

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**HIDROXIALUMINOSILICATOS E A
BIODISPONIBILIDADE DO ALUMÍNIO: AVALIAÇÃO
*IN VIVO***

TESE DE DOUTORADO

Simone Moraes da Silva Noremberg

Santa Maria, RS, Brasil

2012

HIDROXIALUMINOSILICATOS E A BIODISPONIBILIDADE DO ALUMÍNIO: AVALIAÇÃO *IN VIVO*

Simone Moraes da Silva Noremborg

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Química.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Denise Bohrer do Nascimento

Santa Maria, RS, Brasil

2012

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação Em Química**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**HIDROXIALUMINOSILICATOS E A BIODISPONIBILIDADE DO
ALUMÍNIO: AVALIAÇÃO *IN VIVO***

elaborada por
Simone Moraes da Silva NoreMBERG
como requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Denise Bohrer do Nascimento
(Presidente/Orientadora)

Prof^a. Dr^a. Francielli Weber Santos Cibin (UNIPAMPA)

Prof^a. Dr^a. Lucielli Savegnago (UFPEL)

Prof^a. Dr^a. Maria Rosa Chitolina Schetinger (UFSM)

Prof^a. Dr^a. Morgana Bazzan Dessuy (UFRGS)

Santa Maria, 10 de dezembro de 2012.

Dedico este trabalho

À minha família, pelo incentivo e carinho.
O orgulho que percebo em vocês a cada conquista renova minhas forças para
continuar.

Ao Marcelo Kunz, pelo companheirismo, amor e força.
Pela compreensão e apoio em todos os momentos.

Agradeço

À professora Denise Bohrer, por ter confiado em mim e proporcionado que eu
fizesse o doutorado.

Pelo carinho e os cuidados que sempre teve comigo, aprendi com você muito
mais do que química analítica.

À professora Francielli Weber Santos Cibin por ser essa pessoa querida e que
consegue tornar tudo mais simples e possível. Obrigada pela grande ajuda e
carinho.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Denise Bohrer do Nascimento, pela orientação, confiança, conselhos e ensinamentos durante a realização deste trabalho. Também agradeço pela amizade, dedicação e apoio demonstrados durante a nossa convivência.

Ao Prof. Dr. Paulo Nascimento pelos seus ensinamentos e pela amizade.

À Prof^a. Dr^a. Maria Rosa Chitolina Schetinger, pela colaboração e pela disponibilização do laboratório e pela ajuda de seus alunos, em especial ao Jessié Gutierrez, Jamile Gonçalves, Rosélia Spanevello e André Bairros.

Às Prof^a. Dr^a. Francielli Weber Santos Cibir e Lucielli Savegnago pela disponibilização do laboratório, pelo incentivo e por nunca medirem esforços em me ajudar. Quero deixar meu agradecimento especial, pois a contribuição de vocês foi essencial para a realização deste trabalho.

À Laura Musacchio, Melina Soares e Ariely Izaguirry pelo auxílio, atenção, disponibilidade, incentivo, pela amizade.

À Suzi Wollenhaupt, Cristiano Spiazzi e Jefferson de Jesus Soares por não medirem esforços e terem enfrentado cobras e lagartos, literalmente, para me ajudar. Com a alegria e amizade de vocês tudo fica mais engraçado e divertido. Obrigada pelo carinho de vocês.

Aos amigos e colegas do LACHEM agradeço pela amizade, conselhos, incentivo e pelos momentos de descontração vividos ao longo deste período em que trabalhamos juntos. Em especial a Marlei Veiga, Vanessa Mörschbacher, Sandra Maria Ribeiro, Luís Ferraz e Alexandre Schneider pelos conselhos, pelo apoio, pela confiança, e por nunca negarem ajuda quando precisei.

Ao Marcelo e toda a minha família que estiveram sempre ao meu lado torcendo por mim, obrigada pelo apoio, amo vocês.

À Monalisa e João, Rone e Gustavo, Tatiana e João, Natália e Marcelo, Marcele e Vinícius pela grande amizade, adoro vocês.

A todos os funcionários e professores que colaboraram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade oferecida de realizar o curso de graduação, mestrado e doutorado.

A Deus por ter me dado força e condições para minhas conquistas.

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

HIDROXIALUMINOSILICATOS E A BIODISPONIBILIDADE DO ALUMÍNIO: AVALIAÇÃO *IN VIVO*

AUTORA: SIMONE MORAES DA SILVA NOREMBERG

ORIENTADORA: DENISE BOHRER DO NASCIMENTO

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 10 de dezembro de 2012.

O alumínio (Al) e o silício (Si) são contaminantes encontrados em substâncias usadas na nutrição parenteral (NP). Devido ao seu grande volume, soluções de nutrição e de infusão são os fármacos, administrados por via parenteral, que apresentam mais efeitos adversos se contiverem contaminantes. Hidroxialuminosilicatos (HAS) insolúveis e biologicamente inertes podem se formar em soluções contendo Al e Si quando o pH > 4,5. Esta interação química é considerada de grande interesse no campo biológico devido ao seu possível papel na desintoxicação ou proteção contra a toxicidade do metal. Neste trabalho, foi investigada a biodisponibilidade do Al na presença do Si e de alguns componentes da NP *in vivo*. Primeiramente otimizou-se os métodos de abertura de tecido biológico para análise de Al e Si coexistentes nas amostras por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite. Foi analisada a distribuição do Al e Si no organismo de ratos Wistar após 60 administrações de 0,5 mg/kg/dia de Al e/ou 2 mg/kg/dia de Si na presença ou não de gluconato de cálcio ou dihidrogenofosfato de potássio em concentrações semelhantes as usadas nas soluções de NP. Foi também avaliada a atividade da enzima δ-aminolevulinato desidratase (δ-ALA-D) e espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos tecidos dos animais. As melhores recuperações de Al e Si nas amostras de tecido animal ocorreram após dissolução com hidróxido de tetrametilamônio (HTMA) utilizando Si 15 mg/L como modificador para determinação de Al e Pd 2 g/L para Si. Foi necessário o recobrimento do forno com Zr para a medida das amostras dissolvidas com HTMA. O Al se acumulou em todos os tecidos, principalmente no fígado, rim, osso e sangue. O Si diminuiu o acúmulo do metal nos tecidos, mas esse efeito é menos pronunciado em meio aos componentes

da NP. Foi observado o depósito de Si nos tecidos, principalmente no tratamento com fosfato. Apesar do Al ter se depositado nos tecidos, não foram observados efeitos pronunciados de toxicidade. Em poucos tecidos observou-se aumento na peroxidação lipídica nos tratamentos e a atividade da enzima δ -ALA-D, quando alterada, aparece aumentada nos grupos tratados com Al, principalmente no tratamento com gluconato de Ca. Como conclusão, o Si não diminui a deposição do Al e, portanto, a biodisponibilidade do metal em meio aos componentes da NP.

Palavras-chave: Alumínio. Silício. Hidroxialuminossilicatos. Soluções de Nutrição parenteral. δ -ALA-D. TBARS.

ABSTRACT

Doctoral Dissertation in Chemistry
Graduate Pos in Chemistry
Universidade Federal de Santa Maria

HYDROXYALUMINOSILICATES AND THE BIODISPONIBILITY OF ALUMINUM: EVALUATION *IN VIVO*

AUTHOR: SIMONE MORAES DA SILVA NOREMBERG
ADVISOR: PROF^a DR^A. DENISE BOHRER DO NASCIMENTO

Aluminium (Al) and silicon (Si) are contaminants found in substances used in the parenteral nutrition (PN). Because of its large volume, nutrition and infusion solutions are pharmaceutical products parenterally administered, which present higher risks of adverse effects when contaminated. Insoluble and biologically inert species of hydroxyaluminosilicates (HAS) may be formed in solutions containing Al and Si when $\text{pH} > 4.5$. This chemical interaction is considered of great interest in biology because of its possible role in detoxification or protection against metal toxicity. In this study the Al bioavailability was investigated in the presence of Si and some PN components *in vivo*. Al and Si body distribution in Wistar rats was analyzed after 60 administrations of Al 0.5 mg/kg/day and/or Si 2 mg/kg/day in the presence or absence of calcium gluconate or potassium dihydrogenphosphate in concentrations similar to those used in the PN solutions. δ -Aminolevulinic acid dehydratase enzyme activity and tiobarbituric acid reactive species (TBARS) content was also evaluated in animal tissues. Tissue digestion methods were optimized for the determination of both Al and Si in the same samples by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (GFAAS). Better Al and Si recoveries in animal tissue samples occurred after dissolution with tetramethylammonium hydroxide (TMAH) using Si 15 mg/L as modifier for Al determination and Pd 2 g/L for Si. Before the measurements, graphite furnace was coated with Zr following a specific heating program. Al accumulated in all tissues, especially in the liver, kidneys, bones and blood. Si decreased Al accumulation, this effect was less pronounced in the presence of PN components though. Si tissue accumulation was also observed, mainly when administered together with phosphate. Although Al was deposited in the tissues, pronounced toxicity effects were not observed. Increase in lipidic

peroxidation was observed in a few tissues. When δ -ALA-D activity was altered, it was increased in Al treated groups, mainly in Ca gluconate treatment. As a conclusion, Si did not decrease Al deposition and therefore the metal biodisponibility amidst the NP components.

Keywords: Aluminium. Silicon. Hydroxyaluminosilicates. Solutions for parenteral nutrition. δ -ALA-D. TBARS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da formação de HAS _B a partir de HAS _A envolvendo uma forma de transição, HAS _{AB}	29
Figura 2: Esquema da possível interferência dos metais na atividade da enzima δ-aminilevulinato desidratase (δ-ALA-D).....	41
Figura 3: Curvas de pirólise e atomização para 1,0 pg de alumínio	67
Figura 4: Curvas de pirólise e atomização para 10 pg de silício	69
Figura 5: Médias semanais dos pesos dos animais durante os tratamentos para os quatro grupos: controle, Al, Si e Al+Si.....	76
Figura 6: Concentração de Al no soro, osso, fígado e rim dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de Al e/ou Si.....	78
Figura 7: Concentração de Al no pulmão dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de Al e/ou Si.....	82
Figura 8: Concentração de Al no cérebro dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de Al e/ou Si.....	83
Figura 9: Concentração de Si no soro, rim e pulmão dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de Al e/ou Si.....	85
Figura 10: Concentração de Si no cérebro dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de Al e/ou Si.....	86
Figura 11: Efeito da administração intraperitoneal de Al e/ou Si na atividade da enzima δ-ALA-D fígado dos ratos.	88
Figura 12: Efeito da administração intraperitoneal de Al e/ou Si na atividade da enzima δ-ALA-D no rim, pulmão, músculo e coração dos ratos.....	89
Figura 13: Níveis de MDA no soro e rim dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de Al e/ou Si.....	92
Figura 14: Níveis de MDA no músculo dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de Al e/ou Si.....	93
Figura 15: Níveis de MDA nas estruturas cerebrais dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de Al e/ou Si.....	95
Figura 16: Médias semanais dos pesos dos animais durante os tratamentos para os quatro grupos: controle, Al com KH ₂ PO ₄ , KH ₂ PO ₄ , Al+Si com KH ₂ PO ₄	97
Figura 17: Concentração de Al no soro, fígado, pulmão e osso dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de KH ₂ PO ₄ e Al e/ou Si.....	98
Figura 18: Concentração de Al no músculo, coração e rim dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de KH ₂ PO ₄ e Al e/ou Si.....	99
Figura 19: Concentração de Al no testículo dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de KH ₂ PO ₄ e Al e/ou Si.....	100

Figura 20: Concentração de Al no cérebro dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de KH_2PO_4 e Al e/ou Si.....	101
Figura 21: Concentração de Si no soro, músculo, coração e pulmão dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de KH_2PO_4 e Al e/ou Si.....	102
Figura 22: Concentração de Si no rim, testículo e fígado dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de KH_2PO_4 e Al e/ou Si.....	103
Figura 23: Concentração de Si no cérebro dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de de KH_2PO_4 e Al e/ou Si.....	104
Figura 24: Efeito da administração intraperitoneal de KH_2PO_4 e Al e/ou Si na atividade da enzima δ -ALA-D no fígado, coração, músculo e pulmão dos ratos. ...	106
Figura 25: Níveis de MDA no fígado e testículo dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de KH_2PO_4 e Al e/ou Si (Si).....	107
Figura 26: Níveis de MDA nas estruturas cerebrais dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de KH_2PO_4 e Al e/ou Si.....	109
Figura 27: Médias semanais dos pesos dos animais durante os tratamentos para os quatro grupos: controle, Al com gluconato de Ca, gluconato de Ca e Al+Si com gluconato de Ca.....	111
Figura 28: Concentração de Al no soro, fígado e pulmão dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de gluconato de Ca e Al e/ou Si.....	112
Figura 29: Concentração de Al no rim, osso e testículo dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de gluconato de Ca e Al e/ou Si.....	113
Figura 30: Concentração de Al no músculo e coração dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de gluconato de Ca e Al e/ou Si.....	114
Figura 31: Concentração de Al no cérebro dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de gluconato de Ca e Al e/ou Si.....	115
Figura 32: Concentração de Si no soro, músculo, coração e testículo dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de gluconato de Ca e Al e/ou Si.....	117
Figura 33: Concentração de Si no cérebro dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de gluconato de Ca e Al e/ou Si.....	118
Figura 34: Efeito da administração intraperitoneal de gluconato de Ca e Al e/ou Si na atividade da enzima δ -ALA-D no sangue, fígado e testículo dos ratos.	120
Figura 35: Efeito da administração intraperitoneal de gluconato de Ca e Al e/ou Si na atividade da enzima δ -ALA-D no rim, pulmão, músculo e coração dos ratos.....	122
Figura 36: Níveis de MDA no soro, coração, rim, pulmão e músculo dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de gluconato de Ca e Al e/ou Si (Si).....	123
Figura 37: Níveis de MDA no fígado e testículo dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de gluconato de Ca e Al e/ou Si (Si).	125
Figura 38: Níveis de MDA nas estruturas cerebrais dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de gluconato de Ca e Al e/ou Si (Si).	126
Figura 39: Granulomas formados no tecido abdominal do grupo de animais com 60 administrações intraperitoneais de Al 0,5 mg/kg/ dia (a), tecido abdominal sem granulomas no grupo controle (b).	129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros instrumentais para determinação de Al e Si por GFAAS e tratamento do forno com Zr.....	48
Tabela 2: Proporção entre massa do tecido e volume de Tris/HCl para homogeneização.....	60
Tabela 3: Volume de soluções e amostra para análise de δ -ALA-D tecidual com respectivo tempo de incubação para cada tecido.....	61
Tabela 4: Volume de soluções e sangue para análise de δ -ALA-D.....	62
Tabela 5: Volume de homogenato e reagentes para análise de TBARS.....	64
Tabela 6: Curva padrão de malondialdeído.....	64
Tabela 7: Curva padrão de albumina para determinação de proteína.....	66
Tabela 8: Recuperações de Al e Si em amostras de fígado abertas com ácido nítrico.....	70
Tabela 9: Recuperações de Al e Si em amostras de fígado abertas com HTMA.....	72
Tabela 10: Concentração de Al no padrão de fígado bovino após abertura com 0,5 mL de HTMA.....	73
Tabela 11: Concentração de Al ($\mu\text{g/g}$) no músculo, coração e testículo dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de Al e/ou Si.....	81
Tabela 12: Concentração de Si ($\mu\text{g/g}$) no fígado, músculo, coração e testículo dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de Al e/ou Si.....	86
Tabela 13: Níveis de porfobilinogênio no sangue (nmol PBG/h/mL) e testículo (nmolPBG/mgptn h) dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de Al e/ou Si.....	88
Tabela 14: Níveis de MDA no pulmão, coração, fígado e testículo (nmolMDA/g de tecido) dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de Al e/ou Si.....	92
Tabela 15: Níveis de MDA no hipotálamo de ratos tratados com Al e/ou Si.....	95
Tabela 16: Níveis de porfobilinogênio no sangue (nmolPBG/h/mL), rim e testículo (nmolPBG/mgptn h) dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de Al e/ou Si e KH_2PO_4	105
Tabela 17: Níveis de MDA no soro (nmolMDA/mL), rim, coração, músculo e pulmão (nmolMDA/g de tecido) dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de KH_2PO_4 e Al e/ou Si.....	107
Tabela 18: Níveis de MDA no hipotálamo de ratos tratados com KH_2PO_4 e Al e/ou Si.....	109
Tabela 19: Concentração de Si ($\mu\text{g/g}$) no fígado, rim e pulmão dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de gluconato de Ca e Al e/ou Si.....	118
Tabela 20: Níveis de MDA no hipotálamo de ratos tratados com gluconato de Ca e Al e/ou Si.....	127

Tabela 21: Concentração de Al medida nos órgãos e sangue nos diferentes grupos tratados quando comparados aos seus respectivos controles.....	132
Tabela 22: Concentração de Si medida nos órgãos e sangue nos diferentes grupos tratados quando comparados aos seus respectivos controles.....	133
Tabela 23: Atividade da enzima δ -ALA-D nos órgãos e sangue nos diferentes grupos tratados quando comparados aos seus respectivos controles.....	133
Tabela 24: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos órgãos e sangue nos diferentes grupos tratados quando comparados aos seus respectivos controles.....	134

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. OBJETIVOS	22
2.1. Objetivos gerais	22
2.2. Objetivos específicos	22
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1. Alumínio	23
3.2. Silício	25
3.3. Interação entre silício e alumínio (Hidroxialuminosilicatos)	28
3.3.1. Formação de hidroxialuminosilicatos	28
3.3.2. Hidroxialuminosilicatos e a biodisponibilidade do alumínio	31
3.4. Nutrição parenteral	33
3.5. Estresse Oxidativo	37
3.6. δ-Aminolevulinato Desidratase (δ-ALA-D)	40
3.7. Análise de Si e Al em amostras biológicas	42
3.7.1. Abertura Alcalina	42
3.7.2. Determinação de Alumínio	43
3.7.3. Determinação de Silício	44
4. MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1. Controle da contaminação	46
4.2. Otimização do método para determinação de Al e Si por GFAAS	46
4.2.1. Instrumentação	47
4.2.2. Reagentes e Soluções	47
4.2.3. Determinação de alumínio e silício	48
4.3. Otimização do método de digestão das amostras de tecido animal	49
4.3.1. Instrumentação	49
4.3.2. Reagentes e Soluções	50
4.3.3. Digestão do fígado com ácido nítrico	50
4.3.4. Dissolução do fígado com hidróxido de tetrametilamônio	50
4.3.5. Dissolução do osso com hidróxido de tetrametilamônio	51
4.3.6. Digestão do osso com ácido nítrico	51

4.3.7. Determinação de alumínio e silício	52
4.4. Administração de alumínio e silício em ratos (Wistar)	52
4.4.1. Instrumentação	52
4.4.2. Reagentes e Soluções	52
4.4.3. Animais	54
4.4.4. Tratamento.....	54
4.4.4.1. Tratamento com Al e Si	55
4.4.4.2. Tratamento com Al, Si e dihidrogenofosfato de potássio.....	55
4.4.4.3. Tratamento com Al, Si e gluconato de cálcio.....	56
4.4.5. Análise de Alumínio e Silício.....	56
4.4.5.1. Tratamento das amostras de sangue	56
4.4.5.2. Amostras de fígado, coração, cérebro, músculo, testículo e rim	56
4.4.5.3. Amostras de osso.....	57
4.4.5.4. Determinação de Al e Si.....	57
4.5. Análises bioquímicas	58
4.5.1. Instrumentação:	58
4.5.2. Reagentes e soluções:.....	58
4.5.3. Preparo do homogenato	60
4.5.4. Atividade da δ -Aminolevulinato Desidratase (δ -ALA-D).....	61
4.5.4.1. δ -ALA-D Tecidual	61
4.5.4.2. δ -ALA-D sanguínea	62
4.5.5. Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	63
4.5.5.1. TBARS Tecidual	63
4.5.5.2. TBARS Sanguíneo	65
4.5.6. Determinação de proteínas totais	65
4.6. Análise estatística.....	66
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1. Otimização do método para quantificação do Alumínio	67
5.2. Otimização do método para quantificação de silício.....	68
5.3. Otimização do método de digestão das amostras de tecido animal.....	70
5.3.1. Digestão do fígado com ácido nítrico	70
5.3.2. Dissolução do fígado com hidróxido de tetrametilamônio	71
5.3.3. Dissolução do osso com hidróxido de tetrametilamônio	74
5.3.4. Digestão do osso com ácido nítrico	74
5.4. Administração de alumínio e silício em ratos Wistar	75
5.4.1. Tratamento com Al e Si.....	76
5.4.1.1. Desenvolvimento dos animais durante o tratamento	76
5.4.1.2. Distribuição do alumínio nos tecidos dos ratos Wistar	77
5.4.1.3. Distribuição de silício nos tecidos dos ratos Wistar	84
5.4.1.4. δ -Aminolevulinato Desidratase (δ -ALA-D)	87
5.4.1.5. Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	91
5.4.2. Tratamento com Al e Si e dihidrogenofosfato de potássio.....	96
5.4.2.1. Desenvolvimento dos animais durante o tratamento	96

5.4.2.2. Distribuição do alumínio nos tecidos dos ratos Wistar	97
5.4.2.3. Distribuição de silício nos tecidos dos ratos Wistar	101
5.4.2.4. δ -Aminolevulinato Desidratase (δ -ALA-D)	104
5.4.2.5. Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	106
5.4.3. Tratamento com Al e Si e gluconato de Ca.....	110
5.4.3.1. Desenvolvimento dos animais durante o tratamento	110
5.4.2.3. Distribuição de silício nos tecidos dos ratos Wistar	116
5.4.2.4. δ -Aminolevulinato Desidratase (δ -ALA-D)	119
5.4.3.5. Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	122
5.4.4. Efeito do tratamento nos tecidos.....	128
6. CONCLUSÃO	130
REFERÊNCIAS.....	135

LISTA DE ABREVIATURAS

Al- Alumínio

ASCN- Sociedade Americana de Nutrição Clínica (do inglês- American Society of Clinical Nutrition)

ASPEN- Sociedade Americana de Nutrição Parenteral e Enteral (do inglês- American Society of Parenteral and Enteral Nutrition)

CAT- Catalase

DA- Doença de Alzheimer

ER- Espécie reativa

ERN- Espécie reativa de nitrogênio

ERO- Espécie reativa de oxigênio

FCM- Fator de calibração médio

FDA- Food and Drug Administration

GFAAS- Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (do inglês- Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry)

GPx- Glutaciona peroxidase

GR-Glutaciona redutase

GSH- Glutaciona reduzida

GSSG- Glutaciona oxidada

HAS- Hidroxialuminossilicatos

HTMA- Hidróxido de tetrametilamônio

MDA- Malondialdeído

NP- Nutrição parenteral

NPT- Nutrição parenteral total

PBG- Porfobilinogênio

SDS- Dodecil sulfato de sódio

Si- Silício

SOD- Superóxido dismutase

TBA- Ácido tiobarbitúrico

TBARS- Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA- Ácido tricloroacético

TFK- Tampão fosfato de potássio

TGI- Trato gastrointestinal

Tris/HCl- Tris(hidroximetil)aminometano hidrocloreto

δ-ALA- Ácido δ-aminolevulínico

δ-ALA-D- δ-aminolevulinato desidratase

δ-ALA-S- δ-aminolevulinato sintase

1. INTRODUÇÃO

Apesar de alumínio (Al) e (Si) serem dois dos três elementos mais abundantes na litosfera, durante a evolução humana ambos tem sido, na maior parte das vezes, excluídos de processos bioquímicos (MEDEL et al., 1996). O alumínio pode causar doenças nos ossos e no cérebro em pacientes que recebem terapia de nutrição parenteral por longo tempo. Além disso, também pode ocorrer o acúmulo de alumínio no osso de crianças prematuras que recebem terapia de nutrição parenteral total (NPT) (KLEIN et al., 2005).

Alguns estudos epidemiológicos e experimentais sugerem que a sílica pode reduzir a absorção oral e/ou aumentar a excreção do alumínio e proteger contra os efeitos adversos induzidos pelo metal. Os hidroxialuminossilicatos são, provavelmente, a principal fase mineral que controla a solubilidade do Al em ambientes naturais (BIRCHALL et al., 1989).

O silício é o segundo elemento mais abundante na litosfera e está distribuído ubiquamente na natureza, ocorrendo principalmente nas formas de aluminossilicatos e hidratos de dióxido de silício. Quantidades consideráveis de silício são encontradas em vários produtos alimentares e em todas as águas naturais (BISSÉ et al., 2005). Por mais de 35 anos, o interesse nutricional no Si para animais superiores e seres humanos tem sido centrado nos seus efeitos benéficos sobre o colágeno e a formação ou função do glicosaminoglicano, que poderiam influenciar na formação óssea, manutenção da saúde cardiovascular e na cicatrização de feridas. Apesar de numerosos sinais de deficiência aparentes de Si terem sido descritas, geralmente ele não é aceito como um nutriente essencial para os animais superiores e seres humanos (NILSEN, 2009).

Estudos mostraram que alumínio e silício são contaminantes encontrados em substâncias usadas na nutrição parenteral. A Nutrição Parenteral (NP) é a administração de nutrientes por meio intravenoso em pacientes que não podem consumi-los por via gastrointestinal.

Devido ao seu grande volume, soluções de nutrição e de infusão são os fármacos, administrados por via parenteral, que apresentam mais efeitos adversos por conterem contaminantes (BOHRER et al., 2008). Dentre os seus componentes

individuais, o gluconato de cálcio e o dihidrogenofosfato de potássio estão entre os mais contaminados com Al e Si.

Um estudo anterior do nosso grupo de trabalho teve como objetivo investigar a formação de HAS em soluções em pH fisiológico, incluindo ensaios com componentes da nutrição parenteral que apresentam maior contaminação por Al e Si, o gluconato de cálcio e o dihidrogenofosfato de potássio. Foi comprovada a hipótese de que o Si interage com o Al em pH fisiológico, entretanto a formação de HAS não foi confirmada em meio aos componentes da nutrição parenteral *in vitro*.

Como continuação deste trabalho, a biodisponibilidade do alumínio na presença de silício e dos componentes da nutrição parenteral foram investigados agora *in vivo* por administração intraperitoneal em ratos. Os efeitos bioquímicos causados pelo tratamento tanto com Al quanto com Si também foram analisados, pois além de verificar seu acúmulo nos órgãos é importante investigar se a ação deste como um protetor da toxicidade do Al não interfere na atividade da enzima δ -ALA-D, e no estresse oxidativo, através da medida da peroxidação lipídica.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O objetivo deste estudo é avaliar o papel do silício na biodisponibilidade do alumínio através da formação de HAS quando administrado concomitantemente com o alumínio por via intraperitoneal em pH fisiológico em ratos e ainda a influência de alguns dos componentes da nutrição parenteral na formação do HAS.

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver uma técnica para abertura de amostras de tecido animal para determinação de Al e Si, com recuperação satisfatória dos dois elementos.

- Determinar a concentração de Al e Si no cérebro, fígado, músculo, pulmão, testículo, ossos, rins, coração e sangue dos ratos tratados com Al e/ou Si na presença ou não dos componentes da nutrição parenteral, após 60 administrações por via intraperitoneal.

- Avaliar a atividade da enzima δ -ALA-D no fígado, músculo, pulmão, testículo, rins, coração e sangue dos ratos tratados com Al e/ou Si e os componentes da nutrição parenteral.

- Verificar os efeitos do alumínio e do silício e dos componentes da nutrição parenteral sobre a peroxidação lipídica através da medida do TBARS sobre os diferentes tecidos (fígado, músculo, pulmão, testículo, rins, coração e soro) e estruturas cerebrais (córtex, cerebelo, hipocampo, hipotálamo e estriado) dos ratos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Alumínio

O alumínio é o elemento metálico mais abundante da crosta terrestre, o terceiro em geral e tem sido descrito como onipresente, pois ele pode ser encontrado em quantidades mensuráveis em alimentos, solo, água e ar (PERRY; KEELING-TUCKER, 1998).

O Al é liberado para o meio ambiente por processos naturais, processos de erosão do solo e erupções vulcânicas, e por ações antropogênicas. A fonte mais importante de obtenção do metal é a bauxita, que contém 55% de óxido de alumínio. As atividades industriais, tais como fundição, são a principal fonte de emissões ao ambiente, no entanto, o uso do alumínio também está estendido aos alimentos comerciais e ao tratamento da água potável (LLOPIS; DÍEZ, 2002).

O alumínio tem uma valência fixa de III, de modo que os compostos de alumínio podem libertar o íon hidratado Al^{3+} , $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$, em solução aquosa. Apenas pequenas quantidades de Al^{3+} existem em solução aquosa, exceto em pH baixo, pois os sais de alumínio em pH 7,4 hidrolisam rapidamente e formam polihidróxidos moderadamente solúveis (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

O Al é um elemento não essencial e a grande importância da avaliação das fontes deste metal é devido à associação deste elemento com doenças ósseas (GURA; PHARM, 2010) e cerebrais podendo estar envolvido em uma série de doenças neurológicas, como por exemplo, a doença de Alzheimer (DA) (BEQUET et al., 1994), e algumas doenças hepáticas (MAILLOUX et al., 2011). A alta biodisponibilidade do Al livre no meio fisiológico levou à hipótese de que ele pode competir com outros metais, causando mudanças na atividade de muitas enzimas bem como afetando o processo de mineralização dos ossos (MENDEL et al., 1996). A toxicidade aguda do alumínio nos sistemas biológicos pode ser relacionada a ele ser um metal “duro” preferindo ligar-se com ligantes “duros”, tais como grupos fosfato em membranas e no DNA e ATP (PERRY; KEELING-TUCKER, 1998).

A DA é provavelmente o resultado de um processo multifatorial, no qual estão inclusos componentes genéticos e ambientais; supõe-se que as características genéticas dos indivíduos modulam exposições ambientais. Dentre os fatores de risco ambientais, relacionados com o desenvolvimento da DA, encontra-se a exposição ao Al, um dos fatores potenciais mais estudados. Em 1965, foi relatada a inoculação intracerebral de fosfato de Al em coelhos, que resultou em degeneração neurofibrilar significativa similar a da DA; a relação entre o Al e doença começou a ser estudada desde então. Em 1973, foi publicado o primeiro artigo que demonstrou o aumento na concentração de Al em cérebros de pacientes com DA (FERREIRA et al., 2008). Segundo Walton (2006) o Al poderia estar associado à formação de emaranhados neurofibrilares no cérebro devendo, portanto, ser considerado um fator causal da DA. Além disso, o Al é encontrado associado com emaranhados de peptídeos beta-amilóides no cérebro dos pacientes com DA (EXLEY, 2005, 2006).

Ferreira et al. (2008) realizaram uma revisão sistemática da literatura produzida entre 1990 e 2005, selecionando 34 trabalhos para a pesquisa, desses, 68% estabeleceram relação entre o Al e a DA, 23,5% não apresentaram dados conclusivos e 8,5% não estabeleceram nenhuma relação entre o Al e DA. A partir dos resultados obtidos, verificaram que o Al intervém em diversos processos neurofisiológicos responsáveis pela degeneração característica da DA. Apesar da polêmica existente, a evidência científica demonstra, ao longo dos últimos anos, que o Al pode estar associado com o desenvolvimento da DA.

Recentemente, foi demonstrado que o aumento da inflamação de regiões do cérebro e da interferência com a função de projeções colinérgicas podem representar os mecanismos de ação através do qual o Al pode causar déficits de aprendizagem e de memória e contribuir com processos patológicos na DA (PLATT et al., 2001). Além disso, o Al pode influenciar a permeabilidade da barreira sangue-cérebro e alterar o fluxo de moléculas e íons para dentro e fora do cérebro (BANKS et al. 1988 apud KAIZER et al., 2007).

O pulmão e a pele são barreiras naturais eficazes na redução da absorção do alumínio, assim como o trato gastrointestinal (TGI), de tal forma que, pensava-se que a toxicidade não fosse possível. Um adulto absorve uma estimativa de 15 µg (0,3 a 0,5%) dos atuais 5 mg Al/dia em uma dieta oral típica. Esta quantidade que atinge a circulação liga-se às proteínas e, em parte, é eliminada por via renal. Se ingerido em doses excessivas a absorção do alumínio administrado por via oral

torna-se possível, quando a capacidade do sistema excretor é excedida. Quando administrado por via parenteral, o alumínio ultrapassa a barreira protetora do TGI e pode depositar-se no osso, fígado, baço, cérebro, rim, e outros tecidos. Por infusão intravenosa cerca de 40% do alumínio é absorvido em adultos e até 78% é retido em recém-nascidos (BOHRER et al., 2010). Além disso, uma vez absorvido, ele permanece no corpo por um longo tempo (GURA; PHARM, 2010), pois há relatos de que em humanos a meia-vida do Al é de 7 anos (PRIEST et al., 1998).

A ingestão de alumínio em excesso leva ao acúmulo em órgãos-alvo e tem sido associado a dano de testículo de seres humanos e animais. Altas concentrações de alumínio em espermatozoides humanos e no plasma seminal são correlacionadas com a diminuição da motilidade e viabilidade do espermatozoide (YOUSEF; SALAMA, 2009). Zaman et al. (1993) demonstraram que o alumínio tem efeitos tóxicos sobre a morfologia das células sanguíneas em ratos.

A ocorrência ubíqua do alumínio na litosfera, terceiro elemento mais comum após oxigênio e silício, e a ausência completa de qualquer necessidade biológica para o elemento se combinam levando a um paradoxo intrigante. Não é suficiente apontar para a insolubilidade ou a conhecida toxicidade do alumínio para explicar este enigma. O ferro é significativamente mais insolúvel e o cálcio igualmente citotóxico. Por uma perspectiva evolutiva, poderia ser argumentado que a biota ou sistemas biológicos, que foram dependentes do alumínio, não teriam sobrevivido a rigores da seleção natural, ou, alternativamente, que apesar de sua abundância, o alumínio tem permanecido indisponível em grande parte da evolução bioquímica. A última possibilidade favorece a proposta de que o silício atue com um controlador biológico da disponibilidade geoquímica do alumínio (EXLEY; BIRCHALL, 1992).

3.2. Silício

Depois do oxigênio, o silício é o segundo elemento mais abundante na litosfera, representando cerca de 28% da crosta terrestre. Está distribuído ubiquamente na natureza, ocorrendo principalmente nas formas de aluminossilicatos e hidratos de dióxido de silício (BISSÉ et al., 2005). As principais fontes alimentares são os cereais/grãos e seus produtos (por exemplo: cereais matinais, pão, cerveja),

algumas frutas e vegetais (por exemplo: bananas, passas, feijão, lentilha) e água potável não filtrada (JUGDAOHSINGH et al., 2004).

O Si existe mais comumente como a sílica mineral, SiO_2 . Quando exposto à água, silicatos liberam ácido ortosilícico $\text{Si}(\text{OH})_4$ numa concentração de 1-15 mg/L de SiO_2 . É desta forma que o silício está disponível para a interação com alumínio em solução e para a absorção no trato gastrointestinal. Estima-se que a dieta humana contém 20-50 mg SiO_2 /dia, dos quais 20% é derivada da água da torneira e bebidas. Do restante, 60% é derivado de cereais e está presente como sílica fitolítica, um polímero hidratado $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, que é de baixa biodisponibilidade (BELLIA et al., 1994). A absorção exigiria a sua decomposição em espécies solúveis muito menores, como o ácido ortosilícico. O ácido ortosilícico ($\text{Si}(\text{OH})_4$) é a principal espécie de Si presente na água potável e em outros líquidos, incluindo cerveja, que é a fonte mais prontamente disponível de Si ao homem (REFFITT et al., 1999). A excreção humana é de 15-20 mg diárias de Si, enquanto que os herbívoros excretam 10 a 20 vezes mais (PÉREZ; MANCILLA, 2012).

O Si geralmente é considerado como sendo um elemento de baixa toxicidade (CAROLI, 1996). As propriedades tóxicas de compostos inorgânicos solúveis e insolúveis de silício são conhecidas por causar problemas nos pulmões e nos rins, conhecidos como fibrose pulmonar e nefropatia dos Balcãs. Estes efeitos tóxicos, entretanto, se manifestam por uma exposição a elevadas concentrações de Si. Altos níveis de compostos de silício na água potável podem também levar ao aumento na frequência de aborto espontâneo, e elevados níveis séricos de silício são observados em pacientes com insuficiência renal crônica (LUGOWSKI et al., 1998).

O papel do Si na natureza ainda é relativamente mal compreendido. Em certos organismos e plantas, o silício é extraído das águas de superfície, polimerizado e incorporado com a função de estabilização (reforço) na parede celular ou nos esqueletos de plantas. Ele também pode cumprir um papel biológico nos mamíferos e vários estudos têm sugerido que é um elemento traço necessário para o desenvolvimento da cartilagem óssea e do colágeno do tecido conjuntivo (LUGOWSKI et al., 1998). Em animais superiores, incluindo ratos e pintos, o silício tem demonstrado ser um elemento traço essencial já que uma dieta deficiente leva a anormalidades no crescimento e esqueléticas (PERRY; KEELING-TUCKER, 1998). Além disso, o consumo elevado de Si aparentemente pode ser benéfico, facilitando a absorção ou utilização de alguns minerais, incluindo cobre e magnésio, que são

essenciais para o crescimento e a manutenção óssea, saúde cardiovascular e cicatrização de feridas.

Apesar de numerosos sinais de deficiência aparente de Si terem sido descritos, ele geralmente não é aceito como um nutriente essencial para os animais superiores e seres humanos. Não há dados mostrando a sua essencialidade para completar o ciclo de vida de um mamífero, ou definindo um papel bioquímico para sua necessidade (NIELSEN, 2009).

Nos vertebrados o Si tem sido encontrado em quantidades marcantes no cabelo, plumas, pele, fígado, coração, músculos, rins e tendões. A sua concentração em tecidos parenquimáticos foi estimada em 2-10 µg/g. Assim, assumindo uma faixa similar de deposição de silício em outros tecidos, o seu teor total no corpo para uma pessoa com 70 kg de peso corporal pode ser extrapolado em uma faixa de 140 a 700 mg. Isto faz com que o silício seja o terceiro elemento traço mais abundante constituinte do corpo (depois do ferro e zinco) (BISSÉ et al., 2005).

Os benefícios do silício para a saúde, no que diz respeito à função esquelética, neurológica e posicional, têm sido recentemente reconhecidos (CHUMLEA, 2007 apud GONZALEZ-MUÑOZ et al., 2008). Além disso, efeitos benéficos da administração de silício em pacientes humanos e em outros animais com osteoporose têm sido relatados (BISSÉ et al., 2005). O Si e o ácido silícico podem diminuir a biodisponibilidade do alumínio, bloqueando a sua absorção pelo trato gastrintestinal (PARRY, KEELING-TUCKER, 1998) e impedindo a reabsorção (REFFITT et al., 1999). No entanto, existem poucas informações disponíveis sobre os possíveis efeitos benéficos do Si na toxicidade neurológica, sistema antioxidante e nos marcadores de estresse de certos distúrbios neurológicos (GONZALEZ-MUÑOZ et al., 2008).

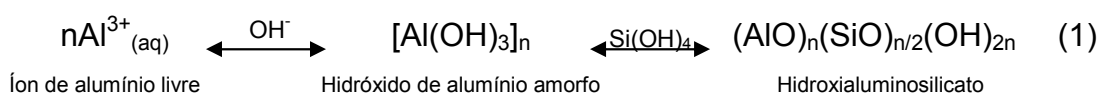
3.3. Interação entre silício e alumínio (Hidroxi-aluminossilicatos)

3.3.1. Formação de hidroxi-aluminossilicatos

O ácido silícico (Si(OH)_4) reage com o alumínio para formar hidroxi-aluminossilicatos. A reação não é com o íon $\text{Al}^{3+}_{(\text{aq})}$, mas envolve a condensação competitiva de Si(OH)_4 entre os grupos hidroxila em átomos adjacentes de Al, que fazem parte da estrutura de um hidróxido de alumínio ($\text{Al(OH)}_{3(\text{s})}$). A reação é descrita como competitiva, porque o Si(OH)_4 deve competir com a formação de hidroxi-aluminocomplexos, de tal forma que o Si(OH)_4 tem sido descrito como um inibidor do crescimento do $\text{Al(OH)}_{3(\text{s})}$. Deste modo, quando o Si(OH)_4 está presente em soluções em que o $\text{Al(OH)}_{3(\text{s})}$ é rapidamente formando, ele reage com os primeiros precursores da fase sólida para abrandar o seu crescimento e precipitação na solução. Mesmo quando o Si(OH)_4 é adicionado à agregados pré-formados de $\text{Al(OH)}_{3(\text{s})}$, ele reage com a fase sólida dividindo-a em pequenas unidades individuais (EXLEY; BIRCHALL, 1993).

