

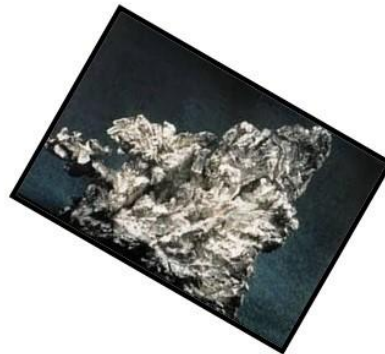
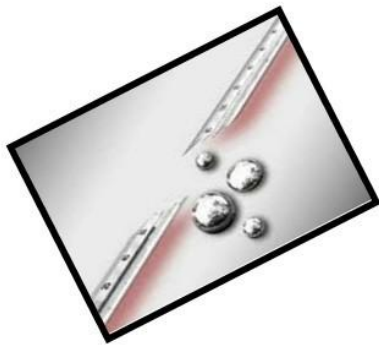
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA  
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA



---

**Análise histológica e elemental da língua na administração  
experimental de metais pesados**

---



Marisa Ribeiro

Orientador:  
Mestre Dr. Rodrigo Farinha

Coorientador:  
Prof. Doutor António Cabrita

Coimbra  
2015



---

Análise histológica e elemental da língua na administração experimental de metais pesados

---

---

Área de Medicina Dentária, FMUC, Coimbra Portugal

Avenida Bissaya Barreto, Blocos de Celas

3000-075 Coimbra

Tel.: +351 239 484 183

Fax.: +351 239 402 910

Endereço eletrónico: [marisaribeiro.md@gmail.com](mailto:marisaribeiro.md@gmail.com)



---

## Agradecimentos

---

Ao Mestre Dr. Rodrigo Farinha  
Quero em primeiro lugar agradecer  
Pois sem a sua ajuda e orientação  
Este trabalho não poderia acontecer.

Ao Sr. Prof. Doutor António Cabrita  
Meu singular e ilustre Coorientador  
Quero agradecer pela sua imensa sabedoria  
Com a qual, desta tese, foi o principal promotor.  
A sua disponibilidade e apoio constantes  
Para as minhas imensas dúvidas esclarecer  
Foram um incentivo importante  
Pelo qual muito lhe tenho a agradecer.

Sempre de sorriso nos lábios  
E uma palavra de alento pronta a dizer  
A si, Mestre Engenheiro Ricardo Cabeças  
Também não poderia deixar de agradecer.  
Pois se por momentos parecesse difícil  
Algum resultado conseguir encontrar  
Com o seu conhecimento e experiência  
Estava sempre lá para me ajudar.  
Pelas inúmeras horas do seu tempo  
Que tão amavelmente me disponibilizou  
Só graças a si e à sua ajuda  
Este trabalho se concretizou.

Aos amigos, colegas e professores  
Que ao longo dos anos encontrei  
Todos vocês me deram sem dúvida  
A força com que sempre lutei.  
E por isso, a todos vós deixo hoje  
Uma palavra de gratidão  
E não se esqueçam jamais  
Que moram no meu coração.

A força, determinação e coragem  
A ti, Marco, quero agradecer  
Pois ao longo destes anos e de todo este caminho  
Nunca me deixaste desistir nem esmorecer.

Minha querida mãe adorada  
Que sempre ao meu lado estás  
Obrigado pelo porto de abrigo  
Que sei que foste, és e serás.

E a ti pai, que tanto amo  
Este trabalho quero dedicar  
Pois só com a tua confiança em mim  
Eu aqui consegui chegar.  
Contigo aprendi a sonhar  
E os sonhos em realidade converter  
Pois na vida tu me ensinaste  
Que todas as batalhas, contigo ao lado, eu consigo vencer!



Figura 1: Imagem representativa do *Big Bang*. Fonte: <http://www.newyorkapologetics.com>

---

## Abstract

---

The use of metals has been central to the progress and evolution of the human civilization. It would be hard to imagine a developed society without the use of metal compounds. Metals are the only toxic pollutants which occur naturally in the environment. So, regardless the use of metals with maximum safety in industrial applications of consumer products, some level of human exposure is always inevitable, forcing the bodies to deal with these potentially toxic substances, being often modified by them in an harmful way. However, it is also true that many metals are fundamental to various biological processes, even so, these may become toxic due to the increasing of the dose and the exposure time.

From a chemical point of view, the heavy metals are located in the periodic table between the copper and the lead and when released as industrial waste in water, soil or air end up being absorbed by animals and plants, causing serious poisoning over the food chain. Thus, heavy metals such as mercury easily bind to sulfur present in some proteins, creating an abnormal molecular rearrangement mechanism very detrimental to the formation and performance of the function of some biomolecules. In turn, the lead can lead to inhibition of the enzymatic activity responsible for the synthesis of heme and, therefore, generate serious deleterious effects on the organism.

In this experimental study 30 Wistar rats, with four weeks of age were used. They were kept in standard handling and maintenance, according to the legislation. The food and the water supply was made in accordance with the anatomical and physiological parameters of the species and only in the test groups were replaced water by contaminated water with heavy metals (lead and mercury).

Regarding the histological analysis, no differences were found among the three groups. Regarding elemental analysis, changes were found in sulfur (decrease) and potassium (increase) in the test group I (water contaminated with lead) and in the case of the test group II (water contaminated with mercury) we only found changes in aluminum (decrease), in potassium (increase), in calcium (increase) and in iron (increase).

These results show the need for more detailed studies, particularly in relation to the exposure time and the concentration of heavy metals used as well as their possible combination.

**Keywords:** X-ray fluorescence, heavy metals, lead, mercury, toxicity, atom, rat.





---

## Resumo

---

A utilização dos metais tem sido fundamental para o progresso e evolução da civilização humana. Seria difícil imaginar uma sociedade desenvolvida sem compostos metálicos. Os metais são os únicos poluentes tóxicos que ocorrem naturalmente no ambiente. Assim, independentemente dos metais serem utilizados com a máxima segurança em aplicações industriais de produtos de consumo, algum nível de exposição humana é sempre inevitável e por isso os organismos têm sido forçados a lidar com estas substâncias potencialmente tóxicas sendo muitas vezes modificados por elas de forma prejudicial. No entanto, também é verdade que muitos metais são essenciais para vários processos biológicos, mas até esses se podem tornar tóxicos com um aumento da dose e do tempo de exposição.

Do ponto de vista químico os metais pesados estão localizados na tabela periódica entre o cobre e o chumbo e quando libertados como resíduos industriais na água, no solo ou no ar, acabam por ser absorvidos pelos animais e plantas, provocando graves intoxicações ao longo da cadeia alimentar. Assim, metais pesados como o mercúrio facilmente se ligam ao enxofre presente em algumas proteínas criando um mecanismo de rearranjo molecular anormal e muito prejudicial para a formação e desempenho da função de algumas biomoléculas. Já o chumbo por sua vez pode conduzir à inibição da atividade enzimática responsável pela síntese do grupo heme e com isso gerar graves efeitos deletérios no organismo.

No presente trabalho utilizaram-se 30 ratos Wistar macho, com quatro semanas de idade no início do ensaio, mantidos em condições padrão de manipulação e manutenção, de acordo com a legislação em vigor. A alimentação e o fornecimento de água foi feito de acordo com os parâmetros anatomofisiológicos da espécie e apenas os grupos teste foram submetidos a água contaminada com metais pesados (chumbo e mercúrio).

Em relação à análise histológica verificou-se não existirem diferenças significativas entre os três grupos. Em relação à análise elemental, verificou-se que apenas foram encontradas alterações no enxofre (diminuído) e no potássio (aumentado) no caso do grupo teste I (água contaminada com chumbo) e no caso do grupo teste II (água contaminada com mercúrio) apenas se encontraram alterações no alumínio (diminuído), no potássio (aumentado), no cálcio (aumentado) e no ferro (aumentado).

Estes resultados mostram que são necessários mais estudos pormenorizados nomeadamente em relação ao tempo de exposição e à concentração de metais pesados que se utiliza, bem como à sua possível combinação.

**Palavras-chave:** Fluorescência de raios-X, átomo, metais pesados, chumbo, mercúrio, toxicidade, rato.



---

## Índice

---

<b>Agradecimentos</b> .....	iii
<b>Abstract</b> .....	v
<b>Resumo</b> .....	vii
<b>Índice</b> .....	ix
<b>Lista de Figuras</b> .....	xi
<b>Lista de Tabelas</b> .....	xiii
Capítulo 1 .....	1
<b>Introdução</b> .....	1
1.1. A formação do átomo .....	1
1.2. Os minerais .....	3
1.3. Alumínio .....	4
1.4. Fósforo .....	4
1.5. Enxofre .....	5
1.6. Cloro .....	5
1.7. Potássio .....	6
1.8. Cálcio .....	8
1.9. Ferro .....	9
1.10. A importância da água .....	10
1.11. Toxicidade .....	11
1.12. Metais pesados .....	12
1.13. Mercúrio .....	13
1.14. Chumbo .....	14
1.15. Cavidade oral/Língua .....	16
Capítulo 2 .....	19
<b>Objetivo</b> .....	19
Capítulo 3 .....	21
<b>Material e Métodos</b> .....	21

3.1. Preparação dos animais .....	21
3.2. Sacrifício e necrópsia .....	21
3.3. Procedimento histológico.....	22
3.4. Análise de fluorescência de raios-X (XRF).....	23
Capítulo 4 .....	25
<b>Análise estatística</b> .....	25
Capítulo 5 .....	27
<b>Resultados</b> .....	27
Capítulo 6 .....	33
<b>Discussão</b> .....	33
Capítulo 7 .....	37
<b>Conclusão</b> .....	37
<b>Referências bibliográficas</b> .....	39

---

## Lista de Figuras

---

<b>Figura 1.1:</b> Imagem representativa da explosão " <i>Big Bang</i> ". Fonte: <a href="http://www.mundos-fantasticos.com">http://www.mundos-fantasticos.com</a> .....	1
<b>Figura 1.2:</b> Esquema representativo de um neutrão e de um próton. Fonte: <a href="http://www.sciexplorer.blogspot.pt">http://www.sciexplorer.blogspot.pt</a> .....	2
<b>Figura 1.3:</b> Esquema representativo de um átomo de hidrogénio e de um de átomo de hélio. Fonte: <a href="https://www.google.pt">https://www.google.pt</a> .....	2
<b>Figura 1.4:</b> Esquema representativo do início do universo. Fonte: <a href="http://4.bp.blogspot.com">http://4.bp.blogspot.com</a> .....	3
<b>Figura 1.5:</b> Esquema representativo da interação das moléculas de água com o ião cloreto. Fonte: <a href="http://atomoemeio.blogspot.pt/">http://atomoemeio.blogspot.pt/</a> .....	6
<b>Figura 1.6:</b> Imagem representativa de ferro. Fonte: <a href="http://imagens.tabelaperiodica.org/">http://imagens.tabelaperiodica.org/</a> .....	10
<b>Figura 1.7:</b> Imagem representativa de gotas de mercúrio. Fonte: <a href="http://pt.dreamstime.com">http://pt.dreamstime.com</a> ....	14
<b>Figura 1.8:</b> Imagem representativa de chumbo. Fonte: <a href="http://cidmarcus.blogspot.pt">http://cidmarcus.blogspot.pt</a> .....	16
<b>Figura 1.9:</b> Esquema representativo da língua. Fonte: <a href="http://www.infoescola.com/">http://www.infoescola.com/</a> .....	18
<b>Figura 3.1:</b> Fotografia dos blocos de parafina no estado sólido contendo o tecido (língua) dos três grupos de estudo. Fonte: imagem fotografada pelo autor. ....	22
<b>Figura 3.2:</b> Fotografia de lâmina preparada para análise histológica do grupo teste I. Fonte: imagem fotografada pelo autor. ....	22
<b>Figura 3.3:</b> Fotografia de lâmina preparada para análise histológica do grupo teste II. Fonte: imagem fotografada pelo autor. ....	22
<b>Figura 3.4:</b> Fotografia do microscópio Nikon Eclipse modelo E600. Fonte: imagem fotografada pelo autor. ....	23
<b>Figura 3.5:</b> Fotografia de bloco de parafina no estado sólido contendo o tecido (língua). Fonte: imagem fotografada pelo autor. ....	24
<b>Figura 3.6:</b> Ilustração do local de incidência do feixe de raios-X. Fonte: imagem fotografada pelo autor .....	24
<b>Figura 3.7:</b> Gráfico do espectro de energias criado pelo software do equipamento de análise por fluorescência de raios-X (Hitachi SEA 6000VX) Fonte: imagem fotografada pelo autor.....	24



---

## Lista de Tabelas

---

<b>Tabela I:</b> Média e desvio padrão dos valores obtidos nos grupos controlo, teste I e teste II ....	28
<b>Tabela II:</b> Relações entre os elementos e K, P e S no grupo controlo.....	30
<b>Tabela III:</b> Relações entre os elementos e K, P e S no grupo teste I.....	30
<b>Tabela IV:</b> Relações entre os elementos e K, P e S no grupo teste II .....	30
<b>Tabela V:</b> Média e desvio padrão da concentração dos elementos Zn, Pb e Hg nos três grupos. .....	31
<b>Tabela VI:</b> Comparação das alterações na concentração dos elementos nos três grupos .....	35





