



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - CAMPUS DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO QUELANTE E ANTIOXIDANTE DA
N-ACETILCISTEÍNA SOBRE O CÁDMIO**

PRISCILA DA CAZ

**CASCAVEL- PR
2018**

PRISCILA DA CAZ

**INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO QUELANTE E ANTIOXIDANTE DA
N-ACETILCISTEÍNA SOBRE O CÁDMIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Área de concentração Fármacos e Medicamentos, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Dra. Ana Maria Itinose

Coorientadora: Dra. Carla Brugin Marek

**CASCADEL - PR
2018**

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Da Caz, Priscila
INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO QUELANTE E ANTIOXIDANTE DA N-
ACETILCISTEÍNA SOBRE O CÁDMIO / Priscila Da Caz;
orientador(a), Ana Maria Itinose; coorientador(a), Carla
Brugin Marek, 2018.
128 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste
do Paraná, Campus de Cascavel, Centro de Ciências Médicas
e Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, 2018.

1. Intoxicação Crônica. 2. Enzimas Antioxidantes. 3.
Metais Pesados. 4. Antídoto. I. Itinose, Ana Maria. II.
Marek, Carla Brugin. III. Título.

PRISCILA DA CAZ

**INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO QUELANTE E ANTIOXIDANTE DA
N-ACETILCISTEÍNA SOBRE O CÁDMIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná como pré-requisito para obtenção do título de Mestra em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Maria Itinose

BANCA EXAMINADORA:

ANA MARIA ITINOSE

Prof.^a Dr.^a Ana Maria Itinose
Universidade Estadual do Oeste do
Paraná
UNIOESTE
Orientadora

Carla Brugin Marek

Prof.^a Dr.^a Carla Brugin Marek
Universidade Estadual do Oeste do
Paraná
UNIOESTE

Sueli Pécio Quináia

Prof.^a Dr.^a Sueli Pécio Quináia
Universidade Estadual do Centro
Oeste
UNICENTRO

BIOGRAFIA

Priscila Da Caz, natural de Francisco Beltrão, Paraná, Brasil, nascida em 15 de maio de 1983, formou-se em Farmácia na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em março de 2007. Em dezembro de 2007 concluiu a Habilitação em Análises Clínicas pela mesma instituição e, em 2012, obteve o título de Especialista em Farmacologia aplicada à Atenção Farmacêutica pelo Instituto Equilibra, em Curitiba, Paraná, Brasil. De 2007 a 2015 se dedicou ao ramo da dispensação onde se desvinculou para dedicar-se exclusivamente ao Programa de Pós-graduação *stricto sensu* em nível de mestrado em Ciências Farmacêuticas no ano de 2016. Desenvolve projeto experimental de dissertação junto à linha Fármacos e Medicamentos, orientada pela Dra. Ana Maria Itinose e coorientada pela Dra. Carla Brugin Marek.

*“Eu sou a pequena semente,
que se viu de repente transformada em pomar!”*

(Autor Desconhecido)

AGRADECIMENTOS

À minha família:

Mãe Juceney e pai Antonio, dedico essa conquista a vocês que me ensinaram desde muito cedo que é preciso dedicação, comprometimento, honestidade, esforço, gratidão, estudo e amor para conquistar os meus sonhos. Foi essa a receita que eu utilizei em cada passo que eu dei aqui. Obrigada por serem exemplos tão fantásticos a serem seguidos, obrigada por me apoiarem e por acreditarem em mim! Amo vocês!

Minha irmã e melhor amiga Karina, meu cunhado Dangler e minhas sobrinhas Amanda e Isadora, foi no abraço de vocês que eu me emocionei comemorando a entrada no mestrado e agora estou aqui finalizando este sonho. Vocês são os meus anjos da guarda, obrigada por todo o apoio, carinho e incentivo. “Sempre unidas!” Amo vocês!

Aos amigos do laboratório: Tanielly, Angélica, Júlio, Suélyn, Marina, Diana, Geisiele, Mayara, Aline, Dario, Fabiana, Denise, Ana Júlia e Isabela:

Vocês são fantásticos, obrigada por compartilharem conhecimentos, por terem sido gentis, companheiros, solidários, cúmplices e divertidos. O mestrado tornou-se leve e divertido com a companhia de vocês.

Aos parceiros Jeferson Meira dos Santos, Profa. Sueli Pércio Quináia, Prof. Helder Vasconcelos, Profa. Ana Cláudia Maller, Cogent do Brasil, Edízio e Laboratório de Fotomicroscopia:

Obrigada pelo auxílio no socorro e pela gentileza em colaborarem com a minha pesquisa.

Aos mestres:

Obrigada Prof. Ralpo Rinaldo dos Reis e Profa. Sueli Pércio Quináia por participarem da minha banca de qualificação e defesa e por, gentilmente, contribuírem com o progresso deste trabalho.

Obrigada professora Fernanda Coleraus da Silva. Sua dedicação, auxílio, gentileza e carinho foram determinantes para que este trabalho fosse concluído.

Agradeço à minha coorientadora e professora Carla Brugin Marek pela paciência, contribuição e pelos conselhos que grandemente contribuíram para esta pesquisa.

À orientadora e professora Ana Maria Itinose, agradeço pela confiança que depositou em mim, pelos ensinamentos, carinho, dedicação e paciência. Minha eterna gratidão, respeito e saudade.

Agradeço à CAPES pelo apoio financeiro e ao PCF – UNIOESTE e ao CEATOX por todo o suporte concedido.

A Deus, pois, sem Ele, nada seria!

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está organizada de acordo com o regulamento do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná e será apresentada em formato misto, sendo composta por fundamentação teórica e dois artigos científicos para publicação. O primeiro artigo “Validação da quantificação de cádmio em espectrômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite para amostras de sangue” será submetido à revista *Química Nova*, e o segundo artigo “Efeito protetor da N-acetilcisteína sobre a peroxidação lipídica induzida pelo cádmio em rim de ratos Wistar” será submetido à revista *Food and Chemical Toxicology*. Ambos foram confeccionados conforme as normas de cada revista. O projeto teve todos os experimentos realizados no Laboratório de Toxicologia Celular da Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO QUELANTE E ANTIOXIDANTE DA N-ACETILCISTEÍNA SOBRE O CÁDMIO

RESUMO

O cádmio (Cd) é um metal pesado, visto como um poluente importante para o homem, amplamente distribuído na natureza e também presente no cigarro e na linha de produção de diversos setores industriais. Apresenta efeitos carcinogênicos e tóxicos em órgãos como cérebro, pulmões, rins e fígado devido à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs). A N-acetilcisteína (NAC) é um agente mucolítico que apresenta propriedades como agente quelante e antioxidante devido a sua habilidade de reduzir espécies reativas de oxigênio e de fornecer sítios quelantes para os metais sendo, portanto, eficaz no processo de desintoxicação. Este estudo validou um método para quantificação de cádmio em plasma de ratos pela técnica de espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (GFAAS) e apresentou resultados satisfatórios e aprovados. Foi também investigada a ação protetora da NAC sobre a peroxidação lipídica no tecido renal de ratos submetidos à intoxicação pelo cádmio. Os resultados demonstraram que a NAC apresenta efeito protetor ao reverter a peroxidação lipídica, sugerindo que ela preserva o tecido renal dos danos causados pelo cádmio.

Palavras-chave: antídoto, enzimas antioxidantes, estresse oxidativo, intoxicação crônica, metais pesados, GFAAS.

INVESTIGATION OF CHELATING AND ANTIOXIDANT ACTION OF N-ACETYLCYSTEINE ON CADMIUM

ABSTRACT

Cadmium (Cd) is a heavy metal seen as an important pollutant for man. It is widely distributed in nature and also presents in cigarette and in production line of various industrial sectors. It has carcinogenic and toxic effects on organs such as brain, lung, kidney and liver due its excessive production of reactive oxygen species (ROS). N-acetylcysteine (NAC) is a mucolytic agent that exhibits properties as antioxidant and chelating agent due its ability to reduce reactive oxygen species and provide chelating sites for metals. Therefore, NAC is effective in detoxification process. This study has validated a method for cadmium quantification in plasma of rats by atomic absorption spectrometry with electrothermal atomization in graphite furnace (GFAAS). It presented satisfactory and approved results. The protective action of NAC on lipid peroxidation in renal tissue of rats submitted to cadmium intoxication was also investigated. The results showed that NAC presents protective effect to reverse lipid peroxidation suggesting that it preserves renal tissue damage caused by cadmium.