Para garantir que Si(OH)_4 seja a espécie presente, é importante que a solução esteja abaixo de pH 9,0 (pKa para Si(OH)_4 é de cerca de 9,6) e não saturada no que diz respeito à solubilidade de Si(OH)_4 (que autocondensa quando $[\text{Si(OH)}_4] > 2,0 \text{ mmol/L}$). Quando esses critérios são preenchidos, HAS de estequiometria e estruturas distintas são formados e podem precipitar em solução (STREKOPYTOV; EXLEY, 2005).

De acordo com Exley et al. (1997) a forma mais simplificada de formação de HAS esta demonstrada na equação 1, para $n=2$.



Hidroxi-aluminossilicatos são, provavelmente, a principal fase mineral que controla a solubilidade do Al em ambientes naturais (DOUCET et al., 2001). Eles têm sido estudados pelo menos nos últimos 50 anos (EXLEY et al., 2002) e pesquisas

recentes determinaram a estrutura e estequiometria de duas formas distintas, HAS_A e HAS_B (DOUCET et al., 2001). HAS_A se forma idealmente quando a razão Si:Al é de 0,5 e quando todos os átomos de Al estão octaedricamente coordenados. A formação de HAS_B envolve uma reação de desidroxilação que, à temperatura e pressão ambientes, parece ser iniciada pelo excesso de $Si(OH)_4$ em solução, com uma razão Si:Al de 1,0, e com até 50% dos íons Al presentes em coordenação tetraédrica (Figura 1). Quando as concentrações de Al e $Si(OH)_4$ na solução mãe são iguais ou $Si(OH)_4$ está presente em pelo menos um fator de dois em relação ao Al, ambos os tipos de HAS estão presentes na fase sólida. A última observação levou a sugestão de que HAS_B são formados através da condensação competitiva do $Si(OH)_4$ entre os grupos hidroxila nos HAS_A (STREKOPYTOV; EXLEY, 2005).

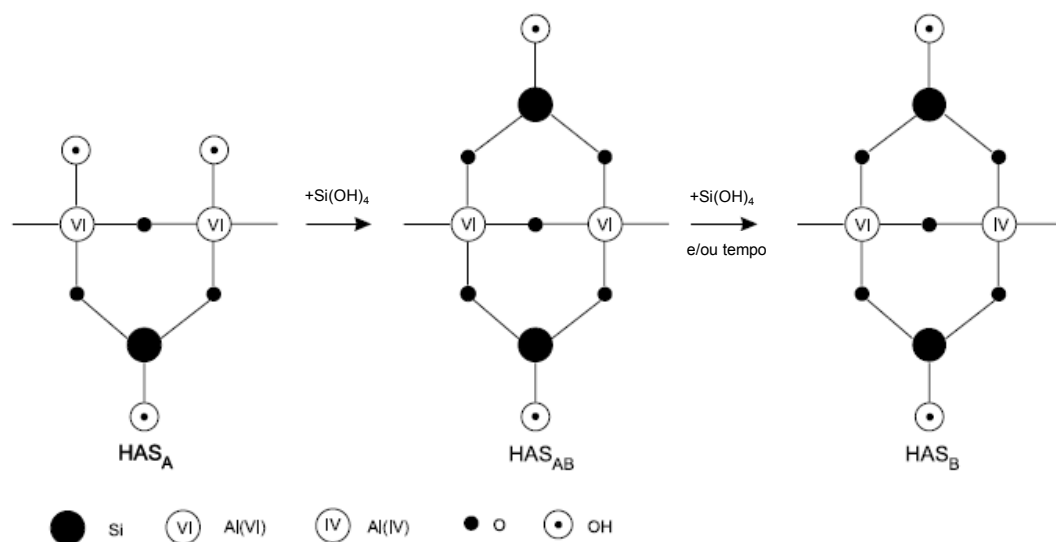


Figura 1: Esquema da formação de HAS_B a partir de HAS_A envolvendo uma forma de transição, HAS_{AB} , que sofre uma desidroxilação com o tempo ou com um excesso de $Si(OH)_4$ (STREKOPYTOV; EXLEY, 2005).

Na maioria das águas do solo, a dissolução não estequiométrica de minerais de aluminossilicatos combinado com a dissolução de outros silicatos garantem que a concentração de $Si(OH)_4$ fique em excesso em relação ao Al e, portanto, que o principal HAS formado seja o HAS_B (SCHNEIDER et al., 2004).

Tem sido demonstrado que espécies de HAS insolúveis e biologicamente inertes podem se formar em soluções contendo alumínio em níveis quase

fisiológicos quando o pH está acima de 4,5 (EXLEY; BIRCHALL, 1993). Sugere-se que o mecanismo pelo qual estes HAS se formam é a inibição da nucleação do hidróxido de alumínio. Esta interação química entre alumínio e silício é atualmente considerada de grande interesse no campo biológico devido ao seu possível papel na desintoxicação do alumínio (PERRY; KEELING-TUCKER, 1998).

Em um trabalho anterior (NOREMBERG, 2010) foi investigada a formação de HAS na presença ou não de componentes da nutrição parenteral *in vitro*. O método de filtração em membrana foi usado para investigar a formação e o tamanho de partículas em soluções contendo Al (0,5 mg/L) e Si (0,5; 1,0; 5,0; 10 e 20 mg/L), na presença ou ausência de gluconato de cálcio 2% ou dihidrogenofosfato de potássio 1M. Transcorridos 24h, 1, 2, 3 ou 6 meses do preparo, as alíquotas das soluções foram filtradas, em membranas de porosidade 0,1; 0,2 ou 0,45 μm e o Al e Si foram determinados no filtrado. O Al forma hidróxidos em soluções de pH neutro ou próximo da neutralidade que ficam retidos nas membranas utilizadas. Na presença de silicato, Al e Si atravessaram as membranas, provavelmente devido à formação de HAS. A formação de HAS ocorreu em soluções com concentração 0,5 mg/L de Al e concentração de Si igual ou maior a 10 mg/L. Em solução de dihidrogenofosfato de potássio houve a retenção de partículas pelas membranas, mas estas são formadas provavelmente pela interação deste com o silício e não com o Al, pois a concentração de Si no filtrado diminuiu enquanto a do Al permaneceu constante. A análise do precipitado mostrou a presença fósforo e Si. Na presença de gluconato de cálcio observou-se o predomínio de partículas com tamanho entre 100-1000 nm, que ficaram retidas nas membranas. Essas partículas são provavelmente formadas por alumínio ligado ao gluconato, pois a concentração de Si não se alterou com a filtração e análise do material retido na membrana mostrou a presença de Ca e Al. Apesar de ocorrer interação e formação de partículas entre as espécies estudadas, pôde-se verificar que estas não excedem o tamanho recomendado para material particulado para soluções parenterais.

3.3.2. Hidroxialuminosilicatos e a biodisponibilidade do alumínio

Considerando todos os efeitos adversos que podem estar relacionados ao alumínio, os estudos epidemiológicos e experimentais que sugerem que a sílica pode reduzir a absorção oral e/ou aumentar a excreção do alumínio e proteger contra esses efeitos induzidos pelo metal (PERRY et al., 1998; REFFITT et al., 1999; GONZALEZ-MUÑOZ et al., 2008) são de grande relevância. De acordo com Gillette Guyonnet e colaboradores (2007) a sílica é provavelmente o antídoto natural ao Al e poderá desempenhar um efeito benéfico diminuindo a biodisponibilidade do mesmo. Esses autores sugerem a possibilidade da utilização de silicatos como agente terapêutico para a DA.

Bohrer e colaboradores (2009) relataram que pela contaminação de soluções de NP com silicato, oriunda do vidro, o silicato pode se ligar ao alumínio para formar hidroxialuminosilicatos estáveis, que podem reduzir a biodisponibilidade do alumínio. Além disso, quando soluções de NP foram aquecidas, a liberação de silício e alumínio foi acelerada. Eles observaram que, quando a proporção molar de silício:alumínio era maior que 5, não havia alumínio livre na solução. Se a razão era menor que 5, o montante de alumínio livre era maior.

Rondeau et al. (2008) examinaram a associação entre a exposição ao alumínio ou sílica através da água potável e ao risco do declínio cognitivo e a DA. A análise não mostrou nenhuma evidência da ingestão de sílica estar associada com a evolução da função cognitiva, porém mostrou uma associação inversa entre a ingestão de sílica da água potável e o risco de demência, ou mais especificamente a doença de Alzheimer.

O potencial do silício em influenciar na biodisponibilidade do alumínio foi primeiramente demonstrado em peixes (BIRCHALL et al., 1989). Experimentos com salmão do Atlântico em água com concentração de alumínio de 6-7 μM e pH 5, demonstraram que peixes podem sobreviver a esta combinação tóxica aguda, na presença de silício em excesso, devido à formação de HAS, uma forma biologicamente inerte que especificamente aliviou a toxicidade do alumínio. Sem o ácido silícico, a mortalidade dos peixes foi de 100%, resultado de grandes danos na estrutura e função branquiais. Quando 100 μM de ácido silícico estavam presentes, não ocorreram mortes, a estrutura das brânquias permaneceu normal e a absorção

sistêmica de alumínio no osso, cérebro e outros órgãos foi inibida. Concentrações mais baixas de ácido silícico apresentaram uma redução no processo de proteção, demonstrando que 100 μM de ácido silícico são necessários para a formação de espécies de HAS estáveis.

As experiências em seres humanos também têm sido realizadas para investigar a relação entre alumínio e silício. Birchall e Chappell (1989) sugeriram que a presença de silício deve reduzir a absorção gastrointestinal de alumínio, o que foi posteriormente confirmado por Edwardson et al. (1993) e Jugdaohsingh et al. (2000). No estudo de Edwardson et al. (1993), suco de laranja contendo Al foi dado à voluntários com e sem a adição de 100 μM de ácido silícico (o mínimo necessário para formar HAS estáveis), e os níveis plasmáticos foram determinados após 1 e 6 h. Os resultados mostraram que a presença de ácido silícico reduziu a absorção de Al em 15% quando comparada com os indivíduos que ingeriram a bebida sem a adição de ácido silícico. Isto ocorreu apesar da presença de citrato, que é conhecido por aumentar a absorção de alumínio. Em outro estudo, em voluntários com função renal normal, foi verificado que o ácido silícico não só foi capaz de reduzir a absorção gastrointestinal de alumínio, mas também de liberar e excretar alumínio de sítios do corpo, incluindo os ossos (BELLIA et al., 1996). Estes resultados mostram que o silício, de alguma forma pode interagir com as espécies de alumínio presente na solução e no estado sólido e pode reverter a formação de fases minerais em grande parte insolúvel.

Gonzalez-Muñoz et al. (2008a) demonstraram que o consumo de cerveja afeta a cinética de absorção e excreção de alumínio, possivelmente devido a uma interação entre o Al e Si no trato digestivo. Gonzalez-Muñoz et al. (2008) mostraram que a inclusão de Si na dieta, em forma de cerveja ou de ácido silícico, reduz os efeitos nocivos causados pela peroxidação cerebral, diminuindo níveis de Al no cérebro.

A formação de HAS é um importante controle da disponibilidade biológica do Al. No entanto, parece que esse controle é principalmente de natureza geoquímica com HAS contribuindo para o controle da solubilidade do Al no ambiente natural. A onipresença do Al na crosta terrestre é lentamente acompanhada pelo número de aplicações do metal na vida moderna. Se quisermos manter esta disponibilidade do Al temos que garantir que ele será usado com segurança e sua química inorgânica

única com Si(OH)_4 , pode ser importante para atingir este objetivo (EXLEY et al., 2002).

3.4. Nutrição parenteral

A nutrição parenteral total (NPT) pode ser definida como o processo pelo qual todos os nutrientes necessários são administrados por via intravenosa. Naqueles indivíduos que são incapazes de consumir alimentos por via oral ou enteral, a nutrição parenteral (NP) é necessária para sustentar a vida (HARRAKI et al. 1995). Produtos para nutrição parenteral são comercializados na forma de soluções estéreis e incluem eletrólitos (Na, K, Ca, Mg, cloreto, bicarbonato, acetato e fosfato), aminoácidos, carboidratos (glicose e polióis), oligoelementos (Cu, Zn, Cr, Mn), albumina, vitaminas e lipídios (FISCHER, 1978).

A NPT é, muitas vezes, necessária como adjuvante à terapia do câncer ou em outras circunstâncias específicas, como quando um paciente não é capaz de tomar calorias oralmente por mais de sete dias, tem capacidade de absorção inadequada após cirurgia, fístula, falha hepática ou renal aguda, ou doença inflamatória do intestino. A nutrição parenteral também pode ser útil na cirurgia para equilibrar o balanço de nitrogênio e permitir que os pacientes suportem melhor o estresse, bem como em pediatria para garantir um bom crescimento e desenvolvimento (HARRAKI et al. 1995). Além de fornecer um balanço calórico positivo com infusão otimizada de proteínas, carboidratos, lipídios, eletrólitos e vitaminas, a adequada suplementação de micronutrientes essenciais também deve ser incluída e personalizada para cada situação clínica do paciente (LEUNG, 1995).

Devido ao seu grande volume, soluções de nutrição e de infusão são os fármacos administrados por via parenteral que apresentam mais efeitos adversos por conterem contaminantes. O volume dado a um paciente em nutrição parenteral total pode chegar a 3000 mL por dia, dependendo do peso corporal. Além disso, NPT é administrada a pacientes em estado crítico ou pacientes com comprometimento metabólico e da função dos órgãos, agravando o efeito deletério dos contaminantes. Embora o silício e o alumínio presentes nos alimentos e na água

sejam seletivamente absorvidos no trato gastrointestinal, a sua introdução diretamente na corrente sanguínea, não enfrenta barreiras (BOHRER et al., 2008).

A Food and Nutrition Board (2001 apud NILSEN, 2009) considerou que os dados animais e humanos eram demasiadamente limitados para a definição da Ingestão Alimentar de Referência para Si. Com base na quantidade excretada na urina em 24 horas, a exigência mínima diária para Si pode estar em torno de 10-25 mg/dia. Assim, a ingestão destas quantidades aproximadas através da nutrição parenteral típica pode ser benéfica para a saúde óssea e cicatrização de feridas. Um número muito limitado de artigos indicou que a maioria das soluções de NP não fornece essa quantidade de Si, que vem somente da contaminação dos ingredientes. Bohrer et al. (2008) determinaram o teor de Si em numerosas formulações comerciais utilizadas para a administração parenteral e mostraram que em média as soluções continham menos de 1 mg/L de Si. Entretanto, gluconato de cálcio, bicarbonato de sódio e fosfato de potássio foram as que apresentaram níveis mais altos de Si, entre 1 e 4 mg/L. A análise urinária de pacientes em tratamento com NP indicaram que receberam somente 1-3 mg Si/dia (NILSEN, 2009).

O alumínio é um contaminante de várias soluções de NP, como sais de cálcio e fosfato e albumina, que são usados em administração intravenosa. Alvarez et al. (2007) determinaram o teor de Al em soluções de nutrição parenteral e seus componentes e obtiveram uma média de 105,7 µg/L de alumínio para soluções de NPT; para os seus componentes individuais, gluconato de cálcio 10% (média de 2711,7 µg/L) e fosfato monopotássico 1M (média de 333,1 µg/L) foram os mais contaminados, assim como o bicarbonato de sódio 1M (média de 772,1 µg/L). A grande variabilidade encontrada no teor de alumínio de soluções sugere que a contaminação ocorre durante o processo de fabricação (BOHRER et al., 2002).

O rim parece ser a principal via para a eliminação do alumínio sistêmico. Acredita-se que pessoas em condições saudáveis, são capazes de excretar todo o alumínio absorvido. No entanto, em pacientes sob NPT que recebem soluções contaminadas com Al, sua capacidade é excedida, mesmo naqueles com função renal normal, e parte do metal infundido é mantido (BERTHON, 2002).

Os pacientes com maior risco a toxicidade do alumínio são aqueles com função renal reduzida, sobretudo prematuros. A toxicidade parece ser negativamente correlacionada com a idade gestacional. Além de possuir a função renal imatura, prematuros são mais propensos à toxicidade do alumínio, devido às

suas necessidades de cálcio e fósforo aumentadas, assim expondo-os a mais contaminantes destes minerais. Mesmo a ingestão de $< 2 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$, o nível sugerido pela Sociedade Americana de Nutrição Clínica (ASCN) e de Nutrição Parenteral e Enteral (A.S.P.E.N.) como sendo seguro, pode ser tóxica para essa população (GURA; PHARM, 2010).

Existem vários fatores que influenciam o grau de contaminação de alumínio em uma solução parenteral. A fonte da matéria-prima pode ser responsável pela variação entre lotes dentro do mesmo produto fabricado pela mesma empresa (BOHRER et al., 2002). As tampas de vidro e borracha usadas para embalagem têm consideravelmente mais alumínio do que as de plástico. Os recipientes de vidro são bem conhecidos por serem uma fonte significativa de contaminação devido à lixiviação. A qualidade do vidro é um fator importante na determinação da quantidade de alumínio que pode lixiviar para o líquido. Até mesmo o tipo de produto embalado em vidro terá impacto sobre a quantidade de lixiviação. Por exemplo, os sais de cálcio e fósforo tem uma alta afinidade pelo alumínio e aumentam a sua lixiviação (BOHRER et al., 2003).

Atualmente, existem poucas opções disponíveis para reduzir a carga de alumínio em soluções de NP. Uma delas é substituir o fosfato de potássio por sais de fosfato de sódio que possuem consideravelmente menos alumínio. Para perceber os benefícios de tal mudança, no entanto, é necessário o uso de fosfato de sódio embalado em frascos de plástico. Infelizmente, estes frascos estão disponíveis apenas em recipientes de 10 mL, tornando-se inconveniente para as instituições que utilizam dispositivos automáticos de composição para a mistura soluções de NP (GURA; PHARM, 2010). Bohrer et al. (2003) concluíram que, sem considerar outras fontes do processamento industrial, a esterilização de soluções de NP por seu aquecimento em recipientes de vidro ou em recipientes com tampas de borracha, pode ser responsável, principalmente, pela presença de Al nessas soluções. No entanto, a liberação de Al ocorre somente sob certas condições, por exemplo, um pH elevado, a presença de cátions na solução com propriedades similares ao Al ou ligantes capazes de se ligar ao metal.

Uma solução óbvia para minimizar o teor de Al é mudar para recipientes de plástico, embora tenha ainda de ser abraçado universalmente pela indústria. Condições de armazenamento e data de validade também determinam a quantidade máxima que um produto potencialmente pode conter. Quanto mais tempo um

produto fica na prateleira, maior o potencial de lixiviação na solução do frasco de vidro (FDA, 2000).

Em relação aos sais de cálcio, poucos fabricantes atualmente utilizam recipientes de plástico para as soluções de gluconato de cálcio. Em um estudo de contaminação de alumínio, foi encontrado menos Al no gluconato de cálcio em recipientes de polietileno que aqueles embalados em frascos de vidro convencional (FREY; MAIER, 2000). Desde 1986, tem sido bem conhecido que os sais de gluconato de cálcio são uma importante fonte de contaminação de alumínio em pacientes de NP. Uma vez que esses sais são uma grande fonte de contaminação, recém-nascidos apresentam um grande risco devido aos seus requisitos de cálcio juntamente com insuficiência renal e imaturidade. Sais de cloreto de cálcio são inerentemente menos contaminados e, em teoria, poderiam ser usados como uma alternativa aos sais de gluconato de cálcio. Ser um sal de cloreto, no entanto, poderia predispor os doentes, especialmente crianças, a um risco potencialmente maior de desenvolver acidose metabólica, devido à carga de cloreto aumentada (GURA; PHARM, 2010). Também, gluconato de Ca é tradicionalmente usado em vez de cloreto de Ca em fluidos parenterais, porque é muito menos provável a sua reação com fosfato do que o cloreto de Ca (BUCHMAN; MOUKARZEL, 2000).

A toxicidade do alumínio associada ao uso da NP tem sido reconhecida desde o início dos anos 1980. Depois de observar complicações semelhantes as observadas em pacientes em diálise, a necessidade de limitar a quantidade de exposição de alumínio em pacientes recebendo soluções de NP tornou-se evidente. Em 1986, a Food and Drug Administration (FDA) e a junta assessora de drogas metabólicas recomendou que o alumínio deve ser controlado nos ingredientes utilizados na composição de soluções NP (GURA; PHARM, 2010). A ASCN e a ASPEN propuseram a restrição da contaminação de alumínio de soluções parenterais de grande volume (ou seja, aminoácidos, água estéril para injeção, dextrose, emulsões lipídicas) para um máximo de 25 µg/L. Para soluções de pequenos volumes ou outros aditivos, tais como multivitaminas, oligoelementos e eletrólitos, não foi proposto um nível máximo, entretanto os rótulos devem informar quantos microgramas de Al por litro o produto contém (KLEIN et al., 1991). Desde julho de 2004, a FDA exige que os fabricantes coloquem a concentração de alumínio nos rótulos de todos os aditivos utilizados para compor soluções de PN. O teor máximo de alumínio no momento da expiração do produto deve ser colocado no

rótulo, juntamente com a declaração afirmando que pacientes que recebem mais de 5 µg/kg/dia de alumínio podem estar em risco de toxicidade (GURA; PHARM, 2010).

Moreno e colaboradores (1994) compararam os níveis de alumínio em recém-nascidos recebendo NP versus controles não tratados. Os níveis no soro e urina foram analisadas para todos os sujeitos. Na autópsia, a concentração de alumínio no cérebro, ossos, fígado e rins também foi analisada. Os autores concluíram que 88% do consumo total de alumínio devido a NP foi retido e resultou em um aumento nos níveis tanto no soro quanto na urina. Por outro lado, devido à menor necessidade de cálcio e fósforo, juntamente com um tamanho total do corpo maior, adolescentes e adultos parecem não ser tão afetados pelo alumínio em NP tanto quanto recém-nascidos. Entretanto, pacientes idosos também podem apresentar risco semelhante à toxicidade relacionada ao alumínio. Em pacientes geriátricos, a absorção de alumínio se torna mais eficiente com o avanço da idade. A toxicidade pode não ser tão dependente da função renal, mas devido a uma barreira de proteção gastrointestinal enfraquecida.

A doença óssea metabólica é uma complicação conhecida em pacientes sob NP de uso prolongado e foi primeiramente relatada por Klein e colegas em 1982. Ele observou doença óssea metabólica atribuída a contaminação de alumínio em até 84% dos pacientes que receberam NP por mais de 6 meses. Os sinais e sintomas incluíram dor óssea grave, hipercalcúria, e aumento nos níveis de fosfatase alcalina sérica. As biópsias ósseas mostraram osteomalácia irregular. Em bebês, o desenvolvimento da doença pode ocorrer mais rapidamente.

Devido à conhecida contaminação das soluções de nutrição parenteral com silício e alumínio e as doenças e complicações que este último pode causar nos pacientes, é importante verificar o potencial do Si em diminuir a biodisponibilidade do metal em meio aos componentes da NP *in vivo*.

3.5. Estresse Oxidativo

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do metabolismo e, assim, os radicais livres e espécies reativas são produzidos naturalmente, principalmente na cadeia de transporte de elétrons, ou por alguma disfunção biológica. Esses

radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio, nitrogênio ou cloro são denominados espécies reativas de oxigênio (EROs), espécies reativas de nitrogênio (ERNs) ou espécies reativas de cloro (ERCs). No organismo, encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

O oxigênio (O_2) é a molécula oxidante mais importante nos organismos aeróbicos. Muitos tipos de EROs são formados dentro dos organismos e as formas mais comuns incluem: ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxil ($^{\bullet}OH$), oxigênio “singleto” (1O_2), e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Essas EROs, são produtos do recebimento de um elétron do O_2 , que é o precursor da maioria das EROs e o mediador nas reações oxidativas em cadeia. O radical hidroxil ($^{\bullet}OH$) é o radical mais reativo, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é produzido *in vivo* em muitas reações e pode ser convertido no altamente reativo ($^{\bullet}OH$) (HALLIWELL, 2006).

As células são capazes de se defender dos efeitos danosos das espécies reativas (ERs) em condições fisiológicas normais, por meio de mecanismos antioxidantes endógenos que incluem um sistema enzimático e não-enzimático, como vitaminas e algumas moléculas antioxidantes. Normalmente, há um equilíbrio entre a produção e a destruição das ERs. O estresse oxidativo é caracterizado por um significativo aumento na concentração de EROs e ERNs, e/ou um decréscimo nos mecanismos de detoxificação celular. Esse excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios da membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, as enzimas, aos carboidratos e ao DNA (BARREIROS et al., 2006).

Os organismos vivos têm um complexo sistema antioxidante, enzimático e não enzimático que protege contra os efeitos deletérios dos radicais livres (SODHI et al., 2008). Os antioxidantes não-enzimáticos são geralmente moléculas pequenas, tais como ascorbato e glutathione, que ocorrem em fases aquosas (fluido intracelular), enquanto os antioxidantes lipofílicos (tocoferóis e carotenóides) são ativos nas membranas celulares (NOCTOR & FOYER, 1998; SMIRNOFF & WHEELER, 2000). Dentre os antioxidantes enzimáticos, estão a superóxido dismutase (SOD) que desempenha um importante papel nos mecanismos de defesa antioxidante das células contra o estresse oxidativo, convertendo o ânion superóxido à molécula

menos reativa H_2O_2 e moléculas de oxigênio; a glutathiona peroxidase (GPx), enzima contendo selênio que remove o H_2O_2 acoplado a redução de H_2O_2 com a oxidação da glutathiona reduzida (GSH) para formar H_2O e glutathiona oxidada (GSSG) (HALLIWELL, 2006); e a catalase (CAT) que é uma clássica enzima, da família das oxirredutases, presente nos peroxissomos, que converte H_2O_2 em H_2O . A catalase tem uma importante função protetora contra os efeitos tóxicos dos peróxidos gerados nos peroxissomos e os remove com grande eficiência (SIRAKI et al., 2002). As SODs estão presentes nos animais contendo sítio ativo de manganês (MnSOD) na matriz mitocondrial, e de cobre e zinco (CuZnSOD) no espaço mitocondrial intermembrana e no resto da célula (HALLIWELL, 2006).

O Al, um metal não redox-ativo, possui atividade pró-oxidante, que pode ser explicada pela formação de superóxidos semireduzidos de Al, o íon radical $\text{AlO}_2^{\bullet 2+}$ (EXLEY, 2005). A formação de $\text{AlO}_2^{\bullet 2+}$ tem implicações significativas para a oxidação biológica, pois catalisa a formação de H_2O_2 e reduz Fe(III) a Fe(II). Em combinação estes dois eventos podem levar a um ataque oxidativo capaz de resultar em danos oxidativos (EXLEY, 2012). Quando as EROs atacam as membranas plasmáticas que são formadas por camadas de moléculas lipídicas, com duplas ligações de ácidos graxos insaturados altamente reativos, causam a peroxidação lipídica (ZATTA et al., 2002). A peroxidação lipídica é relatada como uma importante causa do dano oxidativo às membranas celulares, e que eventualmente levam à morte celular. Um bom indicador da injúria oxidativa e um produto final da peroxidação lipídica é a formação de malondialdeído (MDA).

Como espécies reativas de oxigênio interagem com todas as macromoléculas biológicas, incluindo lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos, aumentam o estresse resultando na morte neuronal, o que contribui com a neuropatologia associada com várias doenças (GONZÁLEZ-MUÑOZ, 2008). O cérebro é particularmente vulnerável ao dano oxidativo, devido ao seu alto consumo de oxigênio e por conter altos teores de lipídeos facilmente oxidáveis e de metais de transição, capazes de catalisar a formação de EROs (ABUBAKAR et al., 2004). Segundo Kaizer et al. (2005) Al e Al+citrato podem levar ao estresse oxidativo em algumas regiões específicas do cérebro. Os autores concluíram que Al, um metal não-redox-ativo, é um pró-oxidante tanto *in vivo* e *in vitro*.

Parte da neurotoxicidade do alumínio é devido à contribuição do íon Al^{3+} ao dano oxidativo neuronal induzido por ferro. Os dois metais agem sinergicamente, a

coordenação do alumínio na membrana neuronal facilita o ataque por radicais livres induzidos por ferro. Enquanto que a oxidação da membrana por sua vez aumenta a ligação do alumínio, agravando a oxidação. Este círculo vicioso depende em grande parte da capacidade dos dois metais em concorrerem aos grupos finais carregados negativamente das moléculas anfifílicas que constituem as membranas (BERTHON, 2002).

Panchalingam et al. (1991), notaram que xenobióticos diversos, incluindo Al, podem alterar a bicamada lipídica da membrana por ligação com seus componentes. Além disso, Van Rensburg et al. (1995) disseram que, quando os íons Al atacam fosfatos adjacentes à membrana fosfolipídica suas cargas positivas se repelem, formando lacunas ou espaços vazios na membrana, expondo ácidos graxos a agentes oxidantes, como Fe, induzindo a produção de radicais livres. O Al é capaz de substituir o Fe em diversas biomoléculas e aumentar as concentrações intracelulares de Fe, promovendo a reação de Fenton (YOUSEF, 2004), aumentando a produção de EROs, o que explica o aumento da peroxidação lipídica.

Yousef (2004) e Yousef et al. (2007) observaram que o alumínio baixou a atividade de enzimas antioxidantes, como a SOD e CAT, *in vivo* e *in vitro* aumentando os níveis de radicais livres e o estresse oxidativo.

3.6. δ -Aminolevulinato Desidratase (δ -ALA-D)

A δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D), conhecida como porfobilinogênio sintase, é uma enzima contendo sulfidril, que catalisa a condensação assimétrica de duas moléculas de δ -aminolevulinato (ácido aminolevulínico, δ -ALA) para produzir porfobilinogênio, que nas células é o precursor da síntese dos tetrapirróis. Os tetrapirróis, como o heme e a clorofila, são essenciais para o metabolismo aeróbico e para a fixação do carbono (ROCHA et al., 2012). Esta enzima é amplamente distribuída no fígado, cérebro, rim e células eritrocitárias (ZAMAN et al., 1993a).

A inibição da δ -ALA-D pode afetar desfavoravelmente as vias biossintese do heme, podendo ter conseqüências patológicas, como a anemia (SILVA et al. 2007). δ -ALA-D é uma metaloenzima sulfidrílica que requer íons zinco para a sua atividade

(VIEIRA et al., 2000). Além disso, pode ser inibida por substâncias que competem com o zinco ou ainda que oxidem os grupos –SH. Esta situação pode estar associada com o estresse oxidativo, pois além da insuficiente produção de heme, a inibição da δ -ALA-D pode resultar no acúmulo do substrato δ -ALA, que está relacionado com a superprodução de EROs (BRITO et al., 2011), como demonstrado na figura 2.

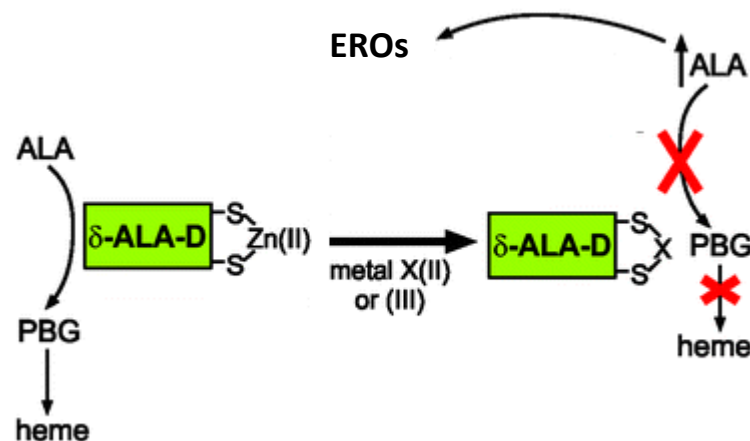


Figura 2: Esquema da possível interferência dos metais na atividade da enzima δ -aminilevulinato desidratase (δ -ALA-D). Ao inibir a atividade da enzima a síntese de porfobilinogênio (PBG) é diminuída e ocorre o acúmulo do substrato ácido δ -aminolevulinico (ALA) que está relacionado com a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Adaptado de Rocha et al. (2012) (Graphical Abstract).

A atividade da δ -ALA-D é altamente sensível à presença de metais pesados como mercúrio, chumbo e outros compostos que oxidam grupos sulfidril. Há um número limitado de estudos que mostram que cátions divalentes, tais como Fe^{2+} , além de Zn^{2+} , pode ativar a enzima, enquanto outros cátions divalentes, tais como Cu^{2+} inibem a enzima. Os cátions trivalentes como In^{3+} inibem a δ -ALA desidratase *in vitro*, enquanto os efeitos do Al^{3+} são bastante contraditórios. A anemia associada à toxicidade do alumínio pode ocorrer devido ao rompimento induzido pelo metal da via biossintética do heme, porém, seus efeitos sobre enzimas envolvidas na hemebiossíntese são contraditórios. Há estudos que apontam uma inibição da hemebiossíntese, após a exposição ao alumínio *in vitro*, mas paradoxalmente, a atividade das enzimas delta aminolevulinato sintase (δ -ALA-S) e δ -ALA-D são aumentados após a exposição *in vivo* (VIEIRA et al., 2000).

Vieira et al. (2000) encontraram, após submeter camundongos a um tratamento crônico oral, que o tratamento com citrato e alumínio mais citrato aumenta a atividade da δ -ALA-D *in vivo* e o aumento da atividade da enzima foi paralela ao aumento do teor de alumínio no sangue e plasma. Estes resultados mostram que o alumínio tem um efeito distinto sobre a atividade da δ -ALA-D: em primeiro lugar, em concentrações relativamente mais baixas é ativada, e em alta concentração pode inibir δ -ALA-D no sangue *in vitro*; segundo, ele ativou a enzima quando administrado através da água potável.

Schetinger et al. (1999) demonstraram que a exposição ao sulfato de alumínio na água potável inibe a atividade de δ -ALA-D no rim, porém aumenta no fígado.

Considerando o fato de o Al ser um dos elementos mais abundantes da crosta terrestre, que este metal é responsável pelo desenvolvimento de anemias, especialmente em pacientes com falência renal, cujo mecanismo parece envolver a síntese do heme e os seus efeitos discrepantes sobre a δ -ALA-D torna-se de extrema importância mais estudos sobre o efeito do Al sobre a atividade da enzima em condições similares aos da NP.

3.7. Análise de Si e Al em amostras biológicas

3.7.1. Abertura Alcalina

Amostras biológicas usualmente requerem um extensivo pré-tratamento para serem analisadas, normalmente através de digestão com ácidos minerais e aquecimento. O hidróxido de tetrametilamônio, uma solução alcalina, tem sido utilizado para o pré-tratamento de amostras como uma atraente alternativa para a substituição da digestão ácida de materiais biológicos para a determinação de elementos traço por diferentes técnicas de espectrometria atômica (BATISTA et al., 2008).

A solubilização com TMAH é muito simples e rápida, e já que não existe aquecimento ou apenas um leve aquecimento é necessário, a perda de substância

volátil é impedida. Além disso, uma vez que apenas uma pequena quantidade de HTMA é utilizada este método oferece diluição da amostra relativamente baixa, resultando em altas concentrações elementares nas soluções da amostra para medida em um procedimento relativamente simples e seguro (RIBEIRO et al, 2000; GIACOMELLI et al., 2002).

A análise de amostras solubilizadas em HTMA diminui grandemente o tempo de vida útil do forno de grafite (SILVA et al., 2003). Uma alternativa para diminuir essa degradação é o revestimento do tubo com através do uso de modificadores permanentes. As principais vantagens atribuídas ao uso de modificadores permanentes são: fácil e rápida produção da camada do modificador sobre a plataforma ou a parede do tubo usando um programa de deposição térmica; na limpeza *in situ* durante a produção da camada contribuindo para a baixa dos valores do branco e melhorando os limites de detecção, aumento de amostras com programas rápidos; eliminação ou minimização das interferências espectrais e não-espectrais, permitindo a análise direta de algumas amostras complexas sem digestão, a proteção do tubo de grafite, resultando em um considerável aumento da vida útil do tubo, reduzindo o custo da análise (GIACOMELLI et al., 2002).

3.7.2. Determinação de Alumínio

A espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS) é provavelmente a técnica mais adequada para determinação de baixas concentrações de Al em amostras aquosas geoquímicas e biológicas (HUANG, 1995).

O alumínio é um elemento onipresente, é o terceiro elemento mais abundante na crosta terrestre. A exposição é inevitável por causa da ampla utilização deste elemento no dia-a-dia e na indústria. Ele está presente em muitos alimentos industrializados e também é adicionado à água potável para purificação. Esses usos fazem do Al contaminante muito comum, e pode chegar ao ambiente de análise através de partículas no ar, dos reagentes utilizados para digerir e diluir amostras e materiais de laboratório. A contaminação é frequentemente encontrada e pode levar a estudos ineficazes, particularmente aqueles que medem Al no sangue e no

cérebro em concentrações muito baixas. A carga corporal total de Al em indivíduos humanos saudáveis é de aproximadamente 30-50 mg e uma desigualdade de distribuição deste elemento em vários tecidos tem sido relatada em condições normais, para seres humanos expostos ao alumínio e em animais experimentais tratados com alumínio, a sua quantificação em qualquer órgão ou tecido deve ser realizada cuidadosamente para evitar a contaminação externa (BOHRER, et al., 2008a).

Portanto, para diminuir o risco de contaminação, todas as soluções devem ser armazenadas e preparadas em frascos de plástico previamente descontaminados e acidificadas com ácido nítrico ou cítrico para estabilização do metal e para prevenir perdas na absorção (BOHRER et al., 2008a) e o manuseio de materiais, amostras e soluções deve ser realizado em câmara de fluxo laminar.

Schneider e Exley (2001) identificaram o ácido silícico (Si(OH)_4) como um importante modificador do sinal de absorvância do alumínio medido por GF-AAS. A presença de Si(OH)_4 aumentou o sinal em até 50%. A extensão do aumento dependeu da concentração de Al e Si(OH)_4 e foi máxima quando a concentração de Al era menor ou igual a $4,44 \mu\text{mol/L}$ e a de Si(OH)_4 maior ou igual a $0,50 \text{ mmol/L}$ (14 mg/L de Si). A melhoria do sinal de absorvância do Al não foi linearmente relacionado com a concentração Si(OH)_4 e o efeito foi, geralmente, saturado, para todos as concentrações de Al testadas, com $[\text{Si(OH)}_4] \geq 0,50 \text{ mmol/L}$. Isso ocorre talvez pela redução da formação de carbeto de Al durante a atomização na presença do Si. Si(OH)_4 foi significativamente mais eficaz na melhoria do sinal de absorvância do Al que $\text{Mg(NO}_3)_2$. E, desta forma, pode ser satisfatoriamente utilizado como um modificador químico para a determinação de Al por GF-AAS.

3.7.3. Determinação de Silício

A onipresença do Si representa um severo risco de contaminação durante sua determinação, entretanto, sendo a maioria dos compostos de Si de difícil dissolução, a presença de silício como contaminante é reduzida. Apesar disso, extremo cuidado é necessário, especialmente na determinação de Si em baixas concentrações.

Outro problema relacionado a determinação de Si é que soluções ácidas de Si são instáveis e tendem a precipitar (WELZ; SPERLING, 1999).

A determinação de Si por espectrometria de absorção atômica apresenta como fatores limitantes a formação de carbeto de silício refratário e de compostos voláteis de óxido de silício durante o ciclo de atomização no tubo de grafite. Desta forma, a determinação do elemento por GFAAS pode sofrer efeitos de memória, interferências pela matriz e ter sensibilidade relativamente baixa (HUANG, 1995).