# Capítulo 1

---

## Introdução

---

### 1.1. A formação do átomo

O universo que nós conhecemos, segundo uma das hipóteses mais aceites na atualidade, terá começado há cerca de 14,5 mil milhões de anos atrás com uma temperatura de  $10^{32}$  °C e uma densidade indescritível. Naquele instante existia apenas uma força universal e um tipo de partícula elementar, até que com a separação desta força universal da força da gravidade se deu uma explosão, o “*Big Bang*” e esta expansão e o subsequente arrefecimento para os  $10^{27}$  °C, permitiu a formação de vários pares de partículas e antipartículas como os quarks e os antiquarks e os eletrões e os positrões.[1][2][3]



Figura 1.1: Imagem representativa da explosão “*Big Bang*”. Fonte: <http://www.mundos-fantasticos.com>

Após algum tempo a temperatura baixou para níveis incompatíveis com esta formação de pares e energeticamente a sua formação deixou de ser possível. E foi durante apenas alguns segundos deste processo de arrefecimento que os quarks se condensaram em núcleos de três formando assim

neutrões (*down down up*) e sete vezes mais prótons (*up up down*) os quais, ao conseguirem fundir-se, deram origem ao núcleo do hélio, o núcleo atómico mais leve, até hoje, conhecido. Estes quarks encontravam-se unidos pelos gluões, partículas mediadoras sem massa e sem carga eléctrica que só existem virtualmente quando dois quarks interagem.[3][4]

Ainda hoje os 73% de hidrogénio e os 25% de hélio que existem no universo tiveram origem nesse curto espaço de tempo de 3 minutos, tendo-se formado ainda quantidades vestigiais de lítio e berílio.[5] Apenas 2% do universo não é formado por hidrogénio e hélio ficando todos os restantes elementos da tabela periódica mais pesados reduzidos a esta pequena percentagem e sendo eles fruto de reações nucleares que foram acontecendo nas estrelas formadas com o arrefecimento do “*Big Bang*” e em seguida agrupadas em galáxias, ou de enormes explosões de estrelas conhecidas como supernovas.[3]

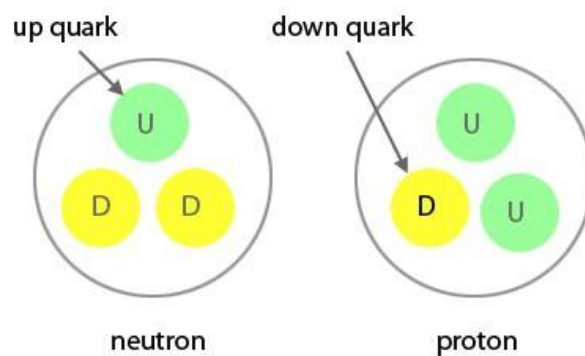


Figura 1.2: Esquema representativo de um neutrão e de um próton.

Fonte: <http://www.sciexplorer.blogspot.pt>

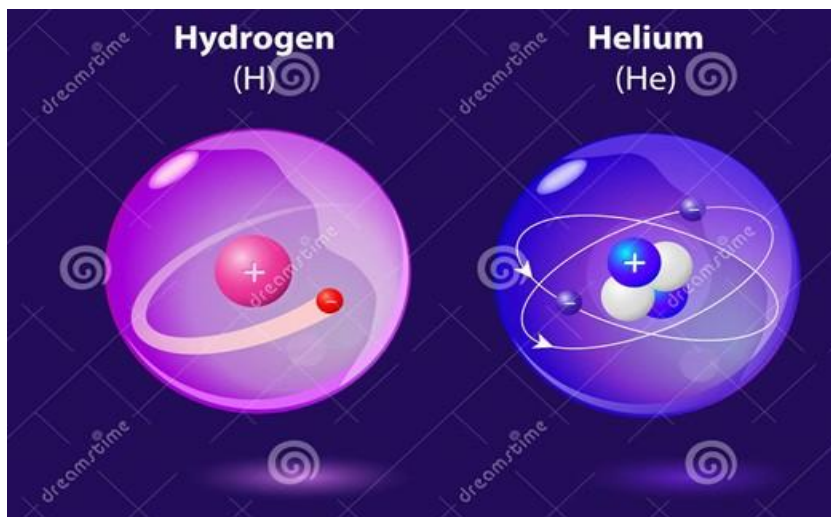


Figura 1.3: Esquema representativo de um átomo de hidrogénio e de um átomo de hélio.

Fonte: <https://www.google.pt>

Dos 116 elementos existentes atualmente apenas 90 ocorrem naturalmente, existindo por isso 26 elementos, feitos pelo homem, resultantes do desenvolvimento de máquinas nucleares conhecidas como aceleradores de partículas. [1]

A maioria das estrelas, ao longo da sua vida vão fundindo no seu núcleo 2 átomos de hidrogénio em hélio sendo estas reações as responsáveis por 85% da energia do Sol. Os restantes 15% vêm de reações que produzem o berílio e o lítio. A energia proveniente destas reações nucleares é emitida em várias formas de radiação tais como: luz ultravioleta, raios-X, luz visível, raios infravermelhos, micro-ondas e ondas de rádio. Além disso, partículas com energia, tais como neutrinos e prótons são também libertadas, sendo as responsáveis pela formação do vento solar. A Terra, ao fazer parte do sistema solar, está no caminho deste fluxo de energia que aquece o planeta e fornece energia para a vida. A atmosfera da Terra é capaz de filtrar a maior parte da radiação prejudicial e o campo magnético da Terra consegue desviar os efeitos nocivos do vento solar. Quando o núcleo de uma estrela começa a ficar sem hidrogénio, a estrela começa a morrer. A estrela expande, torna-se enorme e avermelhada e começa a produzir átomos de carbono através da fusão de átomos de hélio. Durante uma supernova, a estrela liberta grandes quantidades de energia, bem como neutrões, o que permite que elementos mais pesados do que o ferro, como o urânio e o ouro, sejam produzidos.

Numa explosão supernova, todos esses elementos são expelidos para o espaço. "Nós somos literalmente as cinzas de enormes estrelas mortas". Astronomer Royal Sir Martin Rees.[4][5]

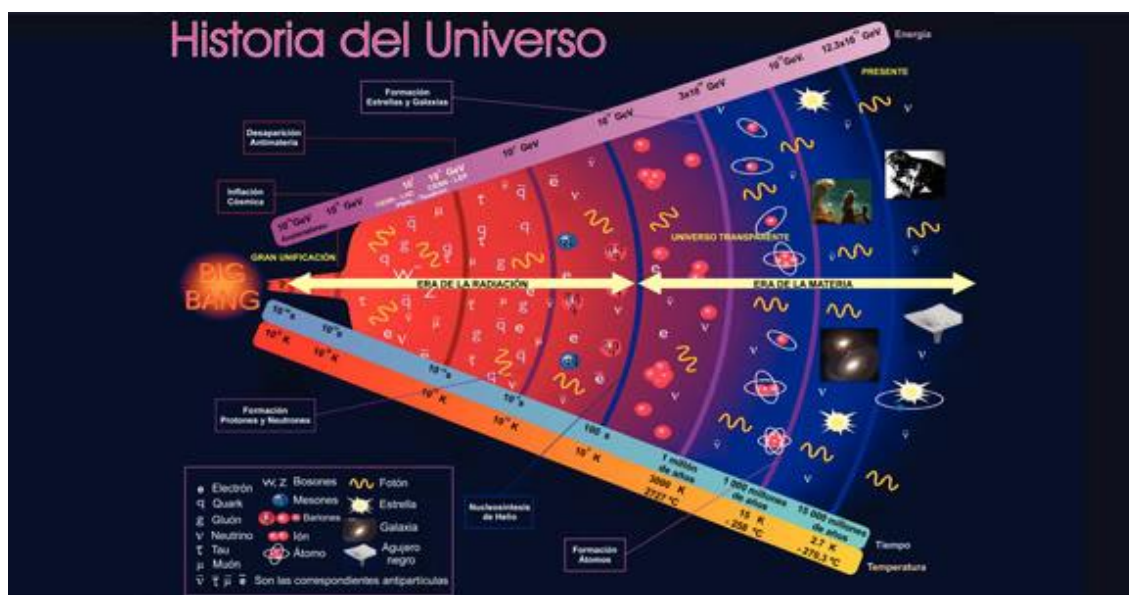


Figura 1.4: Esquema representativo do início do universo.

Fonte: [http://s1222.photobucket.com/user/magnificos/media/Poster\\_Evolucion\\_Universotest.jpg.html](http://s1222.photobucket.com/user/magnificos/media/Poster_Evolucion_Universotest.jpg.html)

## 1.2. Os minerais

Os minerais são substâncias inorgânicas, não podendo ser por isso sintetizados pelo corpo. Assim o seu aporte é feito através do alimento. Ao contrário dos hidratos de carbono, das gorduras e das proteínas, os minerais não fornecem energia. Uma vez que a maioria dos minerais são solúveis em água estes são facilmente absorvidos e excretados na urina e, em menor grau, nas fezes. Cerca de 20-30g de minerais são excretados por dia. Os elementos químicos com funções biológicas podem ser divididos em 5 grupos. No primeiro estão incluídos o carbono, o hidrogénio, o oxigénio, o

azoto e o enxofre que são os componentes maioritários das moléculas do corpo humano. No segundo encontram-se os minerais nutricionalmente importantes como o cálcio, o fósforo, o magnésio, o sódio, o potássio e o cloro que devem constar na dieta diária em quantidades superiores a 100 mg/dia. Do terceiro grupo fazem parte o crómio, o cobalto, o cobre, o iodo, o ferro, o manganês, o molibdénio, o selénio e o zinco que são necessários em muito pequenas quantidades. No quarto grupo ficam os elementos adicionais necessários à dieta mas que não desempenham nenhuma função conhecida essencial aos humanos e são eles o arsénio, o cádmio, o níquel, o silício, o estanho e o vanádio. O último grupo contém os elementos tóxicos como o chumbo e o mercúrio.[6]

### 1.3. Alumínio

O alumínio é um elemento químico, que pertence ao grupo dos metais, de símbolo Al, com um número atómico 13 (13 prótons e 13 eletrões) e massa atómica igual a 27 uma. À temperatura ambiente este elemento encontra-se no estado sólido. Apresenta um ponto de fusão de 933,47 K e um ponto de ebulição de 2792 K. A sua estrutura cristalina é cúbica.[7] Trata-se de um mineral sem benefício nutricional conhecido e que pelo contrário pode ser prejudicial quando em demasia para o osso e para os tecidos cerebrais. Altos níveis de alumínio na dieta podem interferir com a absorção ou a utilização de outros minerais essenciais como o cálcio, o fósforo, o magnésio e o flúor. A fraqueza muscular e a perda óssea podem ser indicativos de toxicidade por alumínio. Alguns estudos em ratos sugerem que a acumulação de alumínio no cérebro pode causar a doença de Alzheimer. As principais fontes deste mineral incluem aditivos alimentares e alimentos cozinhados em panelas de alumínio.[8][9][10][11]

### 1.4. Fósforo

O fósforo é um elemento químico de símbolo P, com um número atómico 15 (15 prótons e 15 eletrões) e massa atómica igual a 31 uma. [7] O corpo humano contém cerca de 500-700g de fósforo e este está presente sob a forma de fosfato, um ião poliatómico ou um radical, que consiste num átomo de fósforo e quatro de oxigénio. Na forma iónica, apresenta uma carga de -3, sendo descrito como  $\text{PO}_4^{3-}$ . No campo bioquímico, um ião de fosfato livre em solução é chamado de fosfato inorgânico o que permite distingui-lo dos fosfatos existentes nas moléculas de ATP, DNA ou mesmo de RNA.[6] Este elemento essencial na dieta está envolvido em quase todos os processos metabólicos e é o segundo mineral mais abundante no corpo.[8] A sua absorção é feita através das fosfatases presentes no lúmen que hidrolisam os fosfatos das substâncias orgânicas. O fosfato livre é absorvido no jejuno e entra no sangue pela circulação da veia porta. Esta absorção pode ser influenciada por diversos fatores, como sejam o calcitriol que aumenta a absorção ou uma dieta rica em cálcio que diminui a absorção do fosfato para formar fosfato de cálcio. O fosfato está presente nos ossos e dentes na hidroxiapatite, é necessário na formação dos ácidos nucleicos, é necessário para a síntese de fosfolípidos, é um constituinte importante de compostos altamente energéticos como o

ATP e o GTP e está envolvido na modificação de várias enzimas e proteínas.[9] Desempenha ainda um papel importante como sistema-tampão intracelular na medida em que as moléculas ricas em fosfatos como o ATP, o DNA e o RNA e os iões fosfato como o  $\text{HPO}_4^{2-}$  atuam como tampão sendo que estes iões, representantes de ácidos fracos, se podem ligar ao  $\text{H}^+$  para formar o  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  quando o pH desce e quando o pH sobe este ião liberta o  $\text{H}^+$ . [10]

O valor normal de fosfato no plasma é de 2,5 a 4,5 mg/dl. Em crianças ele é ligeiramente superior entre 4 a 6 mg/dl. A falta de fosfato ocorre devido a uma elevada absorção ou uma perda excessiva pelo rim. O seu aporte é feito principalmente pelos cereais, pelo coco, pelo amendoim e pelos ovos. A dose diária recomendada é de: 200-300 mg/dia.[9]

