antioxidant intervention during six months.

Keywords: coal miners, airborne contamination, oxidative stress, antioxidants, vitamin supplementation

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Padrão de Circulação de Ventos na Área de Estudo	14
FIGURA 2: Níveis de Dano ao DNA.....	34

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Critérios para a Formação do Grupo Referência para Concentração de Metais	17
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP - Adenosina tri fosfato

CAT - Catalase

CDNB - Cloro 2, 4 Dinitrobenzeno

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Performance

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DNPH - Dinitrofenilhidrazina

EP - Erro Padrão

ERN - Espécies Reativas de Nitrogênio

ERO - Espécies Reativas de Oxigênio

GPx - Glutathione Peroxidase

GSH - Glutathione Reduzida

GSSG - Glutathione Oxidada

GR - Glutathione Redutase

GST - Glutathione S-transferase

GT - Glutathione Total

HU-UFSC - Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina

MP - Material Particulado

RNA - Ácido Ribonucléico

SOD - Superóxido Dismutase

TBARS - Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TCA - Ácido Tricloro Acético

•OH - Radical Hidroxil

® - Marca Registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 COMPONENTES METÁLICOS DO CARVÃO	16
1.1.1 Chumbo	17
1.1.2 Cobre	18
1.1.3 Ferro	19
1.1.4 Manganês	20
1.1.5 Zinco	21
1.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	22
1.3 ESTRESSE OXIDATIVO	23
1.4 DEFESAS ANTIOXIDANTES	24
1.4.1 Antioxidantes Endógenos	25
1.4.2 Antioxidantes Exógenos.....	26
1.4.2.1 Vitamina E	26
1.4.2.2 Vitamina C.....	27
1.4.3 Eficácia da Terapia Antioxidante.....	28
2 OBJETIVOS	30
2.1 OBJETIVO GERAL	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 CONSTITUIÇÃO DOS GRUPOS	31
3.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	32
3.3 MARCADORES DE DANO CELULAR	33
3.3.1 Avaliação do Dano ao DNA (Teste Cometa).....	33
3.3.2 Medida da Lipoperoxidação pelo TBARS	34
3.3.3 Avaliação do Dano Oxidativo a Proteínas.....	34
3.3.4 Tióis Totais	35
3.4 AVALIAÇÃO DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICAS	35
3.4.1 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)	35
3.4.2 Atividade da Glutaciona Peroxidase (GP _x)	36
3.4.3 Atividade da Glutaciona Redutase (GR)	37
3.4.4 Atividade da Catalase (CAT).....	37

3.4.5 Atividade da Glutathione S-Transferase (GST).....	38
3.5 AVALIAÇÃO DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICAS	38
3.5.1 Determinação dos Níveis Séricos de α -Tocoferol.....	38
3.5.2 Avaliação da Glutathione Total, Oxidada e Reduzida.....	39
3.6 DOSAGEM DE METAIS PESADOS	40
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
4 RESULTADOS.....	42
4.1 MANUSCRITO 1	42
4.2 MANUSCRITO 2	43
5 DISCUSSÃO	44
6 CONCLUSÕES	53
7 PERSPECTIVAS	54
REFERÊNCIAS	55
APÊNDICES	66
APÊNDICE I - Manuscrito 1.....	66
APÊNDICE II - Manuscrito 2.....	75
APÊNDICE III - Questionário de Pesquisa.....	96
APÊNDICE IV - TCLE	99
APÊNDICE V - Termo de Compromisso	101
APÊNDICE VI - Orientação ao Participante	102
ANEXOS	103
ANEXO I - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	103
ANEXO II - Certificado do Fornecedor da Vit. C	105
ANEXO III - Certificado da Farmácia da Vit. C.....	106
ANEXO IV - Certificado do Fornecedor da Vit. E.....	107
ANEXO V - Certificado da Farmácia da Vit. E.....	108

1 INTRODUÇÃO

Segundo o balanço energético nacional de 2008, o carvão mineral foi responsável pela produção de 6,2% de toda a energia elétrica produzida no país (ANEEL, 2008). Santa Catarina colabora por dispor de uma reserva de cerca de 4,3 bilhões de toneladas, o que corresponde a 13% do total do país. As reservas de carvão do estado de Santa Catarina concentram-se numa área alongada no sentido norte/sul, situada entre os municípios de Lauro Müller e Araranguá, com cerca de 70 km de comprimento por 15 a 20 km de largura (CAMPOS et al., 2003).

A exploração do carvão em Santa Catarina é feita tanto em minas subterrâneas como a céu aberto. Ambos os processos podem acarretar problemas ambientais, por modificarem a estrutura do meio natural, pela deposição inadequada dos resíduos da mineração, causando contaminação de águas superficiais e subterrâneas, além de promover contaminação na atmosfera nas proximidades das minas, pela geração de gases e material particulado (MP) ou perda de solo fértil (SANCHEZ e FORMOSO, 1990).

O município de Lauro Müller situa-se nas coordenadas 28° 20' S e 49° 20' W no estado de Santa Catarina e apresenta, ainda nos dias de hoje, os dois tipos de procedimentos utilizados para a extração do carvão mineral, sendo que as mineradoras têm seu campo de trabalho situado a no máximo, 12 km da área urbana do município. Esta distância pode levar a contaminação do ar e da água utilizados por sua população, possibilitando, desta forma, contaminação ambiental relevante, e conseqüentemente, contribuindo para a diminuição da sua qualidade de vida.

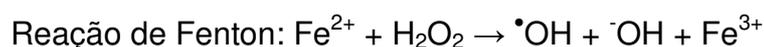
Toda a região situada no entorno das cidades acima citadas, fica exposta ao risco da contaminação atmosférica, em especial por hidrocarbonetos e metais pesados, que são os principais componentes do carvão, já que o relevo da área de estudo proporciona a recirculação das emissões atmosféricas, aumentando o risco de contaminação pela atividade carbonífera (MONTEIRO e FURTADO, 1995). Mais especificamente, a região está cercada por uma cadeia montanhosa em toda a sua extensão, denominada Serra do Rio do Rastro. Esta ocorrência geográfica tem em média 1300m de altitude, e associada ao padrão de circulação (nordeste) de vento predominante na região durante todo o ano, favorece a

O mecanismo pelo qual a carcinogênese é gerada, permanece ainda em estudo, sendo que um dos possíveis mecanismos de sua indução consiste no estresse oxidativo, pela geração das chamadas Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) (BECKMAN e AMES, 1997; SMITH et al., 1998). Há fortes evidências que as ERO e também as Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN) estão envolvidas no desenvolvimento do câncer, não somente por efeitos diretos ao DNA, mas também na alteração de sinais de transdução, proliferação celular, morte celular e comunicação intercelular (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

O carvão em si não aparece como o agente gerador da doença, mas sim outros minerais e elementos como diversos metais pesados presentes no MP durante o processo de extração. Os metais possuem a propensão de perder elétrons formando íons com cargas positivas que tendem a ser solúveis em fluídos biológicos (BENITE et al., 2007). Enquanto íons metálicos apresentam-se deficientes de elétrons, biomoléculas tais como proteínas e DNA são ricas em elétrons. A atração entre estas oposições de cargas conduz a uma tendência geral de íons metálicos interagirem com moléculas biológicas, formando moléculas altamente estáveis (BENITE et al., 2007; FLORA et al., 2002; KAKKAR e JAFFERY et al., 2005; VALKO et al., 2006). Alguns metais podem inclusive induzir *in vitro* a atividade da glutathione S-transferase (GST) e diminuir a concentração de glutathione reduzida (GSH) (KORASHY e EL-KADI, 2008). Já em 1995 STOHS e BAGCHI, descreveram a capacidade que alguns metais de transição apresentam como catalisadores na deterioração oxidativa de moléculas biológicas (proteínas, lipídeos e DNA), e conseqüentemente, atuarem como potencializadores do estado de estresse oxidativo.

As atenções têm sido direcionadas para a geração das ERO e sua ligação com o dano pulmonar e, a partir do mesmo, em outros tecidos (CASTRANOVA et al., 2002; CHO et al., 1999; SHUKLA et al., 2003; ZHANG et al., 2002). O mecanismo essencial do dano tecidual induzido pelo MP do carvão tem sido descrito como sendo mediado pela ativação dos macrófagos e pelo recrutamento dos polimorfonucleares. Esta ativação celular induz a liberação de mediadores inflamatórios como as ERO (DALAL et al., 1995; LI et al., 2008). Os pulmões são o alvo primário das espécies pró-oxidantes geradas naturalmente após a inalação de poluentes atmosféricos (SHUKLA et al., 2003). Além disso, é

sabido que a presença de metais, inclusive os que compõem o carvão mineral da região pesquisada, pode conduzir à formação das ERO, já que há o predomínio, entre outros metais, de cobre e ferro no MP, que podem favorecer tanto a reação de Fenton quanto a de Haber-Weiss conforme segue:



(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).

1.1 COMPONENTES METÁLICOS DO CARVÃO

Os principais componentes metálicos do carvão explorado na região sul de Santa Catarina segundo relatório de composição e resíduos da indústria carbonífera onde o presente estudo foi realizado serão apresentados na seqüência. Antes, porém, deve-se ressaltar que na legislação brasileira (NR-7) (BRASIL, 2005) são colocados valores máximos apenas para o chumbo.

Em todo o mundo, há uma grande dificuldade em determinar valores de referência para estes analitos, e esta dificuldade é decorrente da alta variabilidade da formação do solo, e diferentes constituintes presentes nas amostras analisadas (APOSTOLI, 1992). Portanto, sem estudos prévios, torna-se difícil avaliar o quanto a atividade de mineração pode influenciar na saúde através da indução do acúmulo destes metais nos organismos de indivíduos expostos.

Para tanto, Apostoli (1992) sugere que sejam tomados como referência valores encontrados em indivíduos não expostos às mesmas condições daqueles envolvidos no estudo experimental. A tabela 1 sugere os critérios de exclusão, a serem utilizados para a formação do grupo a ser considerado como referência para os valores aceitáveis, quando da exposição aos componentes metálicos do carvão:

Tabela 1: Critérios para a Formação do Grupo Referência para Concentração de Metais

Critérios bioquímicos de exclusão	Critérios toxicológicos ambientais de exclusão
Doenças sistêmicas	Exposição ocupacional ou ambiental anormal
Desordens Fisiopatológicas	Dano orgânico ou funcional gerado pelo tóxicocinética de metais.
Uso de drogas ou fármacos	
Estados Fisiológicos modificados	

Fonte: IFCC (1987)

1.1.1 Chumbo

O chumbo é um elemento não essencial abundante em toda a crosta terrestre e é utilizado desde a antiguidade. Este uso tem causado contaminações do ar e do solo, e fez com o que o chumbo fosse conhecido como capaz de induzir uma grande quantidade de disfunções bioquímicas, fisiológicas e comportamentais em diferentes espécies, inclusive a humana (GOYER, 1996; RUFF et al., 1996; FERRARO et al., 2004).

Quando o indivíduo está exposto a concentrações relativamente grandes durante um longo período, o metal pode levar a distúrbios em praticamente todas as partes do organismo, desde o sistema nervoso central até o sangue e rins, culminando com a morte. Em concentrações baixas, há alteração na produção de hemoglobina, por interferência no metabolismo do ferro e em processos bioquímicos cerebrais, já que este metal interfere na ação de determinadas enzimas ativas neste sítio. Isso produz alterações psicológicas e comportamentais, sendo a diminuição da capacidade cognitiva um dos principais efeitos (RUFF et al., 1996). Os efeitos tóxicos desse metal são consequência de alterações nas

membranas celulares e nas enzimas, causadas por interações com complexos contendo ligações enxofre, fósforo, nitrogênio e oxigênio (FERRARO et al., 2004).

A propriedade de se ligar a esses elementos, confere ao chumbo igualmente a capacidade de se ligar também ao DNA, RNA e enzimas, inativando ou inibindo sua síntese. Ainda segundo Ferraro e colaboradores (2004), a intoxicação por chumbo (II) aumenta significativamente os danos ao DNA, principalmente porque induz quebra simples na fita e, conseqüentemente, quebra dupla, como resultado da inativação de alteração nos mecanismos de reparo. Os valores aceitáveis para o chumbo de acordo com a legislação brasileira é de 50 µg/g creatinina e o índice biológico máximo permitido (IBMP) é de 100 µg/g creatinina (BRASIL, 2005).

1.1.2 Cobre

O cobre é um metal de transição, capaz de realizar um ciclo redox entre seus dois estados, Cu^{+++} (II) oxidado, e Cu^{++} (I) reduzido. Virtualmente, todos os organismos requerem cobre como co-fator catalítico para processos biológicos, como a respiração, transporte de ferro, produção de hormônios peptídicos, pigmentação, crescimento e desenvolvimento celular (PUIG & THIELE, 2002). No entanto, o cobre participa também de reações capazes de gerar radical hidroxil, que pode levar a danos nos lipídeos proteínas e DNA (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

A intoxicação aguda ocorre mais freqüentemente após a ingestão de sulfato de cobre, encontrados, por exemplo, em algicidas aplicados aos reservatórios de águas, piscinas, corantes industriais, na conservação de alimentos, inseticidas, germicidas, na indústria para preservação de madeiras, tinturas de cabelo, ou outros sais de cobre, sendo a necrose hepática uma característica da sua intoxicação crônica. No entanto, o cobre é um cofator comum para muitas enzimas, incluindo as oxidases e oxigenases e, semelhante ao ferro, o cobre age como um catalisador na formação de ERO (Reação de Fenton) desencadeando a peroxidação lipídica da membrana.

Vários estudos realizados *in vitro* e *in vivo* mostraram a habilidade do cobre em reagir com diversas substâncias indutoras da lesão do DNA por citotoxicidade, como por exemplo, a hidroquinona, como também a produção aumentada de oxigênio singlet. Todavia, os neutrófilos fagocíticos são grandes produtores de oxigênio singlet e são escassos os sistemas de varredura dos mesmos (TAPIA e ARAYA, 2006). A literatura específica apresenta valores para o cobre entre 13 a 36 $\mu\text{g. L}^{-1}$ (IYENGAR e WOLTTIEZ, 1988; MINOIA et al., 1990; FORTE et al., 2004; OHASHI et al., 2006; BENES et al., 2002).

1.1.3 Ferro

É o quarto elemento mais abundante da crosta terrestre (aproximadamente 5%) e, entre os metais, somente o alumínio é mais abundante (TAPIA e ARAYA, 2006). Normalmente, pouquíssimas quantidades de ferro estão presentes na maioria das células do organismo, no plasma ou em outros líquidos extracelulares, e o organismo conserva de forma rigorosa sua reserva de ferro (BURTIS et al., 2008).

Na espécie humana pode ocorrer em duas formas fundamentais através das fontes nutricionais: heme e não heme. A heme refere-se às formas derivadas de fontes animais, nas quais a molécula de ferro aparece fortemente ligada a um anel porfirínico, tanto na mioglobina quanto na hemoglobina. A forma não heme refere-se a todas as outras formas de ferro, inclusive aquelas encontradas no MP do carvão (BEARD & HAN, 2009).

A absorção do ferro apresenta dois processos fundamentais de regulação: o primeiro é a quantidade e a forma na qual o ferro se apresenta na fonte de onde deve ser removido; o segundo, o *status* do íon ferro no indivíduo (AISEN et al., 2001). Portanto, a quantidade de ferro a ser absorvida, será proporcional às quantidades de ferro presentes no organismo do indivíduo. Este processo de absorção seletivo é o mecanismo fundamental pelo qual a espécie humana regula o balanço de ferro (BOTHWELL et al., 1979).

Concentrações anormais de ferro aparecem em diferentes desordens do sistema nervoso, especialmente naquelas que envolvem controle de movimento

(ZECCA et al., 2004). Além disso, é sabido que nas placas neuríticas presentes na doença de Alzheimer o ferro está presente como um de seus componentes (ROGERS et al., 2002).

Os íons, Fe e Cu, têm a capacidade de doar e aceitar elétrons, o que os permite reagir com outros compostos que geram ERO, os quais podem afetar rapidamente as membranas celulares, proteínas e o DNA (TAPIA e ARAYA, 2006). Para este metal, a literatura apresenta como valores encontrados em diferentes populações de $8,25 \pm 5,40 \mu\text{g.L}^{-1}$ a $129 \mu\text{g.L}^{-1}$ (IYENGAR e WOLTTIEZ, 1988; FORTE et al., 2004). Na legislação brasileira (NR-15; NR-7), que dispõe sobre parâmetros do controle biológico da exposição a agentes químicos, o ferro não está presente, e, portanto não apresenta valores de referência (BRASIL, 2005).