As tentativas para superar esses problemas geralmente envolvem o uso de tubos de grafite revestidos com carbetos de metais e/ou plataformas de L'vov e modificadores químicos (HUANG, 1995). Weltz e Sperling (1999) recomendam o uso de modificadores de Pd para diminuir as perdas do analito durante a pirólise por volatilização.

Para o revestimento dos tubos de grafite e/ou plataformas, vários elementos formadores de carbetos podem ser usados para melhorar a medida de silício, incluindo o molibdênio, tântalo, zircônio, tungstênio, lantânio e nióbio (HUANG, 1995). Mukhtar; Limbeck (2009) utilizaram tubos de grafite tratados com zircônio e constataram que este impede a formação de carbetos estáveis de Si durante a medida da amostra.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Controle da contaminação

A água utilizada no preparo de todas as soluções foi destilada, deionizada e adicionalmente purificada no sistema Milli-Q.

Apenas material plástico foi utilizado no preparo e armazenagem das soluções para diminuir a contaminação com Si e Al, ambos constituintes do vidro na forma de SiO_2 e Al_2O_3 . Esse material foi deixado por pelo menos 24h mergulhado em solução etanólica de HNO_3 10% (v/v), sendo, após este período, lavado abundantemente com água purificada. Todas as etapas do preparo de soluções e manuseio das amostras foram conduzidas dentro da câmara de fluxo laminar classe 100, ligada meia hora antes do início dos ensaios.

4.2. Otimização do método para determinação de Al e Si por GFAAS

Para verificar a melhor temperatura para determinação de Al e Si por espectrofotometria de absorção atômica com forno de grafite (do inglês- Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry- GFAAS) e verificar se a matriz das amostras abertas com hidróxido de tetrametilamônio interfere na medida foram feitas curvas de pirólise e atomização para os elementos. Através destas, também foram verificados os efeitos dos modificadores de Si 15 mg/L, para a determinação de Al, e de Pd 2 g/L, no caso do Si e Zr como modificador permanente.

4.2.1. Instrumentação

- Sistema de purificação de água Milli-Q com resistividade $18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$, Millipore, Bedford, MA, USA.
- Balança analítica com quatro casas de precisão Sartorius, Goettingen, Alemanha.
- Destilador de ácidos, Berghof Subboiling, BSB-939-IR.
- Câmara de fluxo laminar classe 100, Trox, Curitiba, Brasil.
- Espectrofotômetro de absorção atômica com forno de grafite Analytikjena, ZEE nit 600, com amostrador automático MPE 60.

4.2.2. Reagentes e Soluções

O reagente hidróxido de tetrametilamônio, solução 25% Sigma-Aldrich foi utilizado na abertura da amostra de fígado.

As soluções de Al e Si utilizadas nas medidas no espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite foram preparadas através da diluição correta do padrão 1 g/L (Specsol) dos respectivos elementos.

A solução de Zr 0,5 g/L utilizada para o recobrimento do forno de grafite para as medidas de Si e Al nos órgãos dos ratos foi preparada através da dissolução de 0,1278 g de ZrCl_4 , Merck, em 50 mL de água ultrapura.

A solução de nitrato de paládio 2 g/L usada como modificador na medida de Si foi preparada adicionando-se 0,3 mL de HNO_3 a 0,2 g do reagente analítico (Merck) e diluindo-se a 100 mL em balão volumétrico com água ultrapura.

Para a abertura das amostras o ácido nítrico (Merck) foi bidestilado.

4.2.3. Determinação de alumínio e silício

As medidas de alumínio e silício foram realizadas no espectrofotômetro de absorção atômica com forno de grafite Analytikjena. As leituras foram feitas com absorvância integrada, modo área do pico, correção de fundo baseada no efeito Zeeman, com gás inerte argônio. Foram utilizados fornos do tipo parede (sem plataforma). Os programas de temperatura para a análise de Al e Si em GFAAS estão na tabela 1.

As medidas de Al foram feitas no comprimento de onda de 309,3 nm, fenda de 0,8 nm e corrente de 6,0 mA e como modificador foi utilizada uma solução de Si 15 mg/L para padronizar o aumento de sinal que esse elemento causa na medida de Al. A curva de calibração foi confeccionada automaticamente pela diluição de um padrão estoque de 50 µg/L de Al.

Tabela 1: Parâmetros instrumentais para determinação de Al e Si por GFAAS e tratamento do forno com Zr.

Parâmetros	Al	Si	Zr
Comprimento de onda (nm)	309,3	251,6	–
Modificador (µL)	Si (5)	Pd (NO ₃) ₂ (5)	Zr (40)
Programa de temperatura (°C) (tempo (“ramp time”) (s), tempo de aquecimento (s))			
Secagem 1	90 (5, 20)	90 (5, 20)	90 (7, 15)
Secagem 2	105 (3, 20)	105 (3, 20)	140 (10, 15)
Secagem 3	110 (2, 10)	110 (2, 10)	–
Pirólise	1500 (250, 10)	1200 (250, 10)	1000 (100, 10)
Atomização	2600 (FP, 4)	2600 (FP, 3)	2000 (FP, 5)
Limpeza	2650 (500, 4)	2650 (500, 4)	–

As medidas de Si foram feitas no comprimento de onda de 251,6 nm, fenda de 0,2 nm e corrente de 10 mA e como modificador de matriz foi usada uma solução de nitrato de paládio 2 g/L. A curva de calibração foi confeccionada automaticamente pela diluição de um padrão estoque de 500 µg/L de Si.

Para a determinação destes elementos em amostras decompostas com hidróxido de tetrametilamônio, foi necessário o recobrimento do forno de grafite com um modificador permanente para aumentar o seu tempo de vida útil. Zr foi utilizado para este fim. As medidas de Si foram feitas pelo método de adição do padrão com lavagem do capilar entre a injeção dos componentes, pois o paládio precipita em meio alcalino (HTMA) entupindo o capilar.

O tubo de grafite foi tratado com solução de Zr 0,5 g/L através de um programa específico de temperatura (Tabela 1) com injeção de um volume de 40 µL a cada vez, por 25 vezes.

O recobrimento do forno foi necessário a cada 300 queimas ou quando a recuperação de Si e Al nas amostras com Spike não eram satisfatórias. Foi aceito um limite de recuperação de 90 a 110% da concentração de Al ou Si adicionado e a cada 5 amostras uma com adição foi medida.

4.3. Otimização do método de digestão das amostras de tecido animal

Para otimizar o método de digestão ou dissolução das amostras de órgãos testou-se diferentes tratamentos em fígado bovino e ossos de frango. O fígado foi escolhido por ser uma matriz orgânica de digestão mais difícil entre os demais órgãos e o osso devido à presença de fosfato de cálcio na composição, levando a uma maior dificuldade de dissolução em meio alcalino.

4.3.1. Instrumentação

A instrumentação utilizada para a otimização do método de digestão é a mesma citada no item 4.2.1.

4.3.2. Reagentes e Soluções

O reagente HTMA, solução 25% Sigma-Aldrich foi utilizado na abertura dos órgãos, com exceção do osso que foi aberto com ácido nítrico bidestilado, Merck.

Amostra certificada Bovine Liver, Standard Reference Material (SRM) 1577b (NIST).

Os demais reagentes utilizados estão listados no item 4.2.2.

4.3.3. Digestão do fígado com ácido nítrico

O fígado foi pesado (entre 0,2 e 0,3 g) e adicionado de diferentes volumes de ácido nítrico concentrado bidestilado: 1,0; 2,0; 3,0 e 5,0 mL em frascos de plástico de 5 mL previamente descontaminados. O ensaio de cada volume de ácido foi feito em duplicata e em um deles foi adicionado 100 µL de solução de Al 10 mg/L e 300 µL de solução de Si 10 mg/L, para dar uma concentração final de 100 e 300 µg/L de Al e Si, respectivamente. As amostras foram mantidas em banho-maria a 100°C por uma hora e em repouso por mais 24 h. Um ensaio em branco (somente com ácido nítrico, sem amostra ou padrão) também foi feito para cada volume de ácido.

Após esse procedimento, o volume foi completado a 10 mL com água ultrapura e silício e alumínio foram determinados por GFAAS para verificar as recuperações e o volume ótimo de ácido nítrico para a decomposição da amostra.

4.3.4. Dissolução do fígado com hidróxido de tetrametilamônio

O fígado foi pesado (entre 0,2 e 0,3 g) e adicionado de diferentes volumes de hidróxido de tetrametilamônio 25%: 0,5; 1,0 e 2,0 mL em frascos de plástico de 5 mL previamente descontaminados. O ensaio de cada volume de hidróxido foi feito em duplicata e em um deles foi adicionado 100 µL de solução de Al 10 mg/L e 300 µL de solução de Si 10 mg/L, para dar uma concentração final de 100 e 300 µg/L de Al e

Si, respectivamente. As amostras foram mantidas em banho-maria a 100°C por uma hora e em repouso por mais 24 h. Um ensaio em “branco” (somente com HTMA, sem amostra ou padrão) também foi feito para cada volume de HTMA.

Após esse procedimento, o volume foi completado a 10 mL com água ultrapura e silício e alumínio foram medidos por GFAAS para determinar as recuperações e o volume ótimo de HTMA para a decomposição da amostra.

O material certificado de fígado bovino (SRM 1577b) contendo 3 µg/g de Al também foi dissolvida com 0,5 mL de HTMA conforme o procedimento acima. Entretanto foi pesado somente 0,05 g (correspondente a uma massa úmida de 0,25 g) do SRM para a abertura já que era uma amostra seca.

4.3.5. Dissolução do osso com hidróxido de tetrametilamônio

A dissolução de amostras de osso foi feita da mesma forma que para o fígado (item 4.3.4).

4.3.6. Digestão do osso com ácido nítrico

A abertura do osso foi feita com 0,5 e 1 mL de ácido nítrico (conforme item 4.3.3) e após o volume foi completado a 10 mL com solução de hidróxido de sódio 4 e 8%, respectivamente, para neutralização da solução. Um ensaio em branco (sem amostra de osso) também foi feito para cada volume de ácido e neutralizado conforme as amostras. Houve a formação de um precipitado (sulfato de cálcio) nas amostras de osso, estas foram centrifugadas por 15 min a 2400 rpm, e, então, alumínio e silício foram determinados no sobrenadante por GFAAS.

4.3.7. Determinação de alumínio e silício

Procedimento descrito no item 4.2.3.

4.4. Administração de alumínio e silício em ratos (Wistar)

4.4.1. Instrumentação

- Sistema de purificação de água Milli-Q com resistividade $18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$, Millipore, Bedford, MA, USA.
- Balança digital com duas casas de precisão, Bel Engineering, para pesagem dos animais.
- Destilador de ácidos, Berghof Subboiling, BSB-939-IR
- pHmetro digital DM 20, Digimed, São Paulo, Brasil.
- Câmara de fluxo laminar classe 100, Trox, Curitiba, Brasil.
- Seringas para insulina de 1 mL, Injex.

4.4.2. Reagentes e Soluções

Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura e armazenadas em recipientes plásticos previamente descontaminados.

A solução de Si 1 g/L utilizada na administração nos ratos foi preparada através da dissolução de 0,85 g de silicato de sódio (Merck), composto por 63% de SiO_2 e 37% de Na_2O , em 250 mL de água ultrapura. A solução contendo 1 g/L de Si e 0,25 g/L de Al foi preparada da mesma maneira com adição de 0,309 g de cloreto de alumínio, Merck. Já para o preparo da solução de Al 0,25 g/L dissolveu-se 0,309 g de cloreto de alumínio em 250 mL de água ultrapura. Todas as soluções tiveram o

pH ajustado a aproximadamente 7 com solução diluída de ácido nítrico bidestilado ou de hidróxido de sódio 1% (Merck). Nos tratamentos com dihidrogenofosfato de potássio e gluconato de cálcio, cloreto de alumínio e/ou silicato de sódio foram adicionados nas soluções destes componentes preparadas conforme descrito abaixo.

Segundo sugestões de fórmulas para nutrição parenteral da Farmácia de Manipulação e Aditivção de Produtos Parenterais (FAMAP, 2010) uma solução para nutrição parenteral periférica pode conter 11 mmol ou 22 mmol de fósforo. O uso recomendado de 22 mmol por dia em um paciente de 60 kg corresponde a 0,367 mmol/kg. Para um rato pesando 200 g, a dosagem seria de 0,0734 mmol de fósforo. 0,0734 mmol de fósforo em 0,4 mL (volume para injetar em um rato de 200 g), corresponde a 0,1835 mmol/mL. Uma solução de 2 mEq/mL de fosfato contém: 0,1567 g de K_2HPO_4 e 0,0300 g de KH_2PO_4 e cada 1 mL contém 1,1 mmol/L de fósforo. Para preparar uma solução contendo 0,1835 mmol/L de fósforo pesou-se 6,535 g de K_2HPO_4 (Merck) e 1,25 g de KH_2PO_4 (Merck) e dissolveu-se em 250 mL de água ultrapura. A solução forma um tampão com pH 7,6, portanto não há necessidade de ajuste do pH.

Uma solução para nutrição parenteral periférica pode conter 2,25 mmol ou 4,5 mmol de cálcio (FAMAP, 2010). O uso de 2,25 mmol por dia, concentração normalmente recomendada, em um paciente de 60 kg corresponde a 0,0375 mmol/kg. Para um rato pesando 200 g, a dosagem seria de 0,0075 mmol de cálcio. 0,0075 mmol de cálcio em 0,4 mL (volume para injetar em um rato de 200 g), corresponde a 0,01875 mmol/mL. Para preparar uma solução contendo 0,01875 mmol/L de cálcio pesou-se 2,01 g de gluconato de cálcio (Sigma-Aldrich) e diluiu-se com água ultrapura a 250 mL. O pH da solução foi ajustado a 7,3.

Para o ajuste do pH das soluções utilizou-se uma solução de hidróxido de sódio, preparada através da dissolução de 1 g do reagente P.A. (Merck) em 100 mL de água ultrapura, e ácido nítrico bidestilado (Merck) diluído 100 vezes.

4.4.3. Animais

Foram usados neste estudo cento e vinte ratos Wistar machos adultos, com 7-8 semanas de idade, pesando aproximadamente 200 g. Os animais foram mantidos em uma sala com ar-condicionado (22-25 °C), sob condições de iluminação artificial, abrigados em número de cinco por caixa e alimentados com ração para ratos e água *ad libitum*. Todos os procedimentos com animais foram aprovados pelo comitê de ética institucional da Universidade Federal de Santa Maria (Número de protocolo 71/2010).

4.4.4. Tratamento

As soluções de tratamento foram injetadas intraperitonealmente com seringa de insulina de 1 mL, durante 5 dias consecutivos, seguidos por 2 dias sem tratamento a cada semana, completando um total de 60 administrações por animal. O volume injetado variou de acordo com o peso do animal, ficando em torno de 400 µL. Todas as soluções administradas, inclusive a água, tiveram o pH ajustado a aproximadamente 7,0.

O grupo controle recebeu administração de água ultrapura e não solução salina (NaCl 0,9%), normalmente injetada, devido a presença de contaminantes neste sal. Mesmo utilizando reagentes ultrapuros, esses na maioria das vezes apresentam alta concentração de Al. A injeção de água ultrapura foi feita para minimizar a contaminação e perceber com maior significância a diferença, quando houver, entre este grupo e os demais .

Os animais foram pesados a cada sete dias durante todo o tratamento.

Após 48 h da última administração, os animais foram anestesiados e de 5 a 6 mL de sangue foi retirado diretamente do coração ainda em atividade com seringa de plástico. O sangue foi dividido em dois frascos plásticos de 5 mL de capacidade, previamente descontaminados, um contendo 100 µL de heparina (anticoagulante) e outro não. O fígado, pulmão, testículos, coração, cérebro, osso, músculo e os rins

foram removidos usando apenas instrumentos de plástico, também previamente descontaminados.

Os órgãos de 5 ratos de cada tratamento foram usados para análises de Al e Si e os dos outros 5 para as análises bioquímicas.

4.4.4.1. Tratamento com Al e Si

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais de 10 animais (duas caixas para cada grupo).

No primeiro grupo foi administrado água ultrapura (grupo controle); no segundo grupo, cloreto de alumínio na dose de 0,5 mg/kg/dia de alumínio (grupo Al); no terceiro grupo silicato de sódio na dose de 2 mg/kg/dia de silício (grupo Si); e no quarto grupo foi administrada uma solução de cloreto de alumínio e silicato de sódio na dose de 0,5 mg/kg/dia de alumínio e 2 mg/kg/dia de silício (grupo Si+Al).

4.4.4.2. Tratamento com Al, Si e dihidrogenofosfato fosfato de potássio

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais de 10 animais (duas caixas para cada grupo).

No primeiro grupo foi administrado água ultrapura (grupo controle); no segundo grupo foi administrado dihidrogenofosfato de potássio em concentração de 62 mg/kg/dia (grupo (F)); no terceiro grupo, dihidrogenofosfato de potássio em concentração de 62 mg/kg/dia e alumínio 0,5 mg/kg/dia (grupo Al+F); no quarto grupo solução de dihidrogenofosfato de potássio em concentração de 62 mg/kg/dia com silício e alumínio em concentrações de 0,5 mg/kg/dia e 2 mg/kg/dia, respectivamente (grupo Al+Si+F).

4.4.4.3. Tratamento com Al, Si e gluconato de cálcio

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais de 10 animais (duas caixas para cada grupo).

No primeiro grupo foi administrado com água ultrapura (grupo controle); no segundo grupo foi administrado gluconato de Ca em concentração de 16 mg/kg/dia (grupo G); no terceiro grupo, gluconato de Ca em concentração de 16 mg/kg/dia e alumínio 0,5 mg/kg/dia (grupo Al+G); no quarto grupo solução de gluconato de Ca em concentração de 16 mg/kg/dia com silício e alumínio em concentrações de 0,5 mg/kg/dia e 2 mg/kg/dia (grupo Al+Si+G), respectivamente.

4.4.5. Análise de Alumínio e Silício

4.4.5.1. Tratamento das amostras de sangue

As amostras de sangue foram processadas no mesmo dia da coleta. Foram centrifugadas durante 15 minutos a 2400 rpm, para que houvesse a separação do soro. A separação do soro foi executada em câmara de fluxo laminar classe 100, utilizando apenas material plástico previamente descontaminado. Após a separação, o soro foi diluído na proporção 1:1 utilizando-se água ultrapura, para a determinação de alumínio e silício por GFAAS.

4.4.5.2. Amostras de fígado, coração, cérebro, músculo, testículo e rim

Para a dissolução ou abertura as amostras foram pesadas (0,25 g), adicionadas de 0,5 mL de solução de hidróxido de tetrametilamônio 25%, mantidas em banho-maria a 100°C por uma hora e em repouso por mais 24 h. Após esse

procedimento, o volume foi completado a 10 mL com água ultrapura e silício e alumínio foram determinados por GFAAS.

Algumas das amostras de fígado, coração, cérebro, músculo, testículo e rim foram analisadas em duplicata para ensaios de recuperação. A uma delas foi adicionado 100 µL de solução de Al 10 mg/L e de 300 µL de solução de Si 10 mg/L, para dar uma concentração final de 100 e 300 µg/L de Al e Si respectivamente.

4.4.5.3. Amostras de osso

Para a abertura, as amostras de osso foram pesadas (0,25 g), adicionadas de 0,5 mL de solução de ácido nítrico bidestilado, mantidas em banho-maria a 100°C por uma hora e em repouso por mais 24 h. Após esse procedimento, o volume foi completado a 10 mL com água ultrapura e o alumínio foi determinado por GFAAS.

Algumas das amostras de osso foram analisadas em duplicata para ensaios de recuperação. A uma delas foi adicionado 100 µL de solução de Al 10 mg/L, para concentração final de 100 µg/L de Al.

4.4.5.4. Determinação de Al e Si

A análise de Alumínio e Silício no sangue, osso e demais tecidos foi feita conforme descrito no item 4.2.3. Também foram analisadas as soluções de gluconato de cálcio e de dihidrogenofosfato de potássio usadas para injetar nos ratos, pois, mesmo utilizando reagentes ultrapuros, esses não são isentos de contaminação.

4.5. Análises bioquímicas

Para análises da peroxidação lipídica e da atividade da δ -ALA-D foram retirados o rim, fígado, pulmão, testículo, coração e músculo dos ratos. Para o TBARS, as estruturas do cérebro (hipocampo, córtex, hipotálamo, cerebelo e estriado) foram separadas. Como o hipotálamo possuía uma massa muito pequena, foi feito um “pool” dessa estrutura para cada grupo tratado.

O sangue foi coletado com heparina (anticoagulante) para análise de δ -ALA-D e sem anticoagulante para análise de TBARS, este último foi centrifugado durante 15 minutos a 2400 rpm, para que houvesse a separação do soro.

4.5.1. Instrumentação:

- Câmara de fluxo laminar classe 100, Trox, Curitiba, Brasil;
- Banho-Maria, Solab, Brasil;
- Espectrofotômetro de absorção molecular, Femto 800XI;
- Agitador magnético, Nova Ética, Brasil;
- Balança analítica, Shimadzu Ay220; Filipinas.

4.5.2. Reagentes e soluções:

Para o preparo da solução de tris(hidroximetil)aminometano hidrocloreto (Tris/HCl) 50 mM 0,788 g do reagente foram dissolvidos em 100 mL de água destilada. O pH foi ajustado com tris(hidroximetil)aminometano base (pó) até 7,4 no pHmetro.

A solução de ácido tiobarbitúrico 0,8% foi preparada pela dissolução de 0,8 g de TBA (J.T. Baker) em 100 mL de água destilada. Esta foi agitada e hidróxido de sódio em pó (Merck) foi cuidadosamente adicionado até que ficasse límpida (pH próximo de 3,2) . A solução foi guardada na geladeira.

A solução tampão de ácido acético foi preparada através da adição de 75,35 mL de ácido acético glacial (Vetec) em 500 mL de água destilada e 22,5 mL de ácido clorídrico P.A. (Vetec). O pH foi corrigido com hidróxido de sódio em pó até pH 3,4 no pHmetro. O volume foi completado a 1000 mL. Todo o procedimento foi feito em banho de gelo.

Para o preparo do dodecil sulfato de sódio (SDS) 8,1%, foram dissolvidos 8,1 g de SDS (Vetec) em água destilada até 100 mL.

Para o preparo do tampão fosfato de potássio (TFK) 1M pH 6,8 foram preparadas duas soluções prévias. Foram dissolvidos 13,608 g de fosfato de potássio monobásico (Vetec) em 100 mL de água destilada e 17,418 g de fosfato de potássio dibásico (Vetec) em 100 mL de água destilada. O TFK foi preparado através da adição da solução tampão de fosfato de potássio monobásico sobre a solução tampão de fosfato de potássio dibásico até o pH desejado (6,8). A solução foi armazenada em geladeira.

A solução do ácido delta-aminolevulínico (ALA) 12 mM foi preparada através da dissolução de 0,05 g do ácido delta-aminolevulínico cloridrato (Sigma-Aldrich) em 25 mL com água ultrapura. A solução foi guardada congelada.

Para o preparo do ácido tricloroacético (TCA) 10% com 10 mM de HgCl_2 , foram pesados 10 g de TCA (Vetec) adicionados 0,27 g de HgCl_2 (Vetec) e o volume foi completado com água destilada até 100 mL.

O reagente Pré-Erich foi preparado através da dissolução de 0,7g de HgCl_2 em 168 mL de ácido acético glacial com posterior agitação por 30 minutos. Após isso foram adicionados 40 mL de ácido perclórico 70% (Vetec). O volume foi completado até 220 mL com ácido acético glacial. A solução foi armazenada em geladeira em frasco âmbar. Já para o reagente de Erlich, 1,0 g de 4-dimetil aminobenzaldeído (Vetec) foram dissolvidos em 55 mL do reagente Pré-Erich.

O reagente de Coomassie foi preparado pela dissolução de 100 mg de azul de Coomassie G (Vetec) em 50 mL de álcool etílico 95% (Synth) e após, acrescentou-se 100 mL de ácido orto-fosfórico 85% (Vetec). O volume foi completado para 1,0 L com água destilada. A solução foi agitada por 2 horas, armazenada em frasco âmbar e filtrada sempre antes da utilização.

Para o preparo do ácido orto-fosfórico 0,2 mol/L foram adicionados 3,0 mL do reagente em água destilada e o volume completado a 200 mL.

Para o preparo do ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,1 mol/L, foi pesado 0,8 g de TBA e dissolvido em 500 mL de hidróxido de sódio 0,1 mol/L.

O malondialdeído (MDA) 0,03 mM foi preparado através da diluição de uma solução mãe de 0,6 mM, feita pela dissolução de 0,0197 g de tetrabutialamônio de malondialdeído (Sigma-Aldrich) em 200 mL de água ultrapura.

A heparina 5000 UI/mL utilizada como anticoagulante para as amostras de sangue foi preparada no dia da coleta pela dissolução de 0,165 g do reagente (Sigma-Aldrich) a 5 mL com água ultrapura.

4.5.3. Preparo do homogenato

Os tecidos foram homogeneizados em Tris/HCl 50 mM pH 7.4 em proporção dependente do tecido (Tabela 2).

Após, o homogenato foi centrifugado por 10 min a 2500 rpm e o sobrenadante armazenado para análises posteriores.

Tabela 2: Proporção entre massa do tecido e volume de Tris/HCl para homogeneização.

Tecido	Proporção
Fígado	1:10
Rim	1:10
Músculo	1:4
Cérebro	1:5
Testículo	1:10
Pulmão	1:5
Coração	1:4

4.5.4. Atividade da δ -Aminolevulinato Desidratase (δ -ALA-D)

O princípio deste método é baseado na incubação da enzima com um excesso de ácido δ -aminolevulínico. O porfibrinogênio (PBG), que é formado em um tempo fixado, quando misturado com o reagente de Ehrlich, desenvolve cor que pode ser medida espectrofotometricamente.

4.5.4.1. δ -ALA-D Tecidual

Os ensaios foram realizados segundo Sassa (1982).

Preparo da Amostra:

Foram adicionados em tubos de ensaio o TFK, a água e o tecido homogeneizado que foram pré-incubados por 10 minutos a 37°C. Após, o substrato (ALA) foi acrescentado e todos os tubos foram incubados conforme o tempo determinado para cada tecido (Tabela 3). Após o tempo de incubação a reação foi parada com adição de 250 μ L de TCA 10 % com 10 mM de HgCl_2 e o conteúdo foi centrifugado.

Tabela 3: Volume de soluções e amostra para análise de δ -ALA-D tecidual com respectivo tempo de incubação para cada tecido.

Tecido	TFK (μ L)	ALA (μ L)	Homogenato (μ L)	H ₂ O (μ L)	Tempo de Incubação (h)
Fígado	50	100	200	150	1
Rim	50	100	200	150	1
Músculo	75	100	300	25	3
Testículo	50	100	200	150	3
Pulmão	75	100	300	25	3
Coração	75	100	300	25	3

Terminado o tempo de incubação, os tubos de leitura foram preparados através da adição de 500 μL do sobrenadante, 1000 μL do reagente de Erlich e 500 μL de água destilada. Esses foram incubados por 10 minutos a temperatura ambiente. A leitura foi feita em espectrofotômetro molecular em 555 nm.

Todas as amostras foram analisadas em duplicata.

O resultados foram expressos em nmol PBG/mg Ptn/hora e a forma como foram calculados está descrita no apêndice 1.

4.5.4.2. δ -ALA-D sanguínea

Os ensaios foram realizados segundo Berlin & Schaller (1974).

Preparo da Amostra:

Após a coleta do sangue com heparina, foram adicionados 10 μL de Triton X-100 10% em 500 μL do sangue total heparinizado, o tubo foi agitado e deixado em repouso por 10 minutos.

Foram adicionados em tubos de ensaio o tampão fosfato de potássio, a água e o sangue que foram pré-incubados por 10 minutos a 37°C. Após, o substrato (ALA) foi acrescentado, tabela 4, e todos os tubos foram incubados por 60 minutos, a 37°C. Após o tempo de incubação a reação foi parada com adição de 250 μL de TCA 10% com 10 mM de HgCl_2 e os tubos centrifugados por 5 minutos a 3000 rpm.

Tabela 4: Volume de soluções e sangue para análise de δ -ALA-D.

Tubo	TFK (μL)	ALA (μL)	Sangue (μL)	H_2O (μL)
Amostra	75	80	100	175

Terminado o tempo de incubação, os tubos de leitura foram preparados através da adição de 400 μL do sobrenadante, 550 μL de Erlich e 550 μL de água

destilada e incubados por 10 minutos a temperatura ambiente. A leitura foi feita em espectrofotômetro molecular em 555 nm.

Todas as amostras foram feitas em duplicata.

Os resultados foram expressos em nmol PBG/hora/mL sangue e a forma como foram calculados está descrita no apêndice 1.

4.5.5. Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Esta técnica tem como objetivo medir a formação de malondialdeído, substância formada pela reação dos radicais livres com lipídios de membrana (lipoperoxidação) em amostras biológicas. O MDA, quando aquecido na presença de TBA, forma um composto rosado que pode ser medido espectrofotometricamente.

4.5.5.1. TBARS Tecidual

Os ensaios foram realizados segundo Drapur & Hodley (1990).

Preparo da Amostra:

O ácido tiobarbitúrico 0,8%, tampão ácido acético e água, quando necessário, foram adicionados em tubos de ensaio. Na hora da incubação o dodecil sulfato de sódio 8,1% e o tecido homogeneizado ou o malondialdeído foram adicionados, conforme tabela 5 para análise dos tecidos e tabela 6 para curva padrão. Após todos os tubos foram incubados durante 2 horas a 95°C em banho-maria. Após esfriar foi feita a leitura em espectrofotômetro molecular em 532 nm.

Quando as amostras ficaram turvas, foram centrifugadas por 10 min a 2000 rpm. Todas as amostras foram analisadas em duplicata.

Tabela 5: Volume de homogenato e reagentes para análise de TBARS.

Tecido	Quantidade de homogenato (µL)	TBA 0,8 % (µL)	Tampão Ácido Acético (µL)	SDS 8,1 % (µL)	H ₂ O (µL)
Fígado	200	500	500	200	100
Rim	200	500	500	200	100
Baço	200	500	500	200	100
Cérebro (estruturas)	100	500	500	200	100
Testículo	200	500	500	200	100
Pâncreas	200	500	500	200	100
Pulmão	300	500	500	200	-----
Coração	300	500	500	200	-----

Tabela 6: Curva padrão de malondialdeído.

Tubos	Água (µL)	MDA 0,03 mM (µL)	Sistema (SDS+ TBA+ Tampão) (mL)	Concentração final (nmol)
Branco	300	-----	1,2	
1	250	50	1,2	1,5
2	200	100	1,2	3,0
3	100	200	1,2	6,0
4	-----	300	1,2	9,0

Os resultados foram expressos em nmol MDA/g tecido ou nmol MDA/ mg ptn para as estruturas do cérebro e a forma como foram calculados o fator de correção da curva de MDA e os resultados encontrados esta descrita no apêndice 1.

4.5.5.2. TBARS Sanguíneo

Os ensaios foram realizados conforme Jentzsch et al. (1996) para análise no soro.

Preparo da Amostra:

Foram adicionados em tubos de ensaio 200 μ L da amostra de soro, 250 μ L de ácido tiobarbitúrico 0,1 mol/L, 550 μ L de água destilada e 1,0 mL de ácido ortofosfórico 0,2 mol/L. A curva padrão para o cálculo do fator de correção foi feita conforme a Tabela 6. Todos os tubos foram incubados durante 45 minutos a 95 °C em banho-maria. Após esfriar foi feita a leitura em espectrofotômetro molecular em 532 nm. As amostras que ficaram turvas foram centrifugadas por 10 min a 2000 rpm.

Todas as amostras foram analisadas em duplicata.

Os resultados foram expressos em nmol MDA/mL e a forma como foram calculados o fator de correção da curva de MDA e os resultados encontrados está descrita no apêndice 1.

4.5.6. Determinação de proteínas totais

As proteínas cerebrais foram determinadas segundo Bradford (1976).

Os homogenatos do hipotálamo, hipocampo, córtex e cerebelo foram diluído com água na proporção 1:10 e do estriado na proporção 1:20.

Em um tubo de ensaio foram adicionados 50 μ L da amostra diluída e 2,5 mL do reagente de Coomassie. Após 10 minutos foi feita a leitura em espectrofotômetro molecular a 590 nm.

Tabela 7: Curva padrão de albumina para determinação de proteína.

	Albumina 1mg / mL (μ L)	Água (μ L)	Comassie (mL)	[] final (mg)
Branco	-	50	2,5	-
1	10	40	2,5	0,01
2	25	25	2,5	0,025
3	50	-	2,5	0,05

O resultados foram expressos em mg/mL e a forma como foram calculados o fator de calibração médio (FCM) da curva de Albumina e a concentração de proteína da amostra esta descrita no apêndice 1.

4.6. Análise estatística

Os cálculos estatísticos foram realizados com o software Statistica® sistema 6.0 (Statsoft Inc., 2001). Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão nas figuras, média \pm erro padrão nas tabelas e comparados usando análise de variância one-way ANOVA, seguido pelo teste de comparação de médias Post-Hoc Duncan. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. Para a confecção dos gráficos foi utilizado o programa Slide Writer.

A correlação de Pearson bicaudal foi usada para avaliar a relação entre duas variáveis e utilizou-se o programa GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Otimização do método para quantificação do Alumínio

A presença do Si em solução interfere na quantificação de alumínio por GFAAS. Como mostrado na curva de pirólise e atomização para 50 µg/L de alumínio, com a utilização de Si 15 mg/L como modificador pode-se verificar um aumento significativo na absorvância, podendo resultar em uma superestimação da concentração de Al nas amostras, figura 3.

De acordo com Schneider e Exley (2001), a influência do Si no aumento do sinal de Al é saturada em concentrações acima de 14 mg/L. Assim, utilizou-se como modificador uma solução de Si 15 mg/L tornando o acréscimo na absorvância igual em todas as amostras e padrões medidos.

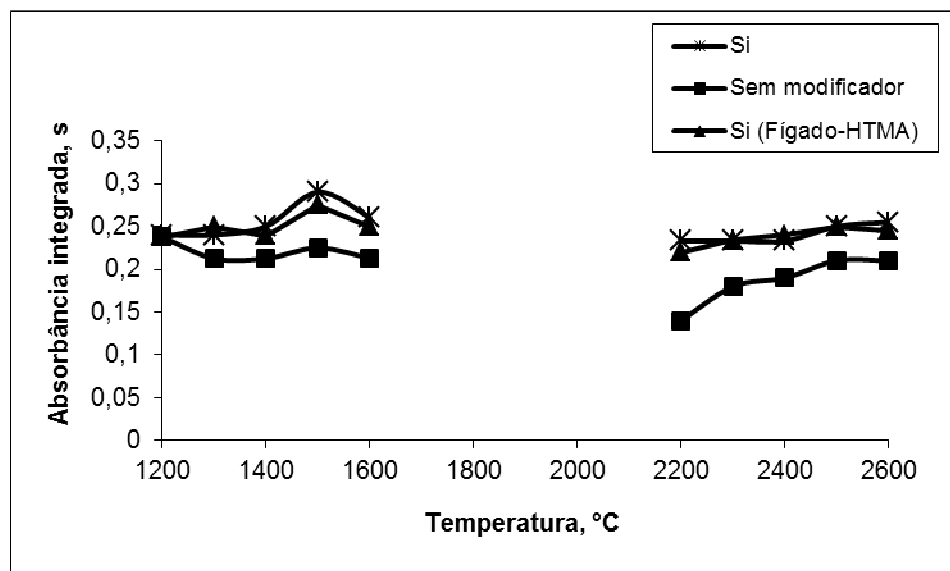


Figura 3: Curvas de pirólise e atomização para 1,0 pg de alumínio com e sem modificador de Si 15 mg/L e modificador de Si 15 mg/L com adição do padrão em amostra de fígado decomposta com HTMA.

As maiores absorvâncias ocorreram em temperatura de pirólise de 1500°C e atomização de 2600°C, sendo assim as temperaturas selecionadas para as medidas de Al.

A presença do hidróxido de tetrametilamônio não interfere na absorvância integrada do alumínio. As curvas de pirólise e atomização não diferem significativamente para padrão diluído em água injetado com e sem adição do reagente da abertura.

5.2. Otimização do método para quantificação de silício

A química do Si no forno de grafite é bastante complexa e ainda não totalmente compreendida, apesar de algumas pesquisas já terem sido realizadas neste campo. A capacidade do Si para produzir óxidos de silício voláteis em temperaturas de 1300 a 1900 °C e carbetos refratários em altas temperaturas obviamente influenciam a sensibilidade e precisão da sua medida (LUGOWSKI et al., 1998).

No nosso trabalho anterior (NOREMBERG, 2010) foi avaliada a ocorrência ou não de melhoria e aumento do sinal do Si na presença dos modificadores CaCl_2 1%, Pd+Ca, Pd+Mg, e somente Pd. O uso de 5 μL de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ 2g/L fez com que os sinais ficassem mais altos e bem estreitos, sendo o que mostrou melhor resultado entre os modificadores testados, por isso o uso deste modificador foi adotado neste trabalho.

Na curva de pirólise e atomização para o Si, figura 4, pode-se notar o aumento significativo na absorvância integrada com o uso do modificador de Pd. As maiores absorvâncias ocorreram em temperatura de pirólise de 1200°C e atomização 2600°C, sendo estas as temperaturas selecionadas para as medidas de Si.

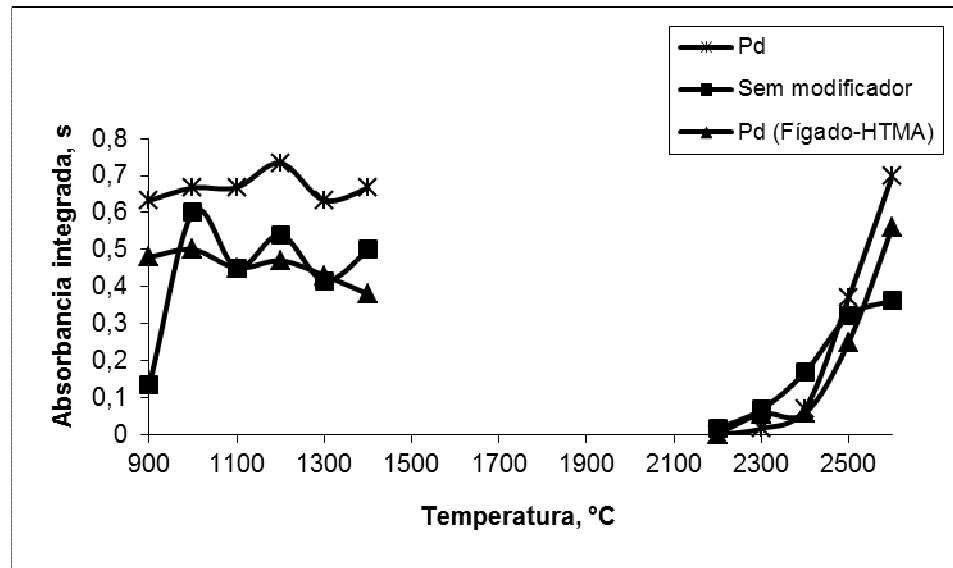


Figura 4: Curvas de pirólise e atomização para 10 pg de silício com e sem modificador de Pd 2 g/L e modificador de Pd 2g/L com adição do padrão em amostra de fígado decomposta com HTMA.

Diferentemente do que acontece para a medida de Al, a presença de HTMA na amostra após a abertura interfere na absorvância do Si (Figura 4). Os sinais de absorvância do elemento são menores com adição do padrão. A concentração de Si adicionado ou presente nas amostras não será recuperada se relacionada a uma curva de calibração normal, pois sem a presença do HTMA a absorvância do padrão é relativamente maior.

Quando a curva de calibração é confeccionada no modo adição do padrão (padrões injetados juntamente com uma amostra aberta com HTMA) os padrões sofrem a mesma interferência da amostra, melhorando a correlação entre eles. Assim, todas as determinações de Si nos tecidos foram feitas com curvas de adição do padrão, e para cada tecido medido foi feita uma nova curva de calibração.