Os fosfatos e os sulfatos são macronutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento e deficiências nestes elementos minerais alteram algumas funções metabólicas importantes. Outros micronutrientes como o zinco e o ferro têm a sua homeostase determinada geneticamente, e o seu défice ou o seu excesso pode provocar distúrbios fisiológicos graves. Estes nutrientes interagem entre si uma vez que a concentração de fosfatos e sulfatos influencia os níveis de ferro e zinco a nível fisiológico e molecular. [12]

## 1.5. Enxofre

O enxofre é um elemento químico de símbolo S, com um número atómico 16 (16 protões e 16 eletrões) e massa atómica igual a 32 uma. À temperatura ambiente este elemento encontra-se no estado sólido. Apresenta um ponto de fusão de 388,36 K e um ponto de ebulição de 717,75 K. A sua estrutura cristalina é ortorrômbica. [7] Este é um elemento não metálico que se pode encontrar em todos os tecidos corporais especialmente naqueles que são ricos em proteínas. O enxofre é um constituinte de alguns aminoácidos e encontra-se também nas vitaminas do complexo B como a tiamina, o ácido pantoténico e a biotina. É ainda um componente importante do cabelo, do músculo, da pele, do tecido conjuntivo, dos ossos e dos dentes. Está envolvido na cascata de coagulação e na ativação de algumas enzimas e é um componente da constituição da insulina. As proteínas ingeridas normalmente na dieta fornecem a quantidade necessária de enxofre e não se conhecem efeitos tóxicos subjacentes.[8]

## 1.6. Cloro

O cloro é um elemento químico de símbolo Cl, com um número atómico 17 (17 protões e 17 eletrões) e massa atómica igual a 35 uma. À temperatura ambiente este elemento encontra-se no estado gasoso. Apresenta um ponto de fusão de 171,6 K e um ponto de ebulição de 239,11 K. A sua estrutura cristalina é ortorrômbica. [7] O ião cloreto,  $\text{Cl}^-$ , é o principal anião inorgânico no fluido extracelular necessário para manter o equilíbrio de fluidos e eletrólitos dentro dos valores normais. As concentrações normais de cloro/cloreto são de 96-106 miliequivalentes por litro de plasma. Concentrações mais elevadas estão presentes no suco gástrico e no líquido cefalorraquidiano.[8] Os

mecanismos que regulam os níveis de sódio, potássio e cálcio são também os responsáveis pelos níveis de cloreto no organismo.[10] Estando por isso uma perda excessiva de cloreto normalmente associada a uma perda de sódio causada pela transpiração excessiva, diarreia crónica, vômitos ou alguns distúrbios renais. Estas perdas podem originar alcalose metabólica, uma desordem do pH do corpo, que pode levar a coma ou até mesmo à morte. O consumo alimentar é geralmente feito na forma de cloreto de sódio, o sal de mesa comum. Existem suplementos disponíveis de baixas concentrações com cloreto e potássio usados para o tratamento de falta de potássio associada ao uso de diuréticos. A hiperclorémia pode causar hipertensão.[8]

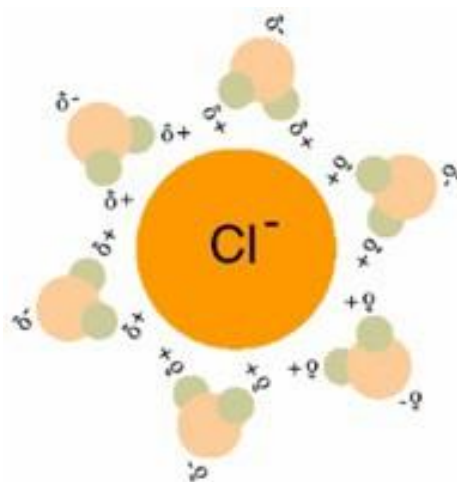


Figura 1.5: Esquema representativo da interação das moléculas de água com o íon cloreto.

Fonte: <http://atomoemeio.blogspot.pt/>

## 1.7. Potássio

O potássio é um elemento químico de símbolo K, com um número atómico 19 (19 prótons e 19 eletrões) e massa atómica igual a 39 uma. À temperatura ambiente este elemento encontra-se no estado sólido, com um ponto de fusão de 336,53 K e um ponto de ebulição de 1032 K. A sua estrutura cristalina é cúbica.[7]

O íon potássio é o principal catião das células do tecido muscular e da maioria de outras células. Um adulto contém cerca de 250 gramas de potássio, sendo este íon essencial para manter o equilíbrio de fluidos nas células e necessário para quase todas as reações celulares.[8]

A maior parte do potássio encontra-se intracelular sendo a sua concentração trinta vezes superior à existente no plasma e no líquido intersticial. Embora a concentração de potássio no sangue seja pequena, é de grande importância, uma vez que este é necessário para a conversão da glicose em glicogénio para armazenamento, para a transmissão de impulsos nervosos, para a contração do músculo esquelético e para a regulação de algumas hormonas. O potássio também desempenha um papel importante na manutenção da pressão sanguínea dentro dos valores normais.[8]

Alguns estudos demonstram que populações que consomem grandes quantidades de potássio na dieta alimentar apresentam uma menor incidência de hipertensão. Estudos em animais mostraram que o potássio pode ter a capacidade de prevenir acidentes vasculares cerebrais. O potássio é

absorvido a partir do trato gastrointestinal e os seus níveis são mantidos em equilíbrio pelo sistema renal.[8]

O déficit plasmático de potássio, hipocaliemia, pode ser devido a alcalose, a administração de elevadas doses de insulina, redução da ingestão de potássio (anorexia nervosa e alcoolismo) ou excessiva perda renal. Os principais sintomas apresentados são a diminuição da excitabilidade neuromuscular do músculo esquelético (fraqueza), diminuição do tônus do músculo liso e atraso da repolarização ventricular no músculo cardíaco. Em relação à hipercaliemia esta deve-se essencialmente a traumatismos celulares, acidose, déficit de insulina, hipoxia celular ou diminuição da excreção renal. Os sintomas resultantes podem ser: aumento da irritabilidade neuromuscular, cólicas intestinais, fraqueza muscular, paralisia, arritmias cardíacas, taquicardia e em casos muito graves pode mesmo levar a paragem cardíaca.[10]

A ação benéfica dos diuréticos, usados para tratar a hipertensão arterial e a insuficiência cardíaca, aumentam a produção de urina e a excreção de sódio, havendo também uma considerável perda de potássio, daí a necessidade de recorrer a diuréticos especiais tais como: a amilorida, o triamtereno ou a espironolactona, chamados “diuréticos poupadores de potássio”. [8]

O impacto da ingestão de quantidades de minerais anormais está na base etiológica do desenvolvimento de algumas doenças como as cardiovasculares, a osteoporose, a anemia, a diabetes *mellitus* e alguns tipos de cancro. Os suplementos ricos em minerais ajudam a combater determinadas deficiências alimentares desses nutrientes, contudo, um consumo excessivo desses produtos pode levar a consequências também nefastas.[13]

Foi realizado um estudo para determinar a contribuição dos suplementos minerais para o total de ingestão de alguns nutrientes em adultos residentes em Varsóvia (573 homens e 497 mulheres). Os níveis de minerais foram analisados de acordo com os valores de referência da *Recommended Dietary Allowance* (RDA) e verificou-se que a ingestão de cálcio, magnésio e potássio foram menores do que os recomendados pela RDA e que os suplementos não conseguiram colmatar o déficit desses nutrientes.[13] Verificou-se ainda que a ingestão de fósforo foi um pouco maior do que a recomendada e que os suplementos de zinco e cobre em ambos os sexos eram desnecessários, bem como os suplementos de ferro no grupo dos homens, uma vez que as suas concentrações no grupo controlo (sem suplementos) atingiam os valores de referência recomendados. Os suplementos de ferro nas mulheres mostraram-se eficazes. Concluíram então que a eficácia de complementar as dietas alimentares de adultos com suplementos ricos em minerais depende muito do tipo de mineral e do grupo de população a que se destina.[13]

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças não transmissíveis (DNT) são as principais contribuintes para a mortalidade no mundo, matando mais pessoas a cada ano do que todas as outras causas combinadas e devido ao aumento da sua prevalência ações de orientação alimentar e nutricional destinadas a promover a saúde pública têm sido consideradas muito importantes. Neste sentido foi realizado um estudo para avaliar a ingestão de potássio e o rácio entre este e o sódio em crianças de 8-10 anos de idade. Os resultados permitiram concluir que existia uma baixa ingestão de potássio nestas crianças e que novas intervenções de promoção da saúde são necessárias como forma de instruir e motivar a consciência pública para a baixa concentração de

potássio na dieta alimentar e aumentar a sua ingestão.[14]

## 1.8. Cálcio

O cálcio é um elemento químico de símbolo Ca, com um número atômico 20 (20 prótons e 20 elétrons) e massa atômica igual a 40 uma. À temperatura ambiente este elemento encontra-se no estado sólido. Apresenta um ponto de fusão de 1115 K e um ponto de ebulição de 1757 K. A sua estrutura cristalina é cúbica.[7]

O cálcio é o mineral essencial com maior concentração no corpo humano (99% nos ossos e dentes), cerca de 1200g num adulto de 70kg e a quinta substância mais abundante no corpo humano.[9] O restante 1 por cento é encontrado no sistema circulatório e ajuda na regulação de várias funções do corpo. O esqueleto do recém-nascido contém cerca de 30g de cálcio, a maioria das quais depositadas durante o terceiro trimestre da gravidez. A absorção de cálcio requer a presença de vitamina D. O cálcio é essencial para a formação do osso saudável não podendo por si só aumentar a massa óssea a partir dos 20 anos de idade. Num estudo francês em mulheres idosas tendo-lhes sido fornecido um suplemento de 800 unidades internacionais de vitamina D3 e 1,2g de cálcio por dia demonstrou-se existir uma diminuição de mais 40% nas fraturas da anca. No entanto o uso de suplementos ainda deixa muitas dúvidas em relação à sua eficácia. Embora alguns estudos em animais pareçam indicar que a ingestão de suplementos de cálcio pode proteger contra o cancro do cólon, evidências na espécie humana ainda não são conhecidas.[8][9]

Num outro estudo foram investigados os efeitos de suplementos de cálcio associados à dieta alimentar sobre o metabolismo ósseo, as concentrações de minerais no rim e a função renal em ratos alimentados com uma dieta alimentar rica em altas concentrações de fósforo e verificou-se que os suplementos de cálcio melhoraram os parâmetros do metabolismo ósseo e renal em ratos alimentados com uma dieta alimentar rica em fósforo, o que sugere que os suplementos de cálcio previnem a perda de massa óssea e a deterioração da função renal induzida por uma dieta rica em fósforo, não afetando no entanto as concentrações de minerais no rim.[15]

Outro estudo resultante de dezanove ensaios clínicos randomizados demonstrou que a utilização de suplementos com vitamina D em associação ou não ao cálcio mostraram resultados variados: sendo a incidência de fratura menor em sete dos ensaios, igual em dez e mesmo superior em dois dos ensaios realizados.[16]

Por este motivo, em pouco mais de uma década, os suplementos de cálcio amplamente utilizados até aí, por pessoas mais velhas, levaram a uma alteração nas recomendações por parte das entidades competentes no sentido de evitar o seu uso generalizado na prevenção primária das fraturas. Esta mudança substancial nas recomendações ocorreu como resultado de alterações consideradas significativas na prevenção de fraturas, associadas a efeitos adversos em vários ensaios clínicos realizados quer com suplementos de cálcio, quer com a sua associação a suplementos de vitamina D. Embora haja pouca evidência para sugerir que a ingestão de cálcio esteja de facto intimamente associada a um aumento do risco de doenças cardiovasculares, também há pouca evidência de que suplementos ricos neste nutriente consigam prevenir o risco de fratura.



Portanto, a prescrição generalizada de suplementos de cálcio para prevenir fraturas deve ser abandonada.[17]

O pH interfere com os mecanismos de absorção deste elemento na medida em que um pH neutro ou ácido favorece a absorção de cálcio e um pH alcalino diminui a sua absorção.[9]

Este mineral também apresenta elevada importância nas grávidas uma vez que a sua diminuição de forma significativa pode contribuir para o desenvolvimento de pré-eclampsia, sendo por isso fundamental nesta situação o aporte deste mineral através de suplementos alimentares para ajuda na prevenção da incidência da pré-eclampsia.[18]

## 1.9. Ferro

O ferro é um elemento químico de símbolo Fe, com um número atômico 26 (26 prótons e 26 elétrons) e massa atômica igual a 56 uma. À temperatura ambiente este elemento encontra-se no estado sólido. Apresenta um ponto de fusão de 1811 K e um ponto de ebulição de 3134 K. A sua estrutura cristalina é cúbica.[7]

Este elemento metálico desempenha um papel muito importante no transporte de oxigénio para os tecidos, no seu armazenamento no músculo e nas reações de oxidação nas células. O ferro é absorvido na mucosa intestinal e a sua absorção é regulada por mecanismos que permitem manter o equilíbrio da concentração deste nutriente.[8] O corpo humano contém cerca de 4-5g de ferro. A maior parte deste (65%) está presente na hemoglobina na forma de ferro heme (forma orgânica) responsável pelo transporte de oxigénio.[9] No entanto na mioglobina também se encontram 9% na forma heme responsável pelo armazenamento de oxigénio. Os cerca de 20 % de ferro não-heme (ferritina, hemossiderina e transferrina) são os responsáveis pelo armazenamento e transporte do ferro no organismo.[6]

A *Recommended Dietary Allowances* (RDA) para o ferro é baseada na obtenção de 300mg para atender às exigências nutricionais para pessoas saudáveis. No caso de mulheres adolescentes e adultas com menstruação o valor deve ser de 15 mg/dia. No caso de mulheres em pós-menopausa e homens adultos é de 10 mg/dia. Para as crianças o aporte de 1,0 a 1,5 mg/Kg é suficiente. Durante a gravidez, a exigência de ferro é maior principalmente no segundo e terceiro trimestre da gravidez sendo um suplemento médio de 15 mg/dia suficiente para satisfazer os requisitos da maioria das mulheres. O ácido ascórbico (vitamina C) presente nos alimentos de origem vegetal melhora a absorção de ferro não-heme e é benéfico para pessoas que não consomem a quantidade certa de proteína animal.