Keywords: antidote, antioxidant enzymes, oxidative stress, chronic intoxication, heavy metals, GFAAS.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2. OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo geral.....	23
2.2 Objetivos específicos	23
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	24
3.1 Cádmio.....	24
3.1.1 Toxicocinética.....	26
3.1.2 Toxicodinâmica	28
3.1.2.1 Mecanismos de toxicidade.....	28
3.1.2.1.1 Estresse Oxidativo	28
3.1.2.1.2 Carcinogênese	31
3.1.2.2 Toxicidade nos órgãos	32
3.1.2.2.1 Toxicidade nos rins	32
3.1.2.2.2 Toxicidade nos pulmões.....	33
3.1.2.2.3 Toxicidade nos ossos.....	33
3.1.2.2.4 Toxicidade no cérebro.....	34
3.1.2.2.5 Toxicidade no fígado	35
3.2 N-acetilcisteína	35
3.2.1 Farmacocinética.....	37
3.2.2 Farmacodinâmica.....	38
3.2.2.1 Propriedade antioxidante	38
3.2.2.2 Propriedade quelante	40
4. ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	42
4.1 ARTIGO 1	42
4.2 ARTIGO 2	63
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	88
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
7. ANEXOS	95
7.1 Normas Revistas	95
7.1.1 Revista Química Nova.....	95
7.1.2 Revista <i>Food and Chemical Toxicology</i>	103
7.2 Protocolo Comitê de Ética Animal	128

LISTA DE TABELAS DA FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Tabela 1	Atividades que colaboram para a introdução de Cd no meio ambiente_____	24
Tabela 2	Atividades industriais onde há exposição ocupacional de Cd_____	25
Tabela 3	Aplicações terapêuticas da N-acetilcisteína_____	37

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO 1

Tabela 1	Programa de aquecimento empregado para validação em água ultrapura_____	53
Tabela 2	Programa de aquecimento empregado para validação em plasma____	54
Tabela 3	Determinações da exatidão e precisão intra e intercorrida em água ultrapura_____	57
Tabela 4	Determinações da exatidão e precisão intra e intercorrida em plasma_____	58
Tabela 5	Determinação do efeito matriz_____	60

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO 2

Tabela 1	Nível de cádmio no plasma e em órgãos de ratos com diferentes tipos de tratamento_____	78
Tabela 2	Índice de peso dos órgãos de ratos com diferentes tipos de tratamento_____	79
Tabela 3	Peroxidação lipídica, grupos tióis e enzimas antioxidantes no rim de ratos com diferentes tipos de tratamento_____	80
Tabela 4	Marcadores de função renal de ratos com diferentes tipos de tratamento_____	82

LISTA DE FIGURAS DA FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Figura 1	Mecanismo do estresse oxidativo_____	29
Figura 2	Estrutura química da N-acetilcisteína_____	36
Figura 3	Formação da glutatona a partir da L-cisteína_____	39
Figura 4	Mecanismo de ação da N-acetilcisteína para a formação de GSH____	40

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO 1

- Figura 1 Análise da linearidade da amostra de solução aquosa, contemplando a faixa de concentração de 0,1, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$, utilizando GFAAS e comprimento de onda de 228,8 nm _____55
- Figura 2 Análise da linearidade da amostra de plasma, contemplando a faixa de concentração de 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$, utilizando GFAAS e comprimento de onda de 228,8 nm _____56
- Figura 3 Análise do efeito residual empregando branco e limite superior de quantificação (LSQ) _____59

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO 2

Figura 1 Análise histopatológica dos rins onde: (A) Grupo controle; (B) Grupo Cd; (C) Grupo CdNAC e (D) Grupo NAC_____81

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Ach	Acetilcolina
AchE	Acetilcolinesterase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATSDR	Agência de Substâncias Tóxicas e de Registros de Doenças dos Estados Unidos
BHE	Barreira hematoencefálica
Ca	Cálcio
CAPES	Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior
CAT	Catalase
CEATOX	Centro de assistência em toxicologia
Cd	Cádmio
Cd-MT	Complexo cádmio + metalotionina
CdNAC	Cádmio + N-acetilcisteína
CdO	Óxido de cádmio
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
CIS	L-cisteína
CMD	Concentração média determinada
CME	Concentração média experimental
Cont	Controle
COX-2	Ciclooxigenase
CQA	Controle de qualidade de alta concentração
CQB	Controle de qualidade de baixa concentração
CQM	Controle de qualidade de média concentração
CQD	Controle de qualidade de diluição
CT	Concentração teórica
Cu	Cobre
CV	Coeficiente de variação
DNA	desoxirribonucléico
DP	Desvio padrão
DP _a	Desvio padrão do intercepto com o eixo do Y
DPR	Desvio padrão relativo
EPI	Equipamentos de proteção individual
EPR	Erro padrão relativo

ERO	Espécie reativa de oxigênio
Fe	Ferro
FMN	Fator de matriz normalizado
GCL	Glutamato cisteína ligase
GFAAS	Espectrômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite
GLI	L-glicina
GLU	L-glutamato
GR	Glutathione redutase
GS	GSH sintetase
GSH	Glutathione reduzida
GSH – PX	Glutathione peroxidase
GSSG	Glutathione oxidada
Hg	Mercúrio
HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HSC	Células hepáticas estreladas
IARC	International Agency for Research on Cancer
IC	Inclinação da curva de calibração
iNOS	NO – sintetase induzível
IRPTC	International Register of Potentially Toxic Chemicals of United Nations Environment Program
LID	Limite de detecção
LIQ	Limite de quantificação
LSQ	Limite superior de quantificação
MDA	malondialdeído
Mn	Manganês
MT	Metalotionina
NAC	N-acetilcisteína
NAG	N- Acetil-β-D glucosaminase
NTP	US National Toxicology Program
Ni	Níquel
NO	Óxido nítrico
⁻ O ₂	Superóxido

OH ⁻	Hidroxila
ONOO ⁻	Peroxinitrito
p. a.	Peso animal
Pb	Chumbo
PCF	Programa de pós-graduação <i>stricto sensu</i> em ciências farmacêuticas
r	Coeficiente de correlação
Se	Selênio
SH	Tiol
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TGF – β	Fator de crescimento transformador beta
UEPG	Universidade Estadual de Ponta Grossa
UNIOESTE	Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Zn	Zinco

1. INTRODUÇÃO

O cádmio (Cd) é um metal pesado, amplamente distribuído no meio ambiente que está presente em alimentos, água, solo, cigarros, ar, no processo de queima de combustíveis químicos e também em atividades ocupacionais como manipulação, montagem e desmontagem de telefones celulares e produção de baterias. É considerado um dos metais mais tóxicos onde, em condições patológicas, leva a danos e à morte celular devido à produção indireta de espécies reativas de oxigênio (EROs). Sua meia vida é de 15 a 20 anos e apresenta toxicidade em órgãos como rins, pulmões, ossos, cérebro e fígado. Está associado ao desenvolvimento de câncer e é classificado como carcinogênico tipo I, devido ao seu alto potencial cancerígeno.

Estudos mostram que a associação de agentes quelantes e antioxidantes melhoram o processo de quelação do metal e previnem a toxicidade induzida pelo Cd, contribuindo, dessa forma, com o processo de desintoxicação.

A N-acetilcisteína (NAC) é um aminoácido com ação mucolítica, com propriedades como agente quelante e antioxidante devido a sua habilidade em reduzir espécies reativas de oxigênio e de fornecer sítios quelantes para os metais; participa, também, da manutenção dos níveis de glutathiona (GSH). Estudos sugerem seu efeito protetor nas intoxicações por Cd, porém, não há nenhum trabalho científico realizado com o uso da NAC na exposição crônica ao metal. Diante disso, este estudo pretende avaliar a ação da N-acetilcisteína sobre os efeitos tóxicos causados pelo cádmio.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a ação da N-acetilcisteína como agente antioxidante e quelante ao cádmio.

2.2 Objetivos específicos

I. Desenvolver um método analítico adequado para a quantificação de cádmio, utilizando espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (GFAAS), em amostras biológicas (plasma, cérebro, fígado, pulmões, rins e fêmur);

II. Medir a concentração de cádmio no sangue e nos órgãos (cérebro, fígado, pulmões, rins e fêmur);

III. Medir a quantidade de tióis nos órgãos (cérebro, fígado, pulmões e rins);

IV. Medir a atividade das enzimas antioxidantes nos órgãos (cérebro, fígado, pulmões e rins);

V. Medir os marcadores de função renal no sangue;

VI. Verificar as alterações histológicas dos órgãos (cérebro, fígado, pulmões e rins).

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Cádmio

O Cd é um metal de transição de cor cinza claro, com símbolo Cd, flexível e maleável à temperatura ambiente. Foi descoberto em 1817, pelo químico alemão Friedrich Strohmeyer (FERNANDES; MAINIER, 2014) e é considerado um dos metais mais tóxicos que existe (NINKOV *et al.*, 2015). Está amplamente distribuído no meio ambiente e ocupa o 67º lugar entre os 90 elementos mais abundantes na terra (JOSEPH, 2009). Encontra-se na natureza associado ao cobre (Cu), ao ferro (Fe) e ao zinco (Zn) (ATSDR, 2012; KUKONGVIRIYAPAN *et al.*, 2016) mais comumente na crosta terrestre (JOSEPH, 2009), conservando-se nos sedimentos e no solo por décadas (BERNARD, 2008).

Atividades como erupções vulcânicas e incêndios florestais são responsáveis por introduzir o Cd naturalmente no meio ambiente (JOSEPH, 2009), sendo essa a contaminação responsável pela maior exposição do metal para os humanos (LUEVANO; DAMODARAN, 2014). Na Tabela 1 estão descritas outras atividades que colaboram para a inserção do metal no meio ambiente, contaminando água, solo, plantas, alimentos e a atmosfera (LI *et al.*, 2017), podendo ser veiculado pelo ar para pontos distantes da sua fonte de emissão (JOSEPH, 2009; WHO, 2010). O descarte incorreto de produtos que contém Cd em sua composição contribui para o aumento da contaminação (ATSDR, 2012).