1.1.4 Manganês

O manganês é bioquimicamente essencial como constituinte de metaloenzimas e ativador enzimático. Como ativador, pode agir ligando-se ao substrato ou diretamente à proteína, causando alterações conformacionais (BURTIS et al., 2008). O manganês absorvido de fontes alimentares é escassamente absorvido, e a pequena parte absorvida, é rapidamente ligado à α_2 – macroglobulinas, ou permanecer livre antes de seu rápido transporte ao fígado e conseqüente eliminação pela bile (KAKKAR E JAFFERY, 2005).

As exposições ocupacionais mais significativas ocorrem pelo fumo e por MP ricos em Mn, como as advindas da mineração de carvão. Nas exposições ocupacionais, como a mineração, a principal via de introdução e absorção de manganês, é o trato respiratório (FLORA et al., 2002). No sangue, o manganês encontra-se principalmente nos eritrócitos, onde sua concentração é cerca de 20 a 25 vezes superior à plasmática. Também são encontrados níveis relativamente elevados nos pulmões, rins, glândulas endócrinas (tireóide, pituitária, supra-renais), intestino delgado e testículos (FLORA et al., 2002).

Os sinais e sintomas de intoxicação envolvem anorexia, cefaléia, insônia e fraqueza geral. As manifestações extrapiramidais incluem distúrbios da fala e redução da habilidade nos movimentos finos (KAKKAR E JAFFERY, 2005). A

resposta tóxica nos seres humanos, quando expostos a grandes quantidades, sofrem acumulação principalmente na *substancia nigra* do cérebro, podendo levar a uma síndrome semelhante ao Parkinson (BURTIS et al., 2008). Iyengar e Woltiez (1988) referiram como valor de referência para o manganês, o intervalo de 0,5 a 9,8 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

1.1.5 Zinco

O zinco é um componente de quase 300 enzimas em todas as espécies (VALEE, & AULD, 1990). Nos humanos, destacam-se a anidrase carbônica, fosfatase alcalina, DNA e RNA polimerase e álcool desidrogenase (ANGER, 2003; BURTIS et al., 2008). O metal é encontrado na insulina, nas proteínas “dedo de zinco” (*zinc finger*), e em diversas enzimas como a superóxido dismutase (ANGER, 2003). É encontrado em diversos alimentos como nas ostras, carnes vermelhas, aves, alguns pescados, mariscos, favas e nozes. A ingestão diária recomendada de zinco é em torno de 10 mg, menor para bebês, crianças e adolescentes (devido ao menor peso corporal), e algo maior para as mulheres grávidas e durante o aleitamento (COUSINS & HEMPE, 1990).

A deficiência de zinco pode produzir retardamento no crescimento, perda de cabelo, diarreias, impotência sexual e imaturidade sexual nos adolescentes, apatia, cansaço e depressão, lesões oculares e de pele, inclusive acne, unhas quebradiças, amnésia, perda de apetite, perda de peso e problemas de crescimento, aumento do tempo de cicatrização de ferimentos e anomalias no sentido do olfato (BURTIS et al., 2008). As causas que podem provocar uma deficiência de zinco são a insuficiente quantidade na dieta alimentar e a dificuldade na absorção do mineral, que pode ocorrer em casos de alcoolismo, quando é eliminado pela urina (BURTIS et al., 2008).

Em excesso, o zinco é tóxico, interferindo com o metabolismo de outros minerais no corpo, especialmente de ferro e cobre (MAURICE, 1994). Depois da ingestão de 2g ou mais de zinco surgem sintomas de envenenamento, que incluem náusea, vômitos e febre (MAURICE, 1994). A concentração de zinco na urina, dependendo da dieta, está entre 50 a 1000 $\mu\text{g}/\text{dia}$ (IUPAC, 1995). Achados na

literatura referem valores entre 270 a 712 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (BENES et al., 2002; IYENGAR e WOLTTIEZ, 1988; MINOIA et al., 1990; FORTE et al., 2004).

1.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

O oxigênio é importante para o fornecimento de ATP através de processos oxidativos, e, no entanto, favorece também a formação de espécies intermediárias daquela redução que podem ser prejudiciais e denominadas de espécies ativas de oxigênio (ERO) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007, 1999).

A reação de formação destas espécies baseia-se na presença de dois elétrons não pareados com spins paralelos. Um destes dois elétrons deve sofrer uma inversão de spin, e para que haja esta inversão, é necessária uma alta energia de ativação, o que pode ser extremamente desfavorável. Por outro lado, a redução de apenas um dos elétrons não está sujeita a esta barreira energética, o que facilita a formação das ERO (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Aproximadamente 2% do oxigênio utilizado na cadeia respiratória sofre redução univalente, favorecendo, desta forma, a produção de ERO (CHANCE et al., 1973; BOVERIS e CADENAS, 1982). Estas espécies são capazes de reagir com qualquer tipo de molécula orgânica, tendo elevada capacidade deletéria (AMES et al., 1993). Dentre os radicais formados, o mais reativo e deletério é o radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$) que é o mais provável iniciador das reações em cadeia que levarão à formação dos peróxidos de lipídeos e radicais orgânicos (AMES et al., 1993).

Os alvos dos danos oxidativos, são todas as moléculas biologicamente importantes, isto é; proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos nucleicos. Nas proteínas os principais efeitos são a carbonilação, *cross-linking* e agregação protéica, com a conseqüente perda de função (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007, 1999). A peroxidação lipídica invariavelmente leva ao dano de sua estrutura molecular, sendo que quando os mesmos fazem parte de alguma estrutura celular, a mesma tem sua conformação e função prejudicadas (AMES et al., 1993; SIES, 1999). Em relação à estrutura do DNA, já existem descritas pelo menos 20 tipos de

lesões provenientes da ação oxidativa destas espécies muitas delas indicativas de mutação (FLOYD, 1990).

Apesar da alta capacidade de formação das ERO, os organismos são também capazes de detoxificá-las, através da ação de defesas intra e extracelulares, enzimáticas ou não, que podem prevenir a formação, inibir a ação e reparar o dano causado pelas mesmas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Quando um desequilíbrio entre estas defesas e a produção de ERO é atingido, instala-se a situação de estresse oxidativo (SIES, 1985; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

1.3 ESTRESSE OXIDATIVO

As células apresentam sistemas pró-oxidantes/antioxidantes que produzem e detoxificam oxidantes de modo contínuo durante o metabolismo aeróbio normal, porém quando ocorrem eventos oxidativos adicionais, combinado ou não com a depleção de antioxidantes, é desencadeado um desequilíbrio nesses sistemas, resultando em danos oxidativos às biomoléculas descritas anteriormente (SIES, 1985).

O estresse oxidativo pode levar a uma alteração nos sistemas antioxidantes ao induzir ou reprimir proteínas que participam desse processo, ou ainda depletar as reservas celulares de antioxidantes (SIES, 1985; THOMAS, 2003). O alvo celular primário do estresse oxidativo depende do tipo de célula, da natureza das ERO (radical ou não radical), do local da geração (intra ou extracelular) e da proximidade do alvo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1996).

Quando o dano é moderado, ocorre o aumento da síntese de defesas antioxidantes para compensar o desequilíbrio, porém o estado crônico de estresse oxidativo contribui para o declínio das funções celulares, o envelhecimento, a mutação espontânea e numerosas doenças (FRIDOVICH, 1998; WILHELM FILHO; 2001; FANG et al., 2002).

O estresse oxidativo está associado a inúmeras doenças em humanos e outros organismos, tem sido considerado o fator mais importante no desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (NAJI, 2001).

1.4 DEFESAS ANTIOXIDANTES

Os organismos aeróbios, dependentes do metabolismo oxidativo, desenvolveram um sistema de defesa antioxidante para detoxificar as formas reativas de oxigênio e nitrogênio. Sob condições fisiológicas, o estresse oxidativo produzido é combatido por um complexo sistema de defesa antioxidante (HALLIWELL, 1996; FANG, 2002). Qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada à do substrato oxidável, atrase ou iniba a oxidação desse substrato de maneira eficaz, protegendo as células contra a ação dos oxidantes, pode ser chamada de antioxidante (SIES, 1993; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

A proteção celular pode ser realizada de duas diferentes formas: atuando como detoxificadora do agente, impedindo a sua formação e, conseqüentemente, o ataque a lipídeos, proteínas e às bases do DNA; ou exercendo a função de reparo da lesão ocorrida, processo que está relacionado com a remoção dos danos à molécula de DNA e a reconstituição de membranas celulares (BIANCHI e ANTUNES, 1999).

Muitos constituintes nutricionais são fontes importantes desses agentes protetores contra a ação de ERO. Esses constituintes consistem principalmente em vitaminas ("C", "E" e carotenóides), polifenóis e minerais (zinco, cobalto, cobre, selênio) (SIES, 1993; MEYDANI, 1998).

Evidências claras também mostram que o consumo de alimentos com propriedades antioxidantes está inversamente associado ao risco de doenças ocasionadas pelo estresse oxidativo (HALLIWELL, 1996). Os antioxidantes endógenos e exógenos atuam sinergicamente, compondo um sistema antioxidante endógeno que inclui principalmente, em termos endógenos, enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), e também substâncias não enzimáticas, como a glutathione (GSH), ácido úrico e alguns hormônios como o estradiol, entre outros (HALLIWELL, 1996; NIJVELDT et al., 2001).

1.4.1 Antioxidantes Endógenos

Os antioxidantes endógenos são sintetizados no organismo humano e demais organismos aeróbios e compõem um sofisticado sistema enzimático e não enzimático de defesa (BIANCHI e ANTUNES, 1999).

A superóxido dismutase (SOD) constitui-se como uma das enzimas mais importantes que atuam como antioxidante celular, estando presente nos organismos aeróbios sob três formas distintas, de acordo com a presença do cofator metálico no seu sítio ativo: cobre e zinco (Cu/Zn-SOD), manganês (Mn-SOD) e ferro (Fe-SOD; somente em bactérias) (DIPLOCK et al., 1998; SARNI e LEITE, 2003). As SODs são encontradas no citosol de células eucariontes, na mitocôndria e no espaço extracelular dos mamíferos e catalisam a conversão do ânion superóxido a peróxido de hidrogênio (reação de dismutação) (MACCARA e FRIDOVICH, 1969).

A catalase está presente em grande quantidade em quase todos os tecidos, principalmente em peroxissomas hepáticos sendo escassa no cérebro, coração e músculo esquelético. Possui como sítio ativo um grupo heme (Fe^{+2}) que catalisa a reação onde o peróxido de hidrogênio é detoxificado especificamente em H_2O e $\text{O}_2\cdot$.

A glutathiona peroxidase (GPx) é a principal peroxidase em vertebrados. Tanto a catalase como a glutathiona peroxidase possuem efeito protetor, no sentido de que ambas removem o peróxido de hidrogênio (SAGARA et al., 1998; SARNI e LEITE, 2003).

A glutathiona (GSH) é o mais abundante tiol de baixo peso molecular encontrado em vegetais, fungos, bactérias aeróbias e animais. Entre suas ações, pode servir como substrato para a glutathiona peroxidase e também detoxificar metabólitos reativos de oxigênio provenientes do ambiente (xenobióticos, através da GST) e do próprio organismo, agindo como agente redutor aceitando elétrons das ERO, neutralizando-as e transformando-as em espécies menos tóxicas (SAGARA et al., 1998; CLARKSON e THOMPSON, 2000).

1.4.2 Antioxidantes Exógenos

Entre os mais importantes estão os tocoferóis (α -tocoferol e γ -tocoferol), a vitamina C, os compostos bioativos encontrados em plantas, como os flavonóides, fitoestrógenos, carotenóides como o licopeno e o β -caroteno e os minerais como zinco, cobre, selênio e manganês. A seguir serão descritos em maior detalhe os antioxidantes exógenos de interesse para este estudo.

1.4.2.1 Vitamina E

Descoberta em 1922 por Evans e Bishop como um micronutriente essencial para a reprodução em ratos, a vitamina E foi redescoberta nos anos 50 como fator 2 por Klaus Schwarz, posicionando-se dentro do contexto do sistema celular antioxidante, juntamente com os aminoácidos sulfurados (fator 1) e o selênio (fator 3).

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 (VALKO et al., 2006). Ocorre na natureza em oito formas estruturais: quatro tocoferóis e quatro tocotrienóis (BRIGELIUS-FLOHÉ e TRABER, 1999; JIANG et al., 2001). Tanto os tocoferóis quanto os tocotrienóis possuem um anel δ -cromanol e uma cadeia lateral; esta cadeia é de natureza isoprênica, constituída por 16 átomos de carbono, sendo responsável pela lipossolubilidade da vitamina E (BIANCHINI-PONTUSCHKA e PENTEADO, 2003). Os diferentes isômeros desses compostos diferem entre si pelo número e pela posição de grupos metil no anel cromanol. A forma α -tocoferol é predominante em tecidos humanos e a principal em suplementos nutricionais. Também observou-se que o α -tocoferol complementa a ação da glutatona que, similarmente, realiza a varredura de mutágenos eletrofílicos

na fase aquosa da célula (BRIGELIUS-FLOHÉ e TRABER, 1999; JIANG et al., 2001).

Após sua oxidação, ocorre a formação do radical tocoferoxil, que migra da dupla camada lipídica para o meio aquoso, reagindo com a vitamina C, sendo oxidado e retornando à sua forma original estável. Desta forma, a vitamina C e também a glutatona, são capazes de realizar a regeneração da vitamina E, já que são doadores de hidrogênio. No entanto, esse fenômeno depende da oferta de antioxidantes hidrossolúveis e da atividade metabólica das células (TRABER, 2007), razão pela qual são utilizadas de forma combinada em estudos que envolvem suplementação antioxidante (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

A atividade antioxidante da vitamina E tem levado estudiosos a avaliar a sua habilidade para prevenção de doenças crônicas, especialmente aquelas relacionadas ao estresse oxidativo envolvendo doenças cardiovasculares, câncer e desordens neurodegenerativas (BRIGELIUS-FLOHÉ e TRABER, 1999; TRABER, 2007; ROBERTS II e TRABER, 2009).

1.4.2.2 Vitamina C

A vitamina C é considerada um dos antioxidantes exógenos mais poderosos, apesar de seu fraco potencial redutor (CADENAS, 1997). Ela é solúvel em água, sendo encontrada em altas concentrações em muitos tecidos e capaz de reagir diretamente com o ânion superóxido, radical hidroxil e oxigênio singlete (CLARKSON e THOMPSON, 2000). Há evidências em estudos *in vitro* que a vitamina C é capaz de reagir com o radical tocoferoxil, regenerando-o em tocoferol (TRABER, 2007).

Porém, estudos *in vitro*, também observaram que o alto consumo de vitamina C pode ser deletério e apresentar efeitos pró-oxidantes por reduzir o íon férrico (Fe^{+3}) a íon ferroso (Fe^{+2}), que pode catalisar a reação de Fenton produzindo o radical hidroxil e causando peroxidação lipídica. No entanto, esses efeitos não foram observados *in vivo*, pois as concentrações utilizadas de ascorbato e íons ferro, não se reproduziam em situação fisiológica (DRAPPER e BETTGER, 1984; ODIN, 1997).

1.4.3 Eficácia da Terapia Antioxidante

Apesar de já bem sedimentados os papéis das vitaminas “C” e “E”, como importantes antioxidantes para todos os organismos aeróbios (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; HALLIWELL, 2009), um grande número de autores tem discutido a validade da suplementação antioxidante, em diferentes tipos de doenças e situações que podem conduzir ao *status* de estresse oxidativo, entre elas as doenças cardiovasculares como a aterosclerose, hipercolesterolemia poligênica, doença de chagas, hepatite C e a exposição à xenobióticos (BLUMBERG, e FREI, 2007; FARIAS, 2009; RIBEIRO, 2009, POSSAMAI, et al., 2009, AVILA et al., 2009).

Em estudos recentes, um novo caminho para a quebra do paradoxo existente entre as doenças anteriormente citadas e a eficácia da suplementação parece ter sido quebrado (HALLIWELL, 2009; ROBERTS II, et al.; 2009). Os resultados positivos alcançados com a suplementação realizada por um período mais longo e com doses mais altas de vitamina “E” e “C” que os anteriormente propostos, demonstrado a eficácia esperada. Em recente estudo Roberts e colaboradores, sugeriram o uso de doses entre 800 e 3200 UI/dia por 15 semanas, demonstrando a eficácia da suplementação através da diminuição das concentrações de F_2 – isoprostanos, um biomarcador de lipoperoxidação no plasma.

Além disso, Ribeiro e colaboradores (2009) demonstraram efeitos positivos em pacientes chagásicos que realizaram suplementação antioxidante por seis meses (vitamina E (800mg/dia) e vitamina C (500mg/dia)) tendo conseguido atenuar o dano oxidativo em proteínas, restaurar e aumentar os níveis de vitamina E, e diminuir as atividades das enzimas, SOD, GPx e GR. Esta suplementação foi capaz de atenuar o dano oxidativo causado pelo tratamento contra a doença de chagas, principalmente nos grupos incluídos nos estágios iniciais da doença.