O uso de Pd como modificador é, neste caso, um fator de complicação, pois um precipitado é formado quando a solução ácida de Pd é misturada com a solução alcalina de HTMA, necessitando de programas de temperaturas e pipetagem específicos e longos. Para evitar precipitação, a solução ácida de Pd pode ser pipetada separadamente da amostra de solução alcalina, para isso foi utilizada a opção de lavagem do capilar entre os componentes.

5.3. Otimização do método de digestão das amostras de tecido animal

A digestão ácida é o método frequentemente utilizado para determinação de Al em amostras de tecido animal por GFAAS (SCHETINGER et al., 1999, BOHRER et al., 2008a, IGLESIAS et al., 2007). Mas, soluções ácidas de Si são instáveis e tendem a precipitar (WELZ e SPERLING, 1999) o que levou a necessidade de otimização de um método de abertura para as amostras de tecido que pudesse ser usada para a determinação de ambos analitos sem perdas.

5.3.1. Digestão do fígado com ácido nítrico

Testou-se o método de digestão com ácido nítrico nas amostras de fígado para verificar, principalmente, a recuperação de Si adicionado.

Tabela 8: Recuperações de Al e Si em amostras de fígado abertas com ácido nítrico

Ácido nítrico (mL)	Amostras	Alumínio		Silício	
		µg/L	Recuperação %	µg/L	Recuperação %
1.0	Branco	30,9		9,0	
	Fig	32,5		35,6	
	Fig+spk*	164,5	132,0	35,8	—
2.0	Branco	17,8		N.D.	
	Fig	28,3		N.D.	
	Fig+spk*	193,8	165,5	N.D.	—
3.0	Branco	38,4		N.D.	
	Fig	41,6		N.D.	
	Fig+spk*	126,1	84,5	N.D.	—
5.0	Branco	52,0		N.D.	
	Fig	118,3		N.D.	
	Fig+spk*	176,3	58	N.D.	—

* Fig+spk- amostra com adição de 100 µg/L de Al e 300 µg/L de Si.
N.D.- não determinado, resultado da medida do limite de detecção.

As recuperações de Al também não foram satisfatórias, sendo que com volumes menores de ácido foram muito altas e com volumes maiores mais baixas que o ideal.

Como já esperado, devido à instabilidade e a formação de precipitados de Si em soluções ácidas, não houve recuperação do elemento adicionado na abertura com ácido nítrico. Na maioria das amostras, não foi possível a determinação de Si, obtendo-se concentrações abaixo do limite de detecção (Tabela 8).

5.3.2. Dissolução do fígado com hidróxido de tetrametilamônio

Uma alternativa para a digestão ácida é um simples e rápido pré-tratamento com HTMA, uma base forte e solúvel em água. A amostra é simplesmente misturada com um pequeno volume de uma solução de HTMA em um frasco aberto, não necessitando de aquecimento, ou somente de um suave aquecimento a baixa temperatura (SILVA et al., 2003).

Amostras tratadas com HTMA são adequadas para análises por GFAAS, pois essa técnica não requer dissolução ou digestão total da amostra (SILVA et al., 2003). Entretanto, a análise de amostras solubilizadas em HTMA diminui grandemente o tempo de vida útil do forno de grafite. O revestimento do tubo com o uso de modificadores permanentes diminui essa degradação.

O uso de Zr como modificador permanente aumentou o tempo de vida útil do forno de aproximadamente 200 queimas para mais de 600. Sem o recobrimento, antes de 200 queimas era possível verificar um aumento na rugosidade e desfragmentação na superfície interna do forno, além disso, o sinal de absorvância dos elementos ficava alargado e muitas vezes duplicado, dificultando a recuperação correta da concentração adicionada dos elementos. O recobrimento era necessário a cada 300 queimas ou quando mudança no sinal de absorvância era observada e a recuperação de Si e Al nas amostras com spike não era satisfatória. Com esse procedimento, pouca ou nenhuma modificação na superfície do forno foi observada, comprovando a eficácia do uso do modificador permanente no aumento da vida útil do forno.

As amostras de fígado foram totalmente dissolvidas após 1 h em banho-maria a 100°C com todos os volumes testados de HTMA: 0,5, 1,0 e 2 mL.

As recuperações do Si adicionado nas amostras eram muito baixas, ou praticamente não ocorriam quando as medidas eram feitas com uma curva de calibração normal, conforme citado no item 5.2. As medidas então foram feitas utilizando uma curva com adição do padrão, onde a curva é confeccionada em condições próximas das amostras. Na tabela 9 são mostradas medidas de Al com curva sem adição de padrão e Si com adição de padrão foram obtidas melhores recuperações para o Si.

Tabela 9: Recuperações de Al e Si em amostras de fígado abertas com HTMA

HTMA (mL)	Amostras	Alumínio		Silício	
		µg/L	Recuperação %	µg/L	Recuperação %
0,5	Branco	126,9		148,7	
	Fig	160,2		544,4	
	Fig+spk*	258,1	97,9	835,7	97,1
1,0	Branco	249,8		104,0	
	Fig	298,3		93,6	
	Fig+spk*	391,2	92,9	426,3	110,9
2,0	Branco	27,4		653,4	
	Fig	74,6		206,6	
	Fig+spk*	187,5	112,9	416,9	70,1

*Fig+spk- amostra com adição de 100 µg/L de Al e 300 µg/L de Si.

Para o cálculo das recuperações de Si os valores do branco não foram descontados.

As melhores recuperações do Al e Si adicionados nas amostras foram obtidas na dissolução com 0,5 mL e 1,0 mL de HTMA. O volume de 0,5 mL foi o escolhido para ser utilizado nas aberturas pela reprodutibilidade e exatidão na recuperação dos dois analitos e porque volumes maiores de HTMA levaram a uma deterioração mais acentuada do forno de grafite durante a medida por AAS.

Foram feitos vários “brancos” da abertura com 0,5 mL de HTMA e foi verificado que a concentração de Al varia de um para outro sem a presença da amostra. A fim de encontrar um valor de “branco”, ou seja, a concentração de Al

correspondente ao reagente de abertura (HTMA) utilizou-se uma amostra padrão de fígado contendo uma concentração conhecida de Al.

Como no “branco” não há consumo do HTMA, foi feita a abertura de um material certificado de fígado bovino, Bovine Liver Standard Reference Material 1577b (NIST), em triplicata, contendo 3,0 µg/g de Al, para avaliar a influência HTMA na medida do Al. Foram pesados 0,05 g (massa que corresponde a 0,250 g de tecido úmido) do padrão para a abertura com 0,5 mL de HTMA e dissolvido a 10 mL com água ultrapura, o que resulta em uma concentração de 15 µg/L de Al. As concentrações de Al encontradas na medida do padrão estão na tabela 10.

Tabela 10: Concentração de Al no padrão de fígado bovino após abertura com 0,5 mL de HTMA

Padrão fígado	1	2	3
Al (µg/L)	84,2	83,4	84,5

A média de Al encontrada é de 84 µg/L, entretanto somente 15 µg/L estão relacionados a ele, o restante (69 µg/L) foi utilizado como valor de “branco” para todas as medidas de Al nos tecidos. Nesse procedimento ocorre o consumo do HTMA pelo padrão de fígado, da mesma maneira que quando a amostra está presente. Então 69 µg/L podem ser descontados, pois devem estar relacionados à interferência do HTMA na medida do metal por GFAAS ou contaminação. Este não é o procedimento mais adequado analiticamente, mas como as medidas são comparativas a imprecisão associada ao cálculo ocorre em todas as amostras.

Para o Si o maior problema encontrado na determinação nas amostras dissolvidas com HTMA foi a obtenção de valores elevados nas medidas dos “brancos”. Observou-se que o HTMA interfere na medida de Si por GFAAS aumentando o sinal de absorção resultando em valores altos de concentração. É possível observar na tabela 9 que os valores das amostras são na maioria das vezes menores que o valor do “branco”. Se a alta concentração de Si encontrada na medida dessas amostras fosse devido à contaminação do reagente de abertura, também deveria ser encontrada quando o fígado estivesse presente. Portanto, a

idéia de contaminação do reagente foi descartada, pois quando a amostra (tecido) é adicionada na abertura o HTMA é consumido e a interferência é diminuída.

Esta interferência não é corrigida com a curva de calibração com adição do padrão porque a curva é confeccionada na presença de uma amostra aberta com HTMA (neste caso a amostra de fígado). Se for feita com o “branco” as absorvâncias da curva serão aumentadas e as amostras darão valores muito baixos ou abaixo da curva de calibração.

A alternativa encontrada foi utilizar somente os valores de medida quando a amostra estava presente, pois para fins de comparação entre grupos esses valores são satisfatórios. Além disso, mesmo sem descontar o valor do “branco” foi possível verificar a recuperação do Si adicionado (spike), conforme apresentado na tabela 9.

5.3.3. Dissolução do osso com hidróxido de tetrametilamônio

Sendo possível a recuperação do Si adicionado nas amostras de fígado dissolvidas com HTMA, tentou-se realizar esse tipo de abertura para a determinação desse elemento no osso. Mas, como o osso é composto principalmente por uma matriz inorgânica (50% da massa do osso é composta por hidroxiapatita ou sais minerais), principalmente fosfato de cálcio (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004) não houve dissolução completa da amostra com HTMA.

5.3.4. Digestão do osso com ácido nítrico

Já foi demonstrado que a digestão de amostras de osso com ácido nítrico gera resultados satisfatórios com baixos desvios-padrão na determinação de Al por GFAAS (BOHRER et al., 2008a), por isso esse método foi utilizado sem a necessidade de otimização.

Já para a determinação de Si no osso, tentou-se a neutralização da amostra com hidróxido de sódio após a abertura com ácido nítrico, devido a não-dissolução no HTMA e a dificuldade de medir Si em soluções ácidas. Entretanto, após este

procedimento, houve a formação de um precipitado (provavelmente de sulfato de cálcio) nas amostras. Estas foram centrifugadas e tentou-se fazer a medida no sobrenadante por GFAAS, mas a interferência do sulfato e até mesmo do hidróxido foi muito grande tornando impossível a utilização deste método na determinação de Si no osso.

Deste modo, somente o alumínio foi determinado no osso utilizando-se a abertura com ácido nítrico sem a adição de hidróxido.

5.4. Administração de alumínio e silício em ratos Wistar

Tem sido sugerido que silicatos podem reduzir a biodisponibilidade do alumínio, já que complexos de HAS se formam em condições fisiológicas. Esta interação química entre alumínio e silício é atualmente considerada de grande interesse no campo biológico devido ao seu possível papel na desintoxicação do alumínio (RAGGI et al., 1999).

Alguns trabalhos já demonstraram que o Si diminui a toxicidade do Al em peixes em águas ácidas (BIRCHALL et al., 1989, EXLEY et al., 1997), que a ingestão de Si aumenta a excreção de Al (REFFITT et al., 1999) e que o Si diminui a absorção gastrointestinal do Al em humanos (EDWARDSON et al., 1993, JUGDAOHSINGH et al., 2000). Entretanto, não foi encontrada nenhuma citação na literatura dessa ação do silício em pH fisiológico (pH 7,0) quando administrado via intravenosa, como feito na nutrição parenteral.

Como já foi demonstrado anteriormente, as substâncias químicas podem apresentar contaminação por alumínio (BOHRER et al., 2002; BOHRER et al., 2003; ALVAREZ et al., 2007) e silício (BOHRER et al., 2008), principalmente se há uma afinidade entre os componentes da substância e o alumínio e/ou silício. No presente trabalho, a concentração de Al e Si nas soluções de gluconato de cálcio e dihidrogenofosfato de potássio foi determinada para verificar a contaminação dos sais com esses elementos. Na solução de dihidrogenofosfato de potássio 0,1835 mmol/L, a concentração de Al e Si encontrada foi de 70,45 µg/L e 4,19 µg/L, respectivamente, e na solução de gluconato de Ca 0,01875 mmol/L foi de 42,09 µg/L de Al e 58,76 µg/L de Si. Esses valores podem ser considerados baixos quando

comparados às quantidades utilizadas nas soluções administradas nos animais, 0,25 g/L de Al e 1,0 g/L de Si.

5.4.1. Tratamento com Al e Si

5.4.1.1. Desenvolvimento dos animais durante o tratamento

Os animais foram pesados semanalmente durante todo o tratamento para ajuste do volume de administração individual. Não foi percebida diferença no comportamento entre os grupos, com exceção dos ratos dos grupos tratados com Al, que apresentaram irritabilidade e menor tolerância ao tratamento.

Relacionando-se o desenvolvimento com o peso dos animais, observa-se na figura 5 que este foi semelhante para todos os grupos, não havendo influência do tratamento no ganho ou perda de peso.

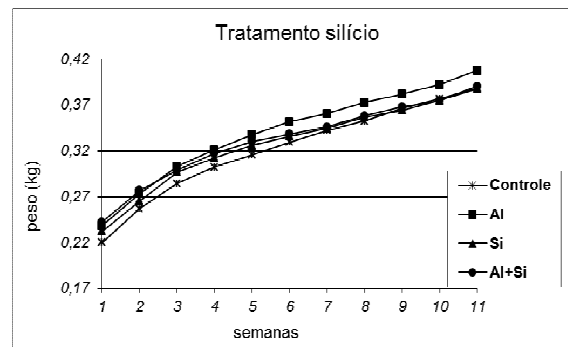


Figura 5: Médias semanais dos pesos dos animais durante os tratamentos para os quatro grupos: controle, Al, Si e Al+Si. As doses foram: Al 0,5 mg/kg/dia, Si 2 mg/kg/dia.

5.4.1.2. Distribuição do alumínio nos tecidos dos ratos Wistar

Fiejka et al. (1996) consideraram o acúmulo de Al significativo no fígado somente após 60 administrações de 0,1 mg/kg. Para garantir a ocorrência desse acúmulo nos órgãos dos animais em estudo e tornar possível a comparação entre os grupos que receberam ou não Si, escolheu-se a dose de 0,5 mg/kg de Al por dia para administração intraperitoneal.

A dose de Al utilizada nesse estudo ainda é considerada baixa quando comparada com outros estudos de administração intraperitoneal (MIU et al., 2003, IGLESIAS et al., 2007). Entretanto, a Sociedade Americana de Nutrição Parenteral e Enteral juntamente com a Sociedade Americana de Nutrição Clínica ASCN-ASPEN (KLEIN, 1991) estima que uma ingestão "segura" de alumínio pela nutrição parenteral é uma dose de 2 µg/kg/dia e uma dose "insegura" é de 15-30 µg/kg/dia. A dose "segura" não resulta em acúmulo de alumínio nos tecidos ou fluidos e está associado a efeitos tóxicos desconhecidos. Uma dose "insegura" é o montante que resulta em acúmulo em tecidos, mas não documenta toxicidade. A dose "tóxica" é aquela que resulta em acúmulo tecidual e sintomas de toxicidade. Esta dose "tóxica" foi derivada dos efeitos de acúmulo de alumínio no osso, com desenvolvimento de doença óssea associada a NPT após o recebimento de 60 µg/kg/dia. A dose utilizada nesse estudo está bem acima da dose considerada insegura, sendo propício o acúmulo de Al nos tecidos e, assim, se o Si diminuir a biodisponibilidade do Al, este efeito poderá ser observado.

Após 60 administrações intraperitoneais de Al e/ou Si, determinou-se a concentração de Al nos tecidos dos ratos. Os resultados estão apresentados abaixo.

A concentração de Al encontrada no soro dos ratos do grupo controle concorda com a encontrada na maioria dos indivíduos saudáveis, pois segundo Bronner (2008) as concentrações de Al no plasma desses indivíduos são de aproximadamente 2 µg/L.

É possível perceber um grande aumento na concentração de Al no sangue, no osso, fígado e em menor proporção nos rins dos ratos tratados com o metal, demonstrando que ele pode se depositar e acumular nesses órgãos (Figura 6).

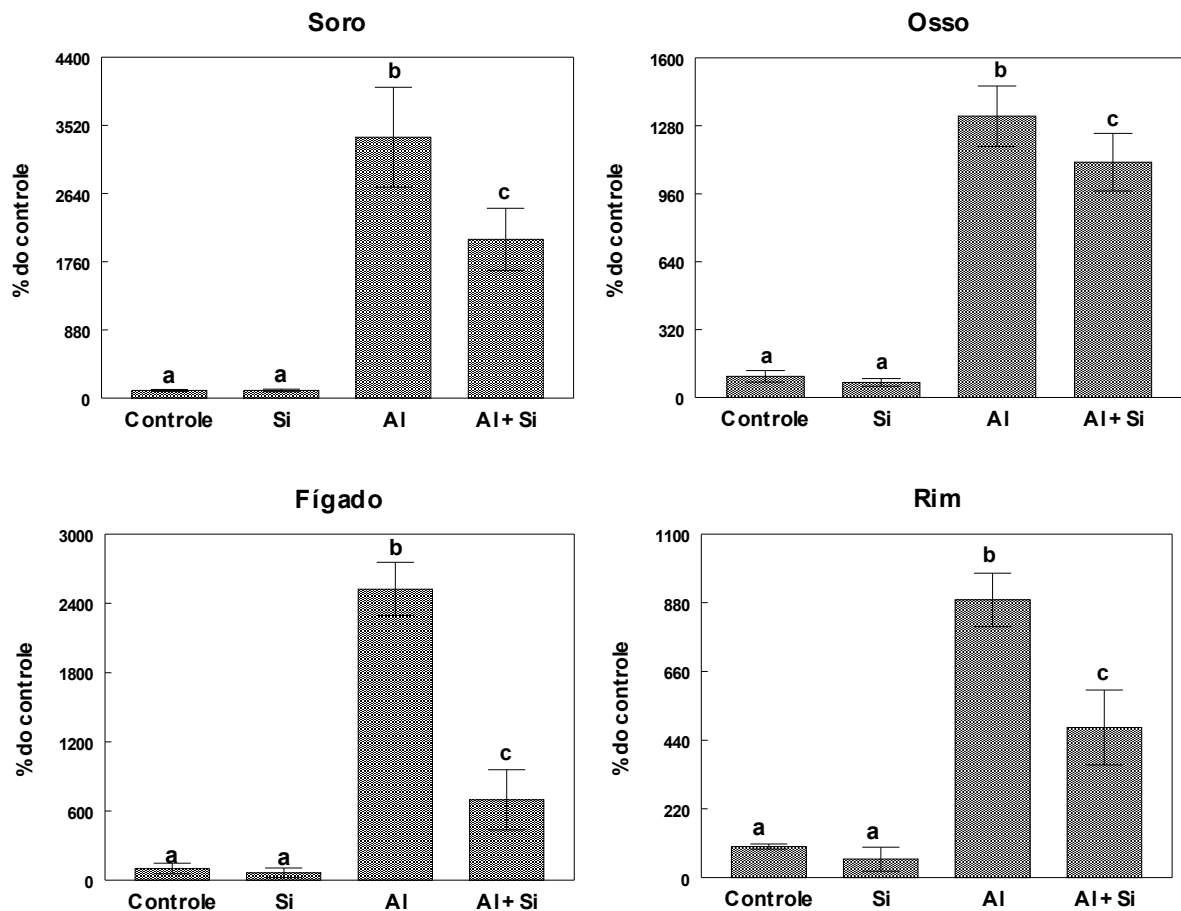


Figura 6: Concentração de Al no soro, osso, fígado e rim dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de Al e/ou Si. Cada coluna representa média \pm D.P. ($n=5$) como porcentagem do controle. A concentração de Al no controle foi de 1,52 $\mu\text{g/L}$ no soro, 1,19 $\mu\text{g/g}$ no osso, 0,67 $\mu\text{g/g}$ no fígado e 0,21 $\mu\text{g/g}$ no rim. Nas colunas letras diferentes significam diferença significativa entre os grupos. One-way ANOVA–Duncan's test ($p < 0,05$).

Quando o Al (0,25 g/L) foi administrado na presença de 1g/L de Si, a concentração de Al no soro foi aproximadamente 30% menor que a observada na ausência de Si.

No osso a administração de Al e Al+Si causou um acréscimo na concentração de alumínio quando comparados com o grupo controle. Houve diferença significativa entre o grupo Al e o Al+Si, entretanto o Si diminui apenas 16% a concentração de Al neste tecido.

Outros estudos também já demonstraram que o Al se acumula no osso. Klein e colaboradores (1982) observaram que pacientes em nutrição parenteral total por longo tempo apresentavam níveis elevados de alumínio no osso, urina e plasma.

Eles verificaram doença óssea metabólica atribuída a contaminação de alumínio afetando até 84% dos pacientes que receberam NP por mais de 6 meses. Os sinais e sintomas incluíram dor óssea grave, hipercalcinúria, e biópsias ósseas mostraram osteomalácia irregular. Doença óssea associada ao alumínio pode ocorrer em crianças que recebem NP por 3 semanas de terapia (GURA; PHARM, 2010). O Al^{3+} pode competir diretamente ou substituir vários íons de metais essenciais *in vivo*. A respeito disso, o Ca^{2+} é o seu primeiro alvo sendo avaliado a partir da osteomalacia induzida por Al (ZATTA et al., 2002).

No fígado, a administração de Al e Al+Si também causou um acréscimo na concentração de alumínio quando comparados com o grupo controle (Figura 6). Novamente verifica-se diferença significativa entre o grupo Al e o Al+Si, o acúmulo foi 72,5% menor quando o Si estava presente.

O Al se acumula no rim quando administrado na presença ou não de Si, o Si diminui a concentração de Al, que foi de até 44,9% menor. Bellia e colaboradores (1996) sugeriram que o ácido ortossilícico (na cerveja) aumenta a excreção urinária de Al talvez por interagir com o Al filtrável nos túbulos renais, formando HAS, e prevenindo a reabsorção do metal.

O rim representa a principal rota de excreção do Al com quantidades insignificantes excretadas na bile. Klein e colaboradores (1982) notaram a excreção continuada de quantidades significativas de Al na urina e a persistente elevação de Al no plasma em pacientes que receberam NPT, evidenciando a baixa taxa de depuração renal e indicando que boa parte do Al pode ser mobilizada para outros tecidos. Bohrer et al. (2010) verificaram através da quantificação de Al na urina que, devido aos altos níveis de Al presente nas soluções parenteralmente administradas em prematuros, a excreção urinária não é capaz de eliminar todo o metal infundido. A alta concentração de Al observada no rim, figura 6, confirma a baixa capacidade de excreção do metal, pois o metal acaba se acumulando neste e em outros tecidos estudados. Nota-se também, que o Si minimiza esse acúmulo, possivelmente por aumentar a excreção e diminuir a mobilização para os demais tecidos. Bellia e colaboradores (1994 apud BERTHON, 2002) investigaram o efeito do silício na excreção urinária de alumínio em pacientes após transplante renal. A excreção urinária de alumínio teve pico entre 4 e 8 dias pós-transplante e foi muito significativamente e positivamente correlacionada com o silício na urina. Foi

sugerido que os dois elementos podem ser eliminados pelo rim através de um mecanismo comum ou como uma espécie química, possivelmente como HAS.

Estes resultados concordam com os encontrados por Fiejka et al. (1996), que mostraram que a administração prolongada de $\text{Al}(\text{OH})_3$ parenteralmente em ratos normais resulta no acúmulo de Al predominantemente no fígado e no osso. Eles presumiram que o acúmulo no tecido do fígado pode ser uma das barreiras para o acesso do alumínio a outros órgãos do corpo. Edwardson et al. (1993) administraram Al oralmente em cinco voluntários saudáveis na presença e ausência de Si e comprovaram que o Si dissolvido, em uma concentração encontrada em muitas águas potáveis (100 $\mu\text{mol/L}$), reduz a concentração de Al no plasma em até 15%.

Alemmari et al. (2011) injetaram alumínio intraperitonealmente em porcos recém nascidos e perceberam que a quantidade de Al acumulada no fígado estava diretamente relacionada com o tempo de duração da terapia, a concentração média após 4 semanas foi de $81,75 \pm 3,8 \mu\text{g/g}$ após administração de 1500 $\mu\text{g/kg}$ de cloreto de alumínio. A infusão de Al parenteralmente causou injúria neste órgão. No presente estudo, a concentração de Al no fígado após 60 administrações foi até 6 vezes menor ($17,14 \pm 4,29 \mu\text{g/g}$), figura 6, mas a concentração de Al administrada nos ratos foi 3 vezes menor, 0,5 mg/kg (500 $\mu\text{g/kg}$), que a injetada nos porcos do trabalho mencionado. A concentração de Al no fígado dos animais tratados neste trabalho não pode ser comparada com a encontrada no trabalho citado, pois além de serem espécies diferentes, deve-se levar em consideração que o tempo de tratamento também não é o mesmo, mas os dados mostram que o metal é retido consideravelmente neste órgão.

O grande decréscimo do acúmulo de Al no fígado e rim na presença de Si confirma que a formação de HAS diminui a biodisponibilidade do alumínio, ou seja, diminui a sua absorção e/ou aumenta sua excreção.

Nosso ensaio *in vitro* demonstrou que a concentração de Si necessita ser maior que 10 mg/L (NOEMBERG, 2010) para permitir a formação de HAS em solução. A diminuição da biodisponibilidade do Al foi confirmada *in vivo*, a concentração de 1 g/L de Si administrada diminuiu significativamente o acúmulo de Al no sangue, osso, fígado e rim dos animais.

Bellia et al. (1996) também observaram essa ação protetora do Si. Eles verificaram em voluntários com função renal normal que o ácido silícico não só foi

capaz de reduzir a absorção gastrointestinal de alumínio, mas também de liberar e excretar alumínio de sítios do corpo, incluindo do osso. Estes resultados mostram que o silício, de alguma forma pode interagir com as espécies de alumínio presente na solução e no estado sólido e pode reverter a formação de fases minerais em grande parte insolúveis.

No músculo, coração e testículo não há diferença significativa entre os grupos tratados com Al e/ou Si e o grupo controle (Tabela 11).

Tabela 11: Concentração de Al ($\mu\text{g/g}$) no músculo, coração e testículo dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de Al e/ou Si.

Tecido	Grupos tratados			
	Controle	Si	Al	Al+Si
Músculo	$0,147 \pm 0,027$	$0,288 \pm 0,070$	$0,107 \pm 0,039$	$0,134 \pm 0,042$
Coração	$0,568 \pm 0,092$	$0,293 \pm 0,087$	$0,386 \pm 0,140$	$0,221 \pm 0,076$
Testículo	$1,260 \pm 0,065$	$1,173 \pm 0,141$	$1,264 \pm 0,105$	$1,339 \pm 0,063$

Valores expressos como média \pm EP, n = 5 para cada grupo tratado.

Guo et al. (2005) verificaram acúmulo de Al no soro e testículo de camundongos após administração subcutânea de 7 e 13 mg/kg de cloreto de alumínio por duas semanas. No soro a concentração encontrada foi de aproximadamente 200 $\mu\text{g/L}$ e 400 $\mu\text{g/L}$ para a menor e maior dose administrada, respectivamente. Já no testículo foi de aproximadamente 21 $\mu\text{g/g}$ e 35 $\mu\text{g/g}$. No nosso estudo não há diferença na concentração de Al acumulado no testículo entre os grupos tratados e o controle, que foi de aproximadamente 1,2 $\mu\text{g/g}$, entretanto a dose administrada foi também menor, 500 $\mu\text{g/kg}$. No sangue a concentração de Al ficou entre 50 e 100 $\mu\text{g/L}$. Esses valores são altos, principalmente para o sangue, quando comparados ao estudo citado, se a dose administrada for levada em consideração. Isso pode ser atribuído a injeção intraperitoneal utilizada neste estudo, pois neste tipo de administração a solução entra em contato direto com uma região altamente vascularizada aumentando a absorção, e também ao maior tempo de tratamento.

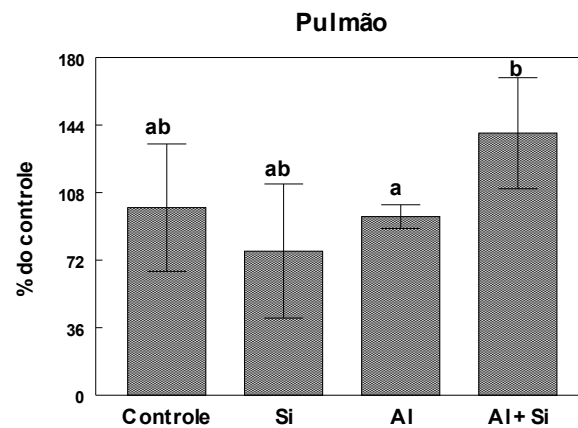


Figura 7: Concentração de Al no pulmão dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de Al e/ou Si. Cada coluna representa média \pm D.P. ($n=5$) como porcentagem do controle. A concentração de Al no controle foi de 1,38 $\mu\text{g/g}$. Nas colunas letras diferentes significam diferença significativa entre os grupos. One-way ANOVA–Duncan’s test ($p < 0,05$).

No pulmão há um aumento significativo na concentração de Al quando administrado juntamente com Si, figura 7. Nesse caso aparece um efeito contrário ao observado nos demais tecidos estudados. No pulmão, além de não observar-se um papel protetor do Si, ele potencializa o acúmulo do metal nesse órgão.

Massie et al. (1988), após tratar camundongos com 0,01M de AlCl_3 na água de beber, encontraram valores médios de Al no osso inferiores a 15 ppm e no pulmão de 6 ppm. No presente estudo, valores menores no pulmão, até 2 ppm foram encontrados. Já no osso nossos valores concordam, até 16 ppm ($\mu\text{g/g}$) de Al foram encontrados. As diferenças estão provavelmente relacionadas ao tratamento das amostras, pois no trabalho citado foram utilizadas amostras secas.

No cérebro, figura 8, apesar de existir uma tendência ao aumento da concentração do Al nos grupos quando comparados ao controle, a diferença é significativa somente no grupo tratado com Al e Si. Neste caso o Si não age como protetor, aumentando a concentração do metal em relação ao controle.

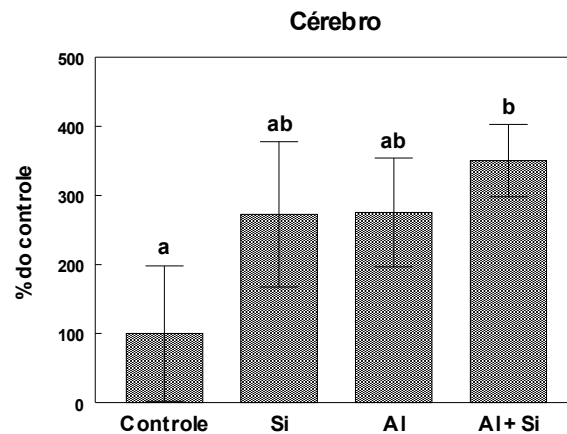


Figura 8: Concentração de Al no cérebro dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de Al e/ou Si. Cada coluna representa média \pm D.P. (n=5) como porcentagem do controle. A concentração de Al no controle foi de 0,063 $\mu\text{g/g}$. Nas colunas letras diferentes significam diferença significativa entre os grupos. One-way ANOVA–Duncan’s test ($p < 0,05$).

No trabalho de Schetinger et al. (1999), apesar da exposição de camundongos ao alumínio ser na água para beber, também foi relatado que as concentrações do metal aumentaram significativamente no fígado e rim, mas não se alterou no cérebro.

Já Iglesias et al. (2007) estudaram o acúmulo e a distribuição do alumínio no cérebro de ratos, tanto com administração intraperitoneal como oral. A maioria das áreas do cérebro mostrou o acúmulo de alumínio, mas um maior e mais significativo aumento foi observado no grupo que recebeu alumínio através da administração intraperitoneal.

O cérebro possui a menor concentração de Al em relação aos demais tecidos (YOKEL; MCNAMARA, 2001). Realmente, a concentração de Al no cérebro é a mais baixa encontrada neste trabalho no controle (0,063 $\mu\text{g/g}$) e nos tratamentos, onde apesar do aumento dos níveis do metal esses não ultrapassam os verificados nos outros tecidos.

Klein (2005) diz que, quando infundido continuamente, tal como com uma solução de nutrição parentérica ou mesmo em um dialisado para pacientes urêmicos, o alumínio se liga à transferrina e apenas 5% é ultrafiltrável, indicando que a transferrina ligada ao alumínio não é excretada, mas entra em um equilíbrio dentro de vários tecidos, incluindo fígado, osso e cérebro. Como neste trabalho utilizou-se a

injeção intraperitoneal, esta pode ser a justificativa para a permanência do Al nesses tecidos, figura 6 e 8.

5.4.1.3. Distribuição de silício nos tecidos dos ratos Wistar

São poucos os trabalhos relacionados a distribuição de Si nos tecidos animais. Segundo Jugdaohsingh e colaboradores (2004) muito pouco se sabe sobre este elemento em espécies de mamíferos, especialmente em humanos, eles dizem que a complexidade da química dos silicatos aquosos e da análise de silício tem inibido estudos detalhados dos níveis fisiológicos de silício.

Embora o silício presente nos alimentos e na água seja seletivamente absorvido no trato gastrointestinal, a sua introdução, diretamente na corrente sanguínea, como ocorre na NP, não enfrenta barreiras. Em vista disso, a concentração de Si foi determinada nos tecidos dos ratos, após 60 injeções intraperitoneais para mimetizar um tratamento crônico de NP. Os resultados estão apresentados a seguir.

Na figura 9 nota-se que a concentração de Si no sangue e no rim aumenta nos grupos tratados com o elemento quando comparados ao controle. No pulmão esse aumento só é verificado no grupo Si.

Reffitt e colaboradores (1999) relataram a farmacocinética e o metabolismo do Si em voluntários saudáveis após a ingestão de ácido ortosilícico na água (aproximadamente 600 mL contendo 27-55 mg/L de Si). Eles verificaram alta depuração e filtrabilidade renal do Si e sugeriram que o ácido ortosilícico é prontamente absorvido pelo trato gastrointestinal do homem e, em seguida, prontamente excretado na urina. Entretanto, o Si administrado por via intraperitoneal (2 mg/kg/dia) nos animais não deve ter sido totalmente excretado na urina, pois nos grupos tratados com esse elemento verifica-se que ele se acumula no rim, no soro e no pulmão, figura 9.

Os resultados mostram que o sangue é um bom indicador da contaminação de Al e Si, já que, mesmo após dois dias da última administração, permanecem em alta concentração no soro sanguíneo.

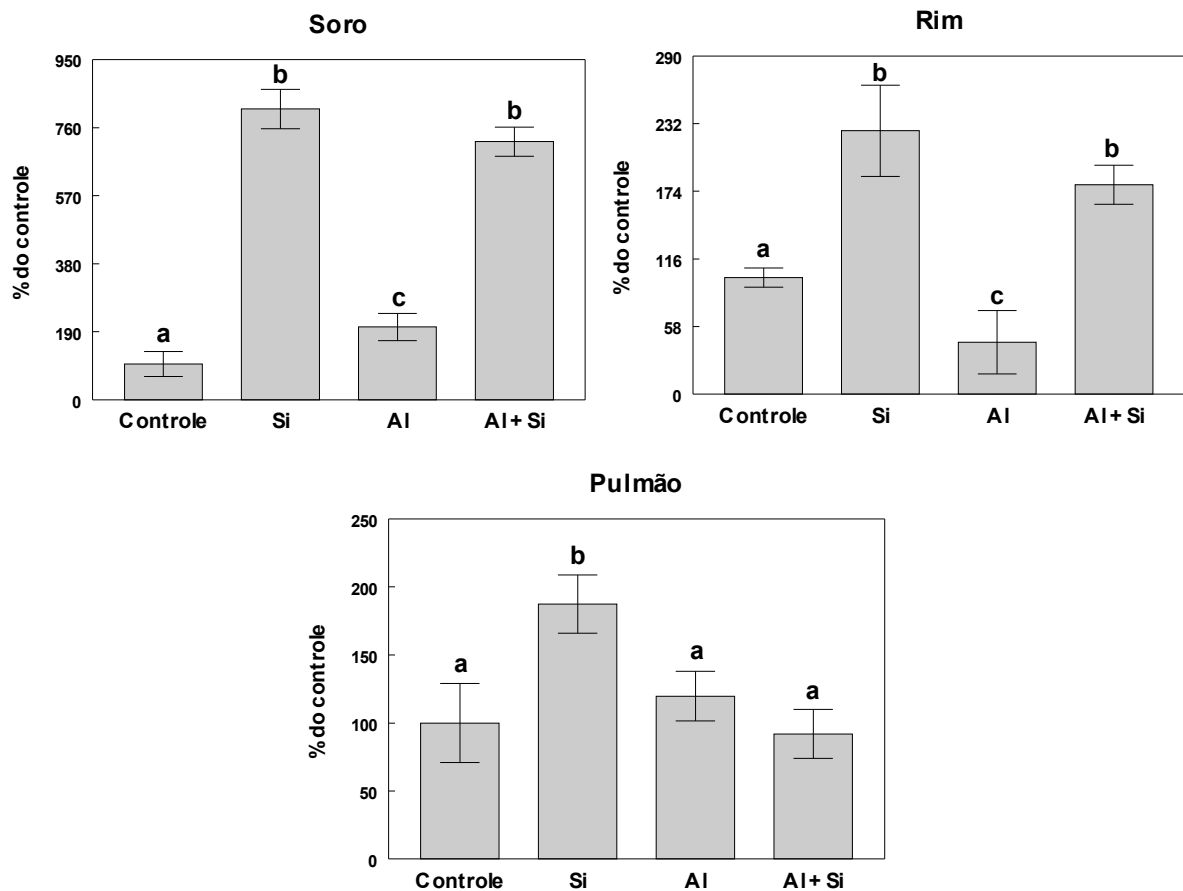


Figura 9: Concentração de Si no soro, rim e pulmão dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de Al e/ou Si. Cada coluna representa média \pm D.P. (n=5) como porcentagem do controle. A concentração de Si no controle foi de 12,21 $\mu\text{g/L}$ no soro, 6,21 $\mu\text{g/g}$ no rim e 8,80 $\mu\text{g/g}$ no pulmão. Nas colunas letras diferentes significam diferença significativa entre os grupos. One-way ANOVA–Duncan's test ($p < 0,05$).

O Si não se acumula no fígado, músculo, coração e testículo dos ratos, pois não se verifica diferença significativa entre os grupos tratados e o controle, tabela 12.

Nielsen (2009) mostrou que a injeção intravenosa diária de 5 mg ou mais de sílica em coelhos induziu fibrose do fígado, aumento do baço e nefrite intersticial. No presente trabalho, a concentração de Si administrada foi menor que no trabalho citado, 2 mg/kg, e não foi observado acúmulo do elemento no fígado, mas no rim a retenção do elemento foi significativa, podendo causar alguma alteração neste órgão.

Tabela 12: Concentração de Si ($\mu\text{g/g}$) no fígado, músculo, coração e testículo dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de Al e/ou Si.

Tecido	Grupos tratados			
	Controle	Si	Al	Al+Si
Fígado	$8,804 \pm 0,666$	$9,417 \pm 0,638$	$6,924 \pm 0,942$	$8,806 \pm 0,667$
Músculo	$1,024 \pm 0,329$	$0,941 \pm 0,211$	$1,043 \pm 0,285$	$0,644 \pm 0,186$
Coração	$1,421 \pm 0,344$	$2,113 \pm 0,197$	$1,645 \pm 0,204$	$2,033 \pm 0,537$
Testículo	$1,009 \pm 0,252$	$1,380 \pm 0,121$	$1,622 \pm 0,204$	$1,296 \pm 0,034$

Valores expressos como média \pm EP, $n = 5$ para cada grupo tratado.

O Si aparece aumentado no cérebro em todos os grupos em relação ao controle, Figura 10.

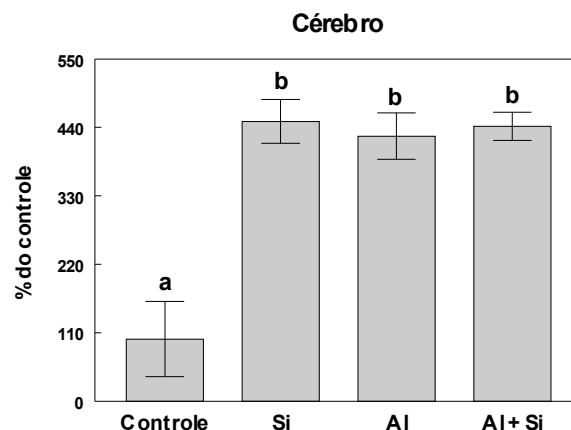


Figura 10: Concentração de Si no cérebro dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de Al e/ou Si. Cada coluna representa média \pm D.P. ($n=5$) como porcentagem do controle. A concentração de Si no controle foi de $0,56 \mu\text{g/g}$. Nas colunas letras diferentes significam diferença significativa entre os grupos. One-way ANOVA–Duncan's test ($p < 0,05$).