Tabela 1 Atividades que colaboram para a introdução de Cd no meio ambiente.

ATIVIDADES	REFERÊNCIAS
Descarga de efluentes de mineração	LI <i>et al.</i> , 2017
Descarga de resíduos industriais	LI <i>et al.</i> , 2017
Gases de escape de automóveis	LI <i>et al.</i> , 2017
Incineração de resíduos	BERTIN; AVERBECK, 2006
Lixo eletrônico	BERTIN; AVERBECK, 2006
Poluição do mar	LI <i>et al.</i> , 2017
Queima de combustíveis fósseis	JOSEPH, 2009; ATSDR, 2012; LI <i>et al.</i> , 2017
Uso de fertilizantes agrícolas	BERTIN; AVERBECK, 2006; ATSDR, 2012
Uso de fertilizantes biológicos	LI <i>et al.</i> , 2017

O perigo de exposição ambiental é continuamente aumentado devido ao Cd não ser um metal degradado (RANI *et al.*, 2014). Quando absorvido pelas plantas, concentra-se ao longo da cadeia alimentar e se acumula no organismo de quem ingere esses alimentos (BERNARD, 2008). A população que reside próximo às áreas poluídas é alvo de preocupação, especialmente em países menos desenvolvidos, pois está exposta a maiores quantidades do metal (BERNARD, 2008; RANI *et al.*, 2014).

O Cd também está presente no ambiente de trabalho e na linha de produção de diversos setores industriais, conforme Tabela 2.

Tabela 2 Atividades industriais onde há exposição ocupacional de Cd.

LINHA DE PRODUÇÃO	REFERÊNCIAS
Baterias de níquel (Ni) e Cd	BERTIN; AVERBECK, 2006; JOSEPH, 2009; RANI <i>et al.</i> , 2014
Anticorrosivos	BERTIN; AVERBECK, 2006
Baterias	BERTIN; AVERBECK, 2006; LI <i>et al.</i> , 2017
Baterias recarregáveis	RANI <i>et al.</i> , 2014
Estabilizadores de plástico	BERTIN; AVERBECK, 2006
Estabilizadores químicos	JOSEPH, 2009; RANI <i>et al.</i> , 2014
Galvanização (galvanoplastia)	BERTIN; AVERBECK, 2006; JOSEPH, 2009
Ligas metálicas	RANI <i>et al.</i> , 2014
Manipulação, montagem e desmontagem de telefones celulares	BERTIN; AVERBECK, 2006
Metalúrgica	BERTIN; AVERBECK, 2006; LI <i>et al.</i> , 2017
Mineração de metais pesados	BERTIN; AVERBECK, 2006
Pigmentos	BERTIN; AVERBECK, 2006; JOSEPH, 2009; RANI, 2014; LI <i>et al.</i> , 2017
Placas de circuito de computador	BERTIN; AVERBECK, 2006
Revestimentos metálicos	RANI <i>et al.</i> , 2014

A exposição ocupacional ganha atenção devido ao risco de intoxicação, pois trabalhadores desses setores estão expostos ao metal em níveis significativamente mais altos do que a população em geral (JOSEPH, 2009). O contato ocorre principalmente pela inalação da fumaça (BERNARD, 2008; RANI *et al.*, 2014) e por ingestão acidental (ATSDR, 2012) podendo levar a intoxicações agudas e crônicas (RANI *et al.*, 2014). O uso de equipamentos de proteção individual (EPI) e as boas práticas de higiene, como se banhar e trocar de roupa antes do retorno aos seus lares, auxiliam no controle da exposição ao metal (ATSDR, 2012).

O cigarro também é uma importante fonte de exposição ao Cd (BERNARD, 2008; JOSEPH, 2009; JOHRI *et al.*, 2010; ATSDR, 2012; LUEVANO; DAMODARAN, 2014; RANI *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2017).

As folhas das plantas de tabaco armazenam naturalmente altas concentrações vindas do solo (JOSEPH, 2009; WHO, 2010; ATSDR, 2012) e cerca de 10% do óxido de cádmio (CdO) é absorvido e levado para a corrente sanguínea quando o cigarro é utilizado (BERNARD, 2008; JOHRI *et al.*, 2010), alcançando níveis de concentração de Cd no sangue e nos rins de 4 a 5 vezes e 2 a 3 vezes maior, respectivamente, quando comparados aos níveis de não fumantes (JOHRI *et al.*, 2010). A quantidade absorvida do metal, quando um maço de cigarro por dia é utilizado, é de 1 a 3 ug, um valor alto considerando o nível médio nacional de 0,376 ug.L⁻¹ segundo a Agência de Substâncias Tóxicas e de Registros de Doenças dos Estados Unidos (ATSDR). Em fumantes, esse nível sobe para 1,58 ug.L⁻¹ (ATSDR, 2012).

Visto como um poluente importante, podendo causar intoxicações agudas e crônicas, a Internacional Agency for Research on Cancer (IARC) e a International Register of Potentially Toxic Chemical of United Nations Environment Program (IRPTC) o reconhecem como um metal bastante perigoso e tóxico para a saúde (BERTIN; AVERBECK, 2006; JOHRI *et al.*, 2010; LUEVANO; DAMODARAN, 2014).

3.1.1 Toxicocinética

Sua meia vida é de 15 a 20 anos (BERTIN; AVERBECK, 2006; JOSEPH, 2009; RANI *et al.*, 2014) e seus efeitos tóxicos dependem da concentração, do tempo de exposição e da via de introdução (ATSDR, 2012), acumulando-se de forma irreversível, principalmente nos rins, fígado e pulmões (BERNARD, 2008).

A absorção pelo trato digestivo a partir da alimentação é de 3 a 5% (BERNARD, 2008) e é influenciada por fatores como a quantidade elevada de gordura e de proteína na dieta e a deficiência em Zn (RANI *et al.*, 2014). A deficiência em Fe permite uma maior absorção do metal pela ingestão de alimentos (BERNARD, 2008; JOHRI *et al.*, 2010; RANI *et al.*, 2014), o que explica, em exposição similar de mulheres jovens apresentarem concentrações mais elevadas do metal quando comparadas aos homens (JOHRI *et al.*, 2010).

A absorção via pele representa apenas 0,2 a 0,8% (RANI *et al.*, 2014), sendo considerada insignificante (BERNARD, 2008) e a pulmonar, cerca de 5 a 50% (ATSDR, 2012). Após absorvido, Cd entra na corrente sanguínea e atinge seus órgãos alvos (RANI *et al.*, 2014), podendo permanecer acumulado ao longo da vida (BERNARD, 2008; ATSDR, 2012).

O metal tem baixos níveis de excreção (LUEVANO; DAMODARAN, 2014) e está presente nas fezes (ATSDR, 2012) e principalmente na urina (ATSDR, 2012; RANI *et al.*, 2014), esta representando 0,005 a 0,01% de toda a carga corporal (RANI *et al.*, 2014).

Cádmio não atravessa a placenta com facilidade, explicando o fato de apresentar menor toxicidade para o feto quando comparado com outros metais pesados (RANI *et al.*, 2014).

Como o Cd não é um metal essencial, não há um sistema de transporte de membranas para que ocorra sua captação celular. Acredita-se que ele utiliza mecanismos de transporte (RANI *et al.*, 2014) principalmente no processo de acúmulo nos rins (YANG; SHU, 2015). São exemplos: canais de Fe em células intestinais e canais de Ca voltagem dependente, os quais permitem a recaptção do metal nas células hepáticas, pituitárias e renais (RANI *et al.*, 2014).

A distribuição de Cd pelo organismo está associada com ligação a moléculas, como, por exemplo, albumina (RANI *et al.*, 2014; YANG; SHU, 2015), aminoácidos e, também e mais fortemente, a proteínas de ligação específica de metais, como a metalotionina (MT) (RANI *et al.*, 2014). Quando o complexo Cd-albumina é transportado para o fígado, o metal é deslocado e, por sua vez, induz a síntese de MT (RANI *et al.*, 2014).

Metalotioninas são proteínas ricas em cisteína que se ligam com alta afinidade aos metais pesados e têm se mostrado muito importante na proteção contra a toxicidade do Cd (BERTIN; AVERBECK, 2006; RANI *et al.*, 2014; YANG; SHU, 2015) e contra o estresse oxidativo, devido a sua capacidade de quelar Cd livre em mamíferos (BERTIN; AVERBECK, 2006), protegendo a célula do íon Cd que é bastante tóxico e reage com os constituintes celulares na sua forma livre (BERNARD, 2008). Essas proteínas estão principalmente associadas ao processo de desintoxicação devido ao fato de aumentarem sua produção quando ocorre intoxicação pelo metal (BERTIN; AVERBECK, 2006). Rins e fígado sintetizam MT, o que pode explicar o acúmulo do metal em maiores quantidades nesses órgãos (BERNARD, 2008).

O Cd possui alta afinidade por grupos tóis e forma complexos com substâncias que os possuem em suas estruturas químicas, tais como glutathione reduzida (GSH), L-cisteína (CIS), L-homocisteínas e N-acetilcisteína (RANI *et al.*, 2014; YANG; SHU, 2015). Essas substâncias também participam do transporte do metal pelo organismo (YANG; SHU, 2015).