No entanto, provavelmente não há benefício em adicionar vitamina C aos suplementos uma vez que o sulfato ferroso presente na maioria dos suplementos é facilmente absorvido.[6][8]

A Organização Mundial de Saúde recomenda o uso de suplementos de ferro e ácido fólico em gestantes não anémicas para prevenir a anemia e melhorar os resultados gestacionais. A composição do suplemento é de 120 mg de ferro e 2,8 mg de ácido fólico, uma vez por semana, durante a gravidez.[19]

A deficiência de ferro ocorre quando há uma redução na quantidade de eritrócitos ou quando os

glóbulos vermelhos se tornam menores do que o normal. A Organização Mundial de Saúde estabeleceu que a anemia ocorre quando a concentração de hemoglobina atinge valores inferiores a 1,3 g/L em homens adultos e 1,2 g/L em mulheres não grávidas. Durante a gravidez os valores normais mais baixos são de cerca de 11g de hemoglobina. Alterações em vários componentes do sistema imunitário também podem ocorrer e as crianças podem apresentar apatia, déficit de atenção, irritabilidade e dificuldades de aprendizagem. Uma alta ingestão de cálcio pode interferir com a absorção de ferro e outros minerais.[8][9]

Em relação à toxicidade em indivíduos saudáveis, a possibilidade de intoxicação por ferro a partir de fontes provenientes dos alimentos é remota. Um estudo sobre a ingestão de ferro, especialmente de ferro heme, através de suplementos, tentou examinar a associação entre a ingestão deste com a incidência de AVC em homens e verificou que os resultados indicavam que uma alta ingestão de ferro heme, particularmente em indivíduos com peso normal, pode aumentar o risco de acidente vascular cerebral.[20]



Figura 1.6: Imagem representativa de ferro. Fonte: <http://imagens.tabelaperiodica.org/>

### **1.10. A importância da água**

Um dos componentes mais importantes dos tecidos é a água. Cerca de três quartos da massa total dos tecidos moles é água e algumas das propriedades físicas destes tecidos são devidas à sua presença. Os ultrassons propagam-se através do tecido mole com uma velocidade semelhante à da água. Fótons de raios-X são atenuados também de modo semelhante na água e nos tecidos moles, sendo as suas capacidades térmicas e de condutividade também similares.[21]

A proporção de peso do corpo composta por água vai diminuindo com o passar dos anos, sendo a sua diminuição mais acentuada logo nos primeiros dez anos de vida e inversamente proporcional ao aparecimento do tecido adiposo. Os principais compartimentos de líquidos no organismo podem dividir-se em: líquido intracelular 40% do peso do organismo (dentro das células) e líquido extracelular 20% do peso do organismo (líquido intersticial, plasma). Iões, pequenas moléculas e a água podem circular livremente entre estes compartimentos sendo a pressão osmótica destes compartimentos

semelhante entre eles. O volume total de água no organismo permanece constante devido aos mecanismos que permitem manter este equilíbrio entre o volume de água que entra no organismo e o que ele perde diariamente. Assim as fontes de água são 90% através da sua ingestão e cerca de 10% resultante do metabolismo celular e as vias de eliminação são 61% através da urina, 35% através da evaporação e 4% através das fezes.[10]

A água é um bem essencial à vida e como tal a sua qualidade é fundamental para a saúde dos diversos organismos. Os controlos apertados nos sistemas de água destinada ao consumo humano são fundamentais para o tratamento adequado dos agentes patogénicos principalmente os que vivem em biofilmes como a *Legionella pneumophila*, sendo por isso fundamental entender a ecologia e diversidade microbiana do biofilme para poder desenvolver desinfetantes eficazes para o tratamento da água que consumimos.[22]

### 1.11. Toxicidade

A toxicologia é o estudo dos efeitos adversos químicos ou físicos de certas substâncias nos organismos vivos. Um toxicologista é preparado para examinar e comunicar a natureza desses efeitos na saúde humana, animal e na saúde ambiental. Este examina e pesquisa os mecanismos celulares, bioquímicos e moleculares da ação destes agentes bem como os efeitos funcionais e avalia a probabilidade da sua ocorrência. A relação entre a dose de exposição e o tipo de resposta é fundamental para a avaliação do risco e para uma estimativa quantitativa dos potenciais efeitos deletérios para a saúde humana e ambiental. A diversidade de produtos químicos no ambiente e a crescente dependência da nossa sociedade nos produtos químicos aumentam a necessidade de avaliar os perigos que podem resultar da utilização destes agentes.[23]

Um relatório recente da OMS confirma que a qualidade do ambiente desempenha um papel significativo no estado de saúde humana. Estima-se que cerca de um quarto das doenças, principalmente as que afetam as crianças sejam devidas a fatores ambientais. Acredita-se que ambientes mais saudáveis podem ajudar na prevenção de uma vasta gama de distúrbios e diminuir a taxa de morbilidade.[24]

Muitos dos medicamentos utilizados pelo homem também levantam algumas dúvidas em relação aos seus possíveis efeitos adversos, nomeadamente a longo prazo e principalmente em crianças. Por exemplo um estudo feito em ratos para avaliar a existência de efeitos adversos a longo prazo resultante do uso de fentanil em recém-nascidos permitiu concluir que este não só não apresentou nenhum efeito no crescimento e desenvolvimento inicial como ainda contribuiu para um melhor desenvolvimento e diminuição da ansiedade numa fase mais tardia, demonstrando-se assim que o seu uso é seguro mesmo em recém-nascidos.[25]

Contudo, a toxicologia evoluiu rapidamente no final do século XIX e durante o século XX acompanhando o desenvolvimento das ciências biológicas e físicas bem como o aumento acentuado da produção de medicamentos, pesticidas, munições, fibras sintéticas e produtos químicos industriais. A história de muitas ciências (medicina, genética, física, biologia, farmacologia) representa uma transição ordenada com base na teoria, hipóteses, testes e síntese de novos produtos aos quais

se seguem efeitos adversos muitos deles tóxicos e com efeitos prejudiciais para os organismos vivos.[23]

## 1.12. Metais pesados

A definição de metal é um pouco subjetiva uma vez que as diferenças entre elementos metálicos e não metálicos podem ser subtis. Os metais são tipicamente definidos por propriedades físicas que incluem uma alta refletividade (brilho), uma elevada condutividade elétrica, uma alta condutividade térmica e elevadas ductilidade e solidez mecânicas. Do ponto de vista toxicológico uma das características mais importantes dos metais é que eles podem reagir facilmente com os sistemas biológicos ao perderem um ou mais elétrons. Muitos metais apresentam estados de oxidação variáveis e várias designações são aplicadas aos subconjuntos de elementos metálicos, incluindo os metais alcalinos (por exemplo, o lítio e o sódio), metais alcalino-terrosos (por exemplo, o berílio e o magnésio) e metais de transição (ou metais pesados) (por exemplo, o cádmio, o chumbo, o mercúrio e o zinco).[23][26]

Os metais pesados são os metais com densidade relativa de 5 ou superior. Estes estão presentes no ambiente devido às atividades naturais e antropogênicas. Naturalmente quando ocorrem estão geralmente presente em níveis relativamente baixos uma vez que, as concentrações destes metais pesados no meio ambiente são aumentadas por influências antropogênicas, tais como: mineração, irrigação de águas residuais, aplicação de pesticidas e aplicação de fertilizantes químicos.[27]

Para alguns autores a designação de metais pesados também é considerada pouco específica não conseguindo descrever a multiplicidade de diferenças existente entre as características destes elementos devendo por isso ser utilizadas em alternativa definições mais específicas para cada subgrupo de metais pesados.[28] A presença de metais pesados como o arsênio, o cádmio, o chumbo, o níquel e o mercúrio, que são poluentes ambientais, em áreas desenvolvidas e modificadas pela espécie humana bem como a sua existência na atmosfera, no solo e na água pode causar sérios problemas a todos os organismos e a elevada biodisponibilidade destes elementos pode conduzir a uma bioacumulação ao longo da cadeia alimentar tornando-se a sua presença altamente perigosa para a saúde humana.[29]

A neurotoxicidade dos metais pesados individuais já se encontra descrita em alguns estudos, no entanto, os efeitos das suas associações ainda é algo que aparece pouco pormenorizado sendo por isso complicado avaliar os efeitos adversos que cada um deles realmente representa para a vida humana. É indiscutível a sua toxicidade mas os mecanismos moleculares subjacentes não são totalmente conhecidos pois embora exista consenso entre muitos autores que as proteínas são os seus principais alvos a forma como os metais pesados interferirem com a sua atividade específicas continua ainda desconhecida.[27][30]

Investigando o efeito combinado de arsênio (As), cádmio (Cd) e chumbo (Pb) no desenvolvimento do cérebro de ratos Wistar, foi possível avaliar o efeito sinérgico de uma mistura de As, Cd, e Pb sobre a neurotoxicidade apresentada por estes animais. Assim, a toxicidade de metais pesados em seres humanos é muitas vezes o efeito combinado de mais do que três metais pesados que acabam

por potencializar os efeitos adversos de cada um individualmente dando origem a danos graves e irreparáveis.[27]

### 1.13. Mercúrio

O mercúrio é um elemento químico de símbolo Hg, com um número atômico 80 (80 prótons e 80 elétrons) e massa atômica igual a 201 uma. À temperatura ambiente este elemento encontra-se no estado líquido. Apresenta um ponto de fusão de 234,32 K e um ponto de ebulição de 629,88 K. A sua estrutura cristalina é romboédrica.[7]

A crescente divulgação sobre o aumento dos níveis de mercúrio no peixe da nossa dieta alimentar por parte dos meios de comunicação social e os altos níveis de mercúrio na atmosfera associados à conjectura de que certas doenças podem ser causadas por exposição ao mercúrio têm vindo a aumentar a consciência pública sobre os potenciais efeitos adversos para a saúde de doses elevadas de mercúrio. Na medicina dentária tem sido criticado o uso de amálgamas devido à percentagem de mercúrio que estas apresentam na sua constituição considerando-se um problema quer para a saúde pública quer para o ambiente.[31]

Os efeitos toxicológicos do mercúrio são mais graves no sistema nervoso central das crianças ainda em desenvolvimento do que nos adultos havendo por isso uma preocupação crescente com a exposição pré-natal e na primeira infância a este metal. Idealmente, nem crianças nem adultos deveriam ter mercúrio no seu organismo porque não há nenhum benefício conhecido da sua presença. Embora as exposições pré-natal e pós-natal ao mercúrio ocorram com frequência a prevenção é a chave para reduzir a intoxicação.[32][33]

Podemos dividir o mercúrio em três espécies diferentes: o metilmercúrio (orgânico) presente nos peixes, o vapor de mercúrio presente nas amálgamas dentárias (metálico) e o etilmercúrio amplamente utilizado como um componente de algumas vacinas. A preocupação com o metilmercúrio em peixe intoxicados aumentou de forma significativa em 1969, quando nos peixes do lago St. Clair, na fronteira com o Michigan, foram encontrados níveis elevados de mercúrio. A dose de referência é definida como sendo a dose que pode ser absorvida por dia, durante toda a vida, sem um risco significativo de efeitos adversos. Em 1997, *U.S. Environmental Protection Agency* (U.S. EPA), estabeleceu que esta dose deveria ser de 0,1µg de metilmercúrio/kg. Outras organizações de regulamentação, posteriormente, estabeleceram níveis mais elevados como a *EUA Food and Drug Administration* (FDA) que defende uma dose de 0,5µg de Hg/kg/dia, e a *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR) que aponta uma dose de 0,3µg de Hg/kg/dia.[34]

Quanto ao vapor de mercúrio das amálgamas dentárias pensa-se que principalmente durante a mastigação este pode ser libertado e facilmente inalado. As concentrações de vapor de mercúrio medidas na cavidade oral de pessoas com restaurações em amálgama aproximou-se e em alguns casos ultrapassou mesmo os limites estabelecidos para a dose máxima de referência. Existe ainda quem alegue que algumas doenças crónicas degenerativas, tais como a doença de Parkinson e o Alzheimer, podem ser exacerbadas ou até mesmo causadas por doses de mercúrio acima do recomendado.[34]

Em relação ao etilmercúrio este apresenta algumas semelhanças químicas com o metilmercúrio, ambos têm uma distribuição inicial similar no corpo e causam efeitos muito semelhantes em doses tóxicas para o cérebro, no entanto, o etilmercúrio é metabolizado mais rapidamente. Desde 1930 que este foi usado como um componente das muitas preparações de vacinas administradas a lactentes, até que em 1999, pelo menos nos Estados Unidos, a Academia Americana de Pediatria e os Serviços de Saúde Pública alertaram para os riscos desta utilização e no prazo de cerca de 18 meses, este conservante rico em mercúrio foi removido por todos os fabricantes de todas as vacinas destinadas a serem utilizadas nos Estados Unidos.[34]