Ainda nesta linha, e utilizando o mesmo protocolo de suplementação, Farias e colaboradores (2009) obtiveram sucesso com o tratamento proposto para indivíduos portadores do vírus HCV. No referido estudo, a suplementação antioxidante diminuiu ou manteve inalterados os processos de lipoperoxidação e oxidação de proteínas, essencialmente em todos os grupos, atenuando os danos

causados pelo estresse oxidativo, além de aumentar os conteúdos de GSH e reduzir significativamente a atividade das enzimas GST, GR e CAT. Ressalta-se, portanto, a importância de estudos como os que estão sendo conduzidos, para que se possa confirmar a eficácia da suplementação, principalmente quando utilizadas na forma profilática, ou seja, antes de um dano maior já ter sido causado pelo estresse oxidativo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar alterações oxidativas no sangue de indivíduos mineradores e de uma amostra da população do município de Lauro Müller, exposta direta e indiretamente aos efeitos da atividade de mineração, antes e após a suplementação diária com vitamina C e vitamina E, durante um período de seis meses.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Verificar as diferenças nos níveis sanguíneos das defesas antioxidantes enzimáticas (CAT, SOD, GPx, GR e GST) de indivíduos expostos direta e indiretamente à atividade de mineração do carvão, antes e depois da administração diária de vitamina E (800 mg/dia), C (500 mg/dia) durante 6 meses;

2. Verificar as diferenças das defesas antioxidantes não enzimáticas (conteúdos sanguíneos de GSH, GSSG e GT, plasmáticos de vitamina E e vitamina C) presentes no sangue destes indivíduos, antes e depois da administração de vitamina E e C;

3. Verificar o comportamento dos indicadores de estresse oxidativo (níveis plasmáticos de TBARS e proteína carbonilada, sanguíneos de GSSG e dano ao DNA através do teste Cometa) nos indivíduos, antes e depois da administração de vitamina E e C;

4. Comparar os resultados obtidos antes e depois da administração de suplementos de vitaminas E e C, entre os diferentes grupos de voluntários, no sentido de verificar a eficácia desta suplementação.

5. Analisar o conteúdo de metais pesados (chumbo, cobre, ferro, manganês e zinco) presentes na urina de indivíduos dos grupos em pauta na fase pré suplementação, tentando relacioná-los com os marcadores de estresse oxidativo presentes no sangue;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi realizado através de um ensaio clínico randomizado por idade e sexo, prospectivo, controlado e realizado em indivíduos que trabalham na extração do carvão (superfície e subsolo, diretamente expostos) e indivíduos que residem nas proximidades da região da extração (indiretamente expostos), em comparação a indivíduos não expostos, antes e após a suplementação vitamínica por um período de seis meses.

3.1 CONSTITUIÇÃO DOS GRUPOS

Foram recrutados 80 voluntários, divididos em quatro diferentes grupos (n=20 por grupo). O primeiro grupo, denominado Exposto Superfície (SUP/SURFACE), foi composto por trabalhadores diretamente envolvidos na extração do carvão em mineração a céu aberto; o segundo grupo, denominado Exposto Subterrâneo (SUB/UNDER), composto por trabalhadores diretamente expostos a extração do carvão em mineração em subsolo ou galerias subterrâneas, o terceiro grupo denominado Residentes (RES), composto por indivíduos que vivem na cidade de Lauro Müller à cerca de 12 Km das áreas de extração do carvão, mas que não tem nenhuma relação profissional com atividades de extração ou qualquer outra atividade que os exponha em contato direto com o minério.

Além dos grupos acima citados, foram recrutados voluntários doadores de sangue, provenientes do Banco de sangue do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC), que compuseram o grupo controle (CONTROLE/CONTROL).

Como critérios de exclusão amostral, foram excluídos da amostra do grupo não exposto, indivíduos que, porventura, tiveram contato profissional ou ocasional com metais pesados componentes do carvão, ou de outra fonte, e que já foram descritos anteriormente. O uso de álcool não foi levado em consideração, pois, para toda a amostra, foi aplicado um questionário, e concluiu-se que, se excluíssem os indivíduos que fazem uso eventual do álcool, não haveria amostra suficiente para a realização do presente estudo. A média de idade e o tempo de

trabalho na mineração foram mantidos homogêneos em todos os grupos, para garantir que o tempo de exposição ou não dos indivíduos fosse praticamente o mesmo. Nenhum dos participantes do estudo, incluindo os do grupo controle, manifestava qualquer doença do tipo crônica.

A triagem dos voluntários foi realizada por contato direto, sendo que os mesmos responderam ao questionário (Apêndice III) proposto pelo pesquisador (adaptado Sales e colaboradores (2006), onde foram avaliados os dados antropométricos, hábitos alimentares, presença de doenças degenerativas, e a utilização de qualquer tipo de suplementação que pudesse interferir nos resultados do presente estudo, além de serem aplicados os critérios de exclusão. Os voluntários devidamente esclarecidos que aceitaram participar do estudo, assinaram o termo de consentimento (Apêndice IV) e foram encaminhados ao local de coleta, gentilmente cedido pela Secretaria de Saúde do Município de Lauro Müller. Os voluntários do grupo controle tiveram suas amostras coletadas no próprio banco de Sangue do HU-UFSC em Florianópolis.

Após a coleta do material biológico, cada voluntário recebeu vitamina C (500 mg) e vitamina E (800 mg), suficientes para três meses de suplementação, quando foram repetidos os contatos para controle do uso da suplementação, e para que se pudesse sanar dúvidas. Neste segundo contato, foram repassadas novas doses de vitaminas, suficientes para mais três meses de tratamento, totalizando seis meses de suplementação. Passado o período de 6 meses, foi realizada a segunda coleta de material biológico, possibilitando desta forma, a detecção do efeito da suplementação antioxidante.

A realização deste estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina, sob protocolo de número 166/2007 (Anexo I).

3.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Imediatamente após a coleta de amostra sangüínea de cada indivíduo, via venosa, em tubo contendo heparina (ou sem heparina para obtenção do soro), uma alíquota de sangue foi separada e precipitada em ácido tricloroacético (TCA

12% 1:4, v:v), sendo estocada imediatamente em nitrogênio líquido (-170°C), até a realização da análise de GSH. A separação dos eritrócitos e plasma, os quais foram utilizados para os ensaios dos marcadores de estresse oxidativo, foi realizada através de centrifugação rápida (3000 g durante 3 min.) do sangue total, para obtenção da fração plasmática e eritrócitos. As amostras foram imediatamente estocadas em nitrogênio líquido até análise no Laboratório de Ecofisiologia Respiratória, CCB, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

As amostras de urina, foram coletadas logo após a coleta da amostra de sangue, sendo então aliquotadas e armazenadas em freezer comum para posterior análise de metais pesados. Esta etapa de preparação das amostras foi realizada nos locais de coleta anteriormente descritos.

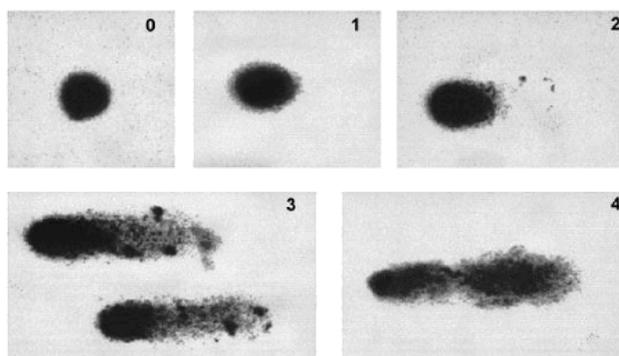
3.3 MARCADORES DE DANO CELULAR

3.3.1 Avaliação do Dano ao DNA (Teste Cometa)

O Teste Cometa de genotoxicidade foi desenvolvido conforme adaptação de Maluf e Erdtmann, para detectar danos no DNA (MALUF; ERDTMANN, 2000).

Para a avaliação do dano, as células foram submetidas a uma carga elétrica realizando-se uma eletroforese, sendo na seqüência coradas com nitrato de prata. Os nucleotídeos com DNA intacto apresentam forma arredondada (dano "0" figura 2), já nas células lisadas, os mesmos migram para fora do núcleo apresentando similaridade à forma de um cometa, de onde se origina o nome do teste. Quanto maior a cauda maior o índice de dano (dano de 1-4; figura 2).

Deve-se ainda ressaltar que a leitura foi realizada com perfil duplo-cego, para que fossem evitadas possíveis interferências nos seus resultados.



Fonte: MALUF; ERDTMANN, 2000

Figura 2: Níveis de Dano ao DNA

3.3.2 Medida da Lipoperoxidação pelo TBARS

A avaliação da peroxidação lipídica endógena foi realizada em triplicata, pela detecção dos seus derivados, presentes no plasma e que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), destacando o seu produto malondialdeído (MDA), produzindo uma base de Schiff de coloração rosa (BIRD; DRAPER, 1984). A concentração de TBARS (nmol/mL) foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de $E_{535} = 156 \text{ mM}$, conforme a fórmula: $[\mu] = [A_{535}] \times 1000 \times \text{diluições} / 156$.

3.3.3 Avaliação do Dano Oxidativo a Proteínas

O dano oxidativo às proteínas por carbonilação foi determinado de acordo com o método proposto por Levine e colaboradores (1990). As amostras de sangue foram homogeneizadas (na diluição de 1: 20) em 5% de ácido sulfossalicílico gelado, e então centrifugadas a 1500 g por 5 min. Os sobrenadantes foram removidos e aos precipitados foram adicionados 0,5 mL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH, 10 mM em 2M de HCl).

As amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 1 hora, sendo vigorosamente agitadas a cada 15 min. Então, foram adicionados 500 μL de TCA 20% e os tubos agitados e centrifugados por 6 min. a 1500 g, sendo os sobrenadantes descartados, o excesso de DNPH removido, lavando-se os

precipitados por três vezes com uma solução de etanol:acetato de etila (1:1), e, em seguida, agitando-se os tubos e centrifugando por 3 min. a 1500 *g*.

Os precipitados resultantes foram dissolvidos em 1,0 mL de cloreto de guanidina 6 M, submetidos à agitação e incubados por 15 min. a 37°C, para dissolução. As absorvâncias máximas no intervalo de 360–370 nm foram determinadas, e os valores finais das proteínas carboniladas ($\mu\text{mol mL}^{-1}$) calculados, utilizando o coeficiente de extinção molar de $E_{360}=22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os brancos foram preparados substituindo-se a DNPH por HCl 2M.

3.3.4 Tióis Totais

A análise dos grupos tióis, ou grupos sulfidrilas (-SH) do plasma envolveu o uso do reagente de Ellman, o 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoato)-DTNB segundo 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 realizada a leitura da absorvância em 412 nm, obtida do plasma que corresponde à quantidade de TNB (ânion tiolato) formado (equivalente à quantidade de grupos sulfidrilas). Os resultados obtidos da leitura dos grupos Tióis foram normalizados de acordo com o nível de proteínas, conforme a metodologia de LOWRY e colaboradores (1951).

3.4 AVALIAÇÃO DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES ENZIMATICAS

3.4.1 Atividade da SOD

A atividade da SOD foi medida em 480 nm, de acordo com o método de Misra e Fridovich (1972), modificado por Boveris e colaboradores (1982), mediante a oxidação da adrenalina (mudança de pH 2,0 para pH 10,0), que produz o ânion superóxido e um cromóforo róseo, o adrenocromo. Quando a amostra era colocada na cubeta, a enzima (SOD) presente nesta alíquota retardava sua formação. Numa cubeta contendo 1,95 ml de tampão glicina 50 mM, pH 10,2, foram adicionados 50

μl de adrenalina 60 mM (mantida em pH em torno de 2,0, gelo e frasco âmbar para evitar sua oxidação).

A velocidade inicial de formação do adenocromo foi monitorada durante cerca de 100 s do início da reação, com acréscimo de absorbância a cada intervalo de 15 s, em torno de 0,013-0,015 unidades, para então adicionar diferentes alíquotas da amostra, geralmente em torno de 30 a 100 μl , dependendo da concentração e atividade da enzima presente nesta alíquota. O tempo total de monitoramento da reação foi de 3 min. Curvas de 4 ou 5 pontos permitiram avaliar indiretamente a atividade enzimática da SOD, medidas em duplicata. Os valores da SOD (U SOD ml^{-1}) foram expressos em termos de atividade da enzima, onde uma unidade arbitrária de SOD é definida como a quantidade de SOD necessária para diminuir à metade a velocidade de formação do adenocromo (MISRA e FRIDOVICH, 1972).

As amostras foram tratadas por uma mistura de clorofórmio:etanol (3:5 v:v), e em seguida por adição de água destilada; após, as amostras foram agitadas vigorosamente e centrifugadas (5000 g durante 4 min) para retirar a hemoglobina presente nos lisados (gradiente de densidade) e impedir a geração e interferência do ânion superóxido artefactual no ensaio (MISRA e FRIDOVICH, 1972).

3.4.2 Atividade da Glutathione Peroxidase (GP_x)

A enzima GP_x catalisa a redução de peróxido de hidrogênio, bem como de outros hidroperóxidos, utilizando a GSH como substrato para esta reação, produzindo GSSG. Para a determinação desta enzima foi utilizado o método de Flohé e Gunzler (1984), usando 10 μl de amostra e 10 μl de *tert*-butilhidroperóxido (t-BuOOH) sendo que para cada 10 mL de tampão fosfato foram adicionados 4,9 μL de T-BuOOH, colocados em 1 ml de um meio de reação. Este meio de reação (50 ml) foi composto de 25 ml de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, 8,6 mg de NADPH, 10 ml de ácido dietilenotriaminopentacético (DPTA) 5 mM pH 7,0, 15 ml de água destilada, 24 mg de GSH, 3,8 μl de GR 5U, ainda 100 μl de KCN 50 mM colocados momentos antes do ensaio.

O método baseia-se em medida indireta pela oxidação (diminuição da absorbância) do NADPH medido em 340 nm, já que o NADPH é utilizado na regeneração de GSH pela GR. Portanto, a velocidade de oxidação do NADPH é proporcional à velocidade de produção de GSSG, a partir de GSH, catalisada pela GPx presente na amostra. Os valores foram expressos em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$. O KCN adicionado ao ensaio evita a interferência do ânion superóxido no ensaio e a superavaliação da enzima devido à oxidação da hemoglobina (FLOHÉ e GUNZLER, 1984).

3.4.3 Atividade da Glutathione Redutase (GR)

O método utilizado foi o de Calberg e Mannervick (1985), que verifica, em 340 nm, durante 30 s, a taxa de oxidação do NADPH devido à formação de glutathione reduzida, a partir da GSSG, pela ação da GR presente na amostra, em um meio de reação (50 ml) contendo tampão fosfato 0,1 M pH 7,0; 8,6 mg de NADPH; 32,7 mg de glutathione oxidada, 10 ml de DPTA 5 mM pH 7,0 e 15 ml de água destilada. Os valores da atividade, analisadas em duplicata, foram também expressos em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ do hemolisado.

3.4.4 Atividade da Catalase (CAT)

Para análise da atividade desta enzima, foi quantificada a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), em 240 nm, pela enzima presente na amostra (AEBI, 1984). Para esse ensaio, foi utilizada a solução de peróxido de hidrogênio (10 mM) em tampão fosfato de potássio (50 mM) pH 7,0 preparadas e tituladas no dia da análise. As amostras são analisadas em duplicata, sendo os valores expressos em $\text{mmol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mL}^{-1}$, utilizando $E_{240}=40 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

3.4.5 Atividade da Glutathione S-Transferase (GST)

A atividade da GST foi medida em 340 nm, de acordo com Habig e colaboradores (1976), onde a 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 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 0,1 M (CDNB) 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 presente na amostra conjugue a GSH ao CDNB, e forme um cromóforo detectável em 340 nm, atividade esta monitorada durante 60 s.

As análises foram feitas em duplicata e os valores expressos em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ do homolisado. Lisados muito concentrados foram diluídos para evitar densidades ópticas elevadas na cubeta, o que poderia interferir na avaliação da cinética enzimática.

3.5 AVALIAÇÃO DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICAS

3.5.1 Determinação dos Níveis Séricos de α -Tocoferol

Anteriormente à realização da detecção de α -tocoferol, conforme será descrito, as amostras foram mantidas em nitrogênio líquido, devidamente acidificadas, para que se pudesse evitar a oxidação do analito. A detecção de α -tocoferol foi feita em um sistema cromatográfico de alta performance (Shimadzu[®] SCL 10A_VP) associado a um detector *photodiode array*, ajustado para uma melhor resposta em um $\lambda=292$ 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[®]), fase móvel MetOH (EM Science[™]) a 1,0 mLmin^{-1} , sob fluxo isocrático (Shimadzu[®] LC10AT_VP). Todos os solventes utilizados na fase móvel tinham grau CLAE, sendo previamente filtrados (Membrana PVDF 0,45 μm - Millipore[®]) antes da injeção no aparelho.