Uma vez absorvido, Cd é retirado rapidamente da circulação sanguínea e se acumula principalmente nos rins, fígado (BERNARD, 2008; RANI *et al.*, 2014), pulmões, testículos, cérebro e sistema nervoso central, causando muitos efeitos tóxicos (RANI *et al.*, 2014).

3.1.2 Toxicodinâmica

O Cd pode prejudicar uma série de sistemas biológicos, geralmente em doses que são muito mais baixas do que a maioria dos metais tóxicos (BERNARD, 2008). Está associado a fatores de risco cardiovascular como aumento do risco de infarto do miocárdio (JOHRI *et al.*, 2010), aterosclerose (KUKONGVIRIYAPAN *et al.*, 2016) e desenvolvimento de hipertensão. Colabora também com o aparecimento de diabetes mellitus tipo 2 (JOHRI *et al.*, 2010; KUKONGVIRIYAPAN *et al.*, 2016), anemia (JOHRI *et al.*, 2010), hipertireoidismo (LI *et al.*, 2017), enfisema, osteoporose (RANI *et al.*, 2014), e de vários tipos de câncer em pulmão, próstata, rins, mama e intestino (JOHRI *et al.*, 2010). É classificado como carcinogênico tipo I pelos US National Toxicology Program (NTP) e IARC (ODEWUMI *et al.*, 2011; RANI *et al.*, 2014; WANG, J. *et al.*, 2014).

Exerce influência no metabolismo energético e transporte de metais em membranas ao competir com metais essenciais como o Ca, Cu, selênio (Se) e Zn (RANI *et al.*, 2014).

3.1.2.1 Mecanismos de toxicidade

3.1.2.1.1 Estresse Oxidativo

O sistema antioxidante é eficaz no combate às espécies reativas de oxigênio (EROs) que danificam as células e participam de vários processos patológicos no organismo. Glutathione reduzida, glutathione redutase (GR), glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) são importantes

substâncias que participam do sistema antioxidante (LI *et al.*, 2017). A enzima SOD catalisa a dismutação do radical superóxido ($\cdot\text{O}_2$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nos meios intracelular e intramitocondrial. A GSH-Px reduz H_2O_2 e forma glutatona oxidada (GSSG). A GR reduz a GSSG em GSH e a catalase, por sua vez, catalisa a redução de H_2O_2 em água (H_2O) (Figura 1) (OGA, 1996; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

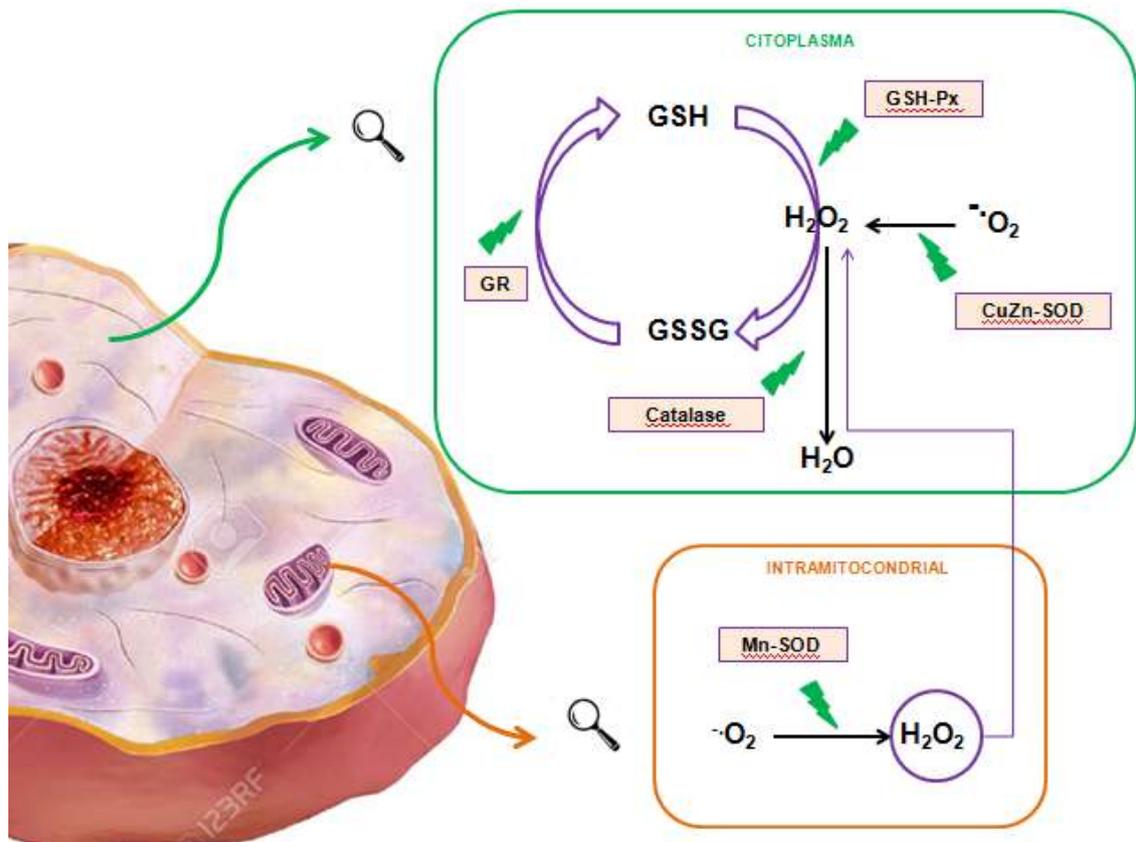


Figura 1 Mecanismo do estresse oxidativo.
Fonte: Adaptado de OGA, 2008.

A GSH é um tripeptídeo considerado um dos mais importantes antioxidantes naturais (RUSHWORTH; MEGSON, 2014; MOKHTARI *et al.*, 2017) e participa de outros processos fisiológicos como desintoxicação de xenobióticos eletrofílicos, modulação de transdução de sinal, regulação da resposta imune, metabolismo de prostaglandinas e leucotrienos, sinalização de neurotransmissores e modulação da proliferação celular (SAMUNI *et al.*, 2013).

Quando ocorre um desequilíbrio entre a produção de EROs e a habilidade do organismo em eliminá-los, o estresse oxidativo é, então, instalado (KUKONGVIRIYAPAN *et al.*, 2016).

O estresse oxidativo desempenha um importante papel na toxicidade do Cd, o qual pode resultar em danos fisiológicos em diferentes órgãos (RANI *et al.*, 2014; KUKONGVIRIYAPAN *et al.*, 2016). Diferente dos outros, Cd é um metal não redox que não consegue gerar EROs por si só, porém, promove indiretamente a produção dos radicais superóxido, hidroxila (OH⁻), óxido nítrico (NO) (BERTIN; AVERBECK, 2006; RANI *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2017) e H₂O₂ (RANI *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2017;), a diminuição dos níveis de glutathiona (BERTIN; AVERBECK, 2006; LUEVANO; DAMODARAN, 2014; RANI *et al.*, 2014), a indução da peroxidação lipídica (LUEVANO; DAMODARANI, 2014) e a liberação de EROs pela mitocôndria (BERTIN; AVERBECK, 2006).

Abaixo estão listados os mecanismos pelos quais o Cd participa indiretamente do estresse oxidativo:

- 1) Afeta a atividade das proteínas antioxidantes que desempenham um importante papel na eliminação de EROs ao reduzir os níveis de catalase, glutathiona redutase (BERTIN; AVERBECK, 2006; KUKONGVIRIYAPAN *et al.*, 2016) e glutathiona peroxidase (KUKONGVIRIYAPAN *et al.*, 2016);
- 2) A afinidade do Cd ao grupo tiol presente na GSH colabora para que seus níveis diminuam após a intoxicação pelo metal, contribuindo para a diminuição da ação antioxidante nas células e para a fragilidade celular (BERTIN; AVERBECK, 2006; KUKONGVIRIYAPAN *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2017). Segundo estudos, alterações na concentração do Cd em intoxicações crônicas ou exposição a altas doses, fazem com que ocorra um aumento da quantidade do antioxidante a fim de ligar-se com o metal e diminuir EROs indiretamente produzidas por ele (LI *et al.*, 2017);
- 3) Embora o tratamento com Cd possa contribuir com o aumento da quantidade SOD (LI *et al.*, 2017), Cd se liga a grupos sulfidrílicos e substitui o Zn e/ou manganês (Mn) ligados à SOD, reduzindo a sua atividade antioxidante (LI *et al.*, 2017);
- 4) É responsável pela diminuição de Se no organismo (RANI *et al.*, 2014), o qual se combina com o metal e, juntos, são eliminados por meio da bile (RANI *et al.*, 2014). Devido a sua participação na formação da glutathiona peroxidase, essa tem sua atividade diminuída (RANI *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2017) e, sendo

uma das principais enzimas antioxidantes do organismo, resulta em um aumento de EROs e de H₂O₂ (RANI *et al.*, 2014);

- 5) O Cd também participa da indução do estresse oxidativo por induzir a peroxidação lipídica (BERTIN; AVERBECK, 2006), onde a membrana se torna alvo da atuação dos EROs promovendo importantes alterações em sua estrutura e permeabilidade, resultando em morte celular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997);
- 6) Estimula a produção de NO-sintetase induzível (iNOS) (LI *et al.*, 2017) que participa do processo de formação do NO que possui forte ação citotóxica e pode reagir com EROs, principalmente o ânion superóxido formando peroxinitrito (ONOO⁻) (DUSSE *et al.*, 2003) e outros produtos tóxicos que contribuem com a nitração de proteínas e com a peroxidação lipídica (OGA, 1996).