Através da interpretação de diversos estudos neurotóxicos que abordam os efeitos de uma dose baixa de timerosal (etilmercúrio) em crianças que o receberam em vacinas, foi possível concluir que existe atividade contra células isoladas do cérebro humano destas baixas doses de timerosal sendo esta compatível com neurotoxicidade do mercúrio. Alguns estudos em animais mostraram também que a exposição a timerosal pode levar à acumulação de mercúrio inorgânico no cérebro e que doses relevantes como a das vacinas possuem o potencial necessário para afetar o desenvolvimento do sistema nervoso humano. Assim, pode concluir-se que o timerosal nestas concentrações é tóxico para as células do cérebro humano.[35][36]

Em Portugal o valor paramétrico da concentração de mercúrio na água destinada ao consumo humano fornecida pelas redes de distribuição é de  $1\mu\text{g/l}$ . [37]



Figura 1.7: Imagem representativa de gotas de mercúrio. Fonte: <http://pt.dreamstime.com>

#### 1.14. Chumbo

O chumbo é um elemento químico de símbolo Pb, com um número atômico 82 (82 prótons e 82 elétrons) e massa atômica igual a 207 uma. À temperatura ambiente este elemento encontra-se no estado sólido. Apresenta um ponto de fusão de 600,61 K e um ponto de ebulição de 2022 K. A sua estrutura cristalina é cúbica.[7]

O chumbo é um metal tóxico cuja utilização generalizada causou uma extensa contaminação ambiental e muitos problemas de saúde em muitas partes do mundo. Este metal pode afetar vários sistemas do corpo, incluindo o neurológico, hematológico, gastrointestinal, cardiovascular e o renal. Os seus efeitos podem ser claros e traduzidos clinicamente, ou subtis com expressão apenas a nível bioquímico. As crianças são particularmente vulneráveis a este tóxico e os efeitos críticos atingem o

sistema nervoso central e até níveis relativamente baixos de exposição podem causar problemas graves e, em alguns casos, o dano neurológico ser mesmo irreversível. Nos adultos com exposição ocupacional excessiva ou mesmo acidental, os danos possíveis estão mais relacionados com a neuropatia periférica e a nefropatia crônica, mas todos os sistemas enzimáticos são potencialmente suscetíveis aos metais pesados.[38]

Embora a redução do uso de chumbo na gasolina, na pintura e na canalização tenha resultado em reduções substanciais nos níveis de chumbo no sangue, fontes significativas de exposição a chumbo ainda permanecem, particularmente em países em desenvolvimento. E por isso todos os esforços adicionais são necessários para continuar a reduzir o uso de chumbo e a reduzir as exposições ambientais a este metal, especialmente para crianças e mulheres em idade fértil, uma vez que se aceita a noção de que o chumbo cause efeitos adversos sobre o sistema reprodutor, ainda que as evidências sejam principalmente qualitativas e não tenham sido estabelecidas relações de dose-resposta. No entanto existe uma maior frequência de abortos e partos de bebês mortos entre as mulheres que trabalham com o chumbo relatada no início do século XX. O chumbo continua presente no ambiente principalmente devido à atividade humana e continua a ser utilizado nos dias de hoje em baterias, criação de joias, fertilizantes químicos, pesticidas, canalizações, algumas tintas e revestimentos de habitações. Para os não fumadores, o maior aporte de chumbo é feito pela ingestão diária de alimentos contaminados, sujidade e poeiras. O chumbo presente na água da torneira raramente é o resultado da sua dissolução a partir de fontes naturais, mas sim devido aos sistemas de canalização, soldaduras e acessórios. A água que tenha estado em contato com estas tubagens com chumbo por um longo período de tempo (por exemplo, durante a noite) terá uma concentração mais elevada, podendo por isso as concentrações de chumbo variar ao longo do dia. A quantidade de chumbo nas plantas comestíveis depende das concentrações no solo e é mais alta em zonas próximas de minas e fundições. Alguns cereais podem conter altos níveis de chumbo e as latas de algumas substâncias (que têm vindo a diminuir) podem aumentar consideravelmente o teor de chumbo do alimento ou bebida, especialmente no caso de alimentos ou bebidas ácidas. Como as bebidas alcoólicas tendem a ser ácidas, a utilização de quaisquer produtos contendo chumbo no seu fabrico, na distribuição ou armazenamento irá elevar os níveis de chumbo.[39] A presença de metais pesados como o chumbo em recursos de água potável pode ser perigoso para a saúde humana devido à toxicidade e acumulação biológica. O consumo de comida ou água contendo chumbo em concentração elevada pode conduzir à inibição da síntese da hemoglobina (anemia) e distúrbios renais. Quanto aos fumadores, o tabaco aumenta a ingestão de chumbo por isso estes têm um risco acrescido de apresentarem concentrações mais elevadas deste metal pesado.[39][40]

Num estudo efetuado em ratos pretendeu-se avaliar o efeito de alguns compostos alimentares ricos em ácidos gordos insaturados nos níveis sanguíneos de chumbo e no metabolismo lipídico. E verificou-se que o chumbo administrado nos ratos atenuou o efeito benéfico dos ácidos gordos insaturados no metabolismo lipídico. Mas por sua vez os compostos alimentares ricos em ácidos gordos insaturados, também reduziram significativamente a concentração de chumbo no sangue.[41]

Em relação às doses recomendáveis em 2010, a Organização das Nações Unidas - *Joint Food and Agriculture (FAO)/WHO* e o *Expert Committee on Food Additives (JECFA)* decidiram que a

ingestão semanal provisória previamente estabelecida (PTWI) de 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  não poderia continuar a ser considerado uma vez que era demasiado elevada para a saúde. No entanto não foi estabelecido nenhum novo valor.[39]

Em Portugal o valor paramétrico da concentração de chumbo na água destinada ao consumo humano fornecida pelas redes de distribuição é de 10  $\mu\text{g}/\text{l}$ .[37]



Figura 1. 8: Imagem representativa de chumbo. Fonte: <http://cidmarcus.blogspot.pt>

### 1.15. Cavidade oral/Língua

A cavidade oral constitui a comunicação do tubo digestivo para o exterior por onde são ingeridos os alimentos, que são divididos durante a mastigação por ação dos dentes e onde a digestão começa pela ação da saliva. A embriologia da cavidade oral desenvolve-se entre o final da quarta até à décima semanas embriológicas a partir de cinco proeminências que se organizam em torno da boca primitiva. A língua inicia o seu desenvolvimento no final da quarta semana embriológica e prolonga-se até ao quarto ano de vida, altura em que o terço posterior termina o processo de descida em direção à orofaringe. A cavidade oral compreende os lábios, as bochechas, o palato, a gengiva, os dentes, as glândulas salivares e a língua. A língua é constituída por uma face superior ou dorsal (em forma de V), uma face inferior ou ventral e dois bordos. Nos 2/3 anteriores encontramos as papilas linguais (estruturas especializadas) e no terço posterior temos a tonsila lingual. A sua constituição é maioritariamente feita por feixes de tecido muscular estriado em posição vertical, horizontal e diagonal o que lhe permite uma elevada mobilidade.[42] A mucosa da superfície ventral da língua apresenta um epitélio não queratinizado fino, com uma lâmina própria relativamente avascular e com algumas glândulas salivares *minor*. Esta mucosa liga-se ao tecido conjuntivo em volta da musculatura da língua sem uma camada submucosa distinta.[43] Na língua encontramos três tipos de papilas: as filiformes (mais abundantes nos 2/3 da face superior, tecido conjuntivo e queratinizadas), as fungiformes (parecem uns cogumelos, epitélio de revestimento pavimentoso estratificado não queratinizado, muito vascularizado, 150 a 200) e as circunvaladas (epitélio de revestimento pavimentoso estratificado não queratinizado, 9 a 11 e as extremidades dos canais das glândulas serosas de von Ebner encontram-se nos sulcos).[42] Na língua encontramos ainda os corpúsculos



gustativos (células gustativas e células de suporte) que são terminações sensitivas presentes nas papilas circunvaladas e nas fungiformes que na sua porção basal contactam com um terminal nervoso de uma extensão dos gânglios sensoriais do nervo glossofaríngeo e do facial.[42]

Nos cortes histológicos estes corpúsculos aparecem pálidos, ovais e estendem-se desde a membrana basal até à superfície do epitélio onde comunicam com a cavidade oral através de poros. Estima-se que a sensibilidade aos quatro sabores básicos esteja distribuída pelas diferentes zonas da língua: o doce mais na ponta da língua, o amargo mais na parte posterior, o azedo nas porções laterais e o salgado por toda a superfície.[43]

A língua é constituída por 60-72 % de água, 15-24% de lípidos e 16-18% de proteínas e 1% de outros componentes e uma vez que se trata de um tecido muscular esquelético podemos descrever a sua composição elemental: 10,2% de hidrogénio (H), 14,3% de carbono (C), 3,4% de azoto (N), 71% de oxigénio (O).[21]

Em relação à concentração dos principais constituintes dos líquidos orgânicos no músculo esquelético temos: no caso do sódio 153,2 mEq/l no plasma, 145,1 mEq/l no líquido intersticial e 12 mEq/l no líquido intracelular; no caso do potássio 4,3 mEq/l no plasma, 4,1 mEq/l no líquido intersticial e 150 mEq/l no líquido intracelular; no caso do cálcio 3,8 mEq/l no plasma, 3,4 mEq/l no líquido intersticial e 4 mEq/l no líquido intracelular; no caso do cloro 111,5 mEq/l no plasma, 118 mEq/l no líquido intersticial e 4 mEq/l no líquido intracelular e no caso dos fosfatos temos 2,2 mEq/l no plasma, 2,3 mEq/l no líquido intersticial e 40 mEq/l no líquido intracelular.[10]

No caso dos ratos a percentagem de água presente na língua será de 75,5-78,4% o que apesar de ligeiramente superior à presente na espécie humana acaba por ser uma percentagem muito parecida o que nos permite utilizar estes animais para a realização de estudos experimentais.[21]

As células musculares, principais constituintes do tecido muscular da língua, têm a capacidade de ser excitadas por estímulos químicos, elétricos e mecânicos e produzem potenciais de ação que depois são transmitidos através das suas membranas celulares, os sarcolemas. O seu citoplasma chama-se sarcoplasma. De acordo com as características que apresentam, podem distinguir-se três tipos de tecido muscular: o músculo estriado esquelético, o músculo estriado cardíaco e o músculo liso. A grande massa muscular do corpo humano encontra-se agarrada ao osso, daí a designação de músculo esquelético.[44] A unidade funcional do tecido muscular estriado esquelético é a fibra muscular. As células deste músculo originam-se da fusão de centenas de células precursoras, os mioblastos, o que as tornam bastante grandes e alongadas, com um diâmetro de 10 a 100µm e até alguns centímetros de comprimento e multinucleadas (núcleos na periferia). Cada fibra muscular é composta por milhares de miofibrilhas, as quais apresentam na sua composição filamentos de miosina (cerca de 1500) e filamentos de actina (3000) dispostos lado a lado, responsáveis pela contração muscular e a sua abundância e organização fazem com que se observem estrias transversais ao microscópio ótico, o que lhe conferiu o nome de estriado. A sua disposição paralela faz com que a força de contração seja aditiva e, por isso, maior.[45][46]

A miofibrilha é composta por vários sarcómeros, que são as unidades funcionais que estão entre duas linhas Z. Um sarcómero, com cerca de 2,5µm, é formado por filamentos de actina e miosina entrelaçados uns nos outros.[44]

Quando observadas ao microscópio de luz, as fibras musculares esqueléticas apresentam estrias transversais, pela alternância de faixas claras (banda I) e escuras (banda A) e no centro de cada banda I nota-se uma linha transversal escura - a linha Z. As fibras musculares estão organizadas em feixes, sendo o seu conjunto revestido por uma camada de tecido conjuntivo chamada epimísio. Deste partem finos septos de tecido conjuntivo que se dirigem para o interior do músculo, separando os feixes. Esses septos constituem o perimísio. Cada fibra muscular, individualmente, é envolvida pelo endomísio que apresenta apenas algumas células de tecido conjuntivo, nomeadamente fibroblastos.[46] A contração acontece porque as fibras do músculo esquelético são inervadas por fibras nervosas, que embora em menor número se ramificam ao chegar ao músculo, podendo uma célula da porção anterior da espinhal medula inervar cerca de 200 fibras musculares. O impulso nervoso percorre o axónio e é transmitido com libertação da acetilcolina do terminal do axónio. Este neurotransmissor difunde-se através da fenda sináptica e prende-se a recetores na membrana da célula muscular, abrindo os canais de sódio do sarcolema, tornando-o permeável ao cálcio, permitindo a entrada destes iões na célula o que resulta na despolarização do músculo.[46] A membrana plasmática despolarizada leva para o interior da célula invaginações que envolvem as junções das bandas A e I as quais compõem o sistema de túbulos transversais ou túbulos T. A despolarização destes túbulos T é transmitida através de pontes proteicas ao retículo sarcoplasmático, promovendo a abertura dos canais de cálcio com a consequente saída deste ião para o citoplasma. O cálcio libertado vai ligar-se ao complexo troponina-tropomiosina que está enrolado sobre a actina tapando-lhe os sítios ativos, altera a sua forma destapando assim os sítios ativos cobertos os quais se ligam imediatamente à miosina dando origem à contração.[44]

O retículo sarcoplasmático é bem desenvolvido e armazena iões de cálcio, importantes para o processo de contração. As mitocôndrias são numerosas e fornecem energia. O glicogénio é armazenado em grânulos no citoplasma. E existe ainda um grande aporte sanguíneo uma vez que o consumo de oxigénio é elevado. Este músculo tem uma contração rápida e voluntária.[46] Os movimentos da língua durante a fala são considerados entre as atividades motoras dos mais complexos parecendo ser únicos entre os mamíferos. A pronúncia de cada vogal e consoante requer precisão, tanto no posicionamento espacial da língua, como na forma da sua superfície dorsal. Trata-se assim de um músculo com características comuns ao tecido muscular esquelético, mas que apresenta depois particularidades especiais únicas que lhe permite desenvolver todo o conjunto de movimentos que permitem falar.[47]



Figura 1.9: Esquema representativo da língua. Fonte: <http://www.infoescola.com/>

# Capítulo 2

---

## Objetivo

---

O presente trabalho, intitulado “Análise histológica e elemental da língua na administração experimental de metais pesados” apresenta como principal objetivo avaliar as alterações a nível histológico e elemental encontradas em porções de língua de ratos submetidos a água contaminada com metais pesados (chumbo e mercúrio).