As concentrações de Si no cérebro dos animais do grupo Al foram superiores aos dos animais do grupo controle, provavelmente devido a uma série de causas diferentes. Há evidências de que o Al é capaz de produzir radicais livres que causam a peroxidação lipídica, danificando as membranas neuronais e aumentando a

permeabilidade da barreira hemato-encefálica (SRIVASTAVA; JAIN, 2002), permitindo que mais Si possa ingressar no tecido cerebral (EXLEY, 2006).

Lugowski et al. (1998) mostrou que o silício é encontrado no cérebro, no fígado, pulmão, rins, ossos, sangue, urina e suor dos seres humanos. Já Landeghem et al. (1998) disseram que escassos dados indicam a presença do elemento no fígado, baço e pulmão dos pacientes em diálise renal e também em modelos animais.

São poucos os trabalhos que relatam sobre a presença de Si no corpo humano ou de animais experimentais. Nosso estudo mostrou que esse elemento pode se depositar no rim, pulmão e cérebro dos ratos, aparecendo também em concentração elevada no soro dos animais.

5.4.1.4. δ -Aminolevulinato Desidratase (δ -ALA-D)

A δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D), uma enzima da via da heme biossíntese, é essencial para todos os organismos aeróbios (VALENTINI et al., 2007).

A anemia associada à toxicidade do alumínio pode ocorrer devido ao rompimento induzido pelo metal da via heme biossintética, porém, os efeitos do elemento sobre enzimas envolvidas na hemebiossíntese são contraditórios. Após a exposição *in vivo*, o Al causa tanto inibição, estímulo ou não causa efeito na atividade da δ -ALA-D, dependendo do tecido, a forma química do Al(III) administrado e da via de administração (ROCHA et al., 2012).

Os níveis de porfobilinogênio foram medidos nos homogenatos obtidos dos tecidos para verificar as interferências do Al e Si na atividade da enzima δ -ALA-D através da injeção intraperitoneal em tratamento crônico para simular a NP.

Os níveis de porfobirinogênio no sangue e testículo não aparecem alterados nos grupos tratados quando comparados ao controle (Tabela 13). Já no fígado a administração de Al, principalmente na presença do Si, aumentou a atividade da enzima (Figura 11).

Tabela 13: Níveis de porfobilinogênio no sangue (nmol PBG/h/mL) e testículo (nmolPBG/mgptn h) dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de Al e/ou Si.

Tecido	Grupos tratados			
	Controle	Si	Al	Al+Si
Sangue	1,267 ± 0,107	1,184 ± 0,037	1,229 ± 0,108	1,142 ± 0,090
Testículo	16,228 ± 0,671	16,590 ± 1,029	15,005 ± 0,085	15,424 ± 0,571

Valores expressos como média ± EP, n = 5 para cada grupo tratado.

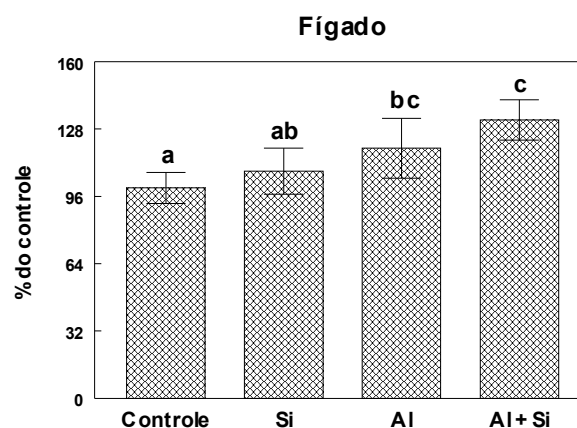


Figura 11: Efeito da administração intraperitoneal de Al e/ou Si na atividade da enzima δ -ALA-D fígado dos ratos. Cada coluna representa média ± D.P. (n=5) como porcentagem do controle. A atividade da δ -ALA-D no controle foi de 71,39 nmolPBG/mgptn h. Nas colunas letras diferentes significam diferença significativa entre os grupos. One-way ANOVA–Duncan's test ($p < 0,05$).

Vieira et al. (2000) encontraram, após submeter camundongos a um tratamento crônico oral, que o tratamento com citrato e alumínio mais citrato aumentou a atividade da δ -ALA-D in vivo e que o aumento da atividade da enzima foi paralelo ao aumento do teor de alumínio no sangue e plasma. Após a exposição in vivo ao Al^{3+} através da água potável, a atividade de δ -ALA-D no sangue foi aumentada em 90%. No nosso estudo os teores de Al no soro aparecem aumentados nos grupos tratados com o metal (Figura 6), entretanto a atividade da enzima não foi alterada significativamente no sangue, tabela 13.

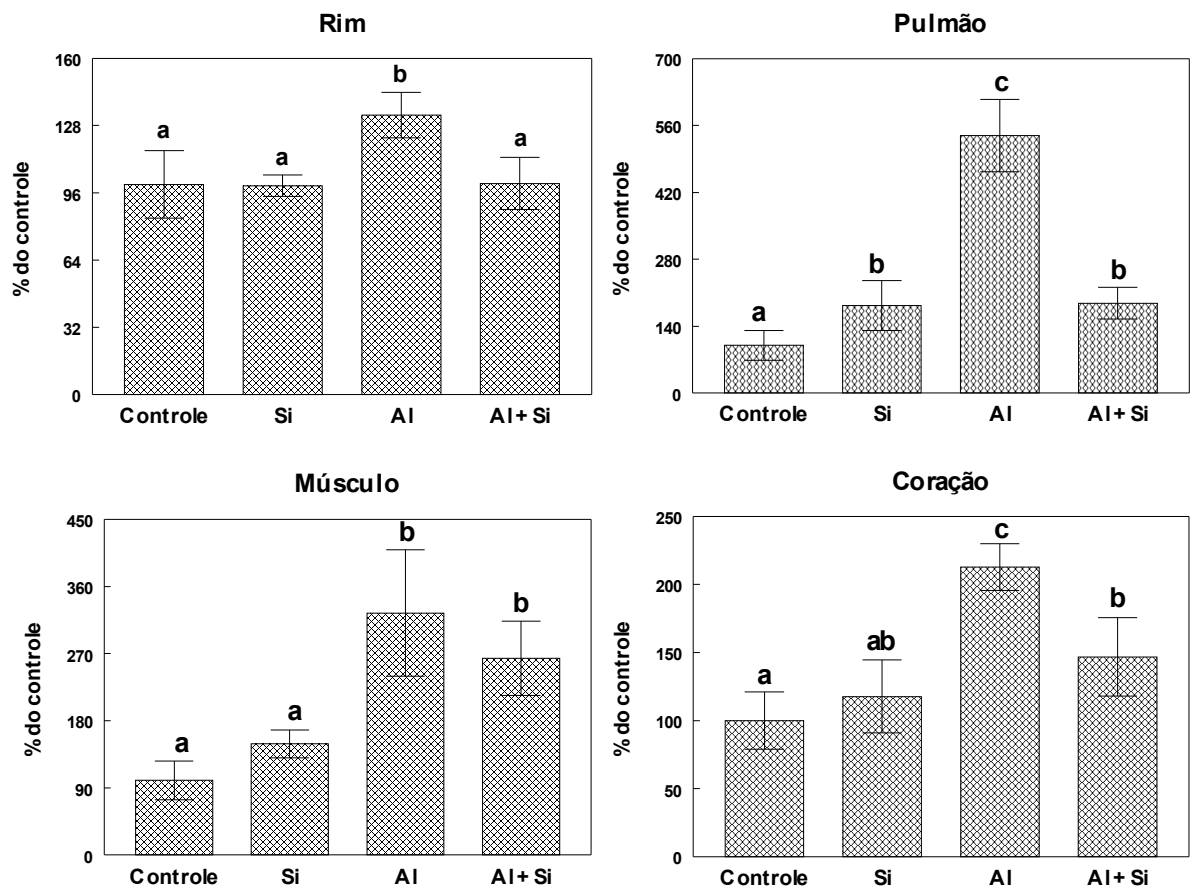


Figura 12: Efeito da administração intraperitoneal de Al e/ou Si na atividade da enzima δ -ALA-D no rim, pulmão, músculo e coração dos ratos. Cada coluna representa média \pm D.P. (n=5) como porcentagem do controle. A atividade da δ -ALA-D no controle foi de 28,23 no rim, 3,37 no pulmão, 2,85 no músculo e 5,73 no coração, resultados expressos em nmolPBG/mgptn h. Nas colunas letras diferentes significam diferença significativa entre os grupos. One-way ANOVA–Duncan's test ($p < 0,05$).

No rim a atividade da enzima δ -ALA-D é ativada na presença do Al, a administração de Si juntamente com o metal reverte essa ativação aos níveis do grupo controle (Figura 12).

No músculo, coração e pulmão a atividade da enzima δ -ALA-D é alterada de forma semelhante. Com exceção do músculo, nos outros tecidos o Si diminui significativamente a atividade da enzima, que aparece aumentada nos animais expostos ao Al.

Após exposição por inalação os efeitos do Al são exercidos principalmente no sistema respiratório, podendo causar asma e decréscimo das funções pulmonares. Entretanto, patologias no sistema respiratório pela exposição ao Al por outras vias

de administração não foram observadas (NAYAK, 2002). Neste trabalho não se observou acúmulo de Al no pulmão, mas um dado interessante é a grande elevação da atividade da enzima δ -ALA-D neste órgão no grupo Al, maior que 500% em relação ao grupo controle. A ativação da enzima não causa danos ao tecido, mas pode ser uma resposta a exposição prolongada ao Al. O Si demonstrou grande eficácia no sentido de reduzir a biodisponibilidade do metal, pois os níveis de porfobirino são revertidos e igualados ao grupo Si.

Schetinger et al. (1999) demonstraram que a exposição ao sulfato de alumínio na água potável inibe a atividade de δ -ALA-D no rim, porém aumenta no fígado. Neste estudo o Al aumentou a atividade da enzima no fígado, rim, músculo, pulmão e coração, e nos demais tecidos estudados, apesar de não haver diferença significativa entre os grupos, também não há inibição da enzima pela exposição ao metal.

A inativação da δ -ALA-D pode levar a um acúmulo de ácido delta-aminolevulínico (substrato) que pode causar uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio que, por sua vez, poderia explicar os efeitos tóxicos de metais. Estes processos podem contribuir para o estresse oxidativo em células e podem estar relacionados a processos degenerativos dos mecanismos celulares (SCHETINGER et al., 1999). Nosso estudo mostrou que o Al causa a ativação da enzima, na maioria dos tecidos, ou não muda a sua atividade, neste caso não parecendo ter ação tóxica no organismo dos animais. A presença do Si em alguns casos reverteu a ação do metal, não podendo ser considerada uma atividade protetora da toxicidade, mas demonstrando a sua capacidade de diminuir a biodisponibilidade do Al.

Chmielnicka et al. (1996) realizaram um experimento utilizando fêmeas de ratos que foram tratados todos os dias intraperitonealmente, durante 3 semanas, com cloreto de alumínio 4 mg Al/kg e nenhuma mudança na atividade de ALA-D no fígado, rim e sangue foi observada. O aumento da atividade da enzima observado no rim neste presente estudo poderia, portanto, ser atribuído a uma resposta do organismo a um maior tempo de exposição, de aproximadamente 3 meses.

Vieira et al. (2000) sugeriram que a sensibilidade da enzima ao Al^{3+} é baixa, pois o alumínio inibe a atividade da δ -ALA-D in vitro somente quando testado em uma concentração relativamente alta (na faixa mM). Em concentrações relativamente baixas, (10-50 μ M), o Al^{3+} causou um aumento de δ -ALA-D no sangue,

que atingiu um máximo de 40%. No presente estudo utilizamos uma concentração de Al considerada baixa, 0,5 mg/kg (18,5 μ M/kg), confirmando essa suposição, pois quando ocorreu alteração na atividade da enzima ela foi aumentada.

Compostos de alumínio têm sido utilizados como adjuvantes em vacinas para estimular as células de imunidade inata e desempenhar um papel chave na eficácia e na natureza da subsequente resposta imune adaptativa (RIMANIOL et al., 2007). O heme também regula a imunidade (ISHIZUKA et al., 2011). A síntese do heme ocorre no citoplasma e na mitocôndria das células através de 8 tipos de enzimas, entre elas está a enzima δ -ALA-D. O aumento da atividade da enzima observado nos tecidos com a administração do Al pode estar relacionado com a capacidade do metal em estimular a resposta imune, através do aumento na produção de heme.

5.4.1.5. Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação lipídica é uma indicação do estresse oxidativo, que interrompe a integridade estrutural das membranas celulares e também pode levar à formação de aldeídos, que por sua vez, causam danos em lipídios, proteínas e DNA (SILVA et al., 2007).

No que diz respeito à peroxidação lipídica, o Al não é um metal de transição e não sofre reações redox *in vivo* (KAIZER et al., 2005). Portanto, o Al é considerado um metal não redox ativo, que promove a oxidação biológica *in vitro* e *in vivo* por causa de sua atividade pró-oxidante.

Os níveis de malondialdeído, um produto da peroxidação lipídica, foram medidos nos homogenatos obtidos dos tecidos para avaliar o estresse oxidativo.

O Si parece diminuir o TBARS sanguíneo. Os grupos Si, embora não significativamente, e Si+Al possuem níveis de MDA menores em relação aos grupos controle e Al (Figura 13).

No rim o Al aumenta os níveis de MDA, entretanto não há diferença significativa entre o grupo Al e o grupo Si. A administração de Si juntamente com o metal, diminui esse estresse, figura 13.

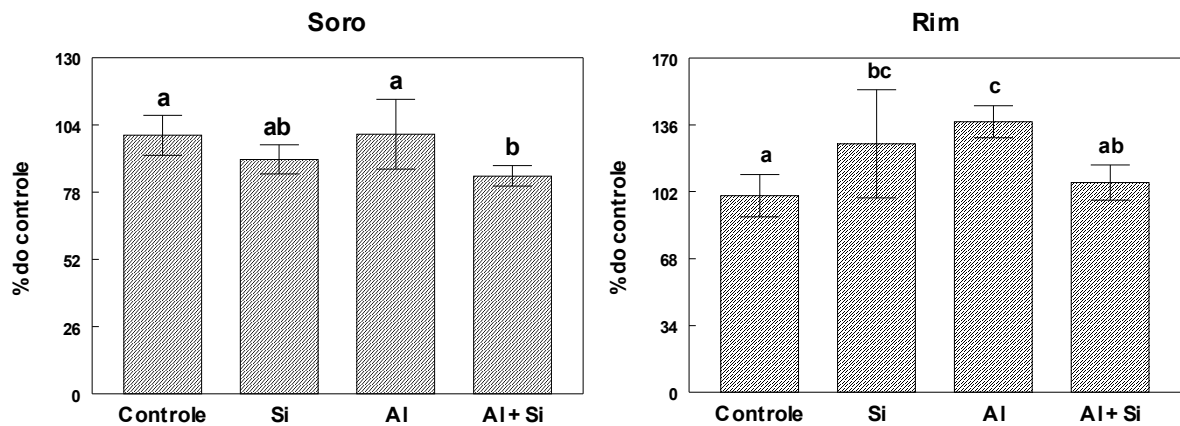


Figura 13: Níveis de MDA no soro e rim dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de Al e/ou Si. Cada coluna representa média \pm D.P. (n=5) como porcentagem do controle. A concentração de MDA no controle foi de 61,75 nmolMDA/mL no soro e 1922,29 nmolMDA/gde tecido no rim. Nas colunas letras diferentes significam diferença significativa entre os grupos. One-way ANOVA–Duncan’s test ($p < 0,05$).

A administração de Al com ou sem Si não interferiu significativamente na produção de MDA no pulmão, coração, fígado e testículo, tabela 14.

Tabela 14: Níveis de MDA no pulmão, coração, fígado e testículo (nmolMDA/g de tecido) dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de Al e/ou Si.

Tecido	Grupos tratados			
	Controle	Si	Al	AI+Si
Pulmão	1200,75 \pm 73,8	1219,91 \pm 76,1	1152,52 \pm 66,8	1253,87 \pm 37,5
Coração	554,78 \pm 60,0	489,63 \pm 26,6	500,53 \pm 20,6	501,49 \pm 19,1
Fígado	2253,24 \pm 176,1	2214,51 \pm 162,6	2498,04 \pm 119,7	2106,89 \pm 35,9
Testículo	895,21 \pm 103,6	1053,16 \pm 120,5	1105,05 \pm 95,1	1096,92 \pm 95,8

Valores expressos como média \pm EP, n = 5 para cada grupo tratado.

Raghuvanshi e colaboradores (2012) verificaram um aumento significativo nos níveis de peroxidação lipídica nos rins, fígado e pulmão após a administração de nanopartículas de sílica em uma concentração consideravelmente mais alta que neste trabalho, 50 mg/kg de SiO₂ intraperitonealmente por 6 semanas. Utilizando-se uma dose mais baixa de Si, 2 mg/kg/dia em 60 administrações intraperitoneais (12

semanas), aqui neste trabalho foi observado um aumento da peroxidação lipídica somente no rim no grupo tratado com Si, provavelmente pelo acúmulo do elemento no órgão por ter ultrapassado a sua capacidade excretora.

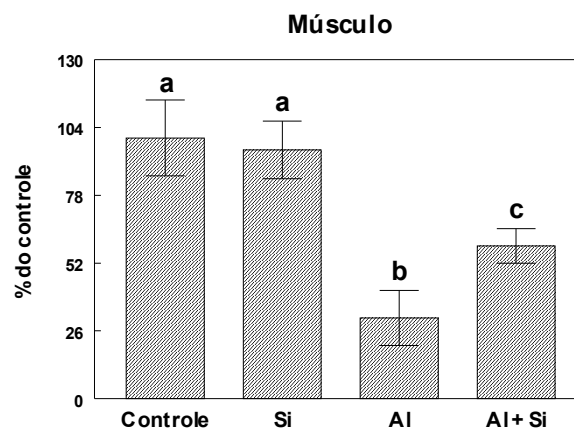


Figura 14: Níveis de MDA no músculo dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de Al e/ou Si. Cada coluna representa média \pm D.P. (n=5) como porcentagem do controle. A concentração de MDA no controle foi de 1294,89 nmolMDA/g de tecido. Nas colunas letras diferentes significam diferença significativa entre os grupos. One-way ANOVA–Duncan’s test ($p < 0,05$).

No músculo o Al reduz grandemente os níveis de MDA quando comparado aos grupos controle e Si. O Si tende a aumentar esses níveis quando administrado juntamente com o Al, mas não aos níveis do controle, figura 14.

O acúmulo de ALA, substrato 5-aminolevulinato, ocorre quando a atividade da enzima δ -ALA-D está diminuída e pode estar envolvido na produção excessiva de espécies ativas de oxigênio (SILVA et al., 2007). Neste caso, o aumento da atividade da enzima δ -ALA-D aumentando o consumo do substrato pode estar reduzindo o estresse oxidativo.

No músculo o Al aumentou a atividade da enzima δ -ALA-D e os níveis de MDA foram diminuídos, portanto a ativação da enzima pode estar exercendo atividade antioxidante. Essa ideia é reforçada ao verificar uma relação inversa, positiva e significativa no coeficiente de correlação de Pearson de -0,99 entre a atividade da δ -ALA-D (Figura 12) e o TBARS (Figura 14) no músculo dos ratos tratados com gluconato, Al e Si.

5.4.1.5.1. TBARS Cerebral

O cérebro pode ser particularmente vulnerável a danos oxidativos, e sabe-se que uma das vias de danos e morte de neurônios na doença de Alzheimer é mediada por radicais livres, principalmente porque o cérebro é rico em ácidos graxos peroxidáveis (KAIZER et al., 2005).

Os níveis de malondialdeído foram medidos nos homogenatos obtidos das estruturas cerebrais para avaliar o estresse oxidativo.

A administração de Al nos animais elevou os níveis de MDA no cerebelo e estriado e a presença do Si reduziu esses níveis nestas estruturas, figura 15. O efeito protetor do Si, diminuindo a peroxidação lipídica pode ser verificado com maior intensidade no estriado, onde os níveis de MDA não somente se igualam ao grupo controle, como acontece no cerebelo, mas são significativamente menores que este.

Gonzalez-Muñoz et al. (2008) mostraram que a inclusão de Si na dieta, em forma de cerveja ou de ácido silícico, reduz os efeitos nocivos do aumento da peroxidação cerebral, diminuindo níveis de Al no cérebro. Este achado é relevante porque o aumento dos níveis de estresse oxidativo e dos produtos da peroxidação lipídica no tecido cerebral são os fatores que mais contribuem no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. Nossos resultados também mostraram que o Si diminui os níveis de TBARS no cerebelo e em maior escala no estriado. Já no hipocampo a presença de Si e Al aumentam a peroxidação lipídica.

A peroxidação lipídica é uma causa importante de danos em neurônios, como em lesões isquêmicas, neurotrauma e doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Doença de Alzheimer. As experiências de Kaizer et al. (2005) demonstraram que Al aumenta a peroxidação lipídica, medida pela formação de TBARS, principalmente no córtex e hipocampo. Neste trabalho também se verificou que estas estruturas cerebrais são afetadas pelo Al, entretanto os resultados foram contraditórios no córtex onde a peroxidação lipídica diminui na presença do Al e o Si aparece como um indutor da formação de TBARS, figura 15.

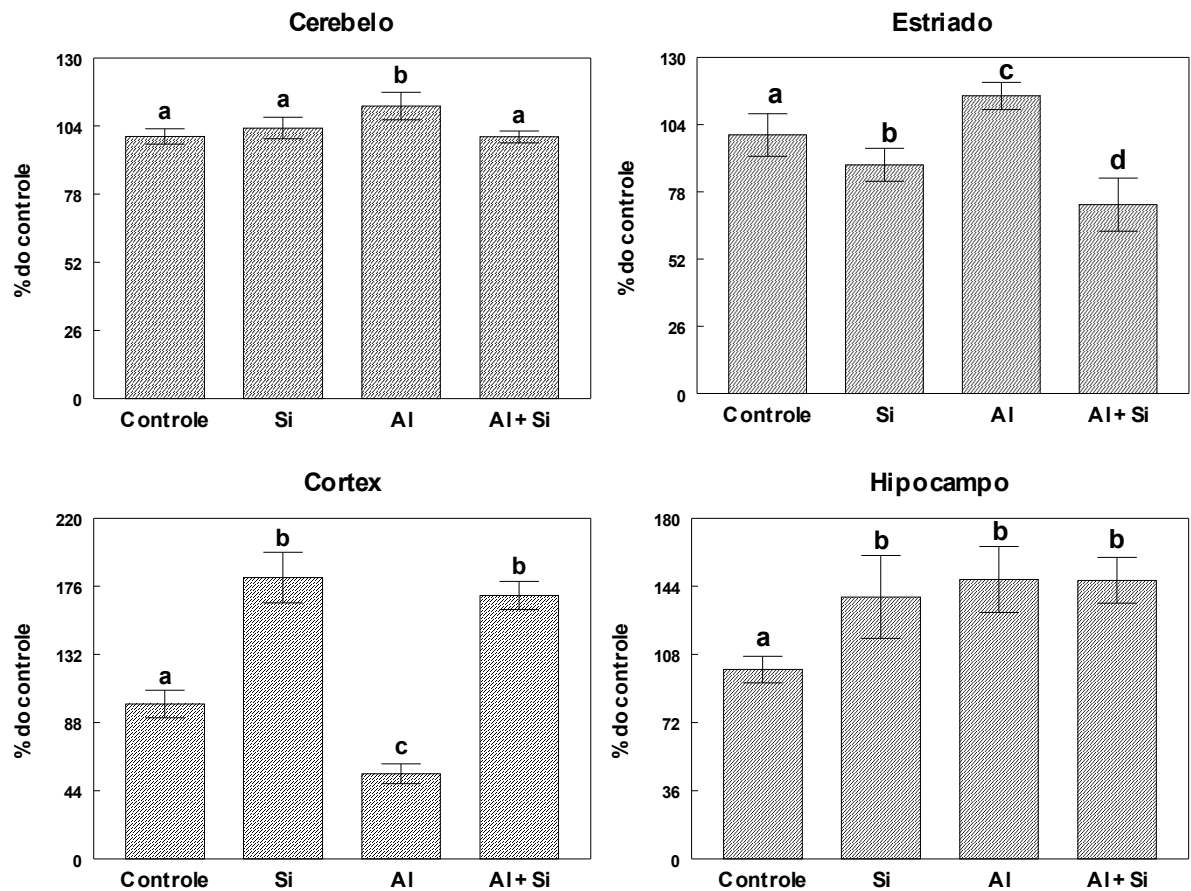


Figura 15: Níveis de MDA nas estruturas cerebrais dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de Al e/ou Si. Cada coluna representa média \pm D.P. ($n=5$) como porcentagem do controle. A concentração de MDA no controle foi de 40,10 no cerebelo, 28,66 no estriado, 42,42 no córtex e 26,93 no hipocampo, resultados expressos em nmolMDA/mg de proteína. Nas colunas letras diferentes significam diferença significativa entre os grupos. One-way ANOVA–Duncan’s test ($p < 0,05$).

Para a dosagem de TBARS no hipotálamo foi feito um “pool” das amostras de cada grupo, devido a isso os resultados não apresentam desvio padrão, tabela 15.

Tabela 15: Níveis de MDA no hipotálamo de ratos tratados com Al e/ou Si

Grupo	Controle	Si	Al	AI+Si
% do controle	100	83,43	80,13	77,10
MDA (nmol)/mg de proteína	21,8	18,2	17,4	16,8

No hipotálamo observa-se uma diminuição dos níveis de MDA nos grupos tratados de aproximadamente 20% em relação ao controle, entretanto não é possível afirmar que Al e Si diminuem a peroxidação lipídica nessa estrutura, pois não se sabe a variação entre os valores nos grupos. Mas verifica-se que o Al e o Si não aumentam o TBARS.

5.4.2. Tratamento com Al e Si e dihidrogenofosfato de potássio

O dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) é um dos componentes da nutrição parenteral que apresenta maior contaminação de Al e Si em solução. Apesar de não ter sido comprovado *in vitro* a formação de HAS na presença deste componente (NOREMBERG, 2010), sugerindo que o Si não teria efeito protetor da toxicidade do Al nesse meio, verificou-se neste trabalho *in vivo* a interferência do KH_2PO_4 na ação do Al e Si nos tecidos dos ratos.

5.4.2.1. Desenvolvimento dos animais durante o tratamento

Da mesma maneira que no tratamento com Al e Si, os animais tratados com Al, ou seja, os grupos Al+F e Al+Si+F, apresentaram irritabilidade e menor tolerância ao tratamento.

Também não há influência do tratamento no ganho de peso dos ratos, observa-se na figura 16 que o desenvolvimento dos animais em função do tempo de tratamento é semelhante entre os grupos.

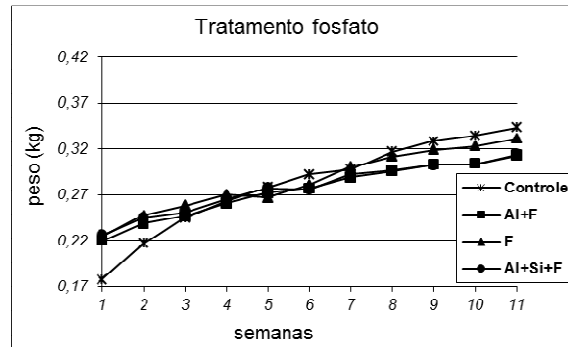


Figura 16: Médias semanais dos pesos dos animais durante os tratamentos para os quatro grupos: controle, Al com KH_2PO_4 , KH_2PO_4 , Al+Si com KH_2PO_4 . As doses foram: Al 0,5 mg/kg/dia, Si 2 mg/kg/dia, KH_2PO_4 62 mg/kg/dia.

5.4.2.2. Distribuição do alumínio nos tecidos dos ratos Wistar

Foi determinada a concentração de Al nos tecidos dos ratos após 60 administrações de Al e/ou Si com dihidrogenofosfato de potássio em concentração similar a encontrada em soluções para NP.

A concentração de Al nos grupos tratados com esse elemento é significativamente maior quando comparado aos grupos controle e Si no soro, fígado, pulmão e osso dos ratos tratados com KH_2PO_4 . É interessante observar que neste tratamento o pulmão apresenta grande aumento na concentração de Al nos grupos quando comparados ao controle (Figura 17), o que não ocorreu no tratamento somente com Al e Si (Figura 7). O fosfato, portanto, parece favorecer a permanência ou entrada do Al neste órgão.

No tratamento com fosfato a concentração de Al no osso não diminuiu na presença do Si no osso e aumentou no soro, fígado e pulmão (Figura 17). Nossos resultados *in vitro* justificam a menor proteção exercida pelo Si em meio de KH_2PO_4 , eles indicaram que deve ocorrer uma ligação entre essas duas espécies (NOREMBERG, 2010). Como o Si está ligado ao KH_2PO_4 , não há a formação de HAS e o Al fica livre em solução. A justificativa para a menor concentração do metal no grupo Al+F é que quando o Si não está presente o fosfato fica livre para interagir com o Al, diminuindo o seu acúmulo.

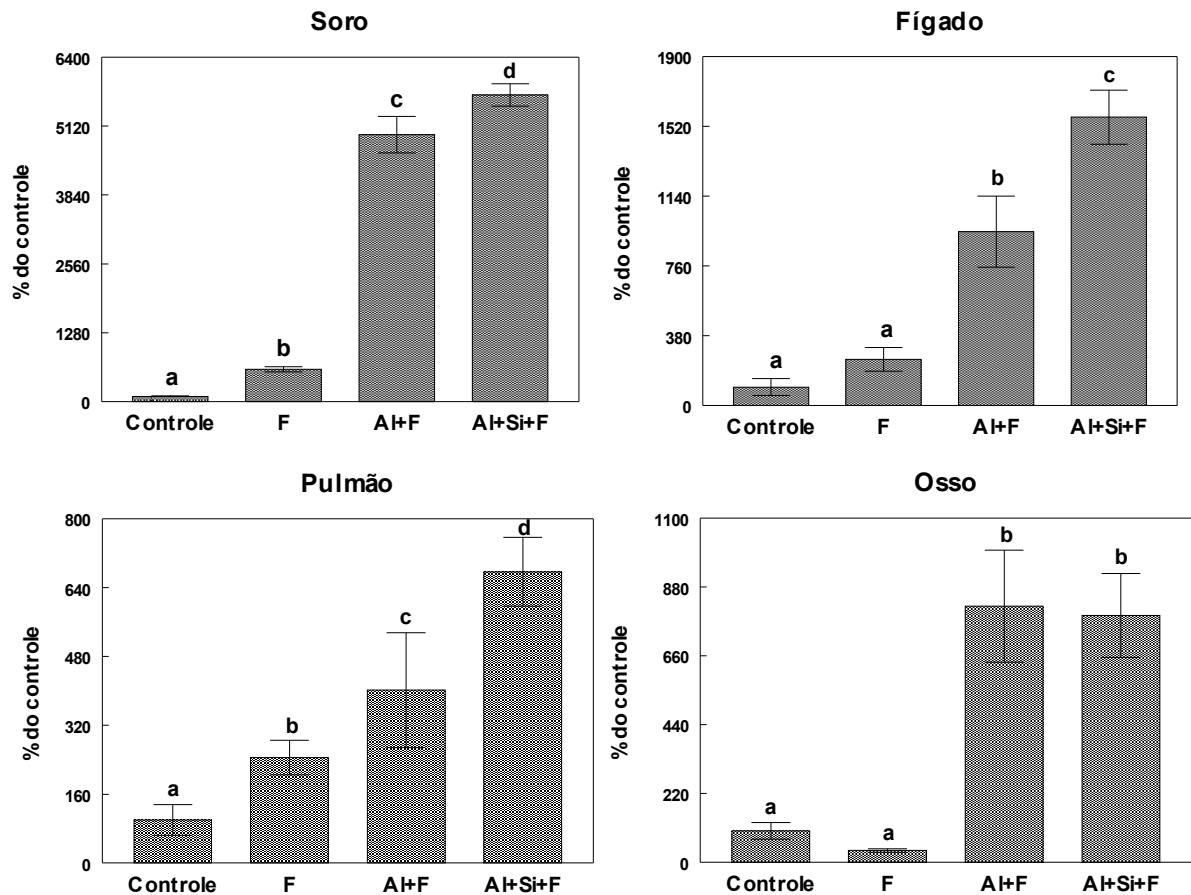


Figura 17: Concentração de Al no soro, fígado, pulmão e osso dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de KH_2PO_4 e Al e/ou Si. Cada coluna representa média \pm D.P. ($n=5$) como porcentagem do controle. A concentração de Al no controle foi de $1,82 \mu\text{g/L}$ no soro, $0,68 \mu\text{g/g}$ no fígado, $0,50 \mu\text{g/g}$ no pulmão e $1,19 \mu\text{g/g}$ no osso. Nas colunas letras diferentes significam diferença significativa entre os grupos. One-way ANOVA–Duncan’s test ($p < 0,05$).

Strekopytov e Exley (2005) concluíram, através da investigação da formação de HAS na presença equimolar de $\text{Si}(\text{OH})_4$ e fluoreto (F^-) ou fosfato (HPO_4^{-2}), que este último resulta na precipitação de hidroxifosfato de alumínio e inibe a formação de HAS, exceto quando a concentração de Al for significativamente superior a de HPO_4^{-2} , onde HAS foi co-precipitado. Não houve evidências de que o fosfato estivesse incluído na formação do HAS. Como a concentração de Al no presente estudo é menor do que a de fosfato, não deve ocorrer a formação de HAS e por essa razão neste meio o Si não diminui o acúmulo de Al nos órgãos.

No músculo, coração e rim também ocorreu o acúmulo de Al. A justificativa para uma maior concentração do metal no grupo Al+Si+F como ocorreu no soro, fígado e pulmão, também pode ser aplicada agora no rim, figura 18.

É importante observar que no músculo, coração e rim o grupo que recebeu administração de somente fosfato apresentou um acúmulo de Al na mesma proporção ou até maior que o grupo Al (no coração) (Figura 18). Possivelmente o KH_2PO_4 esteja mobilizando o Al presente no organismo do animal, pois mesmo os não tratados com o metal estão expostos a contaminação presente no ambiente, na alimentação e na água. No pulmão e no soro, figura 17, também ocorreu um aumento na concentração de Al no grupo F quando comparado ao controle, mas em menor proporção.

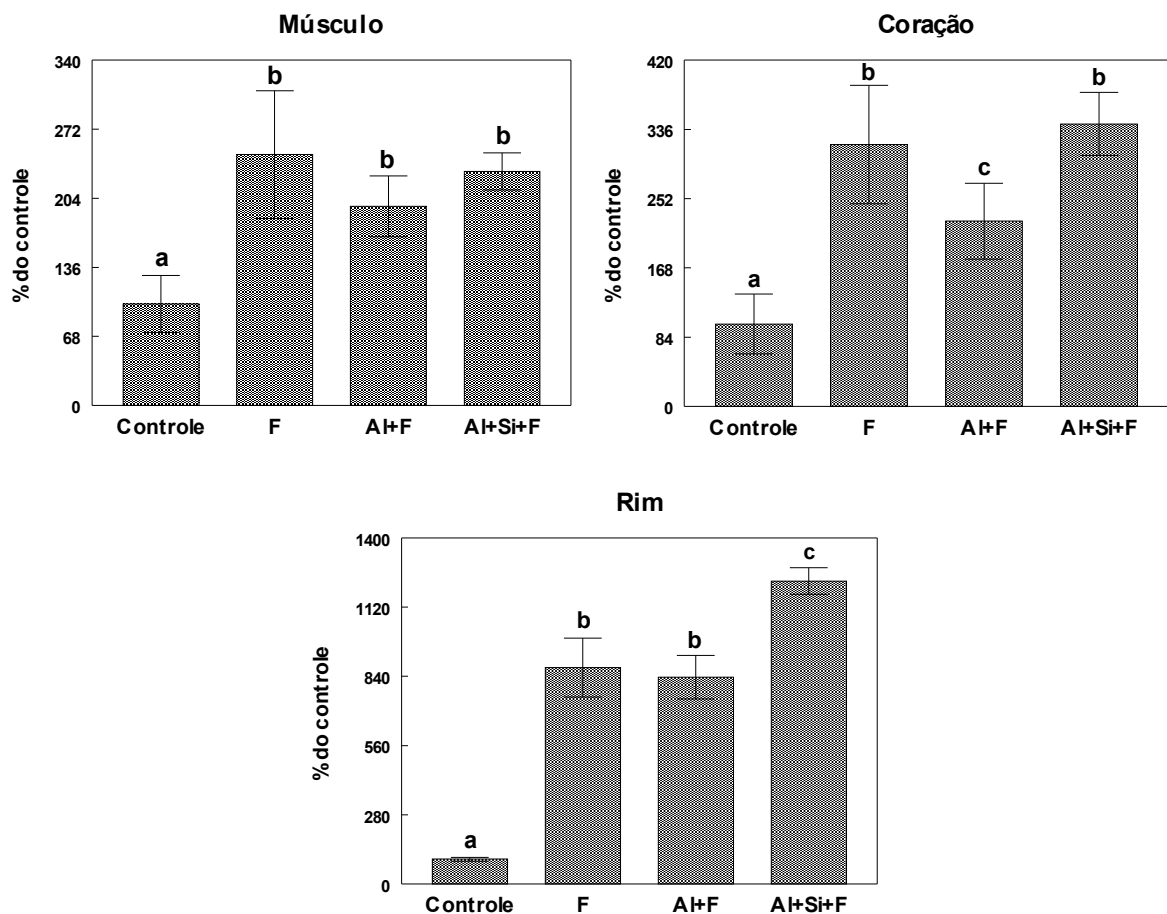


Figura 18: Concentração de Al no músculo, coração e rim dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de KH_2PO_4 e Al e/ou Si. Cada coluna representa média \pm D.P. (n=5) como porcentagem do controle. A concentração de Al no controle foi de 0,79 $\mu\text{g/g}$ no músculo, 0,57 $\mu\text{g/g}$ no coração e 0,21 $\mu\text{g/g}$ no rim. Nas colunas letras diferentes significam diferença significativa entre os grupos. One-way ANOVA–Duncan's test ($p < 0,05$).

Gura e Pharm (2010) salientaram que como os rins são a principal via de eliminação, os pacientes com maior risco de toxicidade ao alumínio são aqueles com função renal reduzida. Realmente o rim acumula grande parte do Al não excretado até mesmo em indivíduos com função renal normal, como podem ser considerados os ratos utilizados neste experimento.

No testículo (Figura 19) contraditoriamente ao comportamento nos demais órgãos, o Al se acumula somente nos grupos tratados com o metal, mas o Si diminui esse acúmulo, exercendo sua capacidade protetora mesmo em meio de KH_2PO_4 .

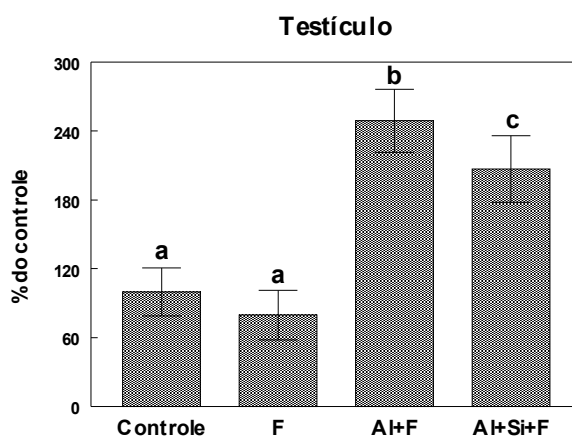


Figura 19: Concentração de Al no testículo dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de KH_2PO_4 e Al e/ou Si. Cada coluna representa média \pm D.P. (n=5) como porcentagem do controle. A concentração de Al no controle foi de 0,75 $\mu\text{g/g}$. Nas colunas letras diferentes significam diferença significativa entre os grupos. One-way ANOVA–Duncan's test ($p < 0,05$).