A participação do Cd no estresse oxidativo colabora, também, para o desenvolvimento da carcinogênese (LUEVANO; DAMODARAN, 2014; RANI *et al.*, 2014).

3.1.2.1.2 Carcinogênese

As maneiras as quais o Cd parece relacionar-se com a carcinogênese são alterações da sinalização dos eventos de reparo do DNA ao atuar na inibição de proteínas que participam do seu reconhecimento e correção (BERTIN; AVERBECK, 2006; LUEVANO; DAMODARAN, 2014; RANI *et al.*, 2014). Ativação de alguns sinais celulares, inibição da metilação e/ou interferência na adesão celular mediada por caderinas regulando, assim, o ciclo de progressão celular. Interfere, também, ao estimular os ciclos de proliferação, diferenciação e replicação do DNA (BERTIN; AVERBECK, 2006).

O metal induz a superexpressão de genes que viabilizam a proliferação de células (BERTIN; AVERBECK, 2006; LUEVANO; DAMODARAN, 2014; RANI *et al.*, 2014) e o desenvolvimento do tumor após a exposição ao metal (BERTIN, 2006). Induz também a apoptose (LUEVANO; DAMODARAN, 2014; RANI *et al.*, 2014) e

em altas concentrações pode causar necrose nos tecidos (LUEVANO; DAMODARAN, 2014).

Estudos de exposição crônica em modelo animal mostraram células epiteliais cultivadas *in vitro* transformadas em células malignas resistentes à apoptose, sugerindo que o Cd induz a carcinogênese (LUEVANO; DAMODARAN, 2014).

3.1.2.2 Toxicidade nos órgãos

3.1.2.2.1 Toxicidade nos rins

O rim é o primeiro órgão que o Cd se concentra e, em função disso, é o primeiro a manifestar os sinais de toxicidade (BERNARD, 2008; RANI *et al.*, 2014). Quando em exposição crônica, cerca de 50% de todo o metal do organismo encontra-se nesse órgão (BERNARD, 2008; JOHRI *et al.*, 2010). Estudos sugerem que a entrada no rim se dá pela utilização de canais transportadores de íons, como canais de Zn, Fe e Ca, embora a interação do Cd com proteínas de baixo peso molecular no plasma dificultam as tentativas em identificar os mecanismos que o metal utiliza para ocupar as células do túbulo proximal *in vivo* (RANI *et al.*, 2014).

Metalotioninas, canais transportadores de Zn e Ca e proteínas de ligação com grupo tiol também atuam no processo de acumulação do metal, onde a ligação com MT (Cd-MT) é um mecanismo de desintoxicação saturável, ou seja, são necessárias concentrações elevadas do metal para a que nefrotoxicidade torne-se evidente (YANG; SHU, 2015). Uma parte do complexo Cd-MT vai para o plasma e é excretada pelos rins na forma de Cd inorgânico (BRUNTON *et al.*, 2012). Outra parte entra no túbulo proximal e é degradada por lisossomos e endossomos (JOHRI *et al.*, 2010; BRUNTON *et al.*, 2012) permitindo que Cd se torne livre no citosol e interaja com componentes celulares (BERNARD, 2008; JOHRI *et al.*, 2010; BRUNTON *et al.*, 2012), induzindo o estresse oxidativo, ativando vias de morte celular (JOHRI *et al.*, 2010) e alterando a taxa de filtração glomerular (YANG; SHU, 2015).

A excreção de proteínas de baixo peso molecular é uma das primeiras manifestações de nefropatia induzida por Cd (BERNARD, 2008; JOHRI *et al.*, 2010; WHO, 2010), B2-microglobulina, alfa microglobulina e proteínas ligadas ao retinol em grandes quantidades na urina refletem a diminuição da capacidade de

reabsorção tubular visto que, em indivíduos saudáveis, essas proteínas são completamente reabsorvidas (BERNARD, 2008; JOHRI *et al.*, 2010). O aumento dessas proteínas associado com a redução da taxa de filtração glomerular também é importante, pois compromete a função tubular, tornando-a irreversível (BERNARD, 2008).

A excreção elevada na urina de enzimas como, por exemplo, N-Acetil- β -D glucosaminase (NAG), proteína total, aminoácidos e albumina também estão associadas à nefropatia (BERNARD, 2008). Essas condições, associadas com albuminúria e diminuição da taxa de filtração glomerular, promovem insuficiência renal já em estágio final (JOHRI *et al.*, 2010).

Cálculos renais são formados quando a nefropatia está associada com distúrbios do metabolismo de Ca (BERNARD, 2008; WHO, 2010).

3.1.2.2.2 Toxicidade nos pulmões

Cerca de 5 a 50% do Cd inalado é absorvido pelos pulmões (ATSDR, 2012) e a contaminação se dá pelo uso do cigarro (a maior fonte de intoxicação), inalação de poeiras e fumaças contaminadas e/ou exposição ocupacional (RANI *et al.*, 2014).

Estudos sugerem que o metal induz a apoptose em células epiteliais de ratos pelo mecanismo de geração de EROs (RANI *et al.*, 2014). Câncer nos pulmões também aparece associado à intoxicação pelo metal, onde alguns estudos relacionam o aumento do risco da doença em trabalhadores expostos ao Cd e seus constituintes (RANI *et al.*, 2014), e outros à exposição crônica também com o aparecimento de câncer nos pulmões e alterações, como, por exemplo, doença obstrutiva crônica das vias aéreas (WHO, 2010). A inalação crônica sugere também o surgimento do câncer tanto em humanos quanto em ratos com manifestação de adenocarcinoma pulmonar, onde células epiteliais brônquicas normais transformaram-se em malignas após a exposição prolongada ao metal (LUEVANO; DAMODARAN, 2014).

3.1.2.2.3 Toxicidade nos ossos

Estudos mostram que a exposição prolongada do Cd em humanos leva ao aumento da fragilidade dos ossos, diminuição da densidade mineral e osteoporose (BERNARD, 2008; SATARUG *et al.*, 2011; RANI *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2017).

Estudo realizado com agricultores expostos ao metal por mais de 20 anos na China (arroz contaminado) confirmou sua toxicidade pela diminuição da densidade óssea em mulheres pós-menopausa e em homens, com elevados índices de Cd no sangue (homens e mulheres) e na urina (mulheres) (BERNARD, 2008).

Embora as complicações ósseas sejam resultados de intoxicações crônicas por Cd, entende-se que isso seja, em grande parte, resultante da toxicidade nos rins induzida pelo metal (JOHRI *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2017), onde as concentrações na urina e no sangue associadas com efeitos ósseos encontram-se mais altas quando há disfunção renal presente (BERNARD, 2008).

Sugere-se, também, que outros mecanismos sejam responsáveis por alteração da função óssea (RANI *et al.*, 2014). Um indiretamente, onde os danos renais ou gastrintestinais causados pelo metal podem produzir um efeito secundário nos ossos, e outro atuando diretamente nos osteoclastos ao estimular a reabsorção óssea, e nos osteoblastos ao inibir a formação óssea e induzir a apoptose (RANI *et al.*, 2014). Nos rins, o metal inibe a atividade da enzima 1-hidroxicolecalciferol hidrogenase, que é responsável pela conversão da forma ativa da Vitamina D3, que exerce importante efeito na absorção de íons de Ca no intestino (RANI *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2017) e provoca perda de Ca e fosfato pela urina (BERNARD, 2008; JOHRI *et al.*, 2010).

3.1.2.2.4 Toxicidade no cérebro

O metal danifica o sistema nervoso, pois atravessa a barreira hematoencefálica (BHE), destruindo a integridade da membrana celular e resultando na perda do potencial de membrana neurológico ao inibir a ativação de GSH e de GR. Há produção de grande quantidade de EROs que, por sua vez, inibem a atividade ATPase por combinar-se com os grupos sulfidrilas de enzimas e, também, por oxidar lipídeos e proteínas de membrana neuronais. Exerce influência na inibição da degradação da acetilcolina (ACh) pela acetilcolinesterase (AChE) e na ação dos neurotransmissores, causando convulsão e epilepsia (LI *et al.*, 2017).

O desequilíbrio causado pelo Cd entre o estresse oxidativo e as defesas antioxidantes do organismo leva a alterações neurodegenerativas como disfunção neurocomportamental, hiperatividade em crianças, deficiência na aprendizagem e memória e diminuição da velocidade psicomotora em trabalhadores expostos ao

metal. Os sintomas incluem vertigem, disfunção olfativa, dor de cabeça e sintomas parkinsonianos (CHEN *et al.*, 2014).

3.1.2.2.5 Toxicidade no fígado

Grande parte do Cd absorvido no organismo chega primeiro na circulação intravenosa do fígado, principalmente ligado à albumina. Retirado dos capilares sinusoidais é, então, levado para os hepatócitos com o auxílio de transportadores de membrana que facilitam a entrada do metal nas células (RANI *et al.*, 2014). A glutathione, encontrada em altas concentrações no fígado, é a primeira defesa contra a hepatotoxicidade gerada pelo metal (RANI *et al.*, 2014), ela combina-se com o Cd e ambos são excretados pela bile (BRUNTON *et al.*, 2012).