Para a preparação da curva de calibração, partiu-se de uma solução de 10 mM de α -tocoferol (Merck[®]) com sucessivas diluições em MetOH (Merck[®]) obtendo os pontos da curva-padrão (5–10–25–100 μ M). Para os controles, usou-se água desionizada (18,2 Mohm.cm - Milli Q[®]) no lugar de TEP. Os padrões foram filtrados em unidades filtrantes Millex-GV[™] 0,22 μ m (Millipore[®]) e, em seguida, transferidas aos *vials* para injeção no equipamento de cromatografia líquida de alta performance (CLAE). O procedimento utilizado foi realizado segundo descrição de Nicoletti e colaboradores (2001).

3.5.2 Avaliação da Glutathiona Total, Oxidada e Reduzida

A detecção de GSH e GSSG (Sigma[®]) foi feita em um sistema cromatográfico de alta performance (Shimadzu[®] SCL 10A_VP) associado a um detector eletroquímico (ESA[®] Cuolochem III). O sistema utilizou uma célula guarda (ESA[®] 5020), posicionada antes do injetor e ajustada para um potencial de 980 mV. A cela de detecção (ESA[®] 5010), posicionada após a saída da coluna possuía dois eletrodos $E_1 = 650$ mV e $E_2 = 850$ mV ambos ajustados para a detecção de GSH e GSSG, respectivamente. A separação, após injeção automática de 20 μ L da amostra (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 μ m (Phenomenex[®]), fase móvel tampão fosfato (Merck[®]) 50 mM pH 2,7, contendo 50 μ M de ácido octanosulfônico (Sigma[®]), e 2% de Acetonitrila (EM Science[™]) a 1,0 mLmin⁻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 CLAE, sendo previamente filtrados (Membrana PVDF 0,45 μ m - Millipore[®]) antes do uso (RODRIGUEZ-ARIZA, 1994). Para a preparação da curva de calibração, utilizou-se como solução-mãe 1 mM de GSH e GSSG. Após sucessivas diluições na própria fase móvel, obteve-se os pontos da curva-padrão (1,0–10–100 μ M). Os padrões foram filtrados em unidades filtrantes Millex-GV[™] 0,22 μ m (Millipore[®]), e, em seguida, transferidos aos *vials* para injeção no CLAE.

Para metodologia analítica por absorvância, foi utilizado um espectrofotômetro UV-visível marca/modelo GBC para a concentração sanguínea de GSH em precipitado ácido (TCA 12%, 1:4, v:v), determinada através dos pequenos tióis não protéicos, já que a GSH representa aproximadamente 95% destes tióis (BEUTLER et al., 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 permitiam, 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 $\mu\text{mol mL}^{-1}$.

3.6 DOSAGEM DE METAIS PESADOS

Para a determinação dos metais pesados, as amostras foram diluídas em 100 vezes e acidificadas com 1% de ácido nítrico (HNO_3) bidestilado, para um volume final de 10 mL.

A determinação dos metais foi realizada pela técnica de Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado, com introdução da amostra por nebulizador pneumático. Foi realizada a calibração externa do espectrômetro utilizando ródio (Rh) como padrão interno. O equipamento utilizado para as determinações foi um espectrômetro de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado ICP-MS, marca Perkin Elmer SCIEX, modelo Elan 6000, do laboratório da central de análises químicas da UFSC, seguindo a metodologia descrita por Willis (1962).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram expressos em média \pm erro padrão. As comparações entre os diferentes grupos antes da intervenção com a suplementação antioxidante foram realizadas usando ANOVA (análise de variância) de uma via, complementada pelo teste de Dunnet na pré suplementação,

tendo sido assumido como valor mínimo para significância $p < 0.05$. Após a intervenção com a suplementação a comparação intra-grupos foi realizada comparando as situações pré e pós suplementação tendo sido utilizado o teste Tukey como ferramenta estatística.

Todas as determinações foram realizadas em duplicatas exceto o conteúdo de TBARS que foi realizado em triplicata. O programa utilizado para esta análise foi GRAPHPAD Prism, versão 3.0, que também foi aplicado para a confecção dos gráficos e tabelas.

4 RESULTADOS

4.1 MANUSCRITO 1

OCCUPATIONAL AIRBORNE CONTAMINATION IN SOUTH BRAZIL: 1.
OXIDATIVE STRESS DETECTED IN THE BLOOD OF COAL MINERS

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

Manuscrito em impressão no periódico *ECOTOXICOLOGY*, fator de impacto=2,405
(*JCR-2007*).

(DOI 10.1007/s10646-009-0364-8)

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 submetido para publicação no periódico *ECOTOXICOLOGY*.

Vide apêndice II.

5 DISCUSSÃO

Os riscos ocupacionais ligados à atividade da mineração do carvão estão relativamente bem definidos, e várias doenças estão ligadas à sua exposição crônica (NADIF, 2001). Dentre as doenças às quais os trabalhadores desta atividade estão expostos, a mais comum é a pneumoconiose, e dentre as suas principais implicações está incluída a geração excessiva de ERO e, conseqüentemente, o estado de estresse oxidativo (NADIF, 2001; PINHO et al., 2004).

A geração de ERO a partir da exposição aos MP do carvão tem dois mecanismos distintos propostos: i) o mecanismo intrínseco, ligado às propriedades das partículas de carvão e a seus componentes; ii) o estresse oxidativo gerado pela excessiva ativação de células fagocitárias, como os macrófagos e os neutrófilos, na tentativa de eliminar estas partículas (NADIF, 2001).

A condição de estresse oxidativo nos indivíduos participantes do presente estudo foi evidenciada inicialmente pela elevação nas concentrações de TBARS plasmático e de carbonilação das proteínas, os quais são indicadores diretos do aumento da geração de ERO, e de seu efeito deletério sobre distintos componentes celulares, mais especificamente no caso desses dois biomarcadores, o efeito oxidativo sobre membranas e proteínas, respectivamente.

Assim sendo, os principais efeitos das ERO incluem dano às membranas celulares, por processos de lipoperoxidação, oxidação de proteínas, interação com os radicais e grupamentos sulfidril, além de dano ao DNA, por oxidação das bases nitrogenadas e riboses gerando sítios AP, que por sua vez, geram quebras de cadeia nas células-alvo (JANSSEN et al., 1993). A lipoperoxidação é uma reação em cadeia que ocorre com os ácidos graxos insaturados da membrana resultando na formação de radicais dos lipídeos, que podem levar ao dano celular e ao remodelamento tecidual (JANSSEN et al., 1993).

As reações das ERO com as proteínas podem levar à inativação de enzimas envolvidas no metabolismo celular, ou na alteração de componentes intra e extracelulares, enquanto a oxidação do DNA pode levar à morte celular, destruição ou proliferação tecidual (neoplasias) (JANSSEN et al., 1993).

Todos os grupos expostos a MP de carvão mineral apresentaram efeitos oxidativos nos lipídeos, proteínas, bem como aumento de defesas antioxidantes enzimáticas como a GST e depleção dos conteúdos de GSH e TP. Entretanto, não foi detectada nenhuma alteração quanto à fragmentação ao DNA, através do teste Cometa, a qual foi estatisticamente semelhante nos grupos examinados, provavelmente constituindo um biomarcador inapropriado para o prognóstico e monitoramento de indivíduos cronicamente expostos ao MP oriundo da extração de carvão mineral, provavelmente por ser mais sensível a exposições agudas.

Altin e colaboradores (2004), em estudo também realizado com mineiros, encontraram resultados similares aos do presente estudo no que se relaciona à lipoperoxidação, assim como Armutcu e colaboradores (2007), que expuseram ratos ao ambiente de mineração por quatro semanas e também encontraram níveis aumentados de MDA. Resultados similares foram igualmente encontrados por Pinho e colaboradores (2004), mostrando aumento da concentração de TBARS em ratos após 60 dias de exposição a MP relacionado ao pó de carvão de atividade de mineração em Santa Catarina. Resultados ainda coincidentes foram encontrados em ratos expostos à inalação de sílica, um dos principais componentes do MP vinculado ao carvão, realizado por Porter e colaboradores (2004), que encontraram um dano pulmonar progressivo, iniciando com inflamação e progredindo com fibrose mesmo após cessar a exposição ao MP contaminante. Estes resultados indicam que o dano, incluindo aquele induzido pela geração de ERO, continua provavelmente ocorrendo após o período de exposição, mostrando um possível efeito de persistência.

No presente estudo, no entanto, os indivíduos participantes de todos os grupos não apresentaram nenhum sinal de pneumoconiose, e, de acordo com os presentes resultados, mostraram quadro evidente de estresse oxidativo. Houve uma correlação positiva ($r=0,728$; $p<0,05$) entre as concentrações de TBARS e os níveis de cobre encontrados na urina dos indivíduos do grupo de mineiros de superfície na pré suplementação. A presença de maiores concentrações de cobre pode ser fator desencadeante da situação de estresse oxidativo, já que este metal é importante para a inialização da reação de Fenton, conforme afirmado anteriormente (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Os conteúdos sanguíneos de glutathiona total e glutathiona reduzida, além da vitamina E plasmática, mostraram-se diminuídos, indicando sua provável utilização como antioxidante, e confirmando a condição de estresse oxidativo induzido pela exposição crônica ao MP de poeira do carvão. Ainda relacionada aos conteúdos de glutathiona total no grupo de mineiros de superfície, observou-se uma correlação negativa entre este antioxidante e a SOD ($r=-0,624$; $p<0,05$).

A diminuição da atividade da GR poderia ser explicada pela presença de metais como o cobre, que apresenta a capacidade de interferir na atividade desta enzima, além da SOD e da GPx (HATZIS et al., 2006). A atividade diminuída da GR apresentou correlação negativa ($r=-0,524$; $p<0,05$) com as concentrações de Mn na urina dos mineradores de superfície antes da suplementação. Parece haver uma relação entre o aumento do cobre e a diminuição na capacidade de absorção do manganês em humanos (BURTIS et al., 2008).

A GST apresentou-se aumentada em todos os grupos quando comparados ao controle, e este aumento provavelmente representa a necessidade da biotransformação dos xenobióticos favorecendo sua excreção, já que a mesma participa da fase II do processo de eliminação destas moléculas e seus metabólitos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

No entanto, em estudo desenvolvido por Evelo e colaboradores (1993), foram encontrados valores diminuídos para GST em indivíduos nos primeiros estágios de pneumoconiose, quando comparados a mineiros sem nenhuma manifestação da doença. Assim, aquele resultado poderia indicar que, em situações de exposições crônicas, onde o dano tecidual já está instalado e avançado, a GST pode não ser capaz de compensar o dano oxidativo gerado recorrentemente por diferentes xenobióticos presentes no ambiente (WILHELM FILHO et al., 2001).

A enzima CAT apresentou-se aumentada apenas nos trabalhadores da mineração o que poderia estar associado à sua crônica exposição aos xenobióticos derivados do MP relacionado com a extração do carvão mineral.

A atividade da SOD apresentou-se diminuída em todos os grupos expostos, enquanto a GPx apresentou diminuição apenas nos mineiros de carvão de subsolo. A diminuição da GPx parece acompanhar a exposição crônica aos contaminantes atmosféricos (NADIF et al., 2001; ALTIN et al., 2004), o que poderia

resultar em uma concentração maior de hidroperóxidos no interior das células. Muitas células do sistema imune são capazes de produzir ERO, e neste grupo estão incluídos os macrófagos alveolares, os quais têm um papel determinante no processo de reação inflamatória contra a presença do MP relacionado com a poeira do carvão (FORSBERG et al., 2001).

O perfil diminuído da SOD nos grupos expostos talvez reflita sua condição debilitada de detoxificação do radical ânion superóxido. Porém, estudos relacionados com trabalhadores expostos à sílica não revelaram nenhuma diferença significativa na atividade da SOD entre mineiros sadios e três subgrupos que apresentavam pneumoconiose (BORM et al., 1987; ENGELEN et al., 1990).

No entanto, ratos expostos de forma sub-crônica ao ambiente de mina de carvão, revelaram aumentos nas atividades da SOD e GPx, durante a primeira semana de exposição, seguida por uma diminuição na quarta semana de exposição (ARMUTCU et al., 2007). Corroborando estes resultados e os do presente trabalho, Altin e colaboradores (2004) mostraram uma perda progressiva na resposta antioxidante relativa à atividade da SOD e da GPx no plasma, que foram proporcionais ao dano pulmonar (fibrose) detectado por tomografia computadorizada. Este decréscimo aparente na capacidade de antioxidante foi acompanhado pelo persistente aumento nos níveis de MDA, que parece interferir na atividade da SOD e da GPx, remetendo aos mesmos resultados do presente estudo.

A GR não apresentou nenhuma diferença entre os grupos estudados, e este perfil repetiu-se em outros dois estudos realizados em paralelo ao presente trabalho, onde foram avaliados trabalhadores de incineração de lixo hospitalar (POSSAMAI et al., 2009), e também trabalhadores de uma usina termelétrica que utiliza o carvão como combustível (POSSAMAI et al, submetido à publicação).

Deve-se ressaltar que, na presença de metais de transição como o ferro e cobre o H_2O_2 é convertido em radical hidroxil (HO^\bullet), através da reação de Fenton. Vários autores têm descrito que a inalação de poluentes leva, tanto em condições *in vivo* quanto *in vitro*, à excessiva formação de radicais HO^\bullet durante a fagocitose (CASTRANOVA et al., 1996; KADIISKA et al., 1997). Tanto a área industrial quanto a agricultura, tem contribuído consideravelmente para o aumento das concentrações de metais pesados nos organismos, através de depósitos de lixo

inadequados, deposição atmosférica e no simples uso de fertilizantes e pesticidas (CUI, 2005). Metais, incluindo o ferro, cobre, cromo e vanádio, diminuem o conteúdo de glutatona e grupos sulfidrilas de proteínas, resultando na geração de ERO, como anion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila (STOHS e BAGCHI, 1995). Com isso, favorecem a lipoperoxidação, dano aos grupos sulfidril e alterações na homeostase do cálcio (STOHS e BAGCHI, 1995), vindo confirmar os resultados neste trabalho, onde estão correlacionados os aumentos de ferro, chumbo, cobre e zinco na urina e os níveis de TBARS e PC no plasma dos indivíduos expostos direta e indiretamente ao MP do carvão.

Ainda, Soyeon e colaboradores (2008), quando avaliaram o risco que indivíduos residentes no entorno de minas abandonadas, verificaram que, mesmo após a parada da atividade de mineração, as mesmas ofereciam riscos à saúde da população por persistentemente contaminarem o ar, cursos d'água e lençóis freáticos.

Os resultados encontrados na primeira fase do estudo permitem afirmar que os indivíduos expostos ao MP emitido pela extração do carvão sejam por habitarem regiões próximas às áreas de extração, ou por trabalharem diretamente na mineração, estão em constante condição de estresse oxidativo. Esta condição poderia estar sendo desencadeada pela simples inalação do MP presente na atmosfera da região ou ambiente de trabalho, ou ainda, através da presença de altas concentrações de metais advindos da exposição crônica a este MP, por sua presença na composição do carvão mineral da região, que, conforme demonstrado nos relatórios em anexo, é rico em cobre, ferro, zinco e chumbo.

Dois mecanismos poderiam ser sugeridos como gatilhos para o disparo da situação de estresse oxidativo nos indivíduos expostos aos MP do carvão: A) ativação dos macrófagos e neutrófilos, no intuito de diminuir o efeito deletério destas partículas, em nível pulmonar; B) presença de metais inalados além de outros componentes do MP, que são incorporados e se acumulam no sangue e tecidos, sendo que ambos favorecem a formação de ERO, e conseqüentemente, geram desequilíbrio nas defesas antioxidantes, ou seja, a referida condição de estresse oxidativo (SIES, 1985).

No presente trabalho sugere-se a segunda hipótese seja predominante apesar de não excludente, já que após a dosagem de metais pesados, foram

detectadas concentrações significativamente maiores de chumbo, cobre, ferro e zinco, tanto no sangue de trabalhadores quanto residentes, quando comparados ao grupo controle. Possamai e colaboradores (Chemosphere, submetido), encontraram resultados semelhantes em trabalhadores e residentes em área de usina termoelétrica que utiliza carvão como combustível.