No cérebro novamente a concentração de Al aparece aumentada em todos os grupos tratados com o fosfato, figura 20, reforçando a hipótese de que este componente pode facilitar a entrada e a permanência do metal nestes tecidos. Além disso, o tratamento com KH_2PO_4 aumentou expressivamente a concentração de Al no cérebro quando comparado com o tratamento somente com Al e Si, figura 8.

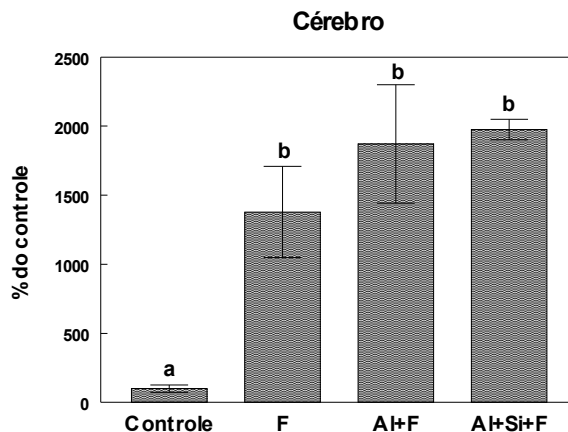


Figura 20: Concentração de Al no cérebro dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de KH_2PO_4 e Al e/ou Si. Cada coluna representa média \pm D.P. ($n=5$) como porcentagem do controle. A concentração de Al no controle foi de $0,076 \mu\text{g/g}$. Nas colunas letras diferentes significam diferença significativa entre os grupos. One-way ANOVA–Duncan’s test ($p < 0,05$).

5.4.2.3. Distribuição de silício nos tecidos dos ratos Wistar

Após 60 administrações intraperitoneais de dihidrogenofosfato de potássio e Al e/ou Si, mediu-se também a concentração de Si nos tecidos dos ratos.

No soro os níveis de Si são maiores nos grupos que receberam o tratamento com o de KH_2PO_4 quando comparados ao grupo controle. Esse comportamento se repete no músculo, coração e pulmão, figura 21. Assim como para o Al o fosfato parece mobilizar o Si presente no organismo e aumentar a sua concentração nos tecidos.

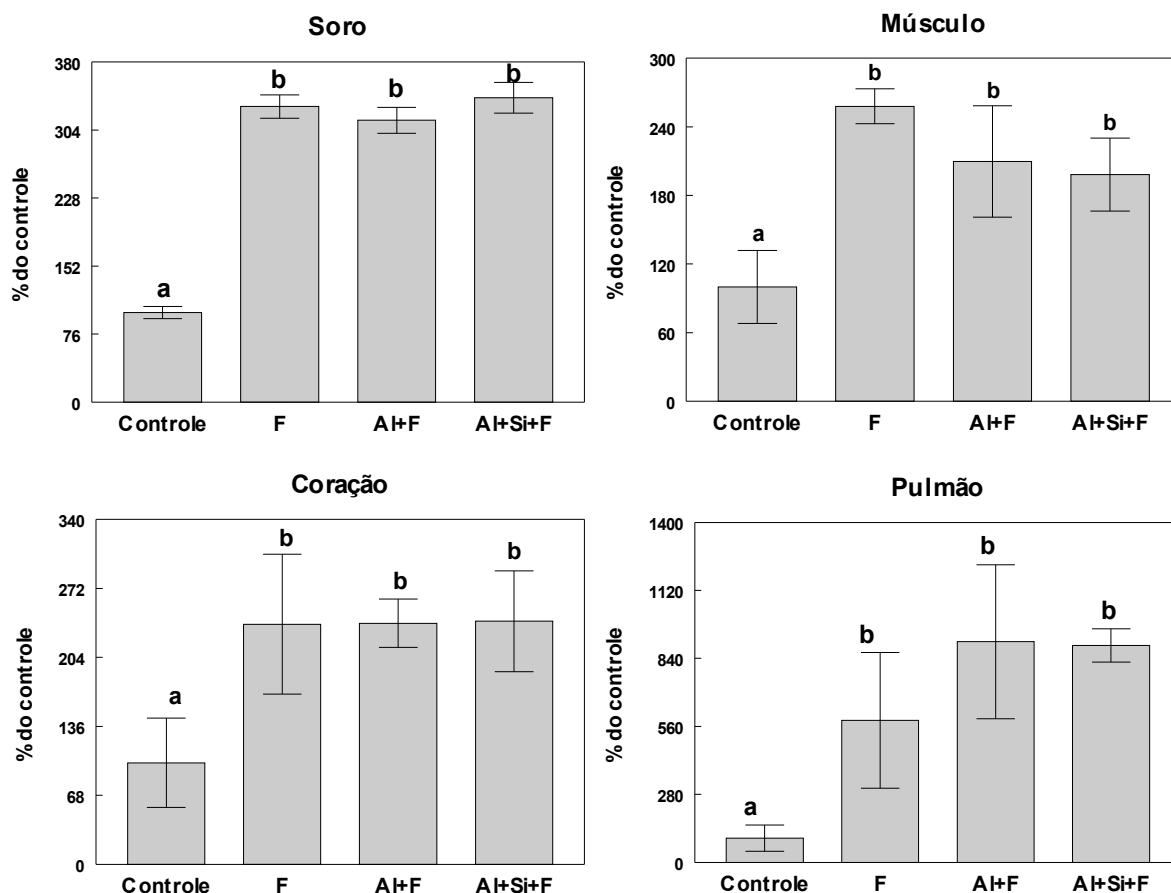


Figura 21: Concentração de Si no soro, músculo, coração e pulmão dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de KH_2PO_4 e Al e/ou Si. Cada coluna representa média \pm D.P. ($n=5$) como porcentagem do controle. A concentração de Si no controle foi de $61,06 \mu\text{g/g}$ no soro, $1,04 \mu\text{g/g}$ no músculo, $4,02 \mu\text{g/g}$ no coração e $1,09 \mu\text{g/g}$ no pulmão. Nas colunas letras diferentes significam diferença significativa entre os grupos. One-way ANOVA–Duncan’s test ($p < 0,05$).

A concentração de Si nesses órgãos é consideravelmente maior neste tratamento, com excessão do pulmão, quando comparado ao tratamento somente com Al e Si, provavelmente porque o fosfato se liga ao Si, como demonstrado *in vitro* (NOREMBERG, 2010), diminuindo a sua excreção e aumentando o acúmulo nos tecidos.

Schwarz (1977) argumenta que o silício atua no metabolismo do colesterol e há a hipótese de que a ausência de Si pode contribuir na etiologia da aterosclerose. O autor menciona que as formas ativas de silício funcionariam como constituintes essenciais do tecido conjuntivo e, assim, contribuiriam para a integridade e a estabilidade das paredes arteriais. Paar (1980) lembra que há uma relação negativa entre o teor de silício na parede arterial e a aterosclerose, sendo que em regiões de

"água dura" (teor de silício de 7 a 8 mg/L) encontra-se menor incidência de doenças coronarianas. Baseado nessas evidências, é possível sugerir que o fosfato, por aumentar a concentração de Si no coração poderia minimizar a incidência dessas doenças.

No rim não há diferença significativa na concentração de Si entre os grupos tratados e o controle, figura 22.

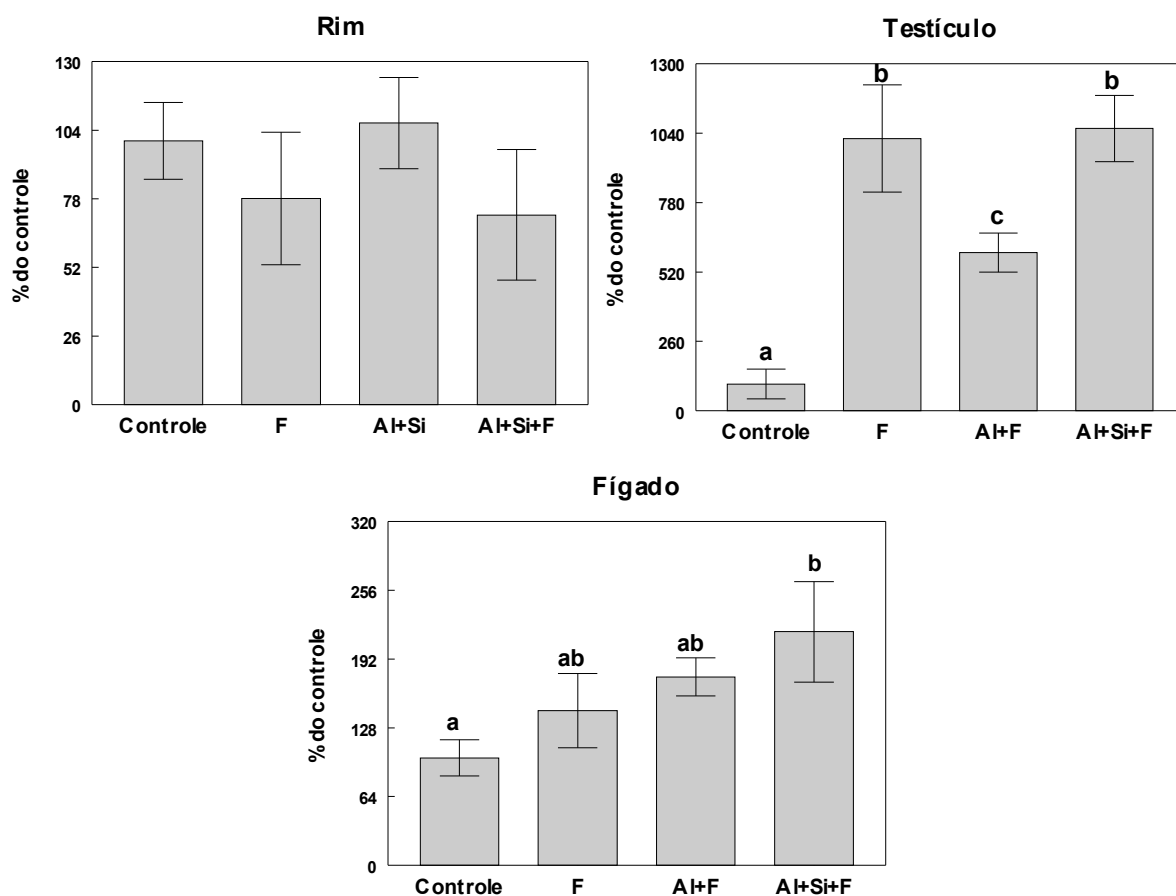


Figura 22: Concentração de Si no rim, testículo e fígado dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de KH_2PO_4 e Al e/ou Si. Cada coluna representa média \pm D.P. (n=5) como porcentagem do controle. A concentração de Si no controle foi de 3,47 $\mu\text{g/g}$ no rim, 2,45 $\mu\text{g/g}$ no testículo e 8,80 $\mu\text{g/g}$ no fígado. Nas colunas letras diferentes significam diferença significativa entre os grupos. One-way ANOVA–Duncan's test ($p < 0,05$).

No testículo novamente há acúmulo de Si nos grupos tratados com KH_2PO_4 , entretanto no grupo Al+F este foi menor (Figura 22). Já no fígado só há diferença

significativa na concentração de Si quando comparado ao controle no grupo tratado com Al+Si+F.

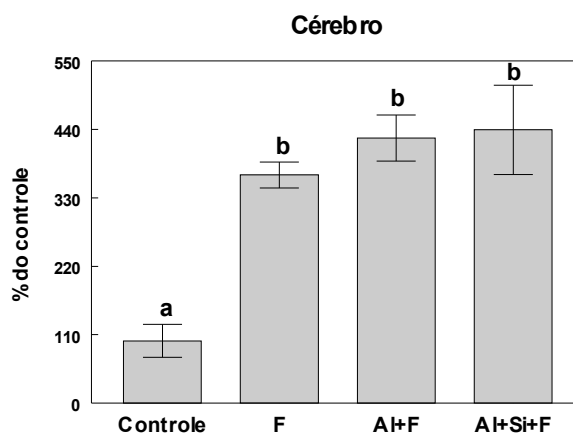


Figura 23: Concentração de Si no cérebro dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de de KH_2PO_4 e Al e/ou Si. Cada coluna representa média \pm D.P. ($n=5$) como porcentagem do controle. A concentração de Si no controle foi de 0,62 $\mu\text{g/g}$. Nas colunas letras diferentes significam diferença significativa entre os grupos. One-way ANOVA–Duncan’s test ($p < 0,05$).

Os níveis de Si no cérebro no tratamento com KH_2PO_4 são semelhantes aos encontrados no tratamento com Al e Si. Em todos os grupos tratados com fosfato a concentração do elemento aparece aumentada quando comparada ao controle, figura 23, como ocorreu em todos os tecidos neste tratamento, com excessão do rim. Como citado anteriormente o Al pode estar permitindo o ingresso do Si no tecido cerebral, aqui verificamos que o fosfato também parece exercer este papel.

5.4.2.4. δ -Aminolevulinato Desidratase (δ -ALA-D)

A atividade da enzima δ -ALA-D não foi alterada pelo tratamento com dihidrogenofosfato de potássio e Al e/ou Si no sangue, rim e testículo dos ratos, tabela 16.

Tabela 16: Níveis de porfobilinogênio no sangue (nmolPBG/h/mL), rim e testículo (nmolPBG/mgptn h) dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de Al e/ou Si e KH_2PO_4 .

Tecido	Grupos tratados			
	Controle	F	Al+F	Al+Si+F
Sangue	0,910 ± 0,107	0,760 ± 0,094	0,848 ± 0,112	0,76 ± 0,049
Rim	37,869 ± 1,968	40,000 ± 1,928	37,180 ± 2,522	36,229 ± 2,147
Testículo	9,872 ± 0,738	10,914 ± 0,729	9,920 ± 0,577	9,536 ± 0,112

Valores expressos como média ± EP, n = 5 para cada grupo tratado.

No tratamento anterior com Al e Si também não foram observadas alterações nos níveis de porfobilinogênio no sangue e testículo dos ratos. No rim, entretanto, o fosfato parece diminuir a ação do Al, pois no tratamento sem esse componente a enzima aparecia ativada na presença do metal e agora se apresentou inalterada. No fígado, coração e pulmão essa alteração também ocorre, figura 24.

No fígado e no coração a presença do fosfato aumenta a atividade da enzima, entretanto o Al diminui essa ação, pois no grupo Al+F essa ativação não é observada.

No fígado, coração, músculo e pulmão o acúmulo de Al foi maior nos grupos tratados com Al+Si+F quando comparados ao controle, podendo ser a justificativa para o aumento da atividade da enzima. Entretanto, no músculo todos os grupos tiveram uma concentração mais elevada de Al quando comparados ao controle, ocorrendo, portanto, uma relação direta entre o aumento da concentração de Al e a elevação da atividade da enzima nesses tecidos, com coeficiente de correlação de Pearson de 0,57, não significativo devido ao aumento pouco pronunciado nos níveis de MDA observado no grupo F comparado à concentração de Al.

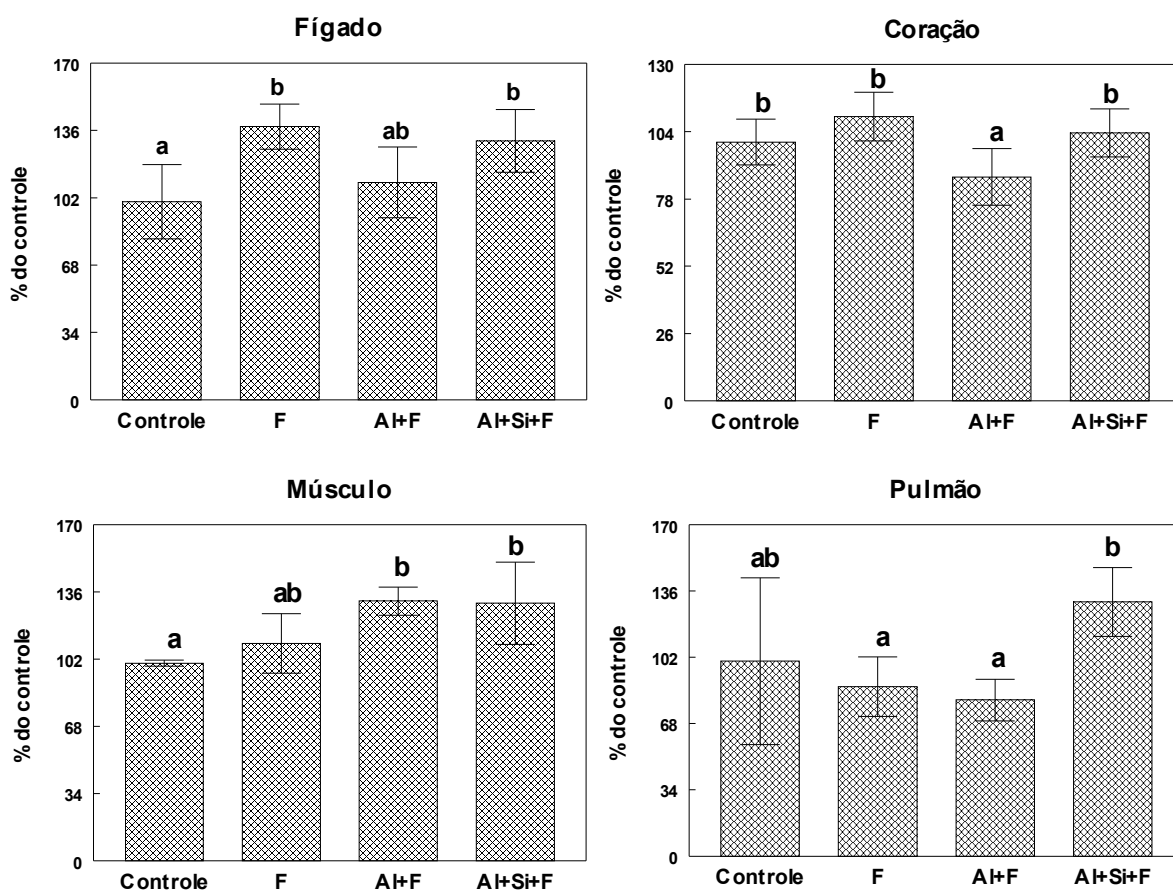


Figura 24: Efeito da administração intraperitoneal de KH_2PO_4 e Al e/ou Si na atividade da enzima δ -ALA-D no fígado, coração, músculo e pulmão dos ratos. Cada coluna representa média \pm D.P. ($n=5$) como porcentagem do controle. A atividade da δ -ALA-D no controle foi de 38,36 no fígado, 15,08 no coração, 8,21 no músculo e 11,38 no pulmão, resultados expressos em nmolPBG/mgptn h. Nas colunas letras diferentes significam diferença significativa entre os grupos. One-way ANOVA–Duncan's test ($p < 0,05$).

5.4.2.5. Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

No soro, rim (figura 13) e músculo (figura 14) dos ratos tratados com Al e Si verificou-se alteração nos níveis de TBARS. Contraditoriamente, no tratamento com fosfato não há diferença significativa entre os grupos tratados e o controle nesses tecidos, tabela 17. No coração e pulmão os níveis de MDA também não são alterados na presença de KH_2PO_4 , concordando com os resultados encontrados no tratamento com Al e/ou Si.

Tabela 17: Níveis de MDA no soro (nmolMDA/mL), rim, coração, músculo e pulmão (nmolMDA/g de tecido) dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de KH_2PO_4 e Al e/ou Si.

Tecido	Grupos tratados			
	Controle	F	Al+F	Al+Si+F
Soro	30,72 ± 2,4	38,27 ± 4,0	29,36 ± 3,4	43,12 ± 1,9
Rim	1865,55 ± 153,2	1694,63 ± 82,2	1877,10 ± 148,7	1614,81 ± 93,1
Coração	553,85 ± 25,2	514,24 ± 37,9	497,52 ± 21,2	511,20 ± 49,4
Músculo	1186,02 ± 98,4	1399,40 ± 115,5	1331,90 ± 100,1	1073,88 ± 71,7
Pulmão	774,05 ± 27,4	718,45 ± 78,4	640,90 ± 41,3	644,14 ± 62,5

Valores expressos como média ± EP, n = 5 para cada grupo tratado.

No fígado a administração de Si diminui significativamente os níveis de MDA quando comparado ao grupo controle, essa diminuição também pode ser percebida no testículo, entretanto o grupo tratado com Si é significativamente diferente do grupo Al+F, figura 25.

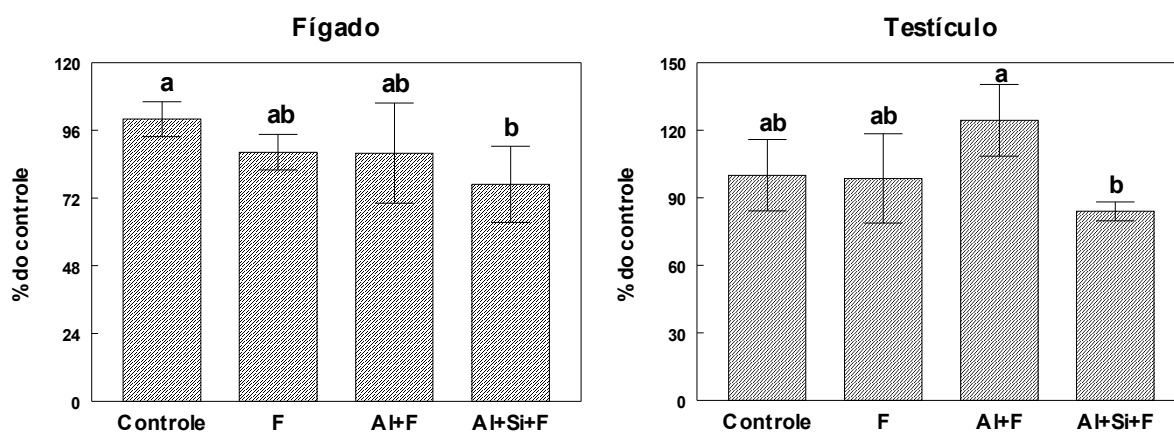


Figura 25: Níveis de MDA no fígado e testículo dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de KH_2PO_4 e Al e/ou Si (Si). Cada coluna representa média ± D.P. (n=5) como porcentagem do controle. A concentração de MDA no controle foi de 1532,41 no fígado e 394,86 no testículo, expressos em nmol MDA/g de tecido. Nas colunas letras diferentes significam diferença significativa entre os grupos. One-way ANOVA–Duncan's test ($p < 0,05$).

Yousef e Salama (2009) encontraram um aumento significativo nos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no testículo em ratos tratados com Al quando comparados com o grupo controle. Neste trabalho só foi verificada uma tendência a esse aumento no tratamento com fosfato. O aumento do TBARS nos testículos pode ser conferido à susceptibilidade dos espermatozóides ao dano oxidativo. Esses possuem alta concentração de ácidos graxos insaturados, limitada capacidade antioxidante, bem como a capacidade de gerar EROs (AITKEN, 1995). No tratamento com fosfato (Figura 25) a presença do Si parece inibir a tendência do Al em aumentar os níveis de MDA no testículo. O Si juntamente com o fosfato podem estar diminuindo a formação de EROs induzidas pelo Al.

5.4.2.5.1. TBARS cerebral

No tratamento com fosfato, a administração de Al com Si tende a aumentar o estresse oxidativo pelo aumento do TBARS no estriado (Figura 26). No hipocampo a administração de somente fosfato diminui os níveis de MDA. No cerebelo e cortex não verifica-se diferença significativa entre os grupos.

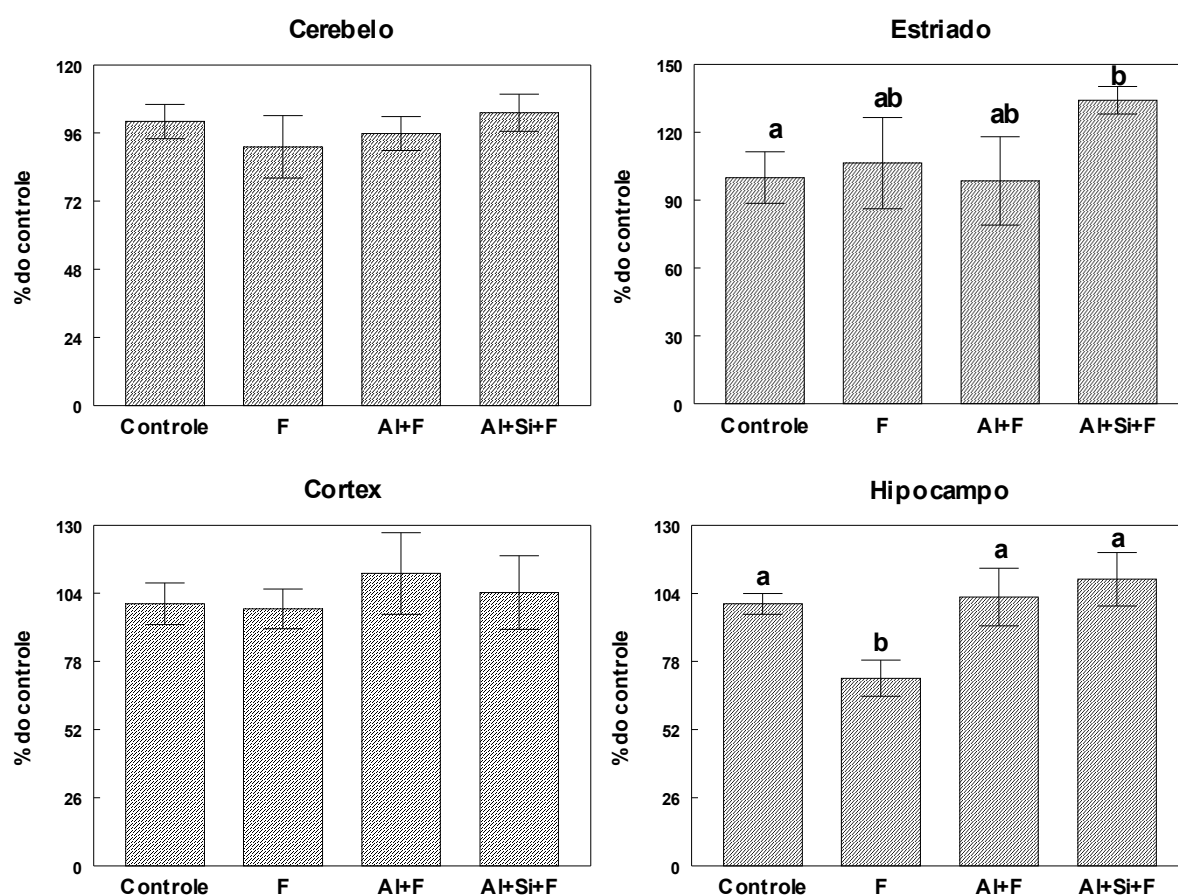


Figura 26: Níveis de MDA nas estruturas cerebrais dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de KH_2PO_4 e Al e/ou Si. Cada coluna representa média \pm D.P. ($n=5$) como porcentagem do controle. A concentração de MDA no controle foi de 32,74 no cerebello, 30,62 no estriado, 38,14 no córtex e 37,23 no hipocampo, resultados expressos em nmolMDA/mg de proteína. Nas colunas letras diferentes significam diferença significativa entre os grupos. One-way ANOVA–Duncan’s test ($p < 0,05$).

No hipotálamo o fosfato interfere de maneira contrária a encontrada no hipocampo, nos grupos tratados com o composto os níveis de MDA aparecem aumentados, principalmente no grupo que não recebeu Si e Al (grupo F), tabela 18.

Tabela 18: Níveis de MDA no hipotálamo de ratos tratados com KH_2PO_4 e Al e/ou Si

Grupo	Controle	F	Al+F	Al+Si+F
% do controle	100	241,1	156,1	127,2
MDA (nmol)/mg de proteína	21,9	52,7	34,1	28,7

O fosfato, portanto, não pode ser considerado um minimizador do stress oxidativo no cérebro, pela medida da peroxidação lipídica, pois apesar de diminuir os níveis de MDA no hipocampo, nas demais estruturas esse efeito não é observado.

5.4.3. Tratamento com Al e Si e gluconato de Ca

O gluconato de Ca foi escolhido para simular a interferência da NP na biodisponibilidade do Al na presença do Si *in vivo* por ser, assim como o dihidrogenofosfato de potássio, um dos componentes que apresenta maiores níveis de contaminação com esses elementos (BOHRER et al., 2002, 2008).

5.4.3.1. Desenvolvimento dos animais durante o tratamento

Como nos tratamentos anteriores, não foi percebida diferença no comportamento entre os grupos, com exceção dos ratos dos grupos tratados com Al, que apresentaram irritabilidade e menor tolerância ao tratamento.

Relacionando-se o desenvolvimento com o peso dos animais, observa-se no tratamento com gluconato de Ca, figura 27, que os animais do grupo controle, os quais não receberam a administração do sal, tem menor ganho de peso que os demais.

O ácido glucônico e os sais de gluconato derivam da oxidação incompleta da glicose. O ácido glucônico pode ser transformado em 6-fosfogluconato, composto que faz parte da rota de oxidação da glicose pela via das pentoses (Ramachandran et al., 2006). Com a administração de gluconato nos animais, pode ter ocorrido uma diminuição do consumo de glicose, pois o sal forma um subproduto de sua oxidação. A glicose proveniente da alimentação e até mesmo o gluconato podem não ter sido totalmente utilizados e o excesso pode ter sido usado na síntese de lipídeos. Essa pode ser a possível causa para o maior ganho de peso dos animais tratados com o gluconato de Ca.

Outra explicação para o ganho de peso dos animais pode ser que durante a oxidação do 6-fosfogluconato ocorre a formação NADPH na via das pentoses e os tecidos utilizam o NADPH produzido por essa via para a síntese de ácidos graxos (NELSON; COX, 2006).

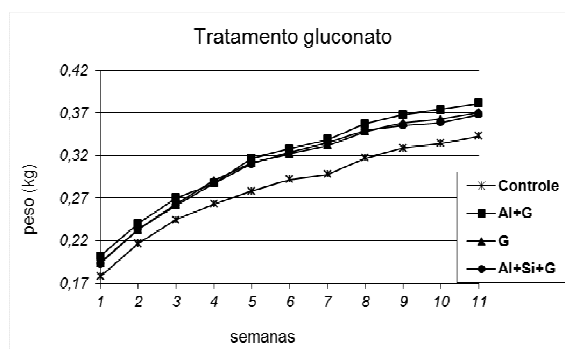


Figura 27: Médias semanais dos pesos dos animais durante os tratamentos para os quatro grupos: controle, Al com gluconato de Ca, gluconato de Ca e Al+Si com gluconato de Ca. As doses foram: Al 0,5 mg/kg/dia, Si 2 mg/kg/dia e gluconato de Ca 16 mg/kg/dia.

5.4.3.2. Distribuição do alumínio nos tecidos dos ratos Wistar

Nossos resultados *in vitro* não comprovaram a interação do Al e Si em meio ao gluconato de Ca, pois para todas as concentrações de Si a concentração de Al aparecia diminuída na solução filtrada (NOREMBERG, 2010), concluindo-se assim que o gluconato interage com o Al, impedindo a interação com o Si para formar HAS de menor biodisponibilidade.

É possível perceber um grande aumento na concentração de Al no soro, pulmão e principalmente no fígado dos ratos tratados com o metal. E realmente em meio ao gluconato de Ca não há diminuição da concentração do Al na presença do Si nesses tecidos, figura 28.

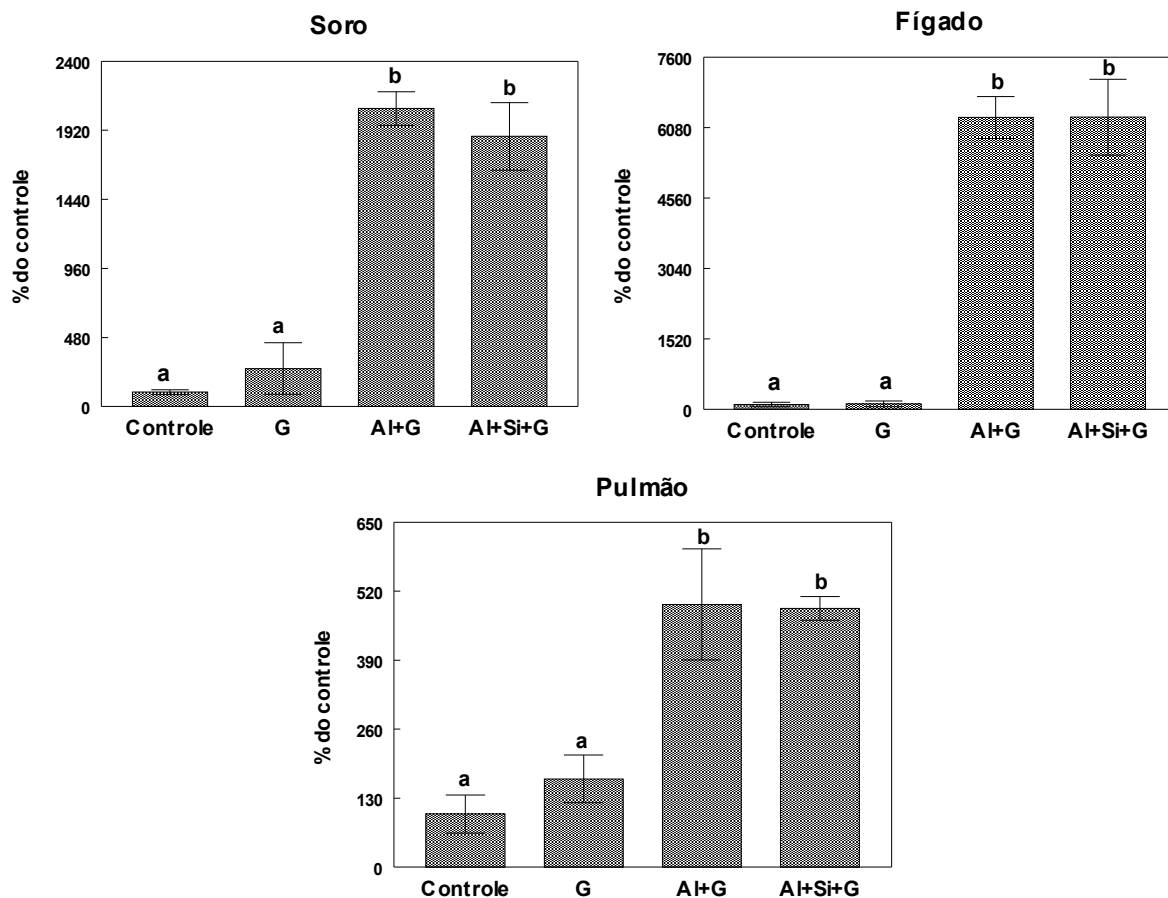


Figura 28: Concentração de Al no soro, fígado e pulmão dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de gluconato de Ca e Al e/ou Si. Cada coluna representa média \pm D.P. (n=5) como porcentagem do controle. A concentração de Al no controle foi de 1,55 $\mu\text{g/L}$ no soro, 0,76 $\mu\text{g/g}$ no fígado e 0,45 $\mu\text{g/g}$ no pulmão. Nas colunas letras diferentes significam diferença significativa entre os grupos. One-way ANOVA–Duncan's test ($p < 0,05$).

Um dado importante a considerar é o grande aumento da concentração de Al no fígado dos ratos neste tratamento, de até 4 vezes mais que nos anteriores.

No rim, osso e testículo, onde também ocorre a deposição de Al nos grupos tratados com o metal, o Si diminui a sua biodisponibilidade, diminuindo a concentração do Al mesmo em meio ao gluconato de Ca, figura 29.

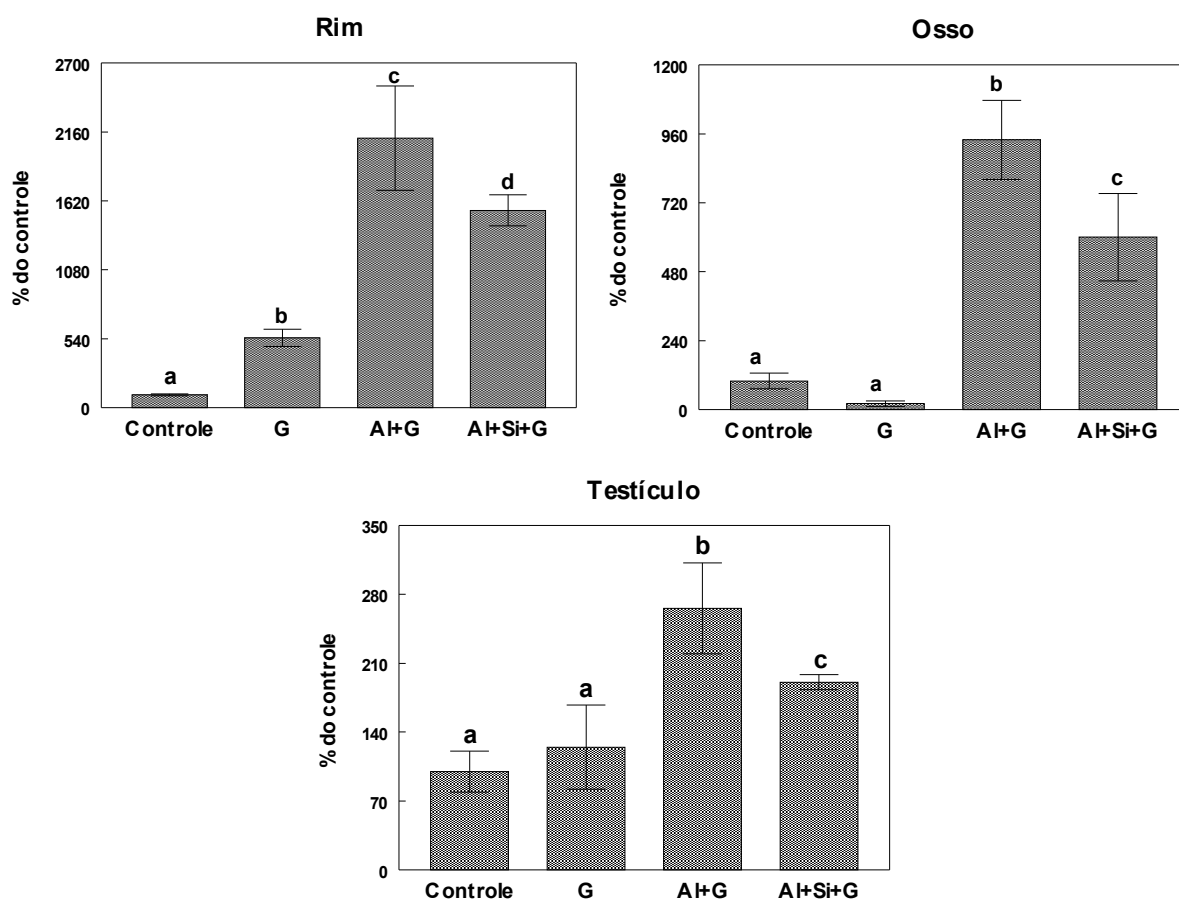


Figura 29: Concentração de Al no rim, osso e testículo dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de gluconato de Ca e Al e/ou Si. Cada coluna representa média \pm D.P. ($n=5$) como porcentagem do controle. A concentração de Al no controle foi de $0,38 \mu\text{g/g}$ no rim, $1,14 \mu\text{g/g}$ no osso e $0,69 \mu\text{g/g}$ no testículo. Nas colunas letras diferentes significam diferença significativa entre os grupos. One-way ANOVA–Duncan's test ($p < 0,05$).

Não é possível esclarecer de que maneira, mas as diferentes características e funções dos tecidos interferem na capacidade de deposição e de interação entre o Al e Si na presença do gluconato. Por exemplo, no fígado no tratamento somente com Al e Si este último diminuía o acúmulo do metal, entretanto não demonstrou essa capacidade em meio ao gluconato. Já no testículo, onde no tratamento sem os componentes da NP não foi observado aumento da concentração de Al, neste tratamento este foi verificado, com redução na presença do Si.