Como já citado anteriormente, estimula a síntese de MT (YANG; SHU, 2015) a qual se liga ao Cd no citosol hepático, deixando-o inativo e armazenando-o, exercendo, assim, atividade benéfica no órgão (RANI *et al.*, 2014; YANG; SHU, 2015). Quando em altas concentrações, a ponto de ocorrer saturação de MT, a lesão hepática ocorre por diversas maneiras. Há um processo de desenvolvimento de fibrose, onde o metal contribui para o progresso de inflamação ao aumentar níveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e induzir a expressão da ciclooxygenase (COX-2) (LI *et al.*, 2017). O aumento de TNF- α e TG- β ativam células hepáticas estreladas (HSC), as quais se proliferam e iniciam a síntese e secreção de colágeno por meio de hidroxiprolina. O resultado é um aumento da síntese de matriz extracelular contribuindo para a formação da fibrose (LI *et al.*, 2017).

Ocorre, também, injúria produzida por efeito direto do metal ao ligar-se aos grupos sulfidrilas em moléculas críticas na mitocôndria. Ao inativar grupos tióis, o estresse oxidativo se instala e a disfunção da mitocôndria e de sua permeabilidade tornam-se presentes. Por fim, ocorre lesão tecidual indireta, motivada por inflamação decorrente da exposição aguda (RANI *et al.*, 2014).

3.2 N-acetilcisteína

N-acetilcisteína é um aminoácido também conhecido como N-acetil-L-cisteína ou NAC (SAMUNI *et al.*, 2013) que vem sendo utilizado há muito tempo na prática

clínica, devido a sua propriedade mucolítica (DODD *et al.*, 2008; SAMUNI *et al.*, 2013; RUSHWORTH; MEGSON, 2014; MOKHTARI *et al.*, 2017) por quebrar as ligações dissulfetos nas proteínas do muco e diminuir sua viscosidade (SAMUNI *et al.*, 2013; RUSHWORTH; MEGSON, 2014). É um medicamento seguro (DHOUIB *et al.*, 2016; MOKHTARI *et al.*, 2017), bem tolerado (DODD *et al.*, 2008; DHOUIB *et al.*, 2016), comercialmente acessível e barato (MOKHTARI *et al.*, 2017).

Possui característica nucleofílica (doador de par de elétrons) (SAMUNI *et al.*, 2013; DHOUIB *et al.*, 2016) e, devido à presença do grupo tiol (SH) em sua estrutura química (Figura 2), pode ser oxidada por vários radicais (SAMUNI *et al.*, 2013; DHOUIB *et al.*, 2016; MOKHTARI *et al.*, 2017), reduzir EROs (FLORA, 2009; MOKHTARI *et al.*, 2017) e fornecer sítios quelantes para metais (SAMUNI *et al.*, 2013).

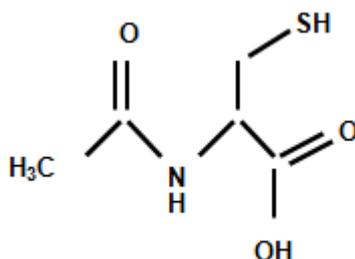


Figura 2 Estrutura química da N-acetilcisteína.
Fonte: Adaptado de RUSCHWORTH, 2014.

Por ser precursor da L-cisteína (SAMUNI *et al.*, 2013; DHOUIB *et al.*, 2016), grande parte de seus efeitos antioxidantes é devido ao estímulo da síntese da GSH (RUSHWORTH; MEGSON, 2014; DHOUIB *et al.*, 2016; MOKHTARI *et al.*, 2017), aumentando seus níveis intracelulares no organismo (RUSHWORTH; MEGSON, 2014). N-acetilcisteína tem uma forte habilidade em restaurar o balanço prooxidante/antioxidante em intoxicações por metais (FLORA, 2009) e sua suplementação reverte a redução da GSH que acontece quando o estresse oxidativo é instalado (DODD *et al.*, 2008). Em função disso, NAC é a opção de tratamento em doenças caracterizadas pela geração de EROs (MOKHTARI *et al.*, 2017).

Estudos mostram que a NAC contribui para a prevenção da apoptose (SAMUNI *et al.*, 2013; MOKHTARI *et al.*, 2017) e da genotoxicidade, a qual está relacionada com o aumento de níveis intracelulares de GSH e diminuição da despolarização da membrana mitocondrial (MOKHTARI *et al.*, 2017). Ainda na mitocôndria restaura a transferência de elétrons, melhora a atividade de absorção do

Ca e exerce influência em algumas atividades, especialmente as associadas com a fosforilação oxidativa (SAMUNI *et al.*, 2013).

Apresenta, além da propriedade mucolítica, efeito protetor em doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (RUSHWORTH; MEGSON, 2014; MOKHTARI *et al.*, 2017) e Doenças de Huntington (RUSHWORTH; MEGSON, 2014) e ação anti-inflamatória (DODD *et al.*, 2008; DHOUIB *et al.*, 2016; MOKHTARI *et al.*, 2017). É aplicada no tratamento de diversas desordens do organismo conforme Tabela 3.

Tabela 3 Aplicações terapêuticas da N-acetilcisteína.

TRATAMENTOS	REFERÊNCIAS
Aterosclerose	RUSHWORTH, 2014
Bronquite crônica	SAMUNI, 2013; MOKHTARI, 2017
Câncer de fígado	MOKHTARI, 2017
Cardiotoxicidade da doxorubicina	SAMUNI, 2013
Colite ulcerativa	MOKHTARI, 2017
Esquizofrenia	DODD, 2008; SAMUNI, 2013
Fibrose cística	RUSHWORTH, 2014, DHOUIB, 2016
Fibrose pulmonar idiopática	RUSHWORTH, 2014
Intoxicação por paracetamol	DODD, 2008; SAMUNI, 2013; RUSHWORTH, 2014; DHOUIB, 2016; MOKHTARI, 2017
Lesão cardíaca isquêmica	SAMUNI, 2013
Nefropatia induzida por contraste	SAMUNI, 2013; RUSHWORTH, 2014, DHOUIB, 2016
Ovário policístico	MOKHTARI, 2017
Prevenção da asma	MOKHTARI, 2017
Síndrome do desconforto respiratório agudo	SAMUNI, 2013
Toxicidade induzida por quimioterápicos	SAMUNI, 2013
Transtorno bipolar	DODD, 2008; SAMUNI, 2013
Vírus da imunodeficiência adquirida (HIV)	SAMUNI, 2013; RUSHWORTH, 2014

3.2.1 Farmacocinética

É apresentada nas formas farmacêuticas oral, intravenosa e inalatória (DODD *et al.*, 2008; SAMUNI *et al.*, 2013).

Em administração oral é rapidamente absorvida no intestino delgado (RUSHWORTH; MEGSON, 2014), apresentando pico de concentração no plasma por volta de 30 a 60 minutos após ser administrada (KELLY, 1998; RUSHWORTH;

MEGSON, 2014). Sofre metabolização de primeira passagem no fígado (RUSHWORTH; MEGSON, 2014) e sua biodisponibilidade é diminuída para 10% (SAMUNI *et al.*, 2013; RUSHWORTH; MEGSON, 2014; MOKHTARI *et al.*, 2017). Existe a possibilidade de que essa baixa quantidade detectada no plasma seja em função da sua rápida difusão para as células e na conseqüente conversão em GSH, mantendo um gradiente de concentração constante através da membrana (RUSHWORTH; MEGSON, 2014).

Uma vez que entra na circulação sistêmica pela absorção via oral ou intravenosa, ela deixa o sangue pela N-desacetilação ou por transporte mediado por transportador, o qual ainda não é esclarecido (SAMUNI *et al.*, 2013). No plasma, por ser um ambiente pró-oxidante, ocorrem reações redox entre proteínas NAC, cistina e cisteína, produzindo NAC-cisteína, NAC-NAC e cisteína (SAMUNI *et al.*, 2013).

É excretada pelos rins (SAMUNI *et al.*, 2013) e apenas 3% da NAC marcada radioativamente é excretada pelas fezes quando administrada via oral (KELLY, 1998).

Os efeitos adversos da NAC dependem da via de administração utilizada (RUSHWORTH; MEGSON, 2014). Em administração intravenosa são comuns reações como náusea, vômitos e reações cutâneas como prurido e eritema (DODD *et al.*, 2008; RUSHWORTH; MEGSON, 2014). Na administração oral há a possibilidade de ocorrer náusea, vômito e diarreia (DODD *et al.*, 2008).

Reações sistêmicas severas são incomuns e são consideradas anafilactóides, incluindo os sintomas de rubor, prurido, broncoespasmos, angioedema e hipotensão (DODD *et al.*, 2008; RUSHWORTH; MEGSON, 2014) e aparecem aumentadas na administração intravenosa quando comparadas com a oral (DODD *et al.*, 2008; RUSHWORTH; MEGSON, 2014), provavelmente devido às maiores concentrações por essa via (RUSHWORTH; MEGSON, 2014).