Ressalta-se que o acúmulo de ferro e cobre pode ser indutor de uma maior injúria oxidativa em todos os tecidos, já que estes dois metais, em sua forma livre e/ou em excesso, têm como característica catalisar a reação de Fenton, levando à formação de radical hidroxil e, conseqüentemente, aos diversos danos relacionados com sua geração excessiva (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Além deste mecanismo, os metais têm a propriedade de reagir com as enzimas antioxidantes através de sua interação com o grupamento sulfidril presente no sítio ativo das enzimas ou em seus metais essenciais dos respectivos grupos prostéticos (GENSHENG, 2008; WANG et al., 2008).

A partir destes resultados prévios à suplementação, a segunda fase do presente estudo consistiu na introdução da suplementação antioxidante, na tentativa de reverter o quadro de estresse oxidativo detectado, relacionado com os efeitos da exposição aos constituintes atmosféricos advindos do MP da mineração do carvão.

Após a suplementação, foi possível observar a quase total reversão do estado de estresse oxidativo nos indivíduos expostos direta ou indiretamente ao MP derivado da extração do carvão mineral. Os marcadores de dano como TBARS e proteína carbonilada foram diminuídos, enquanto que a GSH e os grupos tióis de proteínas, mostraram aumento, sugerindo a capacidade protetora da atuação sinérgica entre as vitamina E e C, relativamente aos lipídeos e proteínas celulares.

O ascorbato pode atuar contra a peroxidação de lipídios de duas maneiras: no plasma sanguíneo, atua na prevenção através da reação com as ERO presentes, ou na restauração da estrutura lipídica, doando hidrogênio ao radical lipídio (BUETTNER, 1993). O ascorbato desempenha ainda papéis metabólicos fundamentais no organismo humano, reduzindo metais de transição (em particular Fe^{3+} e Cu^{3+}) presentes nos sítios ativos das enzimas ou nas formas livres no organismo (HALLIWELL, 1999).

Corroborando os presentes resultados, Armutcu e colaboradores (2007), mostraram em ratos expostos ao carvão e tratados com erdosteína, um antioxidante que possui um grupamento sulfidril doador de elétrons, a reversão da lipoperoxidação, alcançando valores próximos aos do grupo controle. Em outro estudo paralelo ao presente, conduzido por Possamai e colaboradores (Ecotoxicology, em impressão), o mesmo efeito antioxidante protetor foi observado em trabalhadores e residentes expostos ao MP emitido por usina de incineração de resíduos sólidos da saúde, utilizando as mesmas doses propostas em nosso estudo.

Relativamente às defesas antioxidantes enzimáticas, após a suplementação antioxidante, observou-se aumento da atividade da SOD, que na situação de pré-suplementação esteve diminuída, e uma diminuição nas atividades da CAT, GST e GPx, para níveis próximos àqueles do controle. Quanto às defesas antioxidantes não enzimáticas, pode-se observar aumento do conteúdo plasmático do α -tocoferol, sugerindo o efetivo uso da suplementação em todos os grupos expostos, além dos aumentos dos níveis de glutathiona reduzida e de tióis proteicos.

Vários autores demonstraram a direta relação entre a inalação de MP e o desenvolvimento de várias doenças pulmonares, tanto mediadas por processos inflamatórios como por produção excessiva de ERO (CHO et al., 1999; ZHANG et al., 2002; CASTRANOVA et al., 2002; SHUKLA et al., 2003).

Poucos estudos têm descrito os possíveis efeitos da suplementação com antioxidantes exógenos em indivíduos expostos ao MP de constituintes atmosféricos, mais especificamente em situação de estresse oxidativo. Sabe-se que os primeiros alvos após a inalação da poeira de carvão são os pulmões, através da produção de oxidantes pela própria combustão do oxigênio (SHUKLA et al., 2003).

Pinho e colaboradores (2005) mostraram a eficácia da suplementação com N-acetilcisteína (NAC) em ratos expostos agudamente à poeira do carvão, tendo obtido resultados similares aos encontrados no presente estudo em relação ao TBARS e à proteína carbonilada. Naquele estudo, as atividades da CAT e SOD foram diminuídas após a suplementação com NAC, quando comparadas aos controles, corroborando também os presentes resultados. O mesmo perfil constatado nos mineiros e residentes da região de extração de carvão foi

encontrado igualmente em trabalhadores envolvidos com a queima de carvão mineral e indivíduos residentes em região próxima a uma usina termoeletrica (POSSAMAI et al., submetido à publicação). Além deste estudo mencionado, Possamai e colaboradores (2009) conduziram avaliação do perfil antioxidante antes e após a suplementação em indivíduos expostos à incineração de resíduos sólidos de serviços de saúde, que também gera MP, obtendo resultados similares aos do presente trabalho, reforçando o conceito de que a exposição a qualquer tipo de MP pode gerar uma resposta oxidativa e trazer danos à população exposta.

Apesar de muito estudada em modelos animais, a eficácia da suplementação vitamínica em humanos, ainda tem sido motivo de diversos conflitos entre diferentes autores (BLUMBERG e FREI, 2007). A eficácia da suplementação com as vitaminas “C” e “E” tem sido questionada envolvendo estudos com diferentes doenças, em especial a aterosclerose (TRABER, 20007). Além de estados patológicos, o uso desta suplementação é proposto em situações nas quais os indivíduos estejam expostos à condição de estresse oxidativo.

A questão que envolve as dúvidas relacionadas à eficácia da suplementação pode ser devida a três aspectos: i) Em alguns casos as ERO podem não estar envolvidas na situação que gera a condição de doença; ii) O início da suplementação pode ter ocorrido após o estado de doença já estar bem avançado ou constituir um caráter crônico, o que dificulta ou mascara seu efeito benéfico; iii) As doses utilizadas, bem como o uso isolado de alguns antioxidantes podem não ser suficientes para que sejam eficazes (HALLIWELL, 2009).

Roberts e colaboradores (2007) determinaram a necessidade de doses superiores a 400 UI de vitamina E para que a mesma fosse capaz de exercer seu efeito protetor em relação ao excesso de geração de ERO em pacientes com hipercolesterolemia, determinando a necessidade de doses ainda maiores em casos da forma de vitamina E utilizadas não ser a natural (*RRR* – α – tocoferol). Naquele estudo, verificaram aumento significativo da eficácia da suplementação, a partir do uso de 800 mg, quando comparadas ao grupo placebo. A vitamina E em doses de 800, 1600 e 3200 mg foi capaz de diminuir as concentrações de marcadores do estresse oxidativo. Reforça-se aqui a utilização de doses diárias de 800mg de vitamina E empregadas no presente estudo.

Os resultados aqui apresentados indicam a eficácia da suplementação vitamínica como protetores dos efeitos da resposta oxidativa em indivíduos expostos aos contaminantes atmosféricos gerados pela mineração do carvão. É necessária uma abordagem mais profunda sobre o tema em pauta para que se possa validar a eficácia do tratamento, apesar de que, considerando as doses seguras (ROBERTS II, et al., 2009) destes suplementos nutricionais, seria possível recomendá-las no cotidiano dos indivíduos expostos e acometidos por esta contaminação ambiental.

6 CONCLUSÕES

i) Os resultados obtidos na fase de pré-suplementação mostraram que a exposição dos indivíduos ao MP remete a uma condição sistêmica de estresse oxidativo, provavelmente relacionado com o conteúdo aumentado de metais pesados detectados na urina. Mais especificamente, os aumentos dos níveis de TBARS e de proteína carbonilada, somados à depleção das defesas antioxidantes não enzimáticas como os níveis de GSH e α -tocoferol, aumentos da atividade da GST e da CAT e diminuição da atividade da SOD, GR e GPx, estão relacionadas ao grau de exposição dos indivíduos;

ii) A injúria oxidativa decorrente da exposição aos MP foi significativamente atenuada através do tratamento com os antioxidantes exógenos durante seis meses, os quais mostraram ser efetivos em reverter a situação de estresse oxidativo, quando comparados ao grupo não exposto (controles);

iii) Os resultados encontrados no presente estudo permitem recomendar a inserção da suplementação antioxidante no cotidiano das populações expostas direta ou indiretamente às fontes de MP avaliadas, tanto no presente trabalho como nos outros dois realizados paralelamente.

7 PERSPECTIVAS

i) Realizar um acompanhamento integrado do impacto em toda a bacia carbonífera, já que toda a área citada recebe os efluentes gerados por esta indústria, utilizando outros biomarcadores (plantas, animais de laboratório, etc.), e acrescentando outros biomarcadores, como aducto de guanosina (8dGuo), micronúcleo, RNAm das enzimas estudadas, Western Blotting das enzimas estudadas, etc.;

ii) Os resultados apresentados no presente estudo, poderão ser utilizados pelas autoridades de fiscalização no intuito de melhorar o controle das emissões dos MP relacionados a esta atividade industrial e àquelas com ela relacionada (usinas termoelétricas, produção de coque, etc.), afim de reduzir os possíveis efeitos deletérios a saúde das populações expostas;

iii) Apontar à indústria carbonífera a importância da inserção da suplementação antioxidante nos trabalhadores diretamente expostos e nas populações indiretamente expostas aos MP emitidos pelos processos de extração e beneficiamento do carvão mineral.

REFERÊNCIAS

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

AISEN, P.; ENNS, C.; WESSLING-RESNICK, M.; Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism, **Int. J. Biochem. Cell. Biol.** 33 (10) (2001) 940–959.

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

ANEEL. Agência Nacional de Energia Elétrica. **Carvão Mineral.** Disponível em: <http://www.aneel.gov.br/aplicacoes/Atlas/carvao_mineral/8_2.htm>. Acessado em: 05 jun 2009.

ANGER, W. K. Neurobehavioral tests and systems to assess neurotoxic exposures in the workplace and community. **Occup. Environ. Med.** v 60:531-538, 2003.

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.

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.

ÁVILA JÚNIOR, S.; POSSAMAI, F. P.; PARISOTTO, E. B. et al. Antioxidant therapy attenuates oxidative stress associated with occupational airborne contamination in south Brazilian coal miners. **Ecotoxicology** (submetido à publicação).

BEARD, J.; HAN, O. Systemic iron status. **Biochim. Biophys. Acta.** Vol. 1790, p. 584-588, 2009.

BECKMAN, K. B.; AMES, B. N. Oxidative decay of DNA. **J. Biol. Chem.** v. 272, n. 32, p. 19633-19636, 1997.

BENES, B.; SPEVACKOVA, V.; SMID, 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.

BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. P.; BARREIRO, E. J. Uma visão da química bioinorgânica medicinal. **Química Nova.** 30 (8):2062-2067, 2007.

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.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BIANCHINI-PONTUSCHKA, R.; PENTEADO, M. V. C. Vitamina E. In. : PENTEADO, M. V. C. **Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos.** São Paulo: Manole, p. 123-55, 2003.

BIRD, R. D.; DRAPER, A. H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. **Methods. Enzymol.** v. 90, p. 105-10, 1984.

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. Commentary 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.

BOTHWELL, T.; CHARLTON, R. W.; COOK, J. D.; FINCH, C. A. Iron Metabolism in Man, **Blackwell Scientific Publications**, Oxford, 1979.

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.

BORM, P. J.; BAST, A.; A, WOUTERS, E. F. et al. Red blood cell anti-oxidant parameters in healthy elderly control subjects versus silicosis patients. **Free Radic. Res. Commun.** 3:117–127, 1987.

BRASIL. **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.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; TRABER, M. Vitamin E: function and metabolism. **FASEB J.** v. 13, p. 1145-55, 1999.

BUETTNER, G. R.; JURKIEWICZ, B. A. The ascorbate free radical as a marker of oxidative stress: An EPR study. **Free Radic. Biol. Med.** 14: 49-55, 1993.

CADENAS, E.; PACKER, L. **Handbook of synthetic antioxidants.** CRC Press, 1997.

CALBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase from rat liver. **Methods Enzymol.** v. 113, p. 484-490, 1985.

CAMPOS, M. L.; ALMEIDA, J. A.; SOUZA, L. S. Avaliação de três áreas de solo construídos após mineração de carvão a céu aberto em Lauro Muller, Santa Catarina. **Rev. Bras. Ci. Solo**, 27:1123-1137, 2003.

CASTRANOVA, V.; ANTONIN, J. M.; REASOR, M. J. et al. Oxidant release from pulmonary phagocytes. In: Castranova V, Vallyathan V, Wallace WE (eds) **Silica and Silica-induced Lung Diseases.** Boca Raton, FL, CRC Press, p. 345–381, 1996.

_____. WANG, L.; ANTONINI, J. M.; ROJANASAKUL, Y. et al. Potential role of apoptotic macrophages in pulmonary inflammation and fibrosis. **J. Cell. Physiol.** Feb; 194(2):215-24, 2002

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

CHO, Y. L.; SEO, M. S.; KIM, J. K. et al. Silica-induced generation of reactive oxygen species in rat2 fibroblasts: role in activation of mitogen-activated protein kinase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 262, 708-712, 1999

CLARKSON, P. M.; THOMPSON, H. S. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? **Am. J. Clin. Nutr.** v. 72, p. 637S-46S, 2000.

COUSINS, R. J.; HEMPE, J. M. Zinc. In: Presente Knowledge in nutrition. 6Th ed. M.L. Brown, Ed. Washington, DC, **Nutrition Foudation**, 1990, pp. 251-260.

CUI, Y. J.; YONG-GUAN, Z. ; RIHONG, Z. et al. Exposure to metal mixtures and human health impacts in a contaminated area in Nanning, China. **Environ. Int.** 31 784 – 790, 2005

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.

DIPLOCK, A. T.; CHARLEUX, J. L.; CROZIER-WILLI, G.; et al. Functional food science and defense against reactive oxidative species **BR. J. Nutr.** v. 80, p. 77S-112S, 1998.

DRAPPER, H. H.; BETTGER, W. J. Role of nutrients in the cause and prevention of oxygen radical pathology. **Adv. Exp. Med. Biol.** v. 366, p. 269-89, 1994.

ENGELEN, J. J.; BORM, P. J.; VAN-SPRUNDEL, M. et al. Blood anti-oxidant parameters at different stages of pneumoconiosis in coal workers. **Environ. Health Perspect.** 84:165–172, 1990.

EVANS, H. M.; BISHOP, K. S. On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. **Science** 56 (1458): 650–65, 1922.

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.

FANG, Y. Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants and nutrition. **Rev. Nutr.** v. 18, n.10, p. 872-78, 2002.

FARIAS, M. S.; BUDNI, P.; RIBEIRO, C. M. et al. Blood antioxidant *status* in chronic hepatitis C patients before and after antioxidant supplementation: a randomized clinical trial. **Hepatology.** (submetido à publicação)

FERRARO, F. R.; MOREIRA, J. C. Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde. Separata de: **Rev Panam. Salud Publica.** 15, 19-29, 2004.

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

FLORA, S. J. S.; MITTAL, M.; METHAL, A. Heavy metal induced oxidative stress and its possible reversal by chelation therapy. **Indian J. Med. Aging.** V. 23, p. 795-807, 2002.

FLOYD, R. A. The role of 8- hydroxyguanosine in carcinogenesis. **Carcinogenesis.** 11, 1447-1450, 1990.

FORSBERG, B.; ATKINSON, R. W.; ANDERSON, H. R.; et al. Acute effects of particulate air pollution on respiratory admissions: results from APHEA 2 project. *Air Pollution and Health: a European Approach.* **Am J Respir Crit Care Med.** 2001 Nov 15;164(10 Pt 1):1860-6.

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.

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

GENSHENG, W.; FOWLER, B. A. Roles of biomarkers in evaluating interactions among mixtures of lead, cadmium and arsenic. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 15;233(1): 92-9, 2008.

GHANEM, M. M.; PORTER, D.; BATELLI, L. A. et al. Respirable coal dust particles modify cytochrome P4501A1 (CYP1A1) expression in rat alveolar cells. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** 31(2):171-83, 2004.

GOYER, R. A. Results of lead research: prenatal exposure and neurological consequences. **Environ. Health Perspect.** vol. 104, p. 1050-1054, 1996.

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

HALLIWEL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annu. Rev. Nutr.** v. 16, p.33-50, 1996.

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

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

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.

HSU, P.C., GUO, Y. L. Antioxidant nutrients and lead toxicity. **Toxicol.** 180, 33-44, 2002.

IFCC, Selection of individuals for the production of reference values. **Clin. Chim. Acta.**, 170 (1987) 3-12

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.

JANSSEN, Y. M.; MARSH, W.; ABSHER J. P. et al. Expression of antioxidant enzymes in rat lungs after inhalation of asbestos or silica. **J. Biol. Chem.** 267, 10625-10630, 1993.

JIANG, Q.; CHRISTEN, S.; SHIGENAGA, M. K. et al. Alpha-tocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention. **Amer. J. Clin. Nutr.** v. 74, p. 714-22, 2001.