Perry & Keeling-Tucker (1998) encontraram silício nas áreas de crescimento ativo no osso jovem de camundongos e ratos e com o aumento da mineralização, as concentrações de cálcio e de silício aumentaram congruentemente. A fase mineral do osso é composta principalmente de cálcio e fosfato. Uma variedade de metais

que podem estar presentes na corrente sanguínea é retida pelo tecido esquelético. A absorção pelo tecido esquelético é uma função da afinidade de um dado metal pelo mineral ósseo e pela matriz extracelular e da concentração do metal no plasma. É também uma função do grau de mineralização do esqueleto (BRONNER, 2008). Considerando que o Si pode estar diretamente ligado ao aumento da mineralização óssea, a sua presença pode diminuir a absorção de metais, neste caso o Al. Isso justificaria a diminuição do acúmulo de Al no osso quando Si e gluconato de Ca são injetados juntamente com o metal, a presença de Si e Ca teriam aumentado a mineralização óssea e ocasionado a diminuição da absorção de Al.

Segundo Gura e Pharm (2010), o alumínio afeta o desenvolvimento dos ossos por uma variedade de mecanismos. Quando níveis elevados são encontrados no osso, a mineralização é prejudicada. O Alumínio atua diretamente sobre o osso por induzir a deficiência de fosfato através da sua ligação com o fósforo e pode prejudicar a absorção de cálcio pelos ossos. Cofirmou-se nesse trabalho que o Al se acumula no osso durante os tratamentos, podendo causar danos neste tecido.

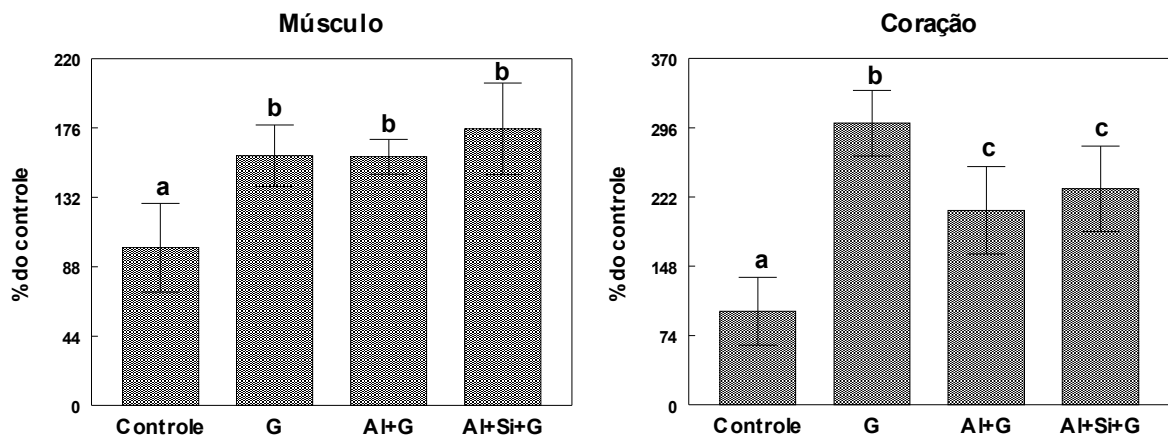


Figura 30: Concentração de Al no músculo e coração dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de gluconato de Ca e Al e/ou Si. Cada coluna representa média \pm D.P. (n=5) como porcentagem do controle. A concentração de Al no controle foi de 0,80 $\mu\text{g/g}$ no músculo e 0,68 $\mu\text{g/g}$ no coração. Nas colunas letras diferentes significam diferença significativa entre os grupos. One-way ANOVA–Duncan’s test ($p < 0,05$).

No músculo e coração novamente verifica-se uma diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle, figura 30. Nesses tecidos e no rim, em menor

escala, no grupo gluconato ocorre acúmulo de Al. Esse comportamento também foi observado nesses e em outros tecidos no tratamento fosfato. Parece que o gluconato possui a mesma capacidade de mobilizar o Al presente no organismo e aumentar o seu depósito nesses tecidos. Também pode-se observar que o Si não diminui a concentração do metal acumulado.

No cérebro o gluconato também aumenta a concentração de Al em todos os grupos em relação ao controle, e não observa-se efeito protetor do Si, figura 31.

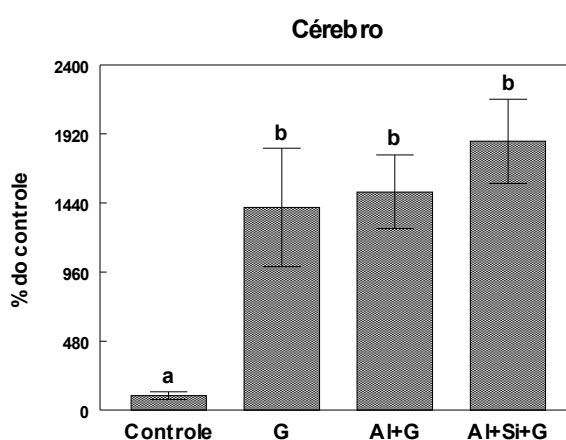


Figura 31: Concentração de Al no cérebro dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de gluconato de Ca e Al e/ou Si. Cada coluna representa média \pm D.P. (n=5) como porcentagem do controle. A concentração de Al no controle foi de 0,073 $\mu\text{g/g}$. Nas colunas letras diferentes significam diferença significativa entre os grupos. One-way ANOVA–Duncan's test ($p < 0,05$).

O primeiro passo na captação de íons de metal no cérebro é a passagem através da barreira sangue-cérebro. Essa barreira é formada por uma única camada de células unidas por junções estreitas. Para atravessar a barreira, a maioria dos solutos devem, portanto: (i) dissolver e se difundirem através dos lipídios da membrana da célula por difusão passiva, que depende muito da lipofilicidade da substância, ou (ii) ser transportados através de um transportador específico, canal ou mecanismo receptor, por exemplo glicose (BERTHON, 2002). O Gluconato de Ca e o dihidrogenofosfato de potássio parecem ser facilitadores da passagem do Al pela barreira sangue-cérebro, podendo estar agindo como transportadores (como citado em ii), já que nestes tratamentos a concentração do metal é bem mais alta quando comparadas as do tratamento somente com Si e Al.

O Al foi associado a doenças neurológicas em pacientes que recebem nutrição parenteral a longo prazo e prematuros que recebem alimentação intravenosa (KLEIN et al., 1991; KLEIN, 2005; BISHOP et al., 1997). Essa afirmação concorda com nossos resultados, pois os componentes da nutrição parenteral, o gluconato de Ca e o dihidrogenofosfato de K, aumentaram a concentração de Al no cérebro.

Gonzalez-Muñoz e colaboradores (2008) verificaram que o ácido silícico, quando dissolvido juntamente com o Al na água de beber durante três meses, reduz a concentração do metal no cérebro de camundongos, chegando aos mesmos valores observados no grupo controle. Neste trabalho, verificou-se que a administração de Si juntamente com o Al intraperitonealmente não diminui a retenção do metal no cérebro dos ratos em nenhum dos tratamentos, demonstrando que nesta via de administração o Si não atua como protetor na disponibilidade do Al neste tecido.

5.4.2.3. Distribuição de silício nos tecidos dos ratos Wistar

A concentração de silício nos tecidos dos ratos tratados com gluconato de Ca e Al e/ou Si também foi determinada após 60 administrações intraperitoneais, simulando o tratamento de NP.

No soro e músculo verificou-se um aumento significativo da concentração de Si tanto nos grupos tratados com o elemento como nos que receberam gluconato e gluconato e Al quando comparados ao controle, figura 32. Novamente, como observado no tratamento com fosfato, nota-se que o gluconato é capaz de mobilizar o Si presente no organismo e concentrá-lo em alguns tecidos. Esse comportamento também ocorre no testículo, entretanto nesse órgão e no coração a presença do Al diminui o acúmulo do Si.

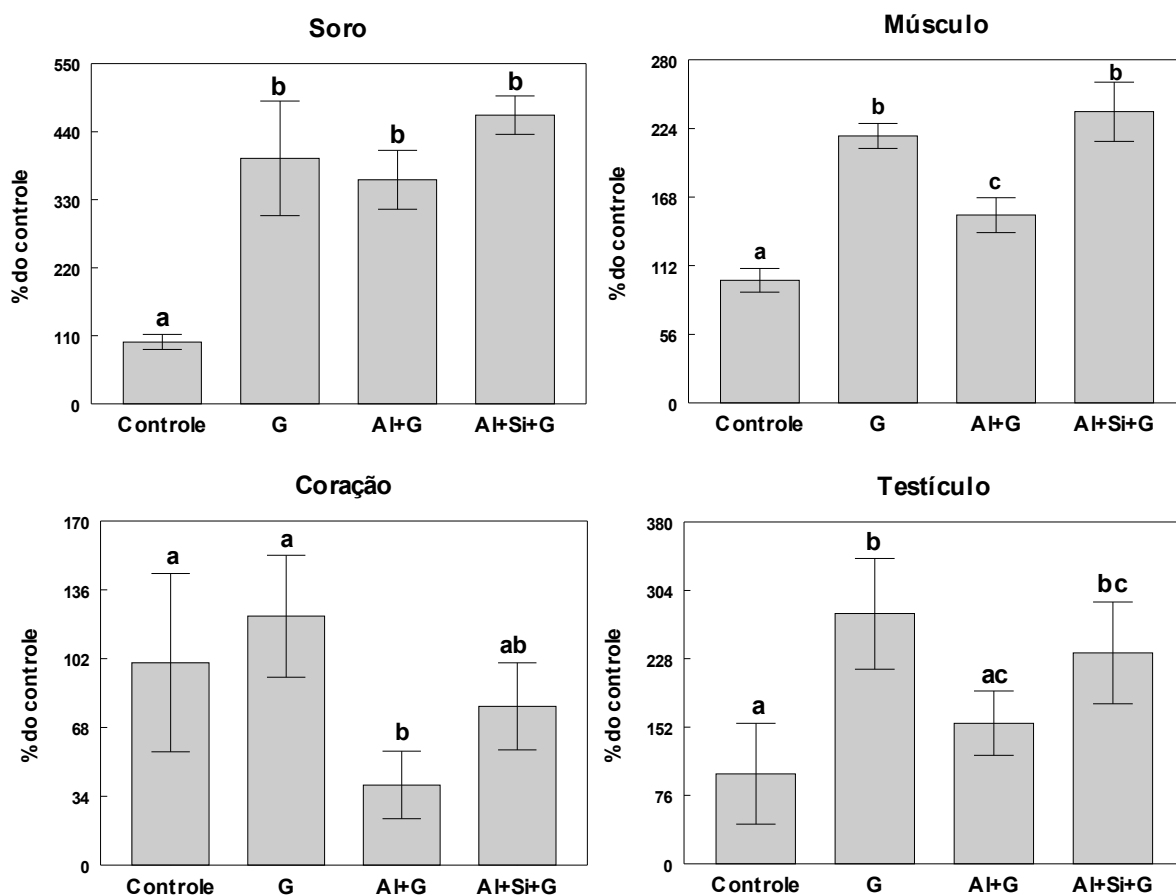


Figura 32: Concentração de Si no soro, músculo, coração e testículo dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de gluconato de Ca e Al e/ou Si. Cada coluna representa média \pm D.P. ($n=5$) como porcentagem do controle. A concentração de Si no controle foi de 59,46 $\mu\text{g/L}$ no soro, 1,54 $\mu\text{g/g}$ no músculo, 3,98 $\mu\text{g/g}$ no coração e 2,45 $\mu\text{g/g}$ no testículo. Nas colunas letras diferentes significam diferença significativa entre os grupos. One-way ANOVA–Duncan's test ($p < 0,05$).

O sangue media as interações metabólicas entre todos os tecidos (NELSON; COX, 2006), portanto o que não for metabolizado ou armazenado nos tecidos permanece nele, justificando a maior concentração de Si e Al observada no soro durante os tratamentos. Mesmo os animais que receberam somente gluconato de Ca e dihidrogeniofosfato de potássio, apresentaram grandes níveis de Si no soro, provavelmente porque esses compostos fixam o elemento diminuindo ou retardando o seu metabolismo.

Bissé et al. (2005) demonstraram que o teor de silício da aorta humana diminui com a idade e que a concentração de silício na parede arterial diminui com o desenvolvimento da aterosclerose, o que mostra que esse elemento deve ter relação com o bom funcionamento das funções arteriais. Nossos resultados mostraram que

o gluconato e o fosfato aumentam a concentração de Si no coração, o que pode ser importante para a manutenção da estrutura arterial. Landeghem et al. (1998) também verificaram o acúmulo de Si na pele e na aorta. O fato do Al diminuir a concentração de Si no coração pode ser considerado uma influência negativa da sua administração.

No fígado, rim e pulmão não há diferença significativa na concentração de Si entre os grupos tratados com gluconato de Ca, Al e Si e o grupo controle, tabela 19.

Tabela 19: Concentração de Si ($\mu\text{g/g}$) no fígado, rim e pulmão dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de gluconato de Ca e Al e/ou Si.

Tecido	Grupos tratados			
	Controle	G	Al+G	Al+Si+G
Fígado	$1,860 \pm 0,137$	$2,375 \pm 0,405$	$2,056 \pm 0,384$	$2,251 \pm 0,877$
Rim	$2,354 \pm 0,142$	$2,292 \pm 0,315$	$2,619 \pm 0,264$	$2,320 \pm 0,239$
Pulmão	$1,083 \pm 0,183$	$0,987 \pm 0,143$	$1,555 \pm 0,076$	$1,324 \pm 0,170$

Valores expressos como média \pm EP, $n = 5$ para cada grupo tratado.

No cérebro o gluconato de Ca também aumenta a deposição do Si, mesmo quando administrado com Al, figura 33.

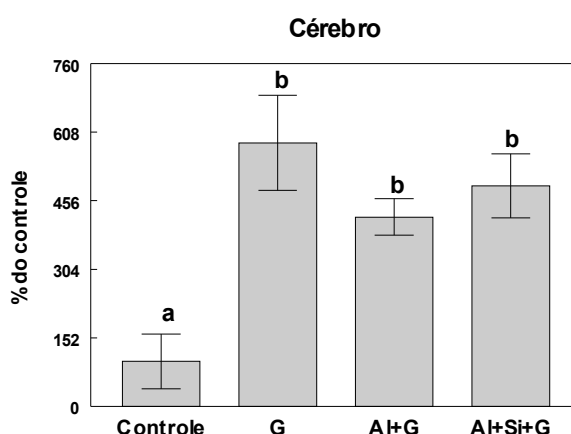


Figura 33: Concentração de Si no cérebro dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de gluconato de Ca e Al e/ou Si. Cada coluna representa média \pm D.P. ($n=5$) como porcentagem do controle. A concentração de Si no controle foi de $0,60 \mu\text{g/g}$. Nas colunas letras diferentes significam diferença significativa entre os grupos. One-way ANOVA–Duncan's test ($p < 0,05$).

O Si é considerado por muitos um elemento essencial. No entanto, a teoria que prevalece é que ele pode proteger, em virtude de um mecanismo evolutivo, contra a toxicidade de alumínio. Uma série de sítios biológicos tem sido identificados em que Si e Al são co-depositados ou co-localizados. Uma das áreas investigadas em maior detalhe é o núcleo da placa senil no córtex cerebral de pacientes portadores de demência senil tipo Alzheimer. Medidas de ressonância magnética nuclear de alta resolução de estado sólido em regiões centrais dessas placas têm mostrado que o Si e Al estão presentes como uma espécie de alumínossilicato (BIRCHALL; CHAPPELL, 1989). Esta suposição resultou em grande debate sobre o uso de suplementos alimentares de Si como uma medida preventiva para esta doença, embora tais estruturas de placa também tivessem sido observadas em pacientes idosos mentalmente normais (GONZALEZ-MUÑOZ, 2008). Nosso estudo confirmou esta co-deposição de Al e Si no cérebro dos ratos, os tratamentos, principalmente com fosfato e gluconato, aumentaram a concentração dos elementos nos grupos quando comparados ao controle. Além disso, não foi verificada uma diminuição da concentração de Al no cérebro dos ratos tratados com Si, demonstrando que o Si não previne a deposição de Al neste tecido.

5.4.2.4. δ -Aminolevulinato Desidratase (δ -ALA-D)

A atividade da enzima não foi alterada no sangue nos tratamentos anteriores. Neste tratamento, com gluconato de Ca, a presença do Al aumenta de forma significativa a atividade da δ -ALA-D no sangue. No fígado e testículo os níveis de porfobirinogênio também aparecem aumentados nos grupos tratados com Al, figura 34. Nestes tecidos, o Si não diminui significativamente a elevação da enzima, observada no grupo Al+G.

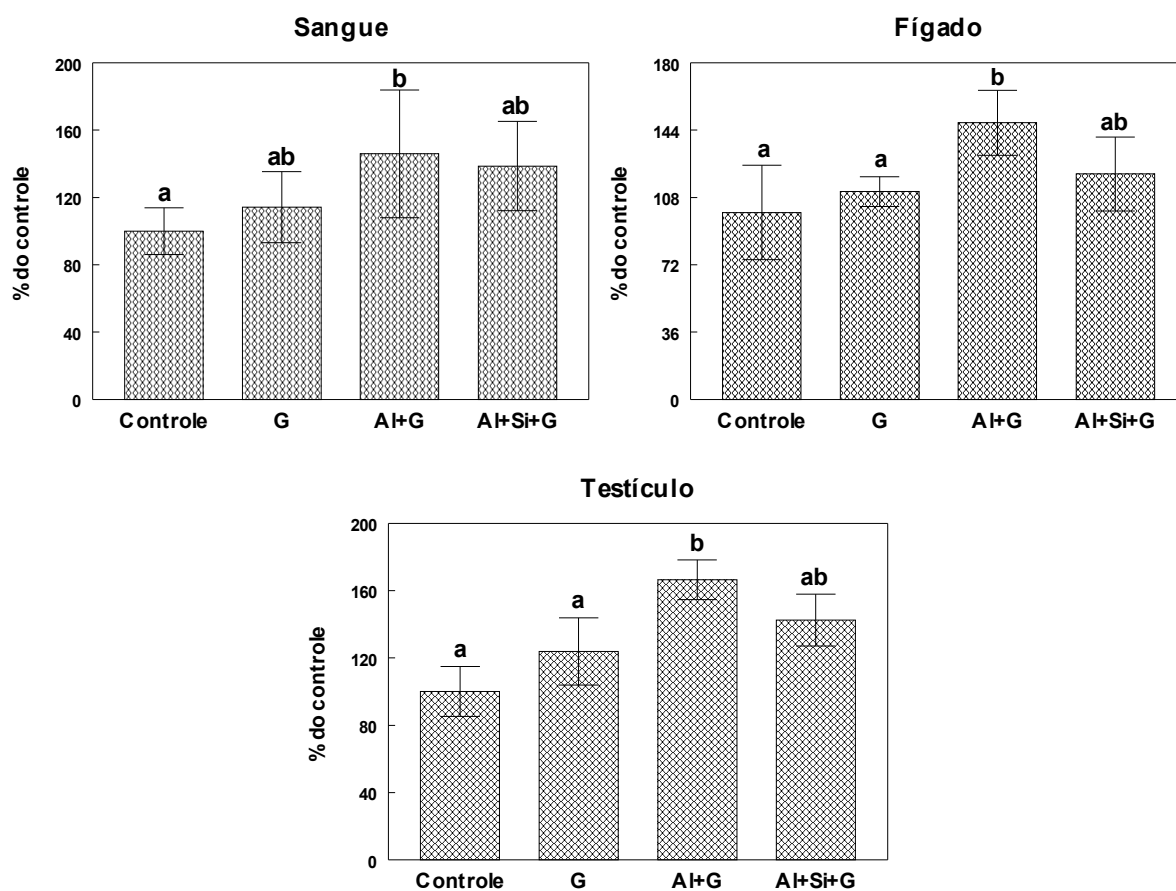


Figura 34: Efeito da administração intraperitoneal de gluconato de Ca e Al e/ou Si na atividade da enzima δ -ALA-D no sangue, fígado e testículo dos ratos. Cada coluna representa média \pm D.P. (n=5) como porcentagem do controle. A atividade da δ -ALA-D no controle foi de 1,56 nmolPBG/h/mL no sangue, 65,86 nmolPBG/mgptn h no fígado e 9,31 nmolPBG/mgptn h no testículo. Nas colunas letras diferentes significam diferença significativa entre os grupos. One-way ANOVA–Duncan's test ($p < 0,05$).

Valentini e colaboradores (2007) atribuíram à inibição da atividade da enzima δ -ALA-D em pacientes de hemodiálise ao maior nível de Al encontrado no sangue destes pacientes. Entretanto eles dizem que o envolvimento do Al na inibição da δ -ALA-D nesses pacientes não está bem esclarecido, pois outros estudos não detectaram este comportamento após a intoxicação aguda. No presente trabalho, também não foi verificada a inibição da enzima durante o tratamento crônico com Al, e, contraditoriamente, na maioria das vezes é ativada na presença do metal.

Schetinger et al. (1999) relataram que a inibição *in vitro* da enzima hepática foi observada somente em altas concentrações de alumínio (superior a 4,0 mM). Baseado no efeito inibitório de uma dose elevada de alumínio seria mais razoável

esperar uma inibição da δ -ALA-D hepática após exposição *in vivo*. No entanto, a atividade da δ -ALA-D hepática de ratos expostos ao alumínio na água potável foi aumentada cerca de 30-40% quando comparado ao grupo controle. Além disso, a ativação causada pelo alumínio foi provavelmente relacionada ao aumento na concentração de alumínio neste órgão. A maior concentração do Al pode ser a justificativa para a elevação da atividade da enzima encontrada no tratamento com gluconato, pois neste caso o acúmulo de Al foi bem maior que nos demais tratamentos e apresentou coeficiente de correlação de Pearson de 0,80, que, apesar de não ser significativo, representa uma considerável relação direta entre as duas variáveis.

A maior deposição de alumínio no fígado observada no presente estudo está em conformidade com as conclusões do Fiejka e colaboradores (1996) que mostraram que o fígado é o principal órgão alvo para o acúmulo e toxicidade do metal. Presumivelmente, a ativação hepática da δ -ALA-D pode ser considerada como uma manifestação da toxicidade do alumínio, ou como parte de uma resposta adaptativa hepática ao seu acúmulo.

No testículo, sangue e rim também observa-se uma correlação direta entre a concentração de Al e os níveis de porfobilinogênio, $r=0,97$, $0,98$ e $0,94$ respectivamente, sugerindo que o acúmulo do metal interfere na atividade da enzima nesses tecidos.

No rim, pulmão, músculo e coração a atividade da enzima δ -ALA-D também é ativada na presença do Al (Figura 35), mas nesses tecidos a administração de Si diminui significativamente essa ativação, demonstrando capacidade de reduzir a biodisponibilidade do metal. Com exceção do rim, nestes tecidos não houve correlação considerável entre o acúmulo do Al e a atividade da enzima ($r= 0,57$ no pulmão, $r= 0,49$ no músculo e $r= 0,17$ no coração) não parecendo ser o seu depósito a causa da elevação dos níveis de porfobilinogênio.

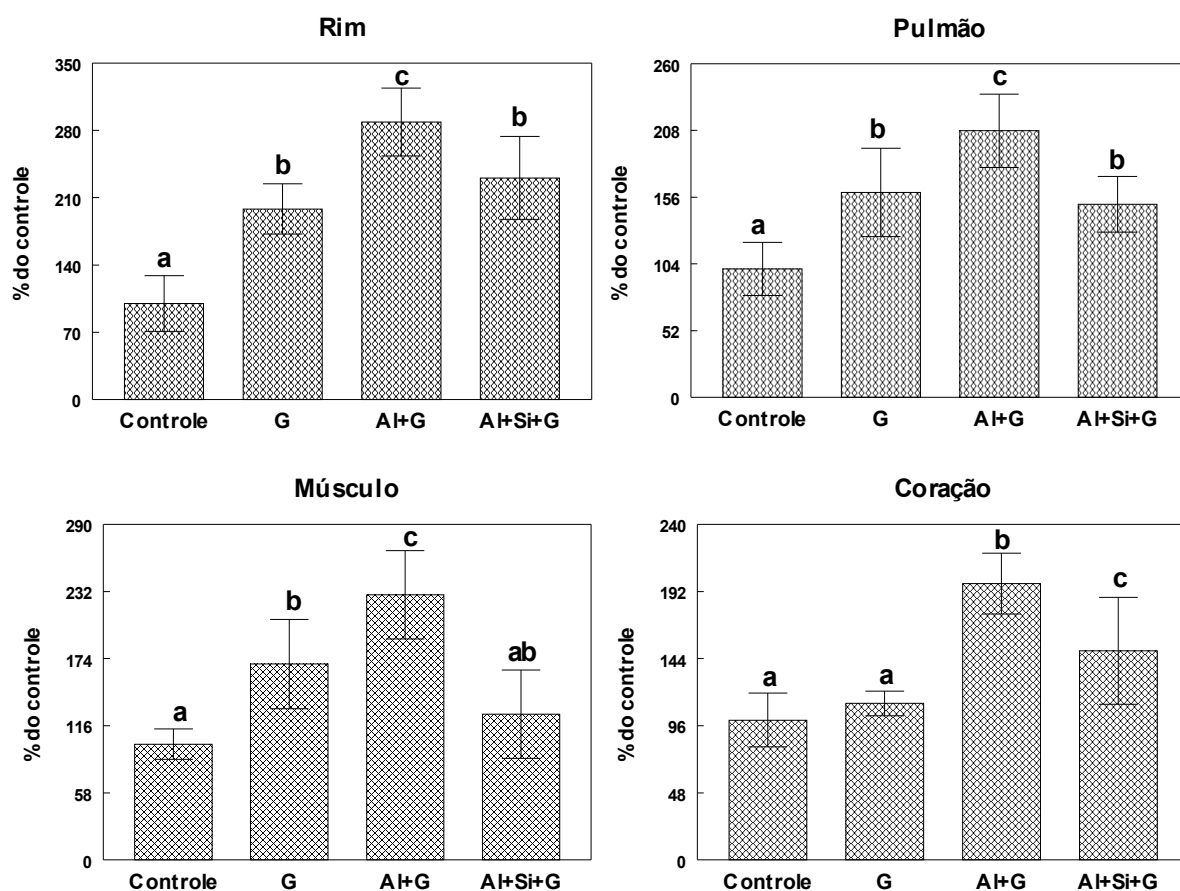


Figura 35: Efeito da administração intraperitoneal de gluconato de Ca e Al e/ou Si na atividade da enzima δ -ALA-D no rim, pulmão, músculo e coração dos ratos. Cada coluna representa média \pm D.P. (n=5) como porcentagem do controle. A atividade da δ -ALA-D no controle foi de 8,97 no rim, 6,05 no pulmão, 3,82 no músculo e 8,17 no coração, expressos em nmolPBG/mgptn h. Nas colunas letras diferentes significam diferença significativa entre os grupos. One-way ANOVA–Duncan’s test ($p < 0,05$).

5.4.3.5. Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

O gluconato de Ca diminui o TBARS no sangue e coração, pois todos os grupos tratados com o sal apresentaram níveis menores em relação ao controle, figura 36.

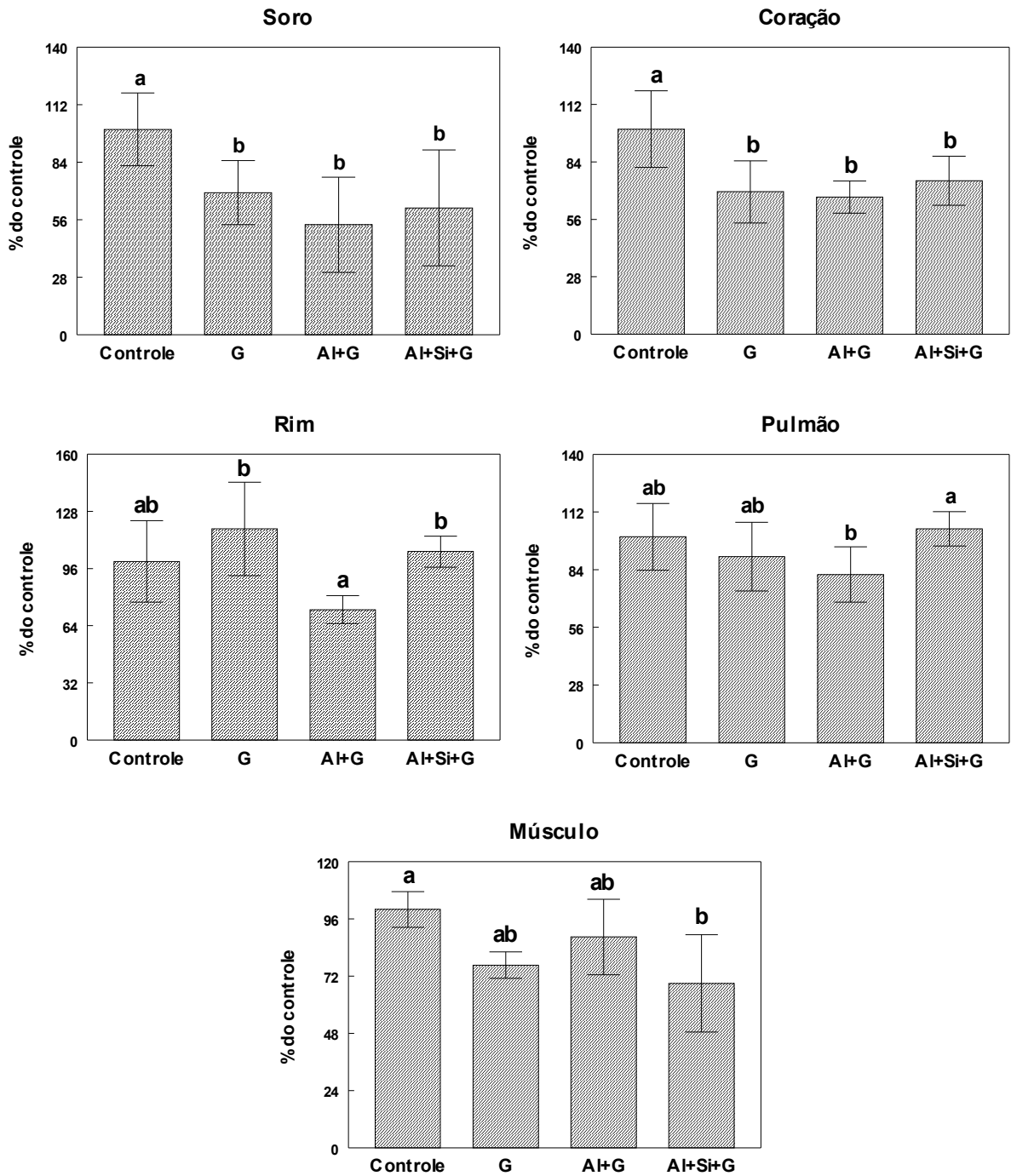


Figura 36: Níveis de MDA no soro, coração, rim, pulmão e músculo dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de gluconato de Ca e Al e/ou Si (Si). Cada coluna representa média \pm D.P. (n=5) como porcentagem do controle. A concentração de MDA no controle foi de 31,19 nmolMDA/mL no soro, 606,61 no coração, 2322,42 no rim, 1021,73 no pulmão e 1291,18 no músculo, expressos em nmolMDA/g de tecido. Nas colunas letras diferentes significam diferença significativa entre os grupos. One-way ANOVA–Duncan’s test (p < 0,05).

As mitocôndrias perfazem quase metade do volume das células musculares cardíacas (NELSON; COX, 2006) e são nelas através da respiração celular, que ocorre a maior parte da formação de EROs. O gluconato complexando o Al (metal pró-oxidante) presente nas células, pode ter diminuído a biodisponibilidade do metal e conseqüentemente minimizado a formação de EROs e o TBARS no coração.

No músculo também ocorreu uma diminuição da peroxidação lipídica após a exposição ao gluconato, entretanto ela só é significativamente diferente do controle no grupo Al+Si+G.

No rim e pulmão quando Al é administrado juntamente com gluconato de cálcio os níveis de MDA aparecem diminuídos em relação aos grupos G e Al+Si+G.

Como dito anteriormente o aumento da atividade da enzima δ -ALA-D aumenta o consumo do substrato (δ -ALA) minimizando o estresse oxidativo. A diminuição do estresse oxidativo nos animais tratados com gluconato pode estar relacionada com a maior atividade da enzima observada nesses grupos. Reforçando a ideia da atividade antioxidante. A análise de correlação confirma a relação inversa entre os níveis de MDA e a atividade da enzima no soro $r = -0,92$, coração $r = -0,65$, rim $r = -0,93$ e pulmão $r = -0,79$.

A glutathione peroxidase (GPx) é uma importante enzima antioxidante, pois remove o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), espécie reativa de oxigênio, pela conversão da glutathione reduzida (GSH) em glutathione oxidada (GSSG). A ação da GPx é dependente da glutathione redutase (GR), enzima NADPH dependente, pois essa regenera a GSH (NELSON; COX, 2006). Como já mencionado, o gluconato poderia aumentar a produção de NADPH e este aumento também pode ser o motivo da diminuição dos níveis de MDA nos grupos tratados com o composto, pois, o aumento da produção de NADPH, estimula a ação da enzima GR inibindo a peroxidação lipídica por diminuir os níveis de EROs. Ou simplesmente pode estar aumentando a regeneração da GSH, um poderoso antioxidante não enzimático. O sangue e o coração são altamente oxigenados e mais propensos a ocorrência de formação de EROs, sendo supostamente essa a justificativa para a maior redução dos níveis de peroxidação lipídica promovida pela exposição ao gluconato nesses tecidos, figura 36.

O Al aumenta a peroxidação lipídica do fígado na presença de gluconato de Ca e o Si diminui essa peroxidação, mas não aos níveis dos grupos controle e G, figura 37.

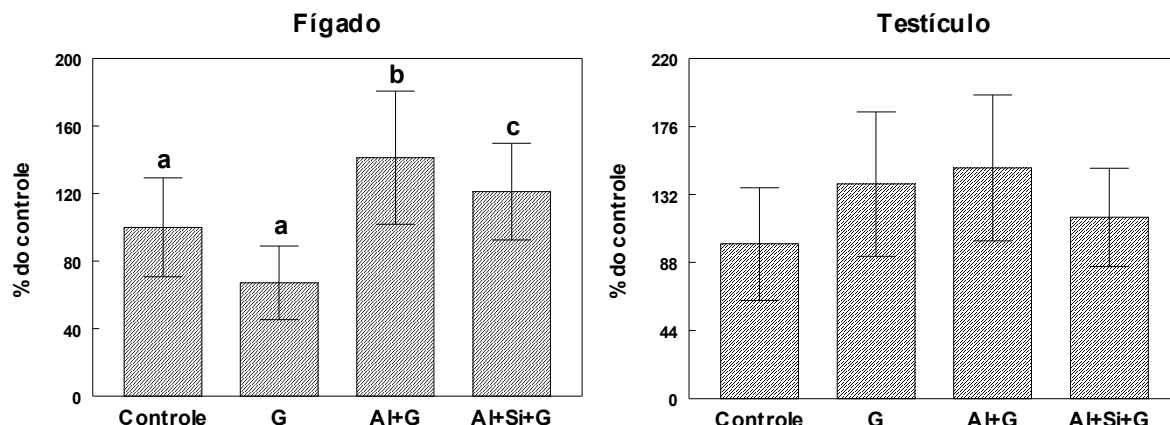


Figura 37: Níveis de MDA no fígado e testículo dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de gluconato de Ca e Al e/ou Si (Si). Cada coluna representa média \pm D.P. (n=5) como porcentagem do controle. A concentração de MDA no controle foi 1712,74 no fígado e 485,81 no testículo, expressos em nmolMDA/g de tecido. Nas colunas letras diferentes significam diferença significativa entre os grupos. One-way ANOVA–Duncan’s test ($p < 0,05$).

No testículo não houve diferença significativa entre os tratamentos, figura 36.

A exposição dos hepatócitos, unidades funcionais do fígado, ao Al leva a diminuição da biodisponibilidade do Fe na mitocôndria e ao stress oxidativo (MAILLOUX et al., 2011). O gluconato de alguma forma aumenta a toxicidade do Al no fígado pela peroxidação lipídica, figura 37. Como o tempo de metabolismo do Al ligado ao gluconato é maior do que quando está livre, a sua permanência no fígado pode ter aumentado seus efeitos tóxicos.

5.4.3.5.1. TBARS cerebral

No cerebelo o tratamento com gluconato de Ca diminui o TBARS, esse efeito é percebido significativamente nos grupos tratados com gluconato, Al e Si. No córtex verifica-se um grande aumento nos níveis de MDA no grupo tratado com Al e gluconato e nessa estrutura a administração de Si reverte o TBARS aos níveis do controle, figura 38, demonstrando ser um protetor da toxicidade do Al.

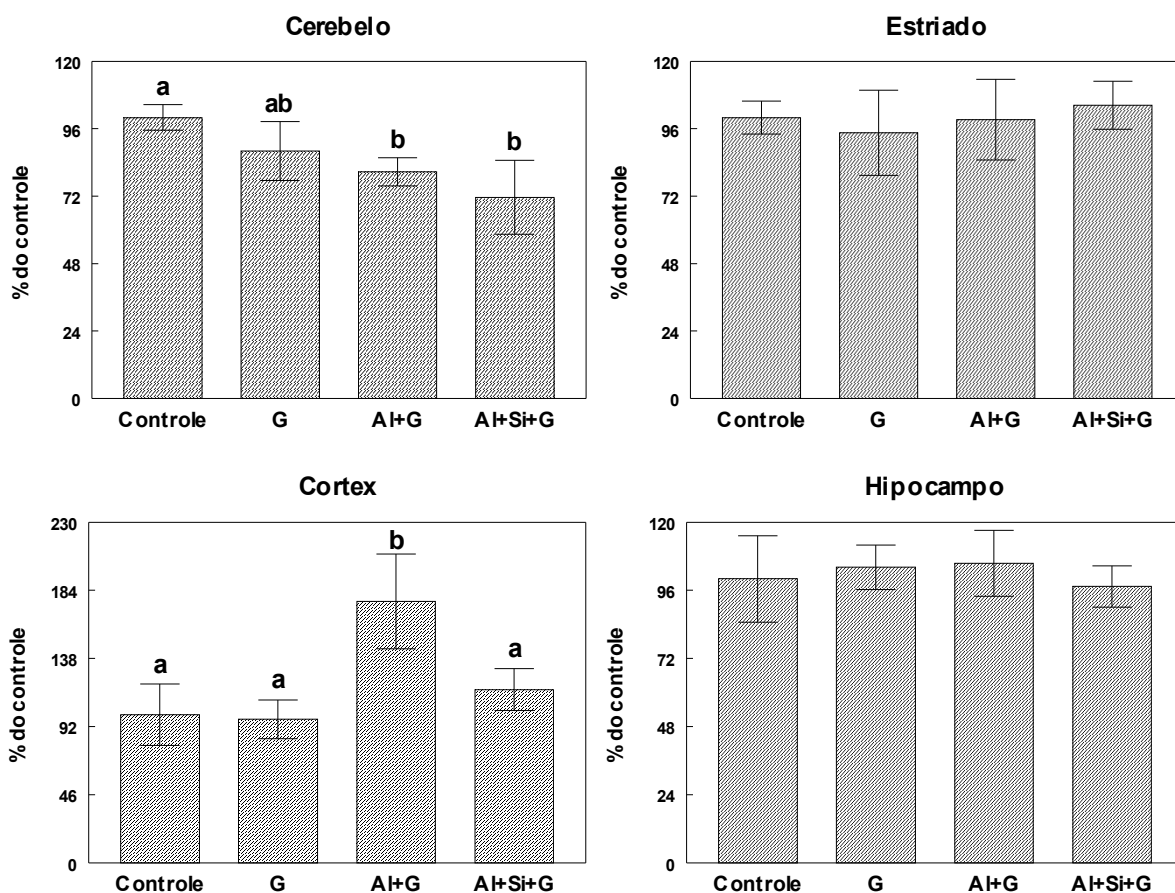


Figura 38: Níveis de MDA nas estruturas cerebrais dos ratos após 60 administrações intraperitoneais de gluconato de Ca e Al e/ou Si (Si). Cada coluna representa média \pm D.P. (n=5) como porcentagem do controle. A concentração de MDA no controle foi de 53,99 no cerebello, 36,20 no estriado, 43,55 no cortex e 36,33 no hipocampo, expressos em nmolMDA/mg de proteína. Nas colunas letras diferentes significam diferença significativa entre os grupos. One-way ANOVA–Duncan’s test ($p < 0,05$).