3.2.2 Farmacodinâmica

3.2.2.1 Propriedade antioxidante

A N-acetilcisteína exerce suas propriedades antioxidantes ao promover a desintoxicação e atuar diretamente na limpeza EROs (RUSHWORTH; MEGSON, 2014; MOKHTARI *et al.*, 2017). Em meio intracelular, ela é convertida em L-cisteína, a qual atua como substrato para a síntese da GSH, sustentando, de forma indireta,

sua produção (Figura 3) (SAMUNI *et al.*, 2013; RUSHWORTH; MEGSON, 2014; MOKHTARI *et al.*, 2017).

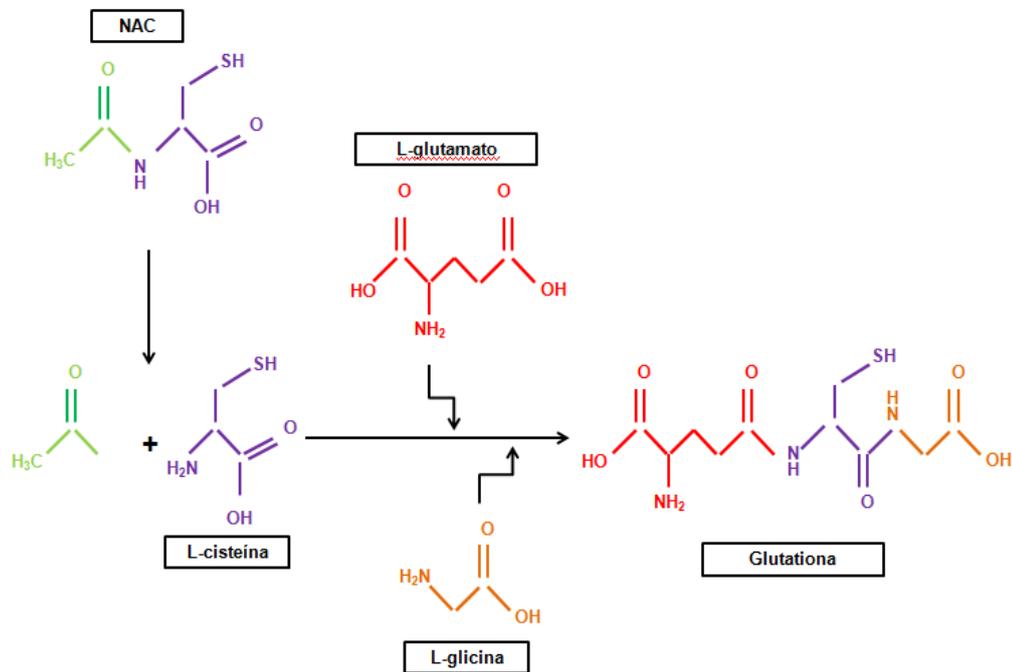


Figura 3 Formação da glutatona a partir da L-cisteína.
Fonte: Adaptado de RUSHWORTH; MEGSON, 2014.

Conforme esquema demonstrado na Figura 4, NAC chega no meio intracelular sem a necessidade de transportador e é desacetilada pela enzima N-desacetilase formando acetil e L-cisteína. É importante que esse processo ocorra no meio intracelular, pois a L-cisteína é facilmente oxidada em sua forma inativa (CIS-CIS) no meio extracelular, enquanto NAC é mais resistente à oxidação. A enzima glutamato cisteína ligase (GCL) permite a incorporação do L-glutamato (GLU) à L-cisteína e, na sequência, L-glicina (GLI) é acrescentada via GSH sintetase (GS). Com isso, ocorre a formação da GSH permitindo que ela exerça sua proteção antioxidante no organismo (RUSHWORTH; MEGSON, 2014).

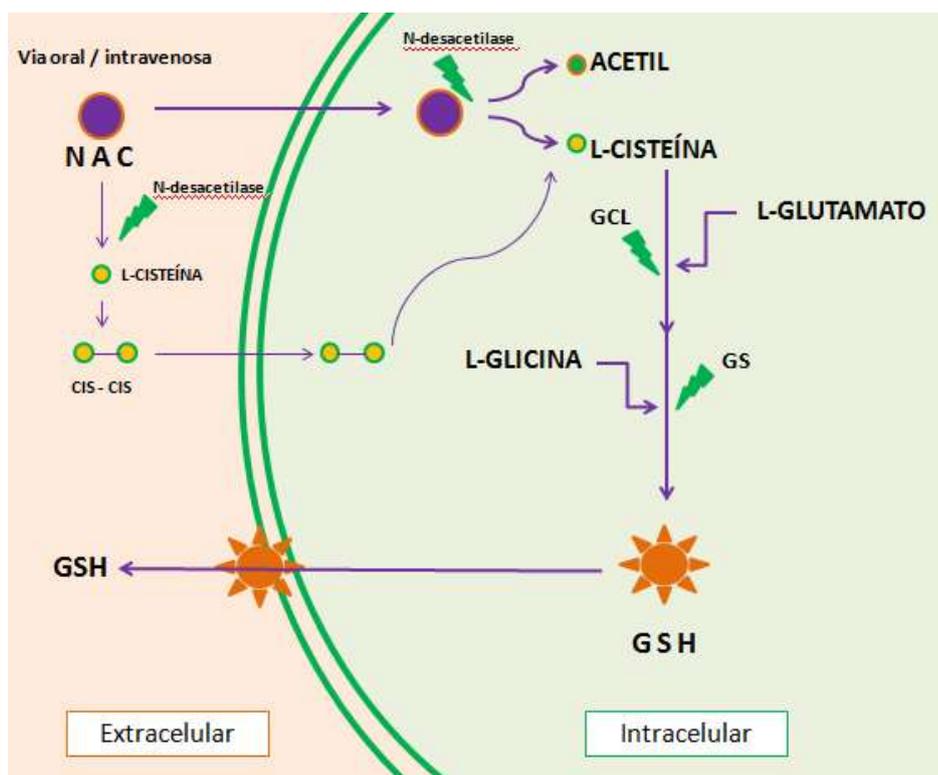


Figura 4 Mecanismo de ação da N-acetilcisteína para a formação de GSH.
Fonte: Adaptado de RUSHWORTH; MEGSON, 2014.

3.2.2.2 Propriedade quelante

Os agentes quelantes são substâncias orgânicas ou inorgânicas utilizadas para se ligar a íons metálicos, originando estruturas em forma de anel heterocíclico chamadas de quelatos e, assim, removê-los facilmente (FLORA; PACHAURI, 2010; AASETH *et al.*, 2015). A eficácia dessas substâncias está relacionada à elevada solubilidade em água, resistência à biotransformação (FLORA, 2009; FLORA; PACHAURI, 2010), baixa toxicidade, alta afinidade com o metal tóxico e rápida formação do quelato (AASETH *et al.*, 2015). É muito importante que o composto formado seja menos tóxico do que o metal em si e também que tenha uma farmacocinética adequada para garantir que o quelante seja capaz de atingir o local crítico onde está depositado o metal, atravessando eficaz e rapidamente as barreiras biológicas (FLORA, 2009; FLORA; PACHAURI, 2010; AASETH *et al.*, 2015).

A NAC é conhecida por apresentar propriedades quelantes devido à presença do grupo tiol em sua estrutura química, onde atua como alvo para a quelação com o Cd (FLORA; PACHAURI, 2010) assim como outros metais pesados como mercúrio (Hg) e chumbo (Pb) e para metais de transição como Cu e Fe (SAMUNI *et al.*, 2013).

Enquanto a NAC tem, portanto, a capacidade de formar conjugados de enxofre com alguns metais, não está claro quanto à importância deste mecanismo em relação ao GSH intracelular atuando como agente quelante ou como antioxidante para melhorar o estresse oxidativo (RUSHWORTH; MEGSON, 2014).

4. ARTIGOS CIENTÍFICOS

4.1 ARTIGO 1

VALIDAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DE CÁDMIO EM ESPECTRÔMETRO DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM ATOMIZAÇÃO ELETROTÉRMICA EM FORNO DE GRAFITE PARA AMOSTRAS DE SANGUE

Priscila Da Caz, Fernanda C. Silva, Carla Brugin Marek e Ana Maria Itinose

Artigo a ser submetido para a Revista Química Nova



Validação da quantificação de cádmio em espectrômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite para amostras de sangue

Priscila Da Caz^a, Fernanda Coleraus Silva^b, Carla Brugin Marek^b e Ana Maria Itinose^{c,*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. CEP 85.819 – 110, Cascavel, Paraná, Brasil.

^bLaboratório de Toxicologia Celular. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. CEP 85.506-470, Cascavel, Paraná, Brasil.