KADIISKA, M. B.; MASON, R. P.; DREHER K. L. et al. In vivo evidence of free radical formation in the rat lung after exposure to an emission source air pollution particle. **Chem. Res. Toxicol.** 10:1104–1108, 1997.

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

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.

LEITE, J.; SCHULER-FACCINI, L. Defeitos congênitos em uma região de mineração de carvão. **Rev. Saúde Pub.** V. 35 n. 2 São Paulo abri. 2001.

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.

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.

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

MAURICE, E. S.; JAMES, A. O.; MOSHE, S. **Modern Nutrition in health and disease**. 18. Edition. 1994.

MEYDANI, M.; LIPMAN, R. D.; HAN S. N. et al. The effect of long term dietary supplementation with antioxidants. In: HARMAN D. *et al.* Towards prolongation of the healthy life span. **Ann. N. Y. Acad.** v. 854. p. 78-91, 1998.

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.

NAJI, I. Z. On the true role of oxygen free radicals in the living state, aging, and degenerative disorders. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 928, p. 187-9, 2001.

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

NIJVELDT, R. J.; VAN NOOD, E.; VAN HOORN, D. E. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Amer. J. Clin. Nutr.** v. 74, n. 4, p. 418-25, 2001.

ODIN, A. P. Vitamins as antimutagens advantages and some possible mechanisms on antimutagenic action. **Mut. Res.** v. 386, n. 1, p. 39-67, 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.

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.

PORTER, D.; GHANEM, M. M.; BATTELLI, L. A. et al. Respirable coal dust particles modify cytochrome P4501A1 (CYP1A1) expression in rat alveolar cells. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.** 31, p. 171–183, 2004.

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).

PUIG, S.; THIELE, D. J. Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. **Curr. Opin. Chem. Biol.** vol.:6, p. 171 – 180, 2002.

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.** vol. 91, p. 49-60, 1983.

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.** vol. 43, p. 1388-1393, 2007.

_____. L. J.; TRABER, M. G. Vitamins E and C in the prevention of cardiovascular disease and cancer in men. **Free Radic. Biol. Med.** vol. 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 Sci. Appl.** vol. 656, n. 2, p. 311-318, 1994.

ROGERS, J. T.; RANDALL, J.; CAHILL, C. M., et al., An iron-responsive element type II in the 5'-untranslated region of the Alzheimer's amyloid precursor protein transcript, **J. Biol. Chem.** Vol. 277 (47), p. 45518–45528, 2002.

ROM, W. N.; BITTERMAN, P. B.; RENNARD, S. I. et al. Characterization of the lower respiratory tract inflammation of nonsmoking individuals with interstitial lung disease associated with chronic inhalation of inorganic dusts. **Am. Rev. Respir. Dis.** vol. 136(6), p. 1429 – 34, 1987.

RUFF, H. A.; MARKOWITZ, M. E.; BIJUR, P.E. et al. 1996. Relationships among blood lead levels, iron deficiency, and cognitive development in 2-year-old children. **Environ. Health Perspect.** vol. 104, p. 180-185.

SAGARA, Y.; DARGUSCH, R.; CHAMBERS, D. et al. Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress. **Free Radic. Biol. Med.** vol. 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.** vol. 19, n. 5, p. 539-552, 2006.

SANCHEZ, J. C. D.; FORMOSO, M. L. L. **Utilização do carvão e meio ambiente.** Porto Alegre: CIENTEC, p. 34, 1990.

SARNI, R. S.; LEITE, H. P. Radicais livres, antioxidantes e nutrição. **Rev. Bras. de Nutr. Clín.** vol. 18, n. 2, p. 87-94, 2003.

SHUKLA, A.; GULUMIAN, M.; HEI, T. K. et al. Multiple roles of oxidants in the pathogenesis of asbestos-induced diseases. **Free Radic. Biol. Med.** Vol. 34, p. 1117-1129, 2003.

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

_____. Oxidative stress: introductory remarks. In.: _____. **Oxidative Stress.** Florida: Academic Press, p. 1-10, 1985.

_____. Strategies of antioxidant defense. Review. **Eur. J. Biochem.** Berlin, vol. 215, n. 2, p. 213-19, 1993.

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.** vol. 53, p. 52-61, 1998.

SOYEON, K.; HO-JANG, K.; HAE-KWAN, C. et al. Investigation on Health Effects of an Abandoned Metal Mine. **J. Korean Med. Sci.**; vol. 23, p. 452-458, 2008.

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

TAPIA, A., S.; ARAYA, M. M. Estrés oxidativo, prooxidantes y enfermedad de Crohn. **Ver. Med. Chil.** vol. 134, p. 95-100, 2006.

THOMAS, J. Estresse oxidativo e defesa contra antioxidantes. In.: SHILS, M. E. et al. **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença**. v. 1, 9 ed, São Paulo: Manole, 2003. 1026 p.

BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R.; BRUNS, D. **Tietz fundamentos de química clínica**. 6ª Ed. Elsevier, 2008.

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

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

VALLE, B. L.; AULD, D. S. Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. **Biochemistry**, 29: 5647, 1990.

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

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.** vol. 34, p. 719-726, 2001.

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

ZECCA, L.; YODIM, M. B.; RIEDERER, P, et al., Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders, **Nat. Rev. Neurosci.** Vol. 5 (11), p. 863–873, 2004.

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.** vol. 42, p. 171-179, 2002.

APÊNDICES

APÊNDICE I - Manuscrito 1

OCCUPATIONAL AIRBORNE CONTAMINATION IN SOUTH BRAZIL: 1.
OXIDATIVE STRESS DETECTED IN THE BLOOD OF COAL MINERS

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

Manuscrito em impressão no periódico *ECOTOXICOLOGY*.

DOI 10.1007/s10646-009-0364-8

Occupational airborne contamination in south Brazil: 1. Oxidative stress detected in the blood of coal miners

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

Accepted: 24 June 2009 / Published online: 18 July 2009
 © Springer Science+Business Media, LLC 2009

Abstract Reactive oxygen species and nitrogen species have been implicated in the pathogenesis of coal dust-induced toxicity. The present study investigated several oxidative stress biomarkers (Contents of lipoperoxidation = TBARS, reduced = GSH, oxidized = GSSG and total glutathione = TG, α -tocopherol, and the activities of glutathione S-transferase = GST, glutathione reductase = GR, glutathione peroxidase = GPx, catalase = CAT and superoxide dismutase = SOD), in the blood of three different groups ($n = 20$ each) exposed to airborne contamination associated with coal mining activities: underground workers directly exposed, surface workers indirectly exposed, residents indirectly exposed (subjects living near the mines), and controls (non-exposed subjects). Plasma TBARS were increased and whole blood TG and GSH levels were decreased in all groups compared to controls. Plasma α -tocopherol contents showed approximately half the values in underground workers compared to controls. GST activity was induced in workers and also in residents at the vicinity of the mining plant, whilst CAT activity was induced only in mine workers. SOD activity was decreased in all groups examined, while GPx activity showed decreased values only in underground miners, and GR did not show any differences

among the groups. The results showed that subjects directly and indirectly exposed to coal dusts face an oxidative stress condition. They also indicate that people living in the vicinity of the mine plant are in health risk regarding coal mining-related diseases.

Keywords Coal mining · Airborne contaminants · Oxidative stress · Antioxidants

Introduction

Air pollution particles cause increases in morbidity and mortality reported in epidemiological studies (Dockery et al. 1993; Schwartz et al. 1996; Keles et al. 1999; McConnell et al. 1999). Chronic inhalation of coal dust in miners leads to several diseases such as pneumoconiosis, bronchitis, emphysema, fibrosis, cancer, and other pathologic-related events. In any case, a chronic inflammatory process takes place, leading to the generation of proinflammatory factors, synthesis of extra cellular matrix, fibroblast proliferation, production of oxidative stress, which is associated with overgeneration of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) (Kadiiska et al. 1997), thus resulting in lung damage (Doelman et al. 1990; Meijers et al. 1997; Schins et al. 1997), even after cessation of exposure to contaminants (Schins and Borm 1999). In response to these contaminants, various enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses protect cells and tissues from oxidative damage (Kinnula and Crapo 2003). Some authors suggest that contamination with airborne particles, such as coal dust, stimulate ROS production leading to oxidative stress (Vallyathan et al. 1998; Hayes and Strange 2000; Fubini and Hubbard 2003; Zeidler et al. 2004).

S. Ávila Júnior · F. P. Possamai
 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 88040-900, Brazil
 e-mail: dawifi@ccb.ufsc.br; dawifi@yahoo.com

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

Such prooxidant/antioxidant alterations are also detected in blood of subjects chronically exposed to coal dusts, usually provoking enhanced lipoperoxidation in plasma (Engelen et al. 1990; Schins et al. 1997; Altin et al. 2004) together with a decline in antioxidants such as reduced glutathione (Evelo et al. 1993), and antioxidant enzymes such as superoxide dismutase, glutathione peroxidase (Perrin-Nadif et al. 1996; Schins et al. 1997; Nadif et al. 2001; Altin et al. 2004), and glutathione S-transferase (Evelo et al. 1993). The continuous production of ROS may overwhelm the antioxidant defenses, thus resulting in oxidative stress, which is defined as an imbalance between antioxidants and oxidants, in favor of the oxidants, leading to cellular damage (Sies 1985). Therefore, biomarkers of oxidative stress have been used to characterize environmental contamination and to monitor several human disorders (Boveris and Cadenas 1997).

The city of Lauro Müller is located in an area where the economy is based in coal mining. The prevalent direction of wind favor an almost continuous exposure of their residents most part of the year (Fig. 1). The city revealed that around 30% of medical procedures were caused by respiratory diseases, and 4% related to different kinds of cancer (DATASUS 2008). Excess occupational exposure to metals, particularly in mining is considered to be a major cause of metal-related cancer (Harris and Shi 2003).

The purpose of the present study is to better understand the relationships between occupational coal dust exposure and the blood antioxidant status, both in workers directly or

indirectly exposed and also in residents living in the vicinity of the mine plant.

Materials and methods

Study area

Lauro Müller is localized in the south part of the Santa Catarina state, ~70 km from Capivari de Baixo (See a related study, Possamai et al. this issue), a region of another airborne contamination (incinerator), and possess around 13,000 thousand inhabitants. Most part of the year the wind flows from northeast in a relatively constant rate (Monteiro and Furtado 1995). The mining area is active since 1936, therefore the exposure of the subjects, both surface workers and residents, is at least one decade. The surface mine is located 15 km northeast from Lauro Müller, and the dominant northeast wind (around 8 months a year) rebounds in a mountain shield thereby favoring the exposure of residents of this city to airborne contamination from the surface mining area, but free from the fly ashes from the incinerator localized in Capivari de Baixo (Fig. 1).

Subjects

The study population consisted of 40 coal miners workers (20 from surface and 20 from underground mining), 20

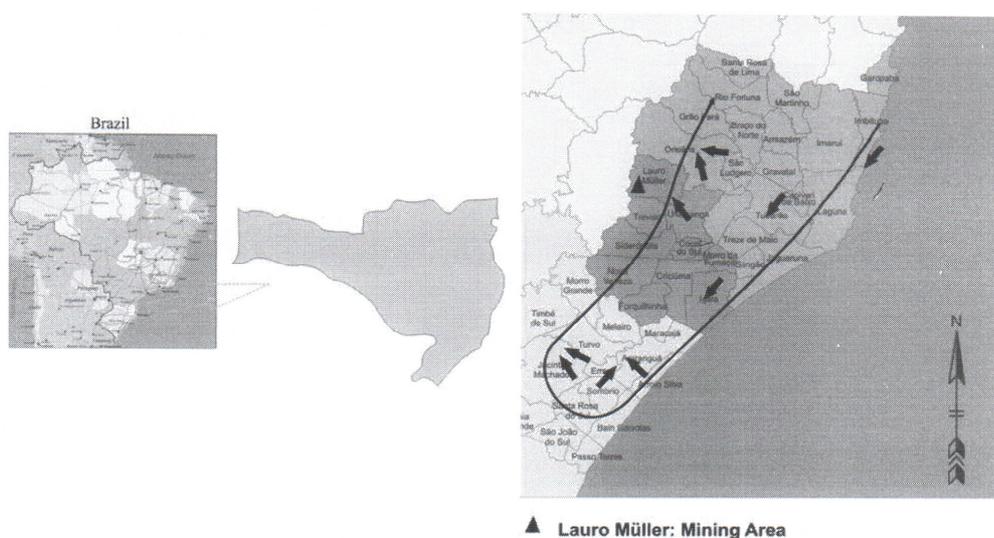


Fig. 1 Predominant wind direction in the city of Lauro Muller, south part of the state of Santa Catarina (Adapted from Monteiro and Furtado 1995)

residents who live near the mining area and 20 healthy subjects who were randomly selected from subjects recruited from a blood bank of the University Hospital (HU/UFSC), localized at Florianópolis ca. 200 km north-east from the mine area (Lauro Müller). All participants were male and exclusion criteria included smoking, recent inflammatory diseases, chronic diseases, long term pharmacological treatment and lung injuries detected. The demographic characteristics of the population and the diet properties of the patients, revealed through a questionnaire are shown in Tables 1 and 2. The diet of the patients in the present study was considered poor regarding the more important nutritional antioxidants and therefore, the diet ingestion of vitamins C and E was considered negligible. None of them were using extra antioxidant supplementation. This study was approved by the Ethic Committee of the Universidade Federal de Santa Catarina (protocol number 166/2007).

Sample preparation

Collection and preparation of blood samples were carried out according to Maçao et al. (2007). In short, blood samples were obtained from the antecubital vein in chilled tubes containing EDTA as anticoagulant (or without EDTA to obtain serum) in overnight fasting subjects. Immediately after blood collection a blood fraction (200 µl) was precipitated in trichloroacetic acid (TCA 12% 1:4 v/v) for

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

Groups	Age (years)	IMC ²	Exposure (years)
Controls	33.1 ± 7.4	25.2 ± 2.6	–
Residents	38.7 ± 6.9	25.6 ± 3.9	37.9 ± 11.5*
Surface	38.2 ± 5.6	27.1 ± 3.5	12.6 ± 7.9*
Underground	34.7 ± 10.1	26.0 ± 3.4	7.1 ± 4.2**

Values are expressed as mean ± SE ($n = 20$ each group). ** $P < 0.01$ and * $P < 0.05$ in relation to the group of residents. One-way ANOVA variance analysis test

Table 2 Nutritional profile of subjects exposed to coal dust groups 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	1.3 ± 0.7	1.2 ± 1.0	1.8 ± 1.2	1.1 ± 0.3
Surface	1.3 ± 0.8	1.2 ± 1.0	2.1 ± 0.8	1.3 ± 0.9
Underground	1.8 ± 0.6	1.9 ± 0.9	2.4 ± 0.7	2.1 ± 0.8

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). $P > 0.05$ in relation to controls. One-way ANOVA variance analysis test

glutathione assays. The remaining whole blood collected was centrifuged at 1,500g for 10 min to separate red cells and plasma. For enzymatic assays, red cells were washed twice with cold saline solution and then centrifuged again (5,000g for 5 min), and hemolysis was carried out by freezing/thaw procedure, using a buffer containing 0.1% Triton X-100, 0.12 M NaCl, 30 mM NaPO₄, pH 7.4 (1:4, v/v). After this, samples were centrifuged at 15,000g for 10 min and the supernatants and the acid extracts were stored in liquid nitrogen (−170°C) until analysis of the different parameters. Enzymatic evaluations were carried out in the supernatants, while the contents of TG, GSH and GSSG were obtained in whole blood extracts. GSH and TBARS contents were examined, respectively only in blood extracts and plasma immediately after blood collection. Vitamins E and C contents were examined in plasma.

Antioxidant enzyme assays

Catalase activity was determined by measuring the decrease in a 10 mM hydrogen peroxide solution at 240 nm (Aebi 1984). Superoxide dismutase activity was measured at 480 nm according to the method of epinephrine autoxidation (Misra and Fridovich 1972). Glutathione reductase activity was measured at 340 nm according to Flohé and Gunzler (1984), by measuring the rate of NADPH oxidation. Glutathione peroxidase was performed according to Calberg and Mannervik (1985) through the glutathione/NADPH/glutathione reductase system, by the dismutation of *tert*-butylhydroperoxide, and glutathione S-transferase activity (GST) was determined at 340 nm using CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene) as substrate and a 0.15 M GSH concentration (Habig et al. 2000). All activities were measured in red cells in duplicate and expressed in milliliters of whole blood.

Glutathione assay

Determination of total (TG), reduced (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) contents were measured in whole blood through high-performance liquid chromatography and electrochemical detection, as described by Rodriguez-Ariza et al. (1994).