# Capítulo 3

---

## Material e Métodos

---

### 3.1. Preparação dos animais

Neste estudo foram utilizados 30 ratos Wistar macho, com quatro semanas de idade no início do ensaio, mantidos em condições padrão de manipulação e manutenção, de acordo com a legislação em vigor. Foram mantidas todas as condições ambientais que permitissem assegurar as condições fisiológicas dos animais em ensaio, nomeadamente: humidade, ciclos de luz e escuro e temperatura. A alimentação e o fornecimento de água foi feito de acordo com os parâmetros anatomofisiológicos da espécie. Os animais foram distribuídos aleatoriamente por três grupos com 10 animais cada um: o grupo controlo mantido durante 4 semanas sem qualquer manipulação indutora de alterações, ou seja, com acesso a água e alimento *ad libitum*; o grupo teste I mantido durante 4 semanas com substituição da água por água contaminada com chumbo (20ppm); e o grupo teste II mantido durante 4 semanas com substituição da água por água contaminada com mercúrio (20ppm).

### 3.2. Sacrifício e necrópsia

Todos os animais foram sacrificados no fim do período experimental de quatro semanas, por sobredosagem anestésica administrada por via intramuscular. A necrópsia completa de cada um dos indivíduos permitiu a recolha de fragmentos da parte média da língua para análise histológica e para a deteção e/ou quantificação de chumbo e mercúrio por fluorescência de raios-X.

### 3.3. Procedimento Histológico

Em todos os animais foram colhidos para histopatologia de rotina fragmentos da porção média da língua, tendo sido a fixação realizada com recurso a formaldeído neutro tamponado a 10%. Todos os fragmentos colhidos para histopatologia foram incluídos em parafina, tendo sido realizados cortes de cerca quatro micrómetros de espessura para coloração de rotina de HE (Hematoxilina de Mayer-Eosina). Todas as lâminas foram avaliadas num Microscópio Nikon Eclipse modelo E600.



Figura 3.1: Fotografia dos blocos de parafina no estado sólido contendo o tecido (língua) dos três grupos de estudo. Fonte: imagem fotografada pelo autor.



Figura 3.2: Fotografia de lâmina preparada para análise histológica do grupo teste I. Fonte: imagem fotografada pelo autor.



Figura 3. 3: Fotografia de lâmina preparada para análise histológica do grupo teste II. Fonte: imagem fotografada pelo autor.

### 3.4. Análise de fluorescência de raios-X (XRF)

A técnica de análise por fluorescência de raios-X é um método de análise elementar qualitativo e quantitativo que permite a identificação de praticamente todos os elementos ( $Z > 12$ ), uma vez que os elementos de número atômico inferior apresentam energias de emissão de raios-X inferiores a 1 KeV e por isso não detetáveis no equipamento usado.

O princípio do método é muito simples e a sua análise rápida. Utiliza-se uma fonte de radiação X para ionizar os níveis internos dos átomos constituintes da amostra, por efeito fotoelétrico, não havendo necessidade de tratamento prévio e não sendo destrutiva. Quando o átomo regresso ao estado fundamental este liberta o excesso de energia através da emissão de um fóton X, de energia igual à diferença das energias de ligação dos níveis entre os quais se deu a transição. Esta radiação é característica do elemento. A deteção e análise deste espectro vai permitir assim a identificação e quantificação dos diferentes elementos constituintes da amostra em simultâneo.



Figura 3. 4: Fotografia do microscópio Nikon Eclipse modelo E600. Fonte: imagem fotografada pelo autor.

Esta técnica de análise de fluorescência de raios-X consistiu em fazer incidir o feixe de raios-X colimado (com uma área de  $0,5 \times 0,5 \text{ mm}$ ), com energia de 15 KeV e com tempo de exposição de 200s a cada uma das amostras. E numa segunda abordagem com uma energia de 50 KeV e o mesmo tempo de exposição de 200s.

Nos espectros obtidos, foi removida a radiação de fundo, permitindo a análise individual com quantificação da presença de alumínio (Al), fósforo (P), enxofre (S), cloro (Cl), potássio (K), cálcio (Ca) e ferro (Fe).

A radiação de fundo também pode ser considerada uma desvantagem, pois está sempre presente em cada determinação. Esta consiste numa emissão de radiação pelos elementos constituintes do equipamento, da fonte de raios-X e plataformas de colocação de amostra.

Para energias mais baixas, como o exemplo dos 15 KeV utilizou-se o gás inerte hélio (He), para que interferências relativas ao ar atmosférico, especificamente do gás árgon (Ar), fossem anuladas.



Figura 3.5: Fotografia de bloco de parafina no estado sólido contendo o tecido (língua).

Fonte: imagem fotografada pelo autor.



Figura 3.6: Ilustração do local de incidência do feixe de raios-X.

Fonte: imagem fotografada pelo autor

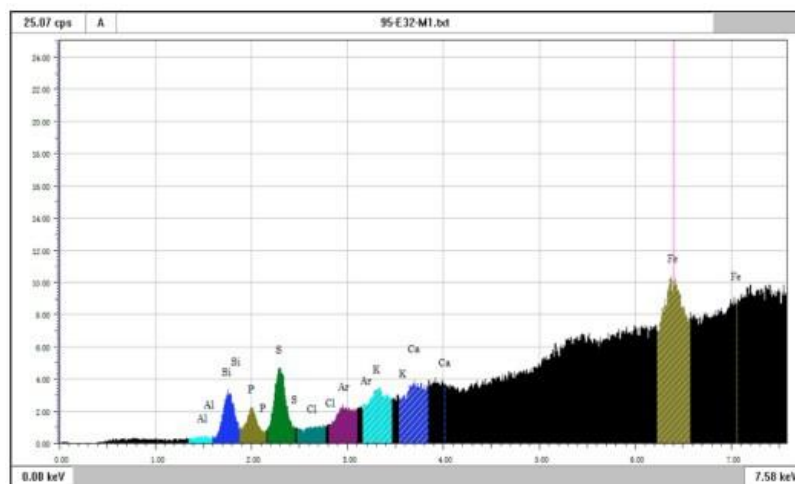


Figura 3.7: Gráfico do espectro de energias criado pelo *software* do equipamento de análise por fluorescência de raios-X (Hitachi modelo SEA 6000VX) Fonte: imagem fotografada pelo autor.



# Capítulo 4

---

## Análise estatística

---

A análise estatística foi feita com o programa estatístico R. O programa R é uma aplicação de distribuição livre dedicado à estatística computacional e gráfica. Este programa utiliza a linguagem R (o mesmo nome do programa), derivada da linguagem S criada nos laboratórios *Bell*, pertencendo atualmente à *Lucent Technologies*. O R fornece vários recursos estatísticos (modelos lineares, modelos não lineares, testes estatísticos, análises de séries no tempo, “*clustering*”, . . . ), ferramentas gráficas e programação orientada a objetos, podendo ser estendido através da instalação de módulos.

As funções utilizadas no programa R para o cálculo da média e do desvio padrão foram a função `mean()` e a função `sd()`, respetivamente. A função `mean()` calcula uma média aritmética a partir de um vetor que recebe como argumento, implementando a (equação 4.1), onde  $\mu$  é a média,  $n$  o número de amostras e  $n_i$  amostra de índice  $i$ . A função `sd()` calcula o desvio padrão de um vetor que recebe como argumento, implementando a equação (equação 4.2), onde  $\sigma$  é o desvio padrão,  $N$  o número da amostra,  $\mu$  a média e  $x_i$  a amostra de índice  $i$ .

$$\mu = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n n_i \quad (4.1)$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^2} \quad (4.2)$$

Para calcular os teste *t*-student, utilizou-se a função `ttest()`. Esta função recebe dois vetores

como argumentos, mantendo-se as opções por defeito que são: teste de duas caudas, correção de Welch para a não homogeneidade da variância e intervalo de confiança de 95%. O teste  $t$  de Welch é definido pela seguinte fórmula:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{N_1} + \frac{s_2^2}{N_2}}} \quad (4.3)$$

Onde  $\bar{X}$  é a média da amostra,  $s^2$  é a variância da amostra e  $N$  o tamanho da amostra.

A utilização do teste  $t$ -student é justificada com o facto de as amostras serem pequenas e diferentes no tamanho. Considerou-se a hipótese nula,  $H_0$ , as médias serem iguais e a hipótese não nula,  $H_1$ , as médias serem diferentes.



Figura 4.4: Equipamento de análise por fluorescência de raios-X (Hitachi modelo SEA 6000VX) Fonte: imagem fotografada pelo autor.

# Capítulo 5

---

## Resultados

---

Da análise das concentrações tecidulares do Al, P, S, Cl, K, Ca e do Fe observa-se que existem algumas diferenças significativas quando se consideram amostras de grupos diferentes segundo a água da bebida não contaminada, ou contaminada com chumbo ou esta contaminada com mercúrio (Tabela I).

Os resultados apresentados seguidamente resultam de uma técnica de análise por fluorescência de raios-X com uma energia de 15 KeV.

O valor médio das contagens por segundo para o Al foi de  $0,56 \pm 0,59$  no grupo controlo,  $0,46 \pm 0,64$  no grupo teste I e de  $0,22 \pm 0,51$  no grupo teste II, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo controlo e o grupo teste II ( $p=0,041$ ).

O valor médio das contagens por segundo para o P foi de  $27,92 \pm 7,36$  no grupo controlo,  $27,94 \pm 15,51$  no grupo teste I e de  $28,04 \pm 14,81$  no grupo teste II, não evidenciado diferenças estatisticamente significativas entre nenhum dos grupos.

O valor médio das contagens por segundo para o S foi de  $126,21 \pm 18,65$  no grupo controlo,  $95,42 \pm 27,92$  no grupo teste I, de  $119,96 \pm 38,93$  no grupo teste II, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo controlo e o grupo teste I ( $p=0,0014$ ) e entre o grupo teste I e o grupo teste II ( $p=0,0233$ ).

O valor médio das contagens por segundo para o Cl foi de  $0,00 \pm 0,00$  no grupo controlo,  $0,64 \pm 1,44$  no grupo teste I e de  $0,31 \pm 0,97$  no grupo teste II, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo controlo e o grupo teste I ( $p=0,0336$ ).

O valor médio das contagens por segundo para o K foi de  $10,64 \pm 2,17$  no grupo controlo,  $28,50 \pm 18,47$  no grupo teste I e de  $22,21 \pm 7,49$  no grupo teste II, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo controlo e o grupo teste I ( $p=0,0003$ ) e entre o grupo controlo e o grupo teste II ( $p<0,0001$ ).

O valor médio das contagens por segundo para o Ca foi de  $31,16 \pm 2,70$  no grupo controlo,  $32,68 \pm 14,27$  no grupo teste I, e de  $34,80 \pm 5,61$  no grupo teste II, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo controlo e o grupo teste II ( $p=0,0086$ ).

O valor médio das contagens por segundo para o Fe foi de  $57,30 \pm 10,23$  no grupo controlo,  $50,89 \pm 12,83$  no grupo teste I e de  $65,19 \pm 12,41$  no grupo teste II, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo controlo e o grupo teste II ( $p=0,0233$ ) e entre o grupo teste I e o grupo teste II ( $p=0,0011$ ).

Tabela I: Média e desvio padrão dos valores obtidos nos grupos controlo, teste I e teste II.

Elementos	Controlo	Teste I	Teste II
<b>Al</b>	$0,56 \pm 0,59$	$0,46 \pm 0,64$	$0,22 \pm 0,51$
<b>P</b>	$27,92 \pm 7,36$	$27,94 \pm 15,51$	$28,04 \pm 14,81$
<b>S</b>	$126,21 \pm 18,65$	$95,42 \pm 27,92$	$119,96 \pm 38,93$
<b>Cl</b>	$0,00 \pm 0,00$	$0,64 \pm 1,44$	$0,31 \pm 0,97$
<b>K</b>	$10,64 \pm 2,17$	$28,50 \pm 18,47$	$22,21 \pm 7,49$
<b>Ca</b>	$31,16 \pm 2,70$	$32,68 \pm 14,27$	$34,80 \pm 5,61$
<b>Fe</b>	$57,30 \pm 10,23$	$50,89 \pm 12,83$	$65,19 \pm 12,41$

Da análise destes valores e estabelecendo as assinaturas elementais como o quociente de cada elemento de cada concentração diferente de zero com a de K, arredondada às unidades para valores iguais ou superior a um e às décimas para valores inferiores, temos: Para o caso de acesso a água não contaminada: Al 0,1, P 3, S 12, Cl 0, Ca 3, Fe 5. Para o caso de acesso apenas a água contaminada com chumbo Al 0,1 P 1, S 3, Cl 0,2, Ca 1, Fe 2. Para o caso de acesso apenas a água contaminada com mercúrio Al 0,1, P 1, S 5, Cl 0,1, Ca 2, Fe 3.