No estriado e hipocampo não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos neste tratamento. No hipotálamo também não se observa uma grande alteração nos níveis de MDA nos grupos tratados em relação ao controle, tabela 20.

No córtex e cerebello os resultados observados no tratamento com gluconato são inversos aos encontrados no com somente Al e Si, demonstrando que os componentes da NP interferem na ação do Al no cérebro.

O alumínio pode exercer tanto efeito oxidante como antioxidante nas membranas cerebrais dos ratos. Foi sugerido que sua ação pró-oxidante ocorre por meio de interações do íon Al^{3+} com as membranas, alterações sutis no rearranjo dos lípidios que aumentam a disponibilidade de ácidos graxos ao ataque dos radicais

livres ou facilitam a propagação da peroxidação lipídica. Em contraste, íons Al^{3+} exercem uma ação antioxidante a uma concentração muito baixa, presumivelmente através da substituição do ferro em sítios de ligação celular (BERTHON, 1996). Esse efeito contraditório do Al foi observado no córtex: no tratamento com Al e Si, onde em concentração maior, ou seja, não ligado, apresentou efeito oxidante aumentando a peroxidação lipídica, já no tratamento com gluconato, onde provavelmente está em concentração mais baixa ou menos disponível por estar ligado ao sal, apresentou efeito antioxidante diminuindo os níveis de MDA.

Tabela 20: Níveis de MDA no hipotálamo de ratos tratados com gluconato de Ca e Al e/ou Si

Grupo	Controle	G	Al+G	Al+Si+G
% do controle	100	103,8	115,7	113,0
MDA (nmol)/mg de proteína	20,6	21,4	23,8	23,3

Níveis maiores de alumínio têm sido detectados em áreas do cérebro de pacientes com placas senis e emaranhados neurofibrilares, ambos os quais são característicos da doença de Alzheimer. O hipocampo e córtex são considerados regiões vulneráveis a DA devido ao acúmulo de proteína β -amilóide (placas senis são formadas pelo depósito dessa proteína no espaço existente entre os neurônios) em camundongos e humanos (CACCAMO et al., 2005). Realmente o cortex e o hipocampo, apesar de não apresentarem modificações nos níveis de MDA no tratamento com fosfato e gluconato, respectivamente, foram as estruturas mais afetadas pelos tratamentos.

Foi proposto que os efeitos tóxicos do alumínio são mediados, pelo menos em parte, por geração de radicais livres. No entanto, esta premissa é inconsistente com o fato de que os íons de alumínio não são capazes de promover a peroxidação lipídica da membrana de forma independente, embora possam aumentar a peroxidação lipídica da membrana Fe^{2+} -dependente. O mecanismo pelo qual isso pode ocorrer não é esclarecido, embora tenha sido sugerido que as interações com alumínio podem induzir sutis mudanças estruturais nas membranas celulares, com conseqüente perturbação funcional incluindo o aumento da vulnerabilidade a danos

dos radicais livres e os efeitos sobre funções lisossômicas e mitocondrial (ZATTA et al., 2002). O Al afeta a bioquímica cerebral de maneira diferente nas regiões estudadas do cérebro para os tratamentos avaliados neste estudo, possivelmente porque interaja de maneira desigual na promoção da peroxidação lipídica com a variação do local de ação e da composição química de administração.

Estudos anteriores mostraram que o alumínio influencia nas atividades de radicais livres em enzimas. Yousef (2004) observou que a administração do alumínio baixou a atividade de enzimas antioxidantes e aumentou a peroxidação lipídica nos testículos, fígado, rim e cérebro de coelhos. Neste trabalho também foi verificado o aumento do TBARS nesses órgãos, mas em tratamentos diferentes: no testículo no tratamento fosfato, no rim no tratamento gluconato e no fígado somente no tratamento com Si e Al. No cérebro esse efeito não foi verificado de forma pronunciada nas estruturas, com exceção do cortex onde os níveis de MDA são contraditórios dependendo do tratamento.

5.4.4. Efeito do tratamento nos tecidos

Os animais que receberam administração intraperitoneal de Al 0,5 mg/kg/dia, com ou sem fosfato e gluconato (grupos Al, Al+F e Al+G), apresentaram granulomas no tecido abdominal, figura 39 (a), possivelmente formadas pela aglomeração de partículas formadas pela precipitação do hidróxido de Al formado em solução em pH fisiológico. Os demais grupos não apresentaram esses aglomerados, figura 39 (b).

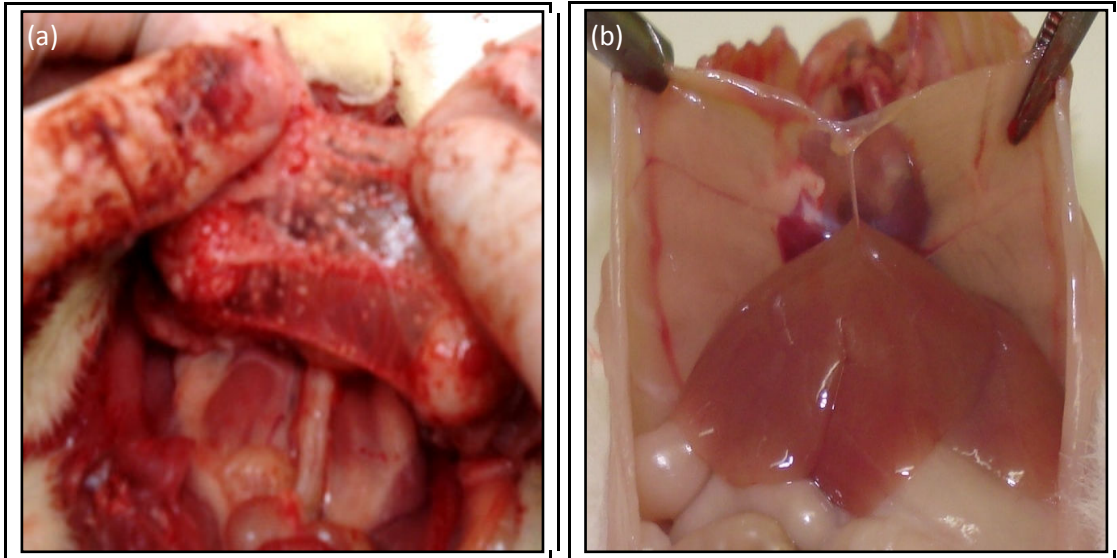


Figura 39: Granulomas formados no tecido abdominal do grupo de animais com 60 administrações intraperitoneais de Al 0,5 mg/kg/ dia (a), tecido abdominal sem granulomas no grupo controle (b).

Bommer (1993) refere-se a vários trabalhos que citam a aglomeração de materiais estranhos em órgãos de pacientes em diálise. Através da análise por fluorescência de raio-x conectada á microscopia de varredura eletrônica confirmaram a presença de silício, cloreto de alumínio, ferro e potássio nas estruturas. Durante o tratamento de diálise os pacientes são submetidos a procedimentos onde o sangue pode entrar em contato com materiais ou substâncias contaminadas com Al e Si, contaminação que, como já mencionado anteriormente neste trabalho, também aparece nas soluções de nutrição parenteral.

6. CONCLUSÃO

Na otimização do método para determinação de Al e Si no tecido animal (fígado) a dissolução do tecido com hidróxido de tetrametilamônio possibilitou melhores resultados de recuperação, mas, devido à obtenção de valores altos na medida dos “brancos”, estes não puderam ser descontados das medidas de Si. Entretanto a comparação entre os grupos tratados pode ser feita sem descontar o valor do “branco”, pois esse mesmo está acrescido em todas as amostras igualmente. A digestão do tecido osseo só foi completa utilizando-se ácido nítrico, sendo possível somente a determinação de Al nessa matriz, pois o Si precipita em pH ácido.

O Si interfere na medida do Al aumentando sua absorvância, mas verificou-se que o uso de modificador de 15 mg/L de Si, tanto na medida dos padrões quanto nas amostras, compensa essa interferência. Na medida de Si nas amostras dissolvidas com HTMA o recobrimento do forno de grafite com Zr (modificador permanente) a cada 300 queimas prolonga seu tempo de vida útil e o uso de Pd como modificador estabiliza o analito e diminui as interferências da matriz. A opção de pipetagem separada entre o modificador e a amostra foi utilizada para evitar a precipitação do Pd em meio alcalino (HTMA). Ainda para a determinação de Si por GFAAS o uso de um programa de confecção da curva com adição do padrão sobre uma amostra dissolvida com HTMA melhora a relação entre as absorvâncias da curva de calibração e as amostras, pois o reagente de abertura aumenta o sinal do elemento.

Após 60 administrações intraperitoneais de Al ou Al e Si em ratos Wistar, dentre as amostras analisadas, observou-se o acúmulo de Al acentuado no sangue, osso e fígado e em menor escala no rim dos animais, tabela 21. A presença de Si nas soluções administradas juntamente com o Al diminuiu em 30% o Al no sangue, 72,5% no fígado e em 44,9% no rim, confirmando que o Si pode agir como protetor da toxicidade biológica do alumínio, seja diminuindo a absorção ou aumentando a excreção através da formação de hidroxialuminosilicatos.

Quando os ratos foram tratados com Al, Si e gluconato de Ca, o acúmulo de Al foi reduzido no osso, rim e testículo. Já no tratamento com Al, Si e fosfato, houve um aumento da concentração do metal no sangue, fígado, rim e pulmão, quando

comparado aos demais grupos do mesmo tratamento. O aumento na concentração de Al ocorre no cérebro, músculo, coração e testículo somente nos tratamentos contendo gluconato de Ca ou dihidrogenofosfato de potássio, e, com exceção do testículo, o Si não muda significativamente essa concentração, não interferindo na biodisponibilidade do metal, tabela 21. Portanto o Si pode ser um protetor da toxicidade do Al em alguns órgãos, mas tem sua ação diminuída na presença dos componentes da nutrição parenteral. Esses, ainda, tendem a aumentar o acúmulo do metal na maioria dos tecidos estudados.

A permanência do Si nos órgãos dos ratos parece ser mais acentuada nos tratamentos com os componentes da nutrição parenteral, tabela 22. Com exceção do rim e do pulmão, os demais tecidos apresentaram aumento nos níveis de Si quando os animais foram tratados com dihidrogenofosfato de potássio e, principalmente com gluconato de Ca, pois esse deve se ligar ao Al deixando o Si livre.

No tratamento com gluconato de Ca, o Al eleva a atividade da enzima δ -aminolevulinato desidratase em todos os tecidos, e o Si parece diminuir a biodisponibilidade do metal, pois diminui os níveis de porfobilinogênio. No tratamento com Si e Al, o metal só não ativou a enzima no sangue e testículo, e a administração de Si juntamente com Al, conseguiu reverter sua ação no rim, coração e pulmão. Já no tratamento com fosfato, o comportamento do Al foi contraditório: no fígado e coração diminuiu os níveis de porfobirinogênio, no músculo aumentou e nos demais tecidos não houve alteração, tabela 23. Com exceção deste último tratamento, o Al, nos casos onde houve alteração, sempre aumentou a atividade da enzima δ -aminolevulinato desidratase nos tecidos dos animais, não demonstrando efeito de toxicidade. Além disso, a presença do Si na maioria das vezes reverte essa alteração, comprovando seu papel na diminuição da biodisponibilidade do metal.

Tomados em conjunto, os resultados de TBARS indicam que o Al tem um comportamento bem diversificado. Entretanto, em vários tecidos observou-se que o tratamento com gluconato tende a diminuir os níveis de MDA, tabela 24, podendo estar relacionado com a atividade antioxidante devido ao aumento da enzima δ -aminolevulinato desidratase nos mesmos. Nas estruturas do cérebro foi observado um comportamento contraditório do Al nos tratamentos, havendo, ainda, uma elevação dos níveis de MDA no córtex no tratamento com o gluconato e no hipocampo no tratamento fosfato não observados no tratamento sem esses

componentes da NP, demonstrando que esses podem potencializar os efeitos tóxicos do metal no cérebro.

Apesar do acúmulo do Al nos tecidos e sangue, ele não demonstrou efeitos pronunciados de toxicidade, pela análise da atividade da enzima δ -ALA-D e de TBARS, pois quando muda os níveis de porfobilinogênio esses são aumentados e não foram observados grandes aumentos nos níveis de malondialdeído, um produto da peroxidação lipídica.

Em vista disso, o tratamento com os componentes da NP contaminados com Al e Si pode causar problemas relacionados ao acúmulo de Al nos tecidos, pois o Si não diminui, na maioria das vezes, a biodisponibilidade do metal em meio aos componentes da NP. Portanto a contaminação por Al ainda deve ser um motivo de preocupação para a saúde dos pacientes, pois apesar de não terem sido observados grandes efeitos de toxicidade relacionados à atividade da enzima δ -ALA-D e a peroxidação lipídica, o metal se deposita nos tecidos podendo causar outros efeitos tóxicos.

As tabelas a seguir expressam de maneira resumida os resultados das medidas de alumínio, silício, atividade da enzima δ -ALA-D e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

Tabela 21: Concentração de Al medida nos órgãos e sangue nos diferentes grupos tratados quando comparados aos seus respectivos controles.

Amostra	Tratamento Al e Si			Tratamento fosfato			Tratamento gluconato		
	Si	Al	Al+Si	F	Al+F	Al+Si+F	G	Al+G	Al+Si+G
Sangue	—	↑↑	↑	↑	↑↑	↑↑↑	—	↑	↑
Osso	—	↑↑	↑	—	↑	↑	—	↑↑	↑
Fígado	—	↑↑	↑	—	↑	↑↑	—	↑↑↑	↑↑↑
Rim	—	↑↑	↑	↑	↑	↑↑	↑	↑↑↑	↑↑
Músculo	—	—	—	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Coração	—	—	—	↑↑	↑	↑↑	↑↑	↑	↑
Pulmão	—	—	—	↑	↑↑	↑↑↑	—	↑	↑
Testículo	—	—	—	—	↑↑	↑	—	↑↑	↑
Cérebro	—	—	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑

Tabela 24: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos órgãos e sangue nos diferentes grupos tratados quando comparados aos seus respectivos controles.

Amostra	Tratamento Al e Si			Tratamento fosfato			Tratamento gluconato		
	Si	Al	Al+Si	F	Al+F	Al+Si+F	G	Al+G	Al+Si+G
Sangue	—	—	↓	—	—	—	↓	↓	↓
Fígado	—	—	—	—	—	↓	—	↑↑	↑
Rim	↑	↑	—	—	—	—	—	↓	—
Músculo	—	↓	↓↓	—	—	—	—	—	↓
Coração	—	—	—	—	—	—	↓	↓	↓
Pulmão	—	—	—	—	—	—	—	↓	—
Testículo	—	—	—	—	↑	↓	—	—	—
Cerebelo	—	↑	—	—	—	—	—	↓	↓
Estriado	↓	↑	↓↓	—	—	↑	—	—	—
Córtex	↑	↓	↑	—	—	—	—	↑	—
Hipocampo	↑	↑	↑	↓	—	—	—	—	—
Hipotálamo	—	—	—	↑↑	↑	↑	—	—	—

— valores medidos não diferenciam significativamente do grupo controle

↓ valores menores que os encontrados no grupo controle

↓↓ valores menores que os encontrados em ↓

↑ valores maiores que os encontrados no grupo controle

↑↑ valores maiores que os encontrados em ↑

↑↑↑ valores maiores que os encontrados em ↑↑

REFERÊNCIAS

ABUBAKAR, M.G.; TAYLOR, A.; FERNS, G.A.A. Regional accumulation of aluminium in the rat brain is affected by dietary vitamin E. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. v.18, p. 53–59, 2004.

AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, p. 659-668, 1995.

ALEMMARI, A. et al. Parenteral aluminum induces liver injury in a newborn piglet model. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 46, p. 883-887, 2011.

ALVAREZ, L. et al. Electrothermal atomic absorption spectrometry determination of aluminium in parenteral nutrition and its components. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 21, n. 1, p. 29-30, 2007.

BARREIROS, A. L. B. S., DAVID, J. M. DAVID, J. P. Estresse Oxidativo: Relação Entre Geração de Espécies Reativas e Defesa do Organismo. **Química nova**. v. 29, p. 113-123, 2006.

BATISTA, B. L. et al. Simultaneous determination of Cd, Cu, Mn, Ni, Pb and Zn in nail samples by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) after tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature: Comparison with ETAAS. **Talanta**. v. 76, p. 575-579, 2008.

BELLIA, J.P.; BIRCHALL, J. D.; ROBERTS, N. B. Beer: a dietary source of silicon. **The Lancet**, v. 343, p. 235, 1994.

BELLIA, J.P.; BIRCHALL, J.D.; ROBERTS, N.B. The role of silicic acid in the renal excretion of aluminium. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v. 26, p. 227-233, 1996.

BEQUET, D.; PAILLER, F.M.; CORBE, H. Aluminium, hypothetic cause of Alzheimer Disease. **Presse Med**. v. 24, 489-490, 1994.

BERLIN, A.; SCHALLER, K.H. European standardized method for the determination of δ -aminolevulinic acid dehydratase activity in blood. **Klinical Chemistry and Klinical Biochemistry**, v.12, p. 389-390, 1974.

BERTHON, G. Aluminium speciation in relation to aluminium bioavailability, metabolism and toxicity. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 228, p. 319-341, 2002.

BERTHON, G. Chemical speciation studies in relation to aluminium metabolism and toxicity. **Coordination Chemistry Reviews**. v. 149, p. 241-280, 1996.

BIRCHALL, J. D.; EXLEY, C.; CHAPPELL, J. S., PHILLIPS, M. J. Acute toxicity of aluminium to fish eliminated in silicon-rich acid waters. **Nature**, v. 338, p. 146-148, 1989.

BIRCHALL, J.D.; CHAPPELL, J.S. Aluminium, water chemistry, and Alzheimer's disease. **Lancet**, v. 29, p. 953, 1989.

BISHOP, N.; MORLEY, R.; CHIR, B.; DAY, P.; LUCAS, A. Aluminium neurotoxicity in preterm infants receiving intravenous feeding solutions. **Nutrition Clinique et Métabolisme**, v. 11, p. 522-523, 1997.

BISSÉ, E. et al. Reference values for serum silicon in adults. **Analytical Biochemistry**, v. 337, p. 130-135, 2005.

BOHRER, D. et al. Aluminum Loading in Preterm Neonates Revisited. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**. v. 50, p.1-5, 2010.

BOHRER, D. et al. Influence of the glass packing on the contamination of pharmaceutical products by aluminium. Part III: Interaction container-chemicals during the heating for sterilization. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 17, p. 107-115, 2003.

BOHRER, D. et al. Low Availability of Aluminum in Formulations for Parenteral Nutrition Containing Silicate. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 33, p. 694-701, 2009.

BOHRER, D. et al. Silicate release from glass for pharmaceutical preparations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 355, p. 174-183, 2008.

BOHRER, D. et al. Tissue digestion for aluminum determination in experimental animal studies. **Analytical Biochemistry**. v. 377, p. 120-127, 2008a.

BOHRER, D. et al. Contribution of the Raw Material to the Aluminum Contamination In Parenterals. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 26, n. 6, p. 382-388, 2002.

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

BRITO, V.B. et al. Inhibition of δ -aminolevulinatase is not closely related to the development of hyperglycemia in alloxan-induced diabetic mice. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 63, p. 443-451, 2011.

BROMMER, V.J. Silikonablagerungen in den Organen von Dialysepatienten- Derzeitiger Stand der untersuchungen. In: SCHULZ, W. **Spurenelemente in der Nephrologie**. Ed. Dustri-Verlag, München, 1993, p. 229-240.

BRONNER, F. Metals in Bone: Aluminum, Boron, Cadmium, Chromium, Lanthanum, Lead, Silicon, and Strontium. Cap. 25. In: Bilezikian, J.P.; Raisz, L.G.; Martin, T.J. **Principles of Bone Biology**, Vol 1, 3^a ed. Ed. Elsevier Science, 2008.

BUCHMAN, A. L.; MOUKARZEL, A. Metabolic bone disease associated with total parenteral nutrition. **Clinical Nutrition**. v.19, p. 217-231, 2000.

CACCAMO, A. et al. Age- and region-dependent alterations in Abeta-degrading enzymes: implications for Abeta-induced disorders. **Neurobiology of Aging**, v. 26, p. 645-654, 2005.

CAROLI, S. **Element Speciation in Bioinorganic Chemistry**, v. 135, Ed. Series, Roma, 1996, cap. 7, p. 223-247.

CHMIELNICKA, J.; NASIADEK, M.; LEWANDOWSKA-ZYNDUL, E.; PIN' KOWSKI, R. Effect of Aluminum on Hematopoiesis after Intraperitoneal Exposure in Rats. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 33, p. 201-206, 1996.

DOUCET, F.J. et al. The formation of hydroxyaluminosilicates of geochemical and biological significance. **Geochimica Cosmochimica Acta**, v. 65, p. 2461-2467, 2001.

DRAPUR, H.H.; HODLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymology**, v.186, p. 421-431, 1990.

EDWARDSON, J. A. et al. Effect of silicon on gastrointestinal absorption of aluminium. **Lancet**, v. 342, p. 211-212, 1993.

EXLEY, C. Aluminium and iron, but neither copper nor zinc, are key to the precipitation of beta-sheets of Abeta₄₂ in senile plaque cores in Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v.10, p. 173-177, 2006.

EXLEY, C. The aluminium-amyloid cascade hypothesis and Alzheimer's disease. **Subcellular Biochemistry**, v. 38, p. 225-234, 2005.

EXLEY, C. The Coordination Chemistry of Aluminium in Neurodegenerative Disease, **Coordination Chemistry Reviews**. v. 256, p. 2142-2146, 2012.

EXLEY, C.; BIRCHALL, J.D. A mechanism of hydroxyaluminosilicate formation. **Polyhedron**, v. 12, p.1007-1017, 1993.

EXLEY, C.; BIRCHALL, J.D. The cellular toxicity of aluminium. **Journal of Theoretical Biology**. v. 159, p. 83-98, 1992.

EXLEY, C.; PINNEGAR, J. K.; TAYLOR, H. Hydroxyaluminosilicates and Acute Aluminium Toxicity in Fish. **Journal of Theoretical Biology**, v.189, p. 133-139, 1997.

EXLEY, C.; SCHNEIDER, C.; DOUCET, F.J. The reaction of aluminium with silicic acid in acidic solution: An important mechanism in controlling the biological availability of aluminium? **Coordination Chemistry Reviews**, v. 228, p. 127-135, 2002.

FAMAP - Farmácia de manipulação e aditivação de produtos parenterais, disponível em: <http://www.famap.com.br/nutricaoparenteral/index.php?pg2=sugestoes>, Acesso em: 27 jun. 2010.

FDA-Food and Drug Administration. Aluminum in large and small volume parenterals used in total parenteral nutrition. **Federal Register**. v.65, p. 4103-4111, 2000.

FERREIRA, P.C.; PIAI, K.A.; TAKAYANAGUI, A.M.M.; SEGURA-MUÑOZ, S.I. Aluminum as a risk factor for Alzheimer's disease. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 16, p. 151-157, 2008.

FISCHER, J. E. **Nutrição Parenteral**. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1978.

FIEJKA, M.; FIEJKA, E.; DLUGASZEK, M. Effect of Aluminium Hydroxide Administration on Normal Mice: Tissue Distribution and Ultrastructural Localization of Aluminium in Liver. **Pharmacology & Toxicology**, v. 78, p. 123-128, 1996.

FREY, O.R.; MAIER, L. Polyethylene vials of calcium gluconate reduce aluminum contamination of TPN. **Annals of Pharmacotherapy**. v. 34, p. 811-812, 2000.

GIACOMELLI, M.B.O. et al. Determination of As, Cd, Pb and Se in DORM-1 dogfish muscle reference material using alkaline solubilization and electrothermal atomic absorption spectrometry with IrqRh as permanent modifiers or PdqMg in solution. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 57, p. 2151-2157, 2002.

GILLETTE GUYONNET, S.; ANDRIEU, S.; VELLAS, B. The potential influence of silica presents in drinking water on Alzheimer's disease and associated disorders. **The Journal of Nutrition Health and Aging**, v. 11, p. 119-124, 2007.

GONZÁLEZ-MUÑOZ, M.J.; PEÑA, A.; MESEGUER, I. Role of beer as a possible protective factor in preventing Alzheimer's disease. **Food and Chemical Toxicology**. v. 46, p. 49-56, 2008a.

GONZALEZ-MUÑOZ, M. J. et al. Beer consumption reduces cerebral oxidation caused by aluminum toxicity by normalizing gene expression of tumor necrotic factor alpha and several antioxidant enzymes. **Food and Chemical Toxicology**. v. 46, p. 1111-1118, 2008.

GUO, C.; LU, Y.; HSU, G. W. The influence of aluminum exposure on male reproduction and offspring in mice. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 20, p. 135-141, 2005.

GURA, K. M.; PHARM, D. Aluminum contamination in products used in parenteral nutrition: Has anything changed? **Nutrition**, v. 26, p. 585-594, 2010.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3^a ed. Editora Oxford. Estados Unidos, 1999, cap.8, p. 592.

HALLIWELL, B.; Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **Journal of Neurochemistry**. v. 97, p. 1634-1658, 2006.

HALLIWELL, B; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**. v.142, 231-255, 2004.

HARRAKI, B. et al. Interactions related to trace elements in parenteral nutrition. **Pharmaceutics Acta Helvetiae**. v. 70, p. 269-278, 1995.

ISHIZUKA, M. Novel development of 5-aminolevurinic acid (ALA) in cancer diagnoses and therapy. **International Immunopharmacology**. v. 11, p. 358-365, 2011.

IGLESIAS, S.S. et al. Analysis of brain regional distribution of aluminium in rats via oral and intraperitoneal administration. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 21, p. 31-34, 2007.

JENTZSCH, A.M.; BACHMANN H.; FURST, P.; BIESALSKI, H. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. **Free Radical Biology and Medicine**, v.2, p. 251-256, 1996.

JUGDAOHSINGH, R. et al. Dietary Silicon Intake Is Positively Associated With Bone Mineral Density in Men and Premenopausal Women of the Framingham Offspring Cohort. **Journal of Bone and Mineral Research**. v. 19, p. 297-307, 2004.

JUGDAOHSINGH, R. et al. Oligomeric but not monomeric silica prevents aluminum absorption in humans. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 71, p. 944-949, 2000.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10^a edição. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2004. Cap. 8, p. 138.

KAIZER, R. R. et al. Acetylcholinesterase activation and enhanced lipid peroxidation after long-term exposure to low levels of aluminum on different mouse brain regions. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, p.1865-1870, 2005.

KAIZER, R. R. et al. The effect of aluminium on NTPDase and 5'-nucleotidase activities from rat synaptosomes and platelets. **International Journal of Developmental Neuroscience**. v. 25, p.381-386, 2007.

KLEIN, G.L. Aluminum: new recognition of an old problem. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 5, p. 637-640, 2005.

KLEIN, G.L. et al. Aluminum loading during total parenteral Nutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 35, p. 1425-1429, 1982.

KLEIN, G.L. et al. Parenteral drug products containing aluminum as an ingredient or a contaminant: response to FDA notice of intent. **American Journal Clinical Nutrition**, v.53, p. 399-402, 1991.

LANDEGHEM, G. F. V.; DE BROE, M.E.; D'HAESE, P.C. Al and Si: Their Speciation, Distribution, and Toxicity. **Clinical Biochemistry**, v. 31, p. 385-397, 1998.

LEUNG, F.Y. Trace Elements in Parenteral Micronutrition. **Clinical Biochemistry**, v. 28, p. 561-566, 1995.

LLOPIS, L. S.; DÍEZ, F. B. Revisión de los Estudios sobre Exposición Al Aluminio y Enfermedad De Alzheimer. **Revista Española Salud Pública**, v. 76, p. 645-658, 2002.

LUGOWSKI, S. J. et al. A review of silicon and silicone determination in tissue and body fluids - a need for standard reference materials. **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, v. 360, p. 486-488, 1998.

MAILLOUX, R.J.; LEMIRE, J. APPANNA, V.D. Hepatic response to aluminum toxicity: Dyslipidemia and liver diseases. **Experimental cell research**. v. 317, p. 2231-2238, 2011.

MASSIE, H.R.; AIELLO, V. R.; TUTTLE, R.S. Aluminum in the Organs and Diet of Ageing C57BL/6J Mice. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 45, p. 145-156, 1988.

MEDEL, A.S.; FAIRMAN, B.; WRÓBEL, K. Aluminum and silicon speciation in biological materials of clinical relevance. In: CAROLI, S. **Element Speciation in Bioinorganic Chemistry**, v. 135, Ed. Series, Roma, 1996, cap. 7, p. 223-247.

MIU, A. C. et al. A Behavioral and Histological Study of the Effects of Long-Term Exposure of Adult Rats to Aluminum. **International Journal of Neuroscience**, v. 113, p. 1197-1211, 2003.

MORENO, A.; DOMINGUEZ, C.; BALLABRIGA, A. Aluminum in the neonate related to parenteral nutrition. **Acta Paediatrica**. v. 83, p. 25-29, 1994.

NAYAK, P. Aluminum: Impacts and Disease. **Environmental Research**. V. 89, p. 101-115, 2002.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 4ª edição, Ed. Sarvier. São Paulo, 2006. Cap. 14, p. 543.

NIELSEN, F.H. Micronutrients in Parenteral Nutrition: Boron, Silicon, and Fluoride. **Gastroenterology**, v. 137, p. 55-60, 2009.

NOCTOR, G., FOYER, C.H. Simultaneous measurement of foliar glutathione, gammaglutamylcysteine, and amino acids by high-performance liquid chromatography: comparison with two other assay methods for glutathione. **Analytical Biochemistry**. v. 264, p. 98-110, 1998.

NOREMBERG, S. M. S. **Influência da Formação de Hidroxialuminossilicatos na Biodisponibilidade do Alumínio**. Dissertação de Mestrado, UFSM, 2010.

PAAR RM. Silicon, wine, and the heart. **Lancet**. v. 1, p. 1087, 1980.

PANCHALINGAM, K. et al. Al-ATP as an Intracellular Carrier of Al(III) Ion. **International Journal of Biochemistry**. v. 23, p. 1453-1469, 1991.

PÉREZ, J. C. R.; MANCILLA, C. L. A. El Papel del Silicio en los Organismos y Ecosistemas. **Conciencia Tecnológica**. v. 43, p.42-46, 2012.

PERRY, C. C.; KEELING-TUCKER, T. Aspects of the bioinorganic chemistry of silicon in conjunction with the biometals calcium, iron and aluminium. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 69, p.181-191, 1998.

PLATT, B. et al. Aluminium toxicity in the rat brain: Histochemical and immunocytochemical evidence. **Brain Research Bulletin**. v. 55, p. 257-267, 2001

PRIEST, N. D. et al. Uptake by man of aluminium in a public water supply. **Human & Experimental Toxicology**, v. 17, p. 296-301, 1998.

RAGGI, M. A. et al. Spectrophotometric determination of silicate traces in hemodialysis solutions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 20, p. 335-342, 1999.

RAGHUVANSHI, S.; SHRIVASTAVA, S.; JOHRI, S.; SHUKLA, S. Therapeutic associated with occupational exposure to silica. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, 2012, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2012.04.006>.

RAMACHANDRAN, S.; FONTANILLE, P.; PANDEY, A.; LARROCH, C. Gluconic Acid: Properties, Applications and Microbial Production. **Food Technology and Biotechnology**. v. 44, p. 185-195, 2006.

REFFITT, D. M. et al. Silicic acid: its gastrointestinal uptake and urinary excretion in man and effects on aluminium excretion. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 76, p. 141-147, 1999.

RIBEIRO, A. S.; CURTIUS, A. J.; POZEBON, D. Determination of As, Cd, Ni and Pb in human hair by electrothermal atomic absorption spectrometry after sample treatment with tetramethylammonium hydroxide. **Microchemical Journal**, v. 64, p.105-110, 2000.

RIMANIOL, A.C.; GRAS, G.; CLAYETTE, P. In vitro interactions between macrophages and aluminum-containing adjuvants. **Vaccine**. v. 25, p. 6784-6792, 2007.

ROCHA, J. B. T. et al. Aminolevulinatase (δ -ALA-D) as marker of intoxication with metals and other pro-oxidant situations. **Toxicology Research**. v. 1, p. 85-102, 2012.

RONDEAU, V. et al. Aluminum and Silica in Drinking Water and the Risk of Alzheimer's Disease or Cognitive Decline: Findings From 15-Year Follow-up of the PAQUID Cohort. **American Journal of Epidemiology**, p. 1-8. 2008.

SASSA, S. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. **Enzyme**, v. 28, p. 133-45, 1982.

SCHETINGER, M.R.C. et al. Effects of aluminum sulfate on delta-aminolevulinatase dehydratase from kidney, brain, and liver of adult mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.32, p. 761-766, 1999.

SCHNEIDER, C.; DOUCET, F.; STREKOPYTOV, S.; EXLEY, C. The solubility of an hydroxyaluminosilicate. **Polyhedron**, v. 23, p. 3185-3191, 2004.

SCHNEIDER, C.; EXLEY, C. Silicic acid ($\text{Si}(\text{OH})_4$) is a significant influence upon the atomic absorption signal of aluminium measured by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS). **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 87, p. 45-50, 2001.

SCHWARZ K. Silicon, fibre, and atherosclerosis. **Lancet**. v. 1, p. 454-7, 1977.

SILVA, A.C. et al. Oxidative stress and d-ALA-D activity in chronic renal failure patients. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 61, p. 180-185, 2007.

SILVA, J.B.B. et al. Determination of cadmium in biological samples solubilized with tetramethylammonium hydroxide by electrothermal atomic absorption spectrometry, using ruthenium as permanent modifier. **Talanta**, v. 60, p. 977-982, 2003.

SIRAKI, A.G., POURAHMAD, J., CHAN, T.S., KHAN, S., O'BRIEN, P.J. Endogenous and endobiotic induced reactive oxygen species formation by isolated hepatocytes. *Free Radical Biology and Medicine*. v. 32, p. 2-10, 2002.

SMIRNOFF, N., WHEELER, G.L. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**. v. 35, p. 291-314, 2000.

SRIVASTAVA, R.A.K., JAIN, J.C. Scavenger receptor class B type I expression and elemental analysis in cerebellum and parietal cortex regions of the Alzheimer's diseased brain. **Journal of the Neurological Sciences**, v.196, p. 45-52, 2002.

STREKOPYTOV, S.; EXLEY, C. The formation, precipitation and structural characterisation of hydroxyaluminosilicates formed in the presence of fluoride and phosphate. **Polyhedron**, v. 24, p. 1585-1592, 2005.

VALENTINI, J. et al. Human erythrocyte δ -aminolevulinatase activity and oxidative stress in hemodialysis patients. **Clinical Biochemistry**, v. 40, p. 591-594, 2007.

VAN RENSBURG, S. J. et al. Transferrin C2 and Alzheimer's Disease: Another Piece of the Puzzle Found? **Medical Hypotheses**. v. 44, p. 268-272, 1995.

VIEIRA, V.L.P. Effect of aluminum on δ -aminolevulinic acid dehydratase from mouse blood. **Toxicology Letters**, v. 117, p. 45-52, 2000.

WALTON, J.R. Aluminium in hippocampal neurons from humans with Alzheimer's disease. **Neurotoxicology**. v. 27, p. 385-394, 2006.

WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic Absorption Spectrometry**, 3^a ed. Ed. Wiley-VCH, Weinheim, 1999.

YOKEL, R. A.; MCNAMARA. P. J. Aluminum toxicokinetics: An updated minireview. **Pharmacology & Toxicology**. v. 88, p. 159-167, 2001.

YOUSEF, M. I.; SALAMA, A. F. Propolis protection from reproductive toxicity caused by aluminium chloride in male rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p.1168-1175, 2009.

YOUSEF, M.I., KAMEL, K.I., EL-GUENDI, M.I., EL-DEMERDASH, F.M. An in vitro study on reproductive toxicity of aluminium chloride on rabbit sperm: the protective role of some antioxidants. **Toxicology**. v. 239, p. 213-223, 2007.

YOUSEF, M.I. Aluminium-induced changes in hemato-biochemical parameters, lipid peroxidation and enzyme activities of male rabbits: Protective role of ascorbic acid. **Toxicology**, v. 199, p. 47-57, 2004.

ZAMAN, K. et al. Inhibition of Delta Aminolevulinic Acid Dehydratase Activity by Aluminum. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 104C, p. 269-213, 1993a.

ZAMAN, K.; ZAMAN, W.; SIDDIQUE, H. Hematological and enzymatic results of aluminum intoxication in rats. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 105C, p.73-76,1993.

ZATTA, P. et al. Aluminium (III) as a promoter of cellular oxidation. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 228, p. 271-284, 2002.

Apêndice 1

- Fórmula para os cálculos dos resultados da atividade da δ -ALA-D tecidual:

$$[\text{PBG}] = \frac{2 \text{ nmol}}{0,061} \times \frac{1}{T} \times \frac{1}{\text{ptn}} \times \frac{1}{\text{tecido}} \times \text{Abs} = \text{nmol PBG/mg Ptn/hora}$$

Ex: 0,2 para fígado (pipeta 200 μL)

Tempo de Incubação Proteína

- Cálculos para expressão dos resultados da atividade da δ -ALA-D sanguínea:

$$\frac{100\mu\text{L}}{430\mu\text{L}} \times \frac{400\mu\text{L}}{1500\mu\text{L}} \times \frac{1000}{0,061} \times \frac{1}{1000} \times \frac{1}{T} \times 10 \times \text{Abs}_{\text{amostra}} = \text{nmol PBG/hora/mL sangue}$$

Ou simplesmente: $\frac{\text{Abs}_{\text{amostra}} \times 10}{T(\text{em horas})} = \text{nmol PBG/hora/mL sangue}$

- Procedimento para os cálculos do fator de correção da curva de MDA e dos resultados de TBARS tecidual:

Fator de calibração médio (FCM) da curva de MDA:

$$\text{FC} = \text{concentração/Abs}$$

$$\text{FCM} = \frac{\text{FC}_1 + \text{FC}_2 + \text{FC}_3 + \text{FC}_4}{4} = \text{_____ nmol}$$

Resultado expresso por g de tecido:

$$\text{Abs}_{\text{amostra}} \times \text{FCM} = X \text{ nmol}$$

$$X \text{ nmol} \rightarrow \underline{X} \text{ g (quantidade de tecido pipetada)*}$$

$$X \rightarrow 1 \text{ g}$$

$$X = \underline{\quad\quad} \text{ nmol MDA/g tecido}$$

* quantidade de tecido pipetada

Exemplo para fígado (1:10):

$$1\text{g} \rightarrow 10 \text{ mL (homogeneização)}$$

$$X \rightarrow 0,2 \text{ mL (volume pipetado)}$$

$$X = 0,02 \text{ g}$$

Resultado expresso por proteína (este cálculo foi usado para as estruturas do cérebro):

$$\frac{\text{Abs}_{\text{amostra}} \times \text{FCM}}{X^* \text{ g}} \times \frac{1}{\text{Prot}} \text{ nmol MDA/ mg ptn}$$

- Fórmula para o cálculo dos resultados de TBARS sanguíneo:

$$\text{Resultado: } \frac{\text{Abs}_{\text{amostra}} \times \text{FCM}}{0,2} = \text{nmol MDA / mL}$$

- Procedimento para os cálculos do fator de calibração médio (FCM) da curva de albumina e da concentração de proteína nas amostras:

Fator de calibração médio (FCM) da curva de Albumina:

$$\text{FC} = \text{concentração/Abs}$$

$$\text{FCM} = \frac{\text{FC}_1 + \text{FC}_2 + \text{FC}_3}{3} = \underline{\quad\quad} \text{ mg}$$

Concentração de Proteína da Amostra:

$$\frac{\text{Abs}_{\text{amostra}} \times \text{FCM} \times \text{diluição}}{\text{Volume pip (mL)}} = X \text{ mg/mL}$$