Vitamin E evaluation

Determination of vitamins E in plasma was carried out by high performance liquid chromatography (HPLC) with UV detection at 292 nm (Nicoletti et al. 2001). An aliquot of 100 µl of plasma was added to 100 µl of ethanol and vortexed for 10 s and added to 100 µl of hexane, and again vortexed for 45 s. After centrifugation at 8,000g for 5 min, 75 µl of the supernatant (hexane) was transferred to an

Eppendorf and the hexane was evaporated by nitrogen flow. 125 μ l diethylether and 375 μ l methanol were added and this mixture was injected in HPLC. Isocratic elution was carried out with methanol using a flow rate of 1 ml min^{-1} . Samples were measured in duplicate and plasma concentrations of α -tocopherol were determined through a standard curve and expressed as $\mu\text{mol vitamin E l}^{-1}$.

Liperoxidation (TBARS levels) evaluation

The lipid peroxidation extent was spectrophotometrically determined at 535 nm in plasma by the thiobarbituric acid method described by Bird and Draper (1984). The thiobarbituric reactive species amount (TBARS) was determined using an extinction coefficient of 153 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Briefly, the method consists in the plasma precipitated with trichloroacetic acid (TCA) followed by the incubation with TBA 0.76%, at 100°C, for 60 min in a phosphate buffer at pH 7.4 (60 mM Tris-HCl and 0.1 mM DPTA). At room temperature the samples were then centrifuged (5 min, 10,000g) and the absorbance of a pink chromophore was measured in triplicate and values were expressed in nmol TBARS ml^{-1} .

Statistical analysis

Results were expressed as mean values \pm standard error. Differences between multiple groups were compared using One-way analysis of variance. The post hoc test employed was Dunnett. Minimal significance was assumed at $P < 0.05$. All determinations were performed in duplicate, excepting TBARS measurements, which were performed in triplicate. Figures were developed using GRAPHPAD Prism, Version 3.0.

Results and discussion

Workers directly and indirectly exposed, as well as subjects living in the vicinity of the coal mining plant, showed enhanced plasma TBARS levels compared to controls (Fig. 2). Similar findings were found by Altin et al. (2004) in a study also carried out with coal mining workers, and also by Armutcu et al. (2007), where rats were exposed to coal mine ambience for 4 weeks. Interestingly, after treatment with the antioxidant erdosteine, which hepatic metabolites possess sulphhydryl group for electron donation, liperoxidation in those rats was reverted to values similar to those of controls. Accordingly, when ROS concentrations increase and exceed the capacity of the antioxidant system, the levels of the major liperoxidation end-product malondialdehyde (MDA) also increase (Ramasarma 1982). Also, early stages of coal worker pneumoconiosis diagnosed by high resolution computed tomography

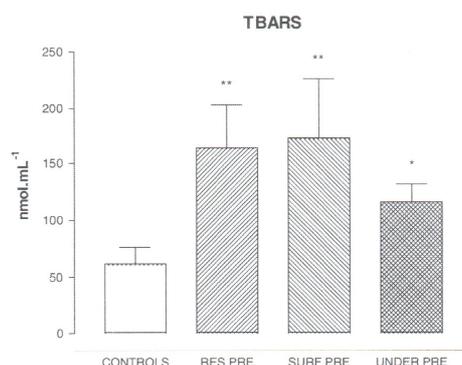


Fig. 2 Liperoxidation (TBARS contents) in plasma of subjects exposed to coal residues and controls. Values are expressed as means \pm SE ($n = 20$). ** $P < 0.01$ and * $P < 0.05$ in relation to controls

were directly correlated with the levels of plasma MDA, but were inversely correlated with the levels of other oxidative stress biomarkers such as the activities of SOD and GPx (Altin et al. 2004).

More concerned were the results obtained in rats exposed to silica inhalation by Porter et al. (2006), who found a progressive lung damage even after the cessation of contaminant exposure. These results clearly indicate that the damage, including that related to ROS generation, still occurs after the non-exposure period. It is important to note that in our study no subject showed pneumoconiosis in both workers and residents groups.

Total glutathione and GSH contents in whole blood showed lower values in all groups compared to controls, including the residents in the vicinity of the mining (Fig. 3). Accordingly, in underground workers levels of plasma α -tocopherol ($\cong 10 \mu\text{M}$) showed approximately half the values found in the control group ($\cong 20 \mu\text{M}$; Fig. 4).

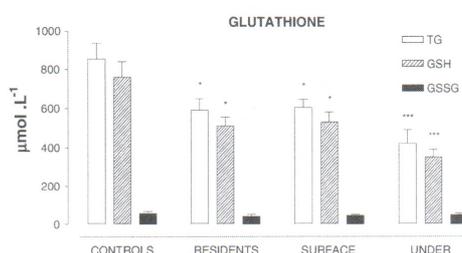


Fig. 3 Total, reduced and oxidized glutathione (TG, GSH and GSSG) contents in whole blood of subjects exposed to coal residues and controls. Values are expressed as means \pm SE ($n = 20$). *** $P < 0.001$ and * $P < 0.05$ in relation to controls

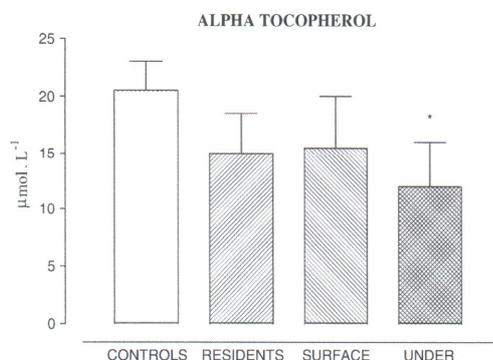


Fig. 4 Vitamin E (Alpha tocopherol) contents in plasma of subjects exposed to coal residues and controls. Values are expressed as means \pm SE ($n = 20$). * $P < 0.05$ in relation to controls

Despite the fact that no significant differences were detected, surface workers and residents showed values intermediary ($\cong 15 \mu\text{M}$) to those found in underground workers, revealing that this liposoluble antioxidant is also being consumed in both groups indirectly exposed to air contaminants (Fig. 4), similarly to the consumption of total and reduced glutathione. The similar profile obtained for vitamin E and total and reduced glutathione strongly suggest an oxidative stress condition and that both antioxidants are probably being used to counteract ROS generation and lipoperoxidation associated with chronic exposition to coal dust. Interestingly, GR activity showed no significant differences among the groups.

Glutathione S-transferase (GST) activity was induced in all groups, directly or indirectly exposed to mining activity (Fig. 5). GST is an important component of phase II enzymes of the biotransformation of xenobiotics able to conjugate GSH to metabolites derived from this process thereby favoring their excretion (Halliwell and Gutteridge

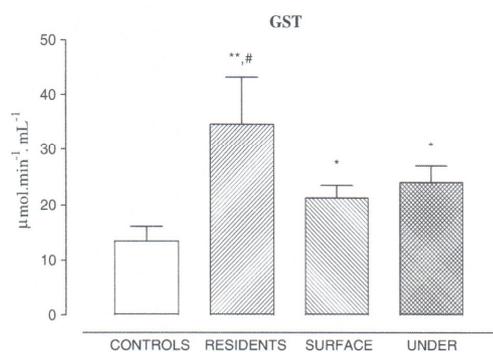


Fig. 5 Glutathione S-transferase (GST) activities in blood of subjects exposed to coal residues and controls. Values are expressed as means \pm SE ($n = 20$). ** $P < 0.01$ and * $P < 0.05$ in relation to controls; # $P < 0.05$ in relation to surface workers

1999). Although the depletion of GSH was detected in all groups examined it seems that all these subjects are still able to compensate for the xenobiotic insult. In this regard, the subjects living near the mining plant (residents) showed the highest induction compared to both worker groups. However, decreased GST activity was found in the red blood cells of subjects with early stages of coal worker pneumoconiosis when compared with control miners without pneumoconiosis (Evelo et al. 1993). In accordance to our findings, that study also revealed decreased GPx activity and decreased GSH concentrations. It is interesting to note that the subjects examined in our study did not present any inflammatory disease in their lungs. The induction of GST found in our study probably consists of the adequate maintenance of the biotransformation process, together with the capacity of GST to detoxify hydroperoxides derived from the oxidative insult.

While catalase was induced in directly exposed workers, only underground workers showed decreased GPx activity (Figs. 6, 7). Inhibition of GPx seems to be consistent with

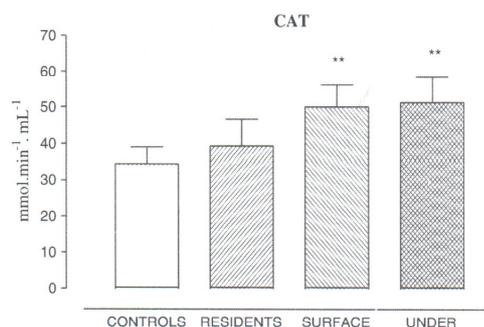


Fig. 6 Catalase (CAT) activities in blood of subjects exposed to coal residues and controls. Values are expressed as means \pm SE ($n = 20$). ** $P < 0.01$ in relation to controls

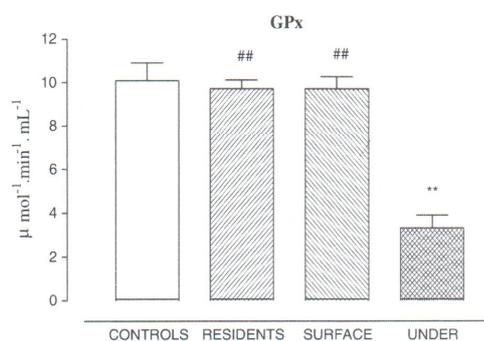


Fig. 7 Glutathione peroxidase (GPx) activities in blood of subjects exposed to coal residues and controls. Values are expressed as means \pm SE ($n = 20$). ** $P < 0.01$ in relation to controls; ## $P < 0.01$ in relation to underground workers

chronic exposure to airborne contaminants (Nadif et al. 2001; Altin et al. 2004), which will consequently render more hydroperoxides in the cells. Many immune cells are capable to produce ROS, and in this group are included the alveolar macrophages which plays a key-role in this process during the immune defense reaction against dust particles (Forsberg et al. 2001). ROS are also formed through microsomal metabolism of endogenous compounds and xenobiotics, including environmental pollutants (Kehrer 1993). During the process of phagocytosis of inhaled particulate, superoxide radical ($O_2^{\bullet-}$) is generated and its dismutation results in hydrogen peroxide (H_2O_2) (Halliwell and Gutteridge 1999). In the presence of transition metal ions, such as ferrous iron or cuprous ions, H_2O_2 is converted to the potent oxidizing radical hydroxyl (HO^{\bullet}), through the Fenton reaction. There is overwhelming evidence that inhalation of toxic occupational and environmental pollutants leads to excessive in vitro and in vivo generation of HO^{\bullet} radicals during phagocytosis (Vallyathan et al. 1992; Castranova et al. 1996; Kadijska et al. 1997).

SOD activity was also inhibited in all groups (Fig. 8) and this response was also found in other studies involving coal mining workers (Nadif et al. 2001; Altin et al. 2004). Other studies on workers exposed to silica-containing dusts, including coal mine dust, revealed no significant differences in SOD activity between healthy miners and three subgroups of miners with pneumoconiosis (Borm et al. 1987; Engelen et al. 1990). However, 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, which were parallel to the

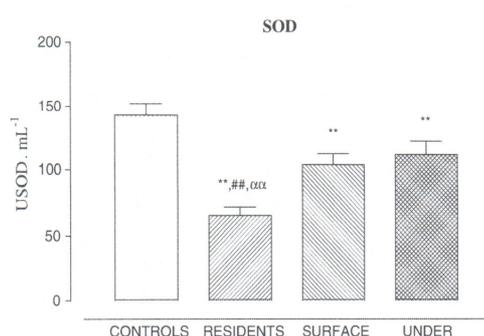


Fig. 8 Superoxide dismutase (SOD) activities in blood of subjects exposed to coal residues and controls. Values are expressed as means \pm SE ($n = 20$). ** $P < 0.01$ in relation to controls; ## $P < 0.01$ in relation to surface workers; $\alpha\alpha$ $P < 0.01$ in relation to underground workers

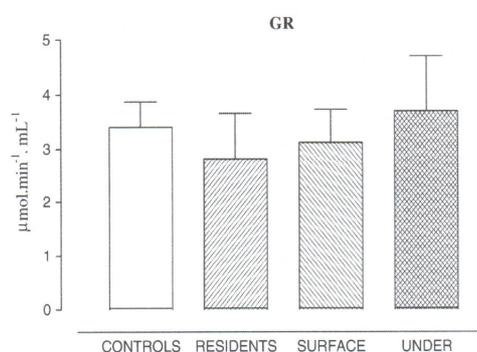


Fig. 9 Glutathione reductase (GR) activities in blood of subjects exposed to coal residues and controls. Values are expressed as means \pm SE ($n = 20$)

damage assessed through high resolution computed tomography (Altin et al. 2004). This apparent decrease of an adequate antioxidant response was accompanied by persistent high MDA levels found in plasma, resembling the profile found in our study. This scenario might imply an impairment of the detoxification capacity for electrophilic and oxidative compounds during this stage of disease (Evelo et al. 1993). The GR activities did not show any statistical difference compared to controls (Fig. 9), and the same response in our laboratory was obtained in workers and residents exposed to incineration of solid residues from health services (Possamai et al. this issue).

Several studies have shown that chronic exposure to metals leads to metal-induced ROS generation and ultimately to carcinogenesis (Halliwell and Gutteridge 1999; Harris and Shi 2003). It is a consensus that Ar, Cr, Ni, Be and Cd are confirmed carcinogens for humans whilst Pb, Co, Fe and An are potential human carcinogens (Klaassen 1996; Steenland et al. 1996; Harris and Shi 2003). Berg et al. (1993) showed an increase of H_2O_2 and $O_2^{\bullet-}$ release in macrophages after exposure to different dust types. Most of these metals are usually present in coal mining ambience and consequently might be important source for metal-induced diseases related to this occupational contamination. Metal analyses in the blood of all groups here examined are already in course. The results of such analyses might shed light into the main causes of metal-induced oxidative stress condition displayed by coal miners and people living in the vicinity of the mine plants.

Conclusions

The results here obtained are consistent with previous data available in the literature, showing that subjects directly

and indirectly exposed to coal dusts face an oxidative stress condition. In general, non-enzymatic antioxidants such as reduced glutathione and vitamin E, were depleted in subjects more exposed to air contamination, whilst enzymatic antioxidants such as the activities of glutathione S-transferase and catalase were induced in directly exposed workers, the activity of superoxide dismutase was inhibited in all groups examined, and the activity of glutathione peroxidase was inhibited only in underground workers. Moreover, they also indicate that people living in the vicinity of the mining area are also facing oxidative stress and risk of coal mining-related diseases. Similar responses and correlations were also found in a related and accompanied study (See Possamai et al., this issue) dealing with exposure of workers and residents living in the vicinity of an incineration plant of solid hospital residues. Other similar studies on coal mining workers and workers from waste incinerators are well in line with our results, revealing that an adequate protection and therapeutic strategies against such occupational contamination are urgently needed. An extension of the present study is being carrying out in our laboratory to evaluate the effect of a 6 months period of antioxidant (vitamins E and C) supplementation in the same subjects.