É também muito interessante avaliar as relações entre os elementos dentro de cada grupo, como se pode ver de forma resumida nas Tabela II, Tabela III e Tabela IV.

O rácio médio do valor médio das contagens por segundo entre Al/K foi de  $0,05 \pm 0,05$  no grupo controlo, de  $0,02 \pm 0,03$  no grupo teste I e de  $0,01 \pm 0,03$  no grupo teste II, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo controlo e o grupo teste I ( $p=0,01876$ ) e entre o grupo controlo e o grupo teste II ( $p=0,00815$ ).

O rácio médio do valor médio das contagens por segundo entre P/K foi de  $2,76 \pm 1,03$  no grupo controlo, de  $1,07 \pm 0,55$  no grupo teste I e de  $1,32 \pm 0,86$  no grupo teste II, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo controlo e o grupo teste I ( $p<0,0001$ ) e entre o grupo controlo e o grupo teste II ( $p<0,0001$ ).

O rácio médio do valor médio das contagens por segundo entre S/K foi de  $12,24 \pm 2,57$  no grupo controlo, de  $4,30 \pm 2,28$  no grupo teste I e de  $5,76 \pm 2,70$  no grupo teste II, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo controlo e o grupo teste I ( $p<0,0001$ ), entre o grupo controlo e o grupo teste II ( $p<0,0001$ ) e entre o grupo teste I e o grupo teste II ( $p=0,0490$ ).

O rácio médio do valor médio das contagens por segundo entre Cl/K foi de  $0,00 \pm 0,00$  no grupo controlo, de  $0,02 \pm 0,03$  no grupo teste I e de  $0,02 \pm 0,04$  no grupo teste II, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo controlo e o grupo teste I ( $p=0,0152$ ). O rácio médio do

valor médio das contagens por segundo entre Ca/K foi de  $3,02 \pm 0,50$  no grupo controlo, de  $1,60 \pm 0,95$  no grupo teste I e de  $1,82 \pm 0,85$  no grupo teste II, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo controlo e o grupo teste I ( $p < 0,0001$ ) e entre o grupo controlo e o grupo teste II ( $p < 0,0001$ ).

O rácio médio do valor médio das contagens por segundo entre Fe/K foi de  $5,50 \pm 1,00$  no grupo controlo, de  $2,46 \pm 1,47$  no grupo teste I e de  $3,34 \pm 1,18$  no grupo teste II, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo controlo e o grupo teste I ( $p < 0,0001$ ) e entre o grupo controlo e o grupo teste II ( $p < 0,0001$ ).

O rácio médio do valor médio das contagens por segundo entre Al/P foi de  $0,02 \pm 0,02$  no grupo controlo, de  $0,01 \pm 0,02$  no grupo teste I e de  $0,00 \pm 0,01$  no grupo teste II, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo controlo e o grupo teste II ( $p = 0,0055$ ) e entre o grupo teste I e o grupo teste II ( $p = 0,047$ ).

O rácio médio do valor médio das contagens por segundo entre S/P foi de  $4,74 \pm 1,05$  no grupo controlo, de  $4,70 \pm 2,60$  no grupo teste I e de  $4,94 \pm 1,46$  no grupo teste II, não evidenciado diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

O rácio médio do valor médio das contagens por segundo entre Cl/P foi de  $0,00 \pm 0,00$  no grupo controlo, de  $0,03 \pm 0,05$  no grupo teste I e de  $0,02 \pm 0,08$  no grupo teste II, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo controlo e o grupo teste I ( $p < 0,0001$ ), entre o grupo controlo e o grupo teste II ( $p < 0,0001$ ) e entre o grupo teste I e o grupo teste II ( $p = 0,0065$ ).

O rácio médio do valor médio das contagens por segundo entre K/P foi de  $0,41 \pm 0,15$  no grupo controlo, de  $1,23 \pm 0,68$  no grupo teste I e de  $0,99 \pm 0,44$  no grupo teste II, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo controlo e o grupo teste I ( $p = 0,0219$ ).

O rácio médio do valor médio das contagens por segundo entre Ca/P foi de  $1,19 \pm 0,32$  no grupo controlo, de  $2,27 \pm 2,78$  no grupo teste I e de  $1,77 \pm 1,13$  no grupo teste II, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo controlo e o grupo teste II ( $p = 0,0195$ ).

O rácio médio do valor médio das contagens por segundo entre Fe/P foi de  $2,19 \pm 0,67$  no grupo controlo, de  $3,05 \pm 2,62$  no grupo teste I e de  $3,19 \pm 1,87$  no grupo teste II, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo controlo e o grupo teste II ( $p = 0,0187$ ).

O rácio médio do valor médio das contagens por segundo entre Al/S foi de  $0,00 \pm 0,00$  no grupo controlo, de  $0,00 \pm 0,01$  no grupo teste I e de  $0,00 \pm 0,00$  no grupo teste II, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo controlo e o grupo teste I ( $p = 0,0188$ ) e entre o grupo controlo e o grupo teste II ( $p = 0,015$ ).

O rácio médio do valor médio das contagens por segundo entre P/S foi de  $0,22 \pm 0,05$  no grupo controlo, de  $0,27 \pm 0,12$  no grupo teste I e de  $0,22 \pm 0,06$  no grupo teste II, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo controlo e o grupo teste I ( $p < 0,0001$ ).

O rácio médio do valor médio das contagens por segundo entre Cl/S foi de  $0,00 \pm 0,00$  no grupo controlo, de  $0,01 \pm 0,01$  no grupo teste I e de  $0,00 \pm 0,01$  no grupo teste II, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo controlo e o grupo teste I ( $p = 0,0151$ ) e entre o grupo controlo e o grupo teste II ( $p < 0,0001$ ).

O rácio médio do valor médio das contagens por segundo entre K/S foi de  $0,09 \pm 0,02$  no grupo

controlo, de  $0,29 \pm 0,14$  no grupo teste I e de  $0,19 \pm 0,05$  no grupo teste II, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo controlo e o grupo teste I ( $p < 0,0001$ ).

O rácio médio do valor médio das contagens por segundo entre Ca/S foi de  $0,25 \pm 0,03$  no grupo controlo, de  $0,40 \pm 0,26$  no grupo teste I e de  $0,34 \pm 0,16$  no grupo teste II, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo controlo e o grupo teste I ( $p < 0,0001$ ) e entre o grupo controlo e o grupo teste II ( $p = 0,0121$ ).

O rácio médio do valor médio das contagens por segundo entre Fe/S foi de  $0,46 \pm 0,07$  no grupo controlo, de  $0,57 \pm 0,19$  no grupo teste I e de  $0,61 \pm 0,22$  no grupo teste II, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo controlo e o grupo teste I ( $p < 0,0001$ ) e entre o grupo controlo e o grupo teste II ( $p = 0,0036$ ).

Tabela II: Relações entre os elementos e K, P e S no grupo controlo.

Elementos	/K	/P	/S
Al	$0,05 \pm 0,05$	$0,02 \pm 0,02$	$0,00 \pm 0,00$
P	$2,76 \pm 1,03$	-	$0,22 \pm 0,15$
S	$12,24 \pm 2,57$	$4,74 \pm 1,05$	-
Cl	$0,00 \pm 0,00$	$0,0 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$
K	-	$0,41 \pm 0,15$	$0,09 \pm 0,02$
Ca	$3,02 \pm 0,50$	$1,19 \pm 0,32$	$0,25 \pm 0,03$
Fe	$5,50 \pm 1,00$	$2,19 \pm 0,67$	$0,46 \pm 0,07$

Tabela III: Relações entre os elementos e K, P e S no grupo teste I.

Elementos	/K	/P	/S
Al	$0,02 \pm 0,03$	$0,01 \pm 0,02$	$0,00 \pm 0,01$
P	$1,07 \pm 0,55$	-	$0,27 \pm 0,12$
S	$4,30 \pm 2,28$	$4,70 \pm 2,60$	-
Cl	$0,02 \pm 0,03$	$0,03 \pm 0,05$	$0,01 \pm 0,01$
K	-	$1,23 \pm 0,68$	$0,29 \pm 0,14$
Ca	$1,60 \pm 0,95$	$2,27 \pm 2,78$	$0,40 \pm 0,26$
Fe	$2,46 \pm 1,47$	$3,05 \pm 2,62$	$0,57 \pm 0,19$

Tabela IV: Relações entre os elementos e K, P e S no grupo teste II.

Elementos	/K	/P	/S
Al	$0,01 \pm 0,03$	$0,00 \pm 0,01$	$0,00 \pm 0,00$
P	$1,32 \pm 0,86$	-	$0,22 \pm 0,06$
S	$5,76 \pm 2,70$	$4,94 \pm 1,46$	-
Cl	$0,02 \pm 0,04$	$0,02 \pm 0,08$	$0,00 \pm 0,01$
K	-	$0,99 \pm 0,44$	$0,19 \pm 0,05$
Ca	$1,82 \pm 0,85$	$1,77 \pm 1,13$	$0,34 \pm 0,16$
Fe	$3,24 \pm 1,18$	$3,19 \pm 1,87$	$0,61 \pm 0,22$

Os resultados apresentados seguidamente resultam de uma técnica de análise por fluorescência de raios-X com uma energia de 50 KeV.

O valor médio das contagens por segundo para o Zn foi de  $13,34 \pm 2,11$  no grupo controlo,  $11,10 \pm 2,84$  no grupo teste I e de  $15,46 \pm 1,56$  no grupo teste II (Tabela V), evidenciado uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo controlo e o grupo teste II ( $p=0,02$ ) e entre o grupo teste I e o grupo teste II ( $p=0,001$ ).

O valor médio das contagens por segundo para o Pb foi de  $0,00 \pm 0,00$  para todos os grupos. O valor médio das contagens por segundo para o Hg foi de  $0,00 \pm 0,00$  no grupo controlo, de  $0,00 \pm 0,00$  no grupo teste I e de  $2,26 \pm 2,14$  no grupo teste II.

Tabela V: Média e desvio padrão da concentração dos elementos Zn, Pb e Hg nos três grupos.

Elementos	Controlo	teste I	teste II
<b>Zn</b>	$13.34 \pm 2.11$	$11.10 \pm 2.84$	$15.46 \pm 1.56$
<b>Pb</b>	$0.00 \pm 0.00$	$0.00 \pm 0.00$	$0.00 \pm 0.00$
<b>Hg</b>	$0.00 \pm 0.00$	$0.00 \pm 0.00$	$2.26 \pm 2.14$





# Capítulo 6

---

## Discussão

---

Da análise das concentrações dos átomos descritos conclui-se que existem variações de concentração tecidual para as quais a única explicação razoável é a contaminação da água da bebida. Esta situação levanta algumas questões relativamente à saúde humana. Uma questão que se prende desde logo com a compreensão da fisiopatologia destas situações ao nível celular, dos tecidos e dos órgãos. Outra questão prende-se com a concentração mínima desses metais pesados em contato com o corpo humano bem como a duração da exposição e a dose acumulada.

Em relação à análise histológica verificou-se não existir diferenças entre os três grupos o que nos leva a concluir não existirem alterações significativas a nível morfológico. Em relação à análise elemental, no caso da administração de água contaminada com chumbo (grupo teste I) e de acordo com a parte da língua estudada os elementos mais atingidos são o enxofre e o potássio e na administração da água contaminada com mercúrio (grupo teste II) os elementos mais alterados são o alumínio, o potássio, o cálcio e o ferro (Tabela VI).

O alumínio é o átomo que possuiu um número atómico de 13 e tem 27 uma, encontrando-se no estado sólido à temperatura ambiente. A diminuição deste elemento no grupo teste I não acarreta nenhum problema nutricional uma vez que o alumínio não desempenha nenhum papel importante conhecido para o organismo e embora possa na forma de hidróxido de alumínio neutralizar a acidez do estômago e funcionar como protetor gástrico mediante barreira física o risco do aumento da sua concentração no sangue em casos de hipofosfatemia, hipocalcemia e insuficiência renal é muito elevado, na medida em que altos níveis de alumínio diminuem a absorção de cálcio e fósforo que são elementos essenciais.

O enxofre é o átomo que tem o número atómico 16 e 32 uma, encontrando-se no estado sólido à temperatura ambiente, sendo insolúvel em água. É um elemento muito importante para todos os seres vivos e está presente em quase todas as células. No caso do corpo humano este elemento encontra-se com muita frequência na constituição de compostos orgânicos integrando moléculas de

alguns aminoácidos, algumas hormonas como a insulina e vitaminas (B) e tem ainda também um contributo importante no equilíbrio de outros minerais. Neste estudo a observação de uma diminuição da concentração tecidual de enxofre, pode traduzir uma diminuição de algumas proteínas. Para esclarecer esta situação propomos um pequeno estudo de proteómica deste tecido nas mesmas condições.