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

- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121–126
- 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 erdoesteine in rats kept in coal mine ambience. *Environ Toxicol Pharmacol* (in press)
- Berg I, Schluter T, Gercken G (1993) Increase of bovine alveolar macrophage superoxide anion and hydrogen-peroxide release by dusts of different origin. *J Toxicol Environ Health* 39(3):341–354
- Bird RP, Draper AH (1984) Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. *Methods Enzymol* 90:105–110
- Borm PJ, Bast A, Wouters EF, Slangen JJ, Swaen GM, Boorder TJ (1987) Red blood cell anti-oxidant parameters in healthy elderly control subjects versus silicosis patients. *Free Radic Res Commun* 3:117–127
- Boveris A, Cadenas E (1997) Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species. In: Clereh L, Massaro D (eds) Oxygen, gene expression and cellular, vol 105. Marcel Dekker, New York, pp 1–25
- Calberg I, Mannervik B (1985) Glutathione reductase from rat liver. *Methods Enzymol* 113:484–490
- Castranova V, Antonin JM, Reasor MJ, Wu L, Van Dyke K (1996) Oxidant release from pulmonary phagocytes. In: Castranova V, Vallyathan V, Wallace WE (eds) Silica and silica-induced lung diseases. CRC Press, Boca Raton, pp 345–381
- DATASUS (2008) Caderno de Informações de Saúde. Available via DIALOG. http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/cadernos/cadernos_map.htm of subordinate document. Accessed 15 May 2008
- Dockery DW, Pope ACD, Xu X, Spengler JD, Ware JH, Fay ME, Ferris Júnior BG, Speizer FE (1993) An association between air pollution and mortality in six cities. *New Engl J Med* 329:1753–1759
- Doelman CJ, Leurs R, Oosterom WC, Bast A (1990) Mineral dust exposure and free radical-mediated lung damage. *Exp Lung Res* 16:41–55
- Engelen JJ, Borm PJ, Van-Sprundel M, Leenaerts L (1990) Blood anti-oxidant parameters at different stages of pneumoconiosis in coal workers. *Environ Health Perspect* 84:165–172
- Evelo CT, Bos RP, Borm PJ (1993) Decreased glutathione content and glutathione S-transferase activity in red blood cells of coal miners with early stages of pneumoconiosis. *Br J Ind Med* 50:633–636
- Flohé L, Gunzler WA (1984) Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 105:114–121
- Forsberg L, de Faire U, Morgenstern R (2001) Oxidative stress, human genetic variation, and disease. *Arch Biochem Biophys* 389:84–93
- Fubini B, Hubbard A (2003) Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radic Biol Med* 34:1507–1516
- Habig WH, Pabst MJ, Jacoby WB (2000) Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249:7130–7139
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1999) Free radicals in biology and medicine. Oxford Science Publications, Oxford
- Harris GK, Shi X (2003) Signaling by carcinogenic metals and metal-induced reactive oxygen species. *Mutat Res* 533:183–200
- Hayes JD, Strange RC (2000) Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology* 61:154–166
- Kadiiska MB, Mason RP, Dreher KL, Costa DL, Ghio AJ (1997) In vivo evidence of free radical formation in the rat lung after exposure to an emission source air pollution particle. *Chem Res Toxicol* 10:1104–1108
- Kehrer JP (1993) Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 23:21–48
- Keles N, Ilicali C, Deger K (1999) The effects of different levels of air pollution on atopy and symptoms of allergic rhinitis. *Am J Rhinol* 13:185–190
- Kinnula VL, Crapo JD (2003) Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 167:1600–1619
- Klaassen CD (1996) Toxic effects of metals. In: Klaassen CD (ed) Casarett and O'Doul's toxicology: the basic science of poisons. McGraw-Hill, New York, pp 691–736
- 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 Chagas' disease. *Intern J Cardiol* 123:43–49
- McConnell R, Berhane K, Gilliland E, London SJ, Vora H, Avol E, Gauderman WJ, Margolis HG, Lurmann F, Thomas DC, Peters JH (1999) Air pollution and bronchitic symptoms in Southern California children with asthma. *Environ Health Perspect* 107:757–760
- Meijers JM, Swaen GM, Slangen JJ (1997) Mortality of Dutch coal miners in relation to pneumoconiosis, chronic obstructive pulmonary disease, and lung function. *Occup Environ Med* 54:708–713

- Misra HP, Fridovich I (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247:188–192
- Monteiro MA, Furtado SMA (1995) O clima do trecho Florianópolis-Porto Alegre: uma abordagem dinâmica. *Geosul* 19(20):117–133
- Nadif R, Oryszczyn MP, Fradier-Dusch M, Hellier G, Bertrand JP, Pham QT, Kaufmann F (2001) Cross sectional and longitudinal study on selenium, glutathione peroxidase, smoking, and occupational exposure in coal miners. *Occup Environ Med* 58:239–245
- Nicoletti G, Crescibene M, Scormaienci M (2001) Plasma levels of vitamin E in Parkinson's disease. *Arch Gerontol Geriatr* 33:7–12
- Perrin-Nadif R, Auburtin G, Dusch M, Porcher JM, Mur JM (1996) Blood antioxidant enzymes as markers of exposure or effect in coal miners. *Occup Environ Med* 53:41–45
- Porter DW, Millicchia LL, Willard P, Robinson VA, Ramsey D, McLaurin J, Khan A, Brumbaugh K, Beighley CM, Teass A, Castranova V (2006) Nitric oxide and reactive oxygen species production causes progressive damage in rats after cessation of silica inhalation. *Toxicol Sci* 90:188–197
- Ramasarma T (1982) Generation of hydrogen peroxide in biomembranes. *Biochim Biophys Acta* 694:69–93
- Rodriguez-Ariza A, Toribio FJ, López-Barea J (1994) Rapid determination of glutathione status in fish liver using high-performance liquid chromatography and electrochemical detection. *J Chrom* 656(B):311–318
- Schins RP, Borm PJ (1999) Mechanism and mediators in coal dust induced toxicity: a review. *Ann Occup Hyg* 43:7–33
- Schins RP, Keman S, Borm PJ (1997) Blood antioxidant status in coal dust induced respiratory disorders: a longitudinal evaluation of multiple biomarkers. *Biomarkers* 2:45–50
- Schwartz J, Dockery DW, Neas LM (1996) Is daily mortality specifically with fine particles? *J Air Waste Manag Assoc* 46:927–939
- Sies H (1985) *Oxidative stress*. Academic Press, London
- Steenland K, Loomis D, Shy C, Simonsen N (1996) Review of occupational lung carcinogens. *Am J Ind Med* 29:474–490
- Vallyathan V, Mega JF, Shi X, Dalal NS (1992) Enhanced generation of free radicals from phagocytes induced by mineral dusts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 6:404–413
- Vallyathan V, Shi X, Castranova V (1998) Reactive oxygen species: their relation to pneumoconiosis and carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 106(5):1151–1155
- Zeidler P, Hubbs A, Battelli L, Castranova V (2004) Role of inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in silica-induced pulmonary inflammation and fibrosis. *J Toxicol Environ Health A* 67:1001–1026

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 submetido para publicação no periódico *ECOTOXICOLOGY*.

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 Gutteridge 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, Harman 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, Smerhovsky 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 (Cativari 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 (Cativari 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±0.52	5.53±1.03*	151.4	9.38±0.22**	326.4	5.69±0.10**	159.0
Copper ($\mu\text{g L}^{-1}$)	43.42±1.27	50.96±1.24**	17.4	78.75±2.01**	81.4	60.84±2.82**	40.6
Iron ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1032.74±60.05	1116.00±39.57	8.2	1245.24±19.26**	21.5	1249.10±71.37**	21.1
Manganese ($\mu\text{g L}^{-1}$)	5.63±0.24	2.84±0.10**	-50.1	4.72±0.40*	-16.7	3.21±0.30**	-43.2
Zinc ($\mu\text{g L}^{-1}$)	287.69±18.21	321.93±23.99	12.0	1064.00±53.69**	270.3	1159.04±157.26**	303.8

Table 1B

Heavy metals	Controls	Residents CB	% ^a	Workers	% ^a
Lead ($\mu\text{g L}^{-1}$)	2.20±0.52	4.37±0.38**	98.6	3.20±0.23*	45.5
Copper ($\mu\text{g L}^{-1}$)	43.42±1.27	48.16±2.42*	10.9	50.25±2.08**	15.7
Iron ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1032.74±60.05	881.41±94.38	-14.7	1208.99±50.13*	17.1
Manganese ($\mu\text{g L}^{-1}$)	5.63±0.24	4.62±0.11**	-17.9	2.53±0.15**	-55.1
Zinc ($\mu\text{g L}^{-1}$)	287.69±18.21	540.58±43.88**	87.9	462.51±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	57.3	96.73±6.70 [#]	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	-58.1	0.82±0.13** [#]	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	37.1	300.96±37.99* [#]	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	37.7	84.27±11.23 [#]	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	-37.1	1.22±0.19* [#]	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	82.9	401.57±43.30** [#]	145.99±12.44*	-33.5	301.84±19.75* [#]	37.4

Table 3A

Antioxidants	Controls	Residents LM				Surface				Underground			
		Pre	% ^a	Post	% ^a	Pre	% ^a	Post	% ^a	Pre	% ^a	Post	% ^a
AT ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	20.50±2.60	15.00±3.50*	-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
GSH ($\mu\text{mol mL}^{-1}$)	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
GPx ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$)	10.09±0.82	9.73±0.40	-4.0	9.49±0.59	-6.0	9.72±0.55	-4.1	9.57±1.42	-5.1	3.30±0.59**	-67.3	8.16±0.72* [#]	-19.1
GR ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$)	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
GST ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$)	13.47±2.64	34.60±8.63**	157.0	9.53±3.33 [#]	-29.2	21.28±2.26*	58.3	7.02±1.82 [#]	-48.1	24.11±2.95*	79.4	7.14±3.56 [#]	-47.0
CAT ($\text{mmol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$)	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
SOD (USOD mL^{-1})	143.29±8.99	65.47±6.53**	-54.3	522.79±27.62** [#]	265.1	104.14±8.68	-27.3	520.69±53.10** [#]	263.4	111.95±11.09	-22.0	531.87±41.75** [#]	271.1

Table 3B

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

Fontes de Vit. E:

Alimento	Quantidade (ex. 1 por dia)	Quantas vezes por semana
Germe de trigo		
Óleos vegetais		
Vegetais de folhas verdes		
Gordura do leite (leite gordo)		
Ovo (gema de ovo)		
Nozes		
Amendoim		

Você tem ou teve contato diário com carvão mineral:

sim não Periodicidade:

.....

Se sim, onde:

Trabalho sim não
Residência sim não
Outros sim não

Você tem ou teve contato diário com lixo hospitalar:

sim não Periodicidade:

.....

Se sim, onde:

Trabalho sim não
Residência sim não
Outros sim não

Você tem ou teve contato com a incineração (queima) de lixo hospitalar:

sim não Periodicidade:

.....

Se sim, onde:

Trabalho sim não
Residência sim não
Outros sim não

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: Avaliação do estresse oxidativo em indivíduos expostos direta e indiretamente à atividade de mineração do carvão antes e após a suplementação com vitamina “C” E “E”

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 da mineração de subsolo e superfície expostos aos poluentes atmosféricos provenientes da exploração deste minério, comparativamente a indivíduos indiretamente expostos e não expostos atividade.

2- Metodologia/procedimentos:

O presente trabalho será desenvolvido na região do município de Lauro Muller, 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:

A exploração do carvão em Santa Catarina é feita em minas subterrâneas e a céu aberto, e ambos os processos acarretam problemas ambientais, pois modificam a estrutura do meio ambiente, pela disposição inadequada dos resíduos da mineração, causando contaminação de águas superficiais e subterrâneas, promovendo contaminação atmosférica ao redor das minas pela geração de gases e poeiras, além da perda de solo fértil. A contaminação ambiental aumenta o risco de exposição a xenobiontes) como metais pesados, entre outras. Espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) tem exercido papel importante na patogenese da toxicidade induzida pelo material particulado (MP) do carvão.

4- Benefícios:

Avaliar o impacto do processo da mineração de carvão 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.

7- Metodologia/procedimentos alternativos disponíveis

Não há procedimentos alternativos para realização da pesquisa. A coleta do material biológico (sangue e urina) são essenciais para o desenvolvimento da pesquisa.

8- Confidencialidade das informações

As informações obtidas ficaram sob sigilo dos pesquisadores, sendo que os resultados das análises serão divulgados diretamente ao participante. O resultado final da pesquisa será divulgada para comunidade científica, sem a identificação dos participantes.

9- Compensação/indenização

Será oferecido aos participantes o reembolso dos custos de transporte até o local da coleta dos materiais biológicos (sangue e urina).

10- Outras informações pertinentes

A pesquisa será realizada mediante o consentimento da Secretária Municipal de saúde de Lauro Muller.

11- Consentimento:

Li e entendi as informações precedentes. Tive oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim, indicando meu consentimento para participar nesta pesquisa, até que eu decida o contrário. Receberei uma cópia assinada deste consentimento.

_____	_____	____/____/____
Nome do participante	Assinatura	Data
_____	_____	____/____/____
Nome da testemunha	Assinatura	Data
_____	_____	____/____/____
Nome do coordenador da pesquisa	Assinatura	Data

Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho

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 “Avaliação do estresse oxidativo em indivíduos expostos direta e indiretamente à atividade de mineração do carvão antes e após a suplementação com vitamina “C” E “E” 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, 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 (Fabricio) 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



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS

Parecer Consubstanciado Projeto nº 166/07

I - Identificação

Data de entrada no CEP: 15/06

Título do Projeto: Avaliação do Estresse Oxidativo e dano celular em indivíduos expostos direta e indiretamente à mineração do carvão e a seus efluentes.

Pesquisador Responsável: Danilo Wilhelm Filho.

Pesquisador Principal: Silvio Avila Junior.

Propósito: A pesquisa em questão se vincula ao doutoramento do aluno Silvio Avila Junior, a ser realizado no Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC.

Instituição onde se realizará: Hospital Universitário da UFSC e comunidade do Município de Lauro Muller - SC.

II - Objetivos:

Geral: Avaliar o perfil antioxidante, bem como, o possível dano celular em indivíduos expostos de forma direta (trabalhadores) e de forma indireta (moradores) à mineração do carvão e a seus efluentes.

III - Sumário do Projeto: A exploração do carvão em Santa Catarina é feita em minas subterrâneas e a céu aberto. Ambos os processos acarretam problemas ambientais, pois modificam a estrutura do meio natural pela disposição inadequada dos resíduos da mineração. A contaminação ambiental aumenta o risco de exposição das pessoas a substâncias que comumente não estão presentes no ambiente. O presente projeto terá como sujeitos quatro diferentes grupos da cidade de Lauro Muller: o primeiro composto por trabalhadores de extração de carvão no subsolo; o segundo de trabalhadores de extração de carvão na superfície; o terceiro composto por moradores da cidade que não trabalham na extração do carvão; o quarto composto por indivíduos não expostos ao contato com a mineração ou seus efluentes. Será coletado material biológico (sangue) dessas pessoas e avaliado o nível das enzimas relacionadas ao estresse oxidativo, os parâmetros relacionados ao dano celular e a dosagem de metais pesados. Após

essa coleta a população estudada receberá uma suplementação antioxidante (vitamina E e vitamina C) durante seis meses visando minimizar o possível efeito deletério da sua exposição a mineração.

IV - Comentários: Os pesquisadores envolvidos com a pesquisa assinaram e se comprometem a aceitar a Resolução número 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. A pesquisa apresenta a documentação exigida pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFSC, dentre eles a autorização da Secretaria de Saúde do município de Lauro Muller e do Hospital Universitário da UFSC. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido encontra-se bem elaborado e será apresentado a todos os sujeitos envolvidos na pesquisa. O referencial metodológico encontra-se bem construído e delineado. Os resultados podem trazer maiores informações sobre a contaminação humana ocorrida na mineração do carvão e, contribuir com uma política pública de atenção a população exposta a esse risco, a partir da avaliação da eficácia proporcionada pela suplementação com vitaminas antioxidantes. A considerar esses aspectos, somos de parecer favorável à aprovação da pesquisa.

V - Parecer:

Aprovado (X)

Aprovado "ad referendum" ()

Aprovado e encaminhado ao CONEP ()

Com pendências ()

Reprovado()

VI - Data da Reunião

Florianópolis, 27 de julho de 2007.



Prof. Washington Portela de Souza
Coordenador em Exercício da Comissão
de Ética em Pesquisa - CEPe/UFSC.

Washington Portela de Souza
Coordenador

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. 96,0% (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: (X) **Aprovado** Data da Análise: **24/11/2006** Nr.Ctrl.: 012526G0011/3706


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% 4/4
NF 525.979 26/07/2007
 Lote : 10609011 #7 Origem: China Fabric.: 09/2006
Procedencia: Koreaia 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
*DESCRIÇÃO	PÓ QUASE BRANCO OU AMARELADO	DE ACORDO
*IDENTIFICAÇÃO	REAÇÃO 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 Laboratório 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 Junpuri 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



ANEXO V - Certificado da Farmácia da Vit. E

VITALIS Farmácia de Manipulação		GARANZIA DE QUALIDADE		Número: 137972/07
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 525929
5. Fornecedor: BEG		6. Origem: China		7. Procedência: Korea
8. Qtidade recebida: 16 Kg		9. Qtidade amostrada: 91 g		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:				
				Resultados
Aspecto:		Pó microgranular		OK
Cor:		Branco a creme		creme
Odor:		Sem referência		Inodoro
Solubilidade:				
				Resultados
Água deionizada		Praticamente insolúvel		Pouco solúvel (3x vezes)
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. PH1% → -6,04				
Fórmula molecular: C ₂₃ H ₃₂ O ₅				
Peso molecular: 472,7				
16. Data Frac. 01/08/07		17. Resp. Fracionamento: <input checked="" type="checkbox"/> anexo		
18. N° Certificado 2918		19. Quantidade a ser Fracionada 16 x 6000-g		
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:		
		<p style="text-align: center;">CONTROLE DE QUALIDADE VITALIS</p> <p style="text-align: center;"> LETÍCIA MACARINI MAGAGNIN - CRF 6026</p>		