O potássio é o átomo que possui o número atómico 19 e tem 39 uma. É um metal alcalino, no estado sólido à temperatura ambiente, com uma estrutura cristalina no sistema cúbico. Este mineral é absorvido pelo intestino delgado quase na totalidade (95%) do que é ingerido e cerca de 98% do potássio do corpo humano é intracelular, pelo que um aumento do valor intracelular leva-nos a pensar que possa estar associado neste caso com uma variação da concentração de água na célula e eventualmente com uma variação de volume das células. O potássio desempenha um papel fundamental no relaxamento muscular e na pressão arterial podendo por isso a sua diminuição conduzir ao enfraquecimento muscular e à hipertensão.

O cálcio é um elemento químico de número atómico 20 e com 40 uma. À temperatura ambiente este elemento encontra-se no estado sólido. Em condições normais o cálcio corresponde a 1,90% do corpo humano em peso encontrando-se maioritariamente na composição dos ossos e dentes mas também na coagulação sanguínea, na regulação hormonal e nas contrações musculares. O aumento deste elemento no organismo para valores elevados pode provocar o aparecimento de cálculos renais, a diminuição da absorção de outros minerais como o magnésio e problemas musculares impedindo o relaxamento.

Em relação ao ferro, em condições normais o corpo humano tem 0,00% do seu peso. O ferro é o átomo com o número atómico 26 e com 56 uma. É um metal de transição, sólido à temperatura ambiente, cristaliza no sistema cúbico, sendo a maioria ferromagnético ou paramagnético. Este elemento é particularmente conhecido, na sua forma orgânica (grupo heme), por fazer parte do grupo prostético da hemoglobina (eritrócitos) e da mioglobina, responsáveis pelo transporte e armazenamento do oxigénio, mas não nos podemos esquecer da sua importância noutra condição, para a fisiologia celular, a sua forma inorgânica, o grupo não-heme, presente na ferritina, na hemossiderina e na transferrina que são as responsáveis pelo armazenamento e transporte do ferro no organismo. O ferro em concentrações acima dos valores normais pode acumular-se em diferentes órgãos e tecidos, como o caso da língua, podendo causar lesões graves. O organismo regula a absorção de ferro não-heme, assim se a concentração no sangue for elevada a sua absorção é reduzida e se a sua concentração estiver diminuída então a sua absorção é aumentada.

Em relação ao zinco o valor encontrado apenas aumentou significativamente no caso do grupo teste II o que nos permite concluir uma possível interferência do mercúrio com este elemento.

Interessa desde já estabelecer grupos experimentais para intoxicação com doses diferentes e diferentes tempos de exposição. Ainda nesta questão da exposição parece ser da maior importância considerar fatores alimentares que possam interferir facilitando ou dificultando a absorção desses metais pesados. Isto considerando apenas a via de administração oral.

Tabela VI: Comparação das alterações na concentração dos elementos nos três grupos.

Elementos	Controlo	teste I	teste II
<b>Al</b>	0,56	=	↓↓
<b>P</b>	27,92	=	=
<b>S</b>	126,21	↓↓	=
<b>Cl</b>	0,00	=	=
<b>K</b>	10,64	↑↑	↑↑
<b>Ca</b>	31,16	=	↑
<b>Fe</b>	57,30	=	↑
<b>Zn</b>	13,34	=	↑



# Capítulo 7

---

## Conclusão

---

Este estudo experimental provou de modo objetivo que é possível encontrar alterações da constituição, ao nível elemental, na língua na intoxicação experimental com chumbo e com mercúrio.

Ao nível da avaliação histológica, nas condições do estudo, pode concluir-se que não existem alterações significativas entre os grupos. A avaliação elemental por análise de XRF permitiu avaliar a existência de Zn nos três grupos, a ausência de chumbo em todos os grupos e a presença de mercúrio apenas no grupo teste II. Como cada elemento tem a sua assinatura elemental foi possível com esta técnica de XRF identificar as diferenças entre os grupos verificando-se uma diminuição do alumínio no grupo teste II quando comparado com o grupo controlo, uma diminuição do enxofre no grupo teste I quando comparado com o grupo controlo, um aumento do potássio em ambos os grupos teste quando comparado com o grupo controlo e um aumento do cálcio e do ferro no grupo teste II quando comparado com o grupo controlo.

É interessante perceber com estes resultados que podemos identificar alterações elementais e provavelmente moleculares que antecedem as alterações morfológicas e histológicas. Estes resultados mostram que são necessários mais estudos, nomeadamente em relação ao tempo de exposição e à concentração dos metais pesados utilizada, bem como à sua possível combinação.



---

## Referências bibliográficas

---

- [1] Gale Martha SCI. Atoms Part 1: How Atoms Are Made. 2012 [13/05/2015]; Available from: <http://Sciexplorer.Blogspot.Pt/2012/10/Atoms-Part-1-How-Atoms-Are-Made.Html>.
- [2] Nigam MC. A New Quantum Mechanical Theory of Evolution of Universe and Life. *Ancient Science of Life*. 1990 Oct-Dec;10(2):74-8.
- [3] Origin Of The Elements, Nuclear Science Wall Chart. 2000 [21/05/2015]; Available from: <http://www2.Lbl.Gov/Abc/Wallchart/Chapters/10/0.Html>.
- [4] Andrulis ED. Theory of the Origin, Evolution, and Nature of Life. *Life*. 2011;2(1):1.
- [5] Elements And The 'Big Bang' Theory. 2009 [23/05/2015]; Available from: <http://sciencelearn.org.nz/Contexts/Just-Elemental/Science-Ideas-and-Concepts/How-elements-are-formed>.
- [6] Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. *Harpers Illustrated Biochemistry* (Lange Medical Book). 29th ed: The McGraw-Hill Companies, Inc; 2012.
- [7] Becky H. *Essential Chemistry - The Periodic Table*. New York: Chelsea House Publishers; 2008.
- [8] Navarra T. *The Encyclopedia of Vitamins, Minerals, and Supplements: Facts On File, Incorporated*; 2004. pp. 9; 46; 98-100; 150-151; 173.
- [9] Rao NM. *Medical Biochemistry: New Age International*; 2006. pp.572-601.
- [10] Seeley RR. *Anatomia & Fisiologia*. Lange MJ, editor: Th. Mcgraw-Hill Companies 2005.
- [11] Sato K, Suzuki I, Kubota H, Furusho N, Inoue T, Yasukouchi Y, et al. Estimation of daily aluminum intake in Japan based on food consumption inspection results: impact of food additives. *Food Science & Nutrition*. 2014;2(4):389-97.
- [12] Briat JF, Rouached H, Tissot N, Gaymard F, Dubos C. Integration of P, S, Fe, and Zn nutrition signals in *Arabidopsis thaliana*: potential involvement of PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1 (PHR1). *Front Plant Sci*. 2015;6(290).
- [13] Waśkiewicz A. Mineral Supplements ' Effect On Total Nutrient Intake In Warsaw Adult Population; Cross-Sectional Assessment. *Rocz Panstw Zakl Hig*. 2015;66(2):123-8.
- [14] Oliveira A, Padrao P, Moreira A, Pinto M, Neto M, Santos T, et al. Potassium urinary excretion and dietary intake: a cross-sectional analysis in 8-10 year-old children. *BMC Pediatrics*. 2015;15(1):60.
- [15] Katsumata S, Matsuzaki H, Uehara M, Suzuki K. Effects of dietary calcium supplementation on bone metabolism, kidney mineral concentrations, and kidney function in rats fed a high-phosphorus diet. *J Nutr Sci Vitaminol*. 2015;61(2):195-200.
- [16] Lips P, Gielen E, van Schoor NM. Vitamin D supplements with or without calcium to prevent fractures. *BoneKEy Reports*. 2014;3:512.

- [17] Bolland MJ, Grey A, Reid IR. Calcium supplements and cardiovascular risk: 5 years on. *Therapeutic Advances in Drug Safety*. 2013 October 1, 2013;4(5):199-210.
- [18] Kanagal DV, Rajesh A, Rao K, Devi UH, Shetty H, Kumari S, et al. Levels of Serum Calcium and Magnesium in Pre-eclamptic and Normal Pregnancy: A Study from Coastal India. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR*. 2014;8(7):OC01-OC4.
- [19] Organization WH. Intermittent iron and folic acid supplementation in non-anaemic pregnant women 2012. 1-31.
- [20] Kaluza J, Wolk A, Larsson SC. Heme Iron Intake and Risk of Stroke: A Prospective Study of Men. *Stroke*. 2013 February 1, 2013;44(2):334-9.
- [21] Duck FA. *Physical Properties of Tissue: A Comprehensive Reference Book*: Academic Press; 1990. pp. 319-328.
- [22] Ashbolt N. Environmental (Saprozoic) Pathogens of Engineered Water Systems: Understanding Their Ecology for Risk Assessment and Management. *Pathogens*. 2015;4(2):390.
- [23] Casarett LJ, Klaassen CD, Doull J. *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*: McGraw-Hill Medical Pub. Division; 2001.
- [24] Rzymiski P, Tomczyk K, Poniedziałek B, Opala T, Wilczak M. Impact of heavy metals on the female reproductive system. *Ann Agric Environ Med*. 2015;22(2):259-64.
- [25] Catr, D, Lopes MF, Cabrita A, et al. Lasting Developmental Effects of Neonatal Fentanyl Exposure in Prewaning Rats. *Anesthesiology Research and Practice*. 2012;2012:10.
- [26] Sharma B, Singh S, Siddiqi NJ. Biomedical Implications of Heavy Metals Induced Imbalances in Redox Systems. *BioMed Research International*. 2014;2014:26.
- [27] Rai A, Maurya SK, Khare P, Srivastava A, Bandyopadhyay S. Characterization of Developmental Neurotoxicity of As, Cd, and Pb Mixture: Synergistic Action of Metal Mixture in Glial and Neuronal Functions. *Toxicological Sciences*. 2010 December 1, 2010;118(2):586-601.
- [28] Hodson ME. Heavy metals—geochemical bogey men? *Environmental Pollution*. 2004;129(3):341-3.
- [29] Waseem A, Arshad J, Iqbal F, Sajjad A, Mehmood Z, Murtaza G. Pollution Status of Pakistan: A Retrospective Review on Heavy Metal Contamination of Water, Soil, and Vegetables. *BioMed Research International*. 2014;2014:29.
- [30] Tamás M, Sharma S, Ibstedt S, Jacobson T, Christen P. Heavy Metals and Metalloids As a Cause for Protein Misfolding and Aggregation. *Biomolecules*. 2014;4(1):252.
- [31] Kao RT, Dault S, Pichay T. Understanding the mercury reduction issue: the impact of mercury on the environment and human health. *J Calif Dent Assoc*. 2004;32(7):574-9.
- [32] Manuscript A. *Nih Public Access. Changes*. 2012;29(6):997–1003.
- [33] Bose-O'Reilly S, McCarty KM, Steckling N, Lettmeier B. Mercury Exposure and Children's Health. Current problems in pediatric and adolescent health care. 2010;40(8):186-215.
- [34] Clarkson TW. The three modern faces of mercury. *Environ Health Perspect*. 2002;1:11-23.
- [35] Dórea J. Integrating Experimental (In Vitro and In Vivo) Neurotoxicity Studies of Low-dose Thimerosal Relevant to Vaccines. *Neurochem Res*. 2011 2011/06/01;36(6):927-38.
- [36] Geier DA, King PG, Hooker BS, Dórea JG, Kern JK, Sykes LK, et al. Thimerosal: Clinical,



- epidemiologic and biochemical studies. *Clinica Chimica Acta*. 2015;444(0):212-20.
- [37] Decreto-Lei Nº 306/2007 De 27 De Agosto Do Diário Da República, 1ª Série, Nº 164; Ministério Do Ambiente, Do Ordenamento Do Território E Do Desenvolvimento Regional.
- [38] Moreira FR, Moreira JC. Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 2004;15:119-29.
- [39] Organization WH. Exposure to lead: A major public health concern. Geneva, Switzerland 2010.
- [40] Fakhri Y, Mohseni SM, Jafarzadeh S, Langarizadeh G, Moradi B, Zandsalimi Y, et al. Assessment of Carcinogenic and Non-Carcinogenic Risk Lead in Bottled Water in Different Age Groups in Bandar Abbas City, Iran. *Global Journal of Health Science*. 2015;7(4):286-94.
- [41] Wojakowska A, Nowacki D, Turczyn B, Smyk B, Szuba A, Trziszka T. Unsaturated Fatty Acids Supplementation Reduces Blood Lead Level in Rats. *BioMed Research International*. 2015;2015:9.
- [42] Gonçalves C, Bairos V. *Histologia - Texto e Imagens*. 3rd ed: Imprensa Universidade Coimbra; 2010.
- [43] Mijor IA, Fejerskov O. *Embriologia e Histologia Oral Humana*. São Paulo: Panamericana; 1990. pp. 333.
- [44] Medeiros J. *Fisiologia Humana E Conceitos De Fisiopatologia*. Coimbra 2008.
- [45] Alberts B. *Molecular Biology of the Cell: Reference edition*: Garland Science; 2008. pp. 961-965.
- [46] Junqueira LCU, Carneiro J. *Histologia básica: texto, atlas*: Guanabara Koogan; 2008.
- [47] Sanders I, Mu L, Amirali A, Su H, Sobotka S. The Human Tongue Slows Down to Speak: Muscle Fibers of the Human Tongue. *The Anatomical Record*. 2013;296(10):1615-27.