^cCentro de Assistência em Toxicologia (CEATOX). Hospital Universitário do Oeste do Paraná. CEP 85.506-470, Cascavel, Paraná, Brasil

*e-mail: ana.itinose@unioeste.br

VALIDAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DE CÁDMIO EM ESPECTRÔMETRO DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM ATOMIZAÇÃO ELETROTÉRMICA EM FORNO DE GRAFITE PARA AMOSTRAS DE SANGUE

O cádmio (Cd) é um metal pesado, presente em alimentos, água, solo, cigarro, poluição do ar e também na linha de produção de diversas atividades ocupacionais. Está associado com o desenvolvimento de câncer e apresenta toxicidade em diversos órgãos e, por conta disso, é considerado um dos metais mais tóxicos amplamente distribuídos no meio ambiente. A forma mais simples de identificar uma intoxicação por cádmio é realizar a dosagem em plasma, portanto, o objetivo deste estudo é desenvolver um método analítico adequado para a quantificação de Cd em água ultrapura e plasma, utilizando espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (GFAAS). As metodologias e os critérios de validação aplicados seguiram as Resoluções RE n° 899, de 29 de maio de 2003, e RDC n° 27, de 17 de maio de 2012, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Os resultados obtidos no processo de validação analítica certificam que o método desenvolvido é adequado, visto que é seletivo para cádmio, não apresenta efeito residual, apresenta exatidão e precisão intra e intercorrida e limites de detecção e quantificação apropriados.

Palavras-chave: GFAAS, validação, determinação, metais pesados.

INTRODUÇÃO

O cádmio (Cd) é um metal pesado, amplamente distribuído no meio ambiente que está presente em alimentos, água, solo, plantas, alimentos, ar, cigarros, no processo de descarga de efluentes de mineração e resíduos industriais¹, no uso de fertilizantes agrícolas² e também em atividades ocupacionais como fabricação de placas de circuito de computador³, uso em revestimentos metálicos⁴ e manipulação, montagem e desmontagem de telefones celulares.³

É reconhecido por ser um poluente importante, bastante perigoso e tóxico para a saúde segundo as agências Internacional Agency for Research on Cancer (IARC) e a International Register of Potentially Toxic Chemical of United Nations Environment Program (IRPTC).^{5,6} Sua meia vida é de 15 a 20 anos e apresenta toxicidade em órgãos como rins, fígado, pulmões, testículos, sistema nervoso central e ossos. Também está associado ao desenvolvimento de câncer e é classificado como carcinogênico tipo I pelos órgãos US National Toxicology Program (NTP) e IARC.⁴

Pela toxicidade atribuída ao cádmio, realizar a dosagem do metal no sangue é válido para o monitoramento biológico em indivíduos expostos ao metal como também para o diagnóstico de intoxicação. Com essa finalidade é empregada a técnica da espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (GFAAS) que é a ideal para a quantificação de metais em doses mais baixas. Ela apresenta sensibilidade, seletividade e precisão apropriadas e trabalha com volumes pequenos de amostras, apresentando melhores limites de detecção para os elementos mais voláteis, como o cádmio.⁷

O desenvolvimento de um método analítico e a sua implementação envolvem técnicas de avaliação que determinam sua eficiência nas análises no laboratório. Para garantir que ele conceda resultados confiáveis e interpretáveis e para que disponibilize um alto grau de certeza antes de sua implantação, é necessário que, nas condições em que é realizado, o método escolhido seja validado.⁸ O processo de validação deve ser baseado a partir do estudo da metodologia que seja mais apropriada, das características do analito e da matriz que serão analisadas e da certificação de que esse processo irá satisfazer os critérios propostos pela validação, portanto, o processo de validação deve ser planejado antes da sua aplicação.^{9,10}

Desta forma, este trabalho tem como objetivo desenvolver um método analítico adequado para a quantificação de Cd, utilizando espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (GFAAS).

PARTE EXPERIMENTAL

Equipamento

As análises foram realizadas utilizando o equipamento Espectrômetro de Absorção Atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (GFAAS) da marca VARIAN, modelo *Zeeman AA240Z GTA120*, com dispensador automático de amostra modelo PSD 120 e suporte do *software Version 5.1 PRO*. As análises foram realizadas a 228,8 nm com emprego de lâmpada de cátodo oco de cádmio 4 mA e corretor de fundo com efeito *Zeeman*. Os parâmetros analíticos aplicados foram: modo de leitura altura do pico, calibração em modo linear, largura da fenda de 0,5 nm e gás argônio ultrapuro (99,99%) com fluxo de 0,3 L.min⁻¹. O volume da amostra aspirado foi de 30 µL para a validação em água ultrapura e, para a validação em plasma, 12 µL associado à 5 µL de modificador químico. Para a validação em água ultrapura, as temperaturas de pirólise e de atomização utilizadas foram de 250 e 1800 °C, respectivamente, com programa de aquecimento descrito na Tabela 1. Para a validação em plasma foi necessária a otimização das temperaturas. Tubos pirolíticos de partição foram utilizados em todas as determinações.

Reagentes e materiais

Todos os reagentes utilizados foram de grau de pureza analítica. Foram utilizados padrão de cádmio 1000 ppm (Biotec® Reagentes Analíticos, lote 45686), água ultrapura (obtida pelo sistema de purificação Gehaka Master System P&D, com valores de resistividade igual a 18,18 Ωm e de condutividade igual a 0,05 µS cm⁻¹), HNO₃ 65% (Anidrol® Produtos para Laboratórios, lote 32574) e plasmas normal, lipêmico e hemolisado cedidos pelo Laboratório Central do Hospital Universitário do Oeste do Paraná. Como modificador químico, foi utilizado conforme orientação do manual, H₃PO₄ 0,010 mol.L⁻¹ (v/v) que foi preparado a partir de H₃PO₄ 85%. As vidrarias foram descontaminadas quimicamente, submersas em HNO₃ 10% por 24 horas e enxaguadas com água destilada.

Amostras

Foram utilizadas, para o desenvolvimento da validação, amostras de padrão em água ultrapura e em plasma, dos tipos normal, lipêmico e hemolisado. A amostra em água ultrapura foi preparada com padrão de Cd com concentração de 3µg.L⁻¹ e HNO₃ 1%. As amostras de plasma também foram preparadas com o padrão de Cd na mesma concentração, HNO₃ 1% e diluídas na razão 1:5. As dosagens de triglicérides e colesterol do plasma lipêmico foram realizadas no equipamento automatizado Bioquímica Au 680 *Beckman Coulter* com kits

comerciais da *Beckman Coulter*, e a dosagem de hemoglobina do plasma hemolisado, no equipamento Analisador *Radiometer ABL800 Basic*.

Otimização das temperaturas de pirólise e atomização

Para encontrar a temperatura de pirólise para a validação de Cd em plasma, a qual favorece as condições ideais com total decomposição da matéria orgânica, um novo programa de aquecimento foi estabelecido. Uma amostra em plasma contendo $15 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Cd foi utilizada no programa de otimização e foi coinjectada no forno de grafite com o modificador químico. A curva de pirólise foi obtida variando-se a temperatura de pirólise enquanto a temperatura de atomização era mantida fixa em 1800°C . A temperatura ideal de pirólise foi aquela que alcançou o maior valor de absorvância. A temperatura de atomização empregada foi de 1800°C , conforme sugestão do *software* utilizado.

Validação analítica

Para a garantia da qualidade, de confiança e de resultados interpretáveis do procedimento de validação, e para a definição dos parâmetros utilizados e seus critérios de aceitação, foram utilizadas as orientações das Resoluções RE n° 899, de 29 de maio de 2003, e RDC n° 27, de 17 de maio de 2012, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), para água ultrapura e plasma, respectivamente. Os parâmetros utilizados foram: linearidade, precisão e exatidão intra e intercorrida, limite de detecção, limite de quantificação, seletividade, efeito residual e efeito matriz.

Faixa de trabalho

A faixa de trabalho compreende o intervalo de concentração no qual a metodologia de determinação de cádmio será empregada. A faixa de trabalho neste estudo envolve o intervalo de concentração de $0,1$ a $3,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ para água ultrapura e $0,5$ a $3,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ para o plasma.

Linearidade

Para avaliar o limite de concentração de cádmio onde os resultados fossem diretamente proporcionais à sua concentração presente na amostra, foram realizadas 3 curvas de calibração em água ultrapura e plasma com concentrações de cádmio de $0,1$; $0,5$; $1,0$; $1,5$; $2,0$; $2,5$ e $3,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $0,5$; $1,0$; $1,5$; $2,0$; $2,5$ e $3,0 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. O coeficiente de correlação r foi considerado aceitável quando $R \geq 0,99$.^{11,12}

Exatidão e Precisão

Para a verificação da exatidão e precisão em água ultrapura, foram realizadas as análises de três controles de qualidade com concentrações conhecidas, compreendendo a faixa de concentração do método, sendo: limite inferior de quantificação (LIQ), controle de qualidade de baixa concentração (CQB) de $1,5 \mu\text{g.L}^{-1}$, controle de qualidade de média concentração (CQM) de $2,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ e controle de qualidade de alta concentração (CQA) de $3,0 \mu\text{g.L}^{-1}$. Para a verificação em plasma, foram realizadas as análises de cinco controles de qualidade com concentrações conhecidas, compreendendo a faixa de concentração do método, sendo: LIQ, CQB de $2,0 \mu\text{g.L}^{-1}$, CQM de $2,25 \mu\text{g.L}^{-1}$, controle de qualidade de alta concentração (CQA) de $2,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ e controle de qualidade de diluição (CQD) de $5,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ o qual foi diluído na razão 1:2 com água ultrapura. As análises da água ultrapura foram realizadas em dois dias diferentes e a do plasma em três dias para contemplar a exatidão e precisão intra e intercorrida. Todas as análises foram realizadas em cinco replicatas. Para a avaliação da exatidão utilizou-se a Equação 1 e, para a avaliação da precisão, utilizou-se a Equação 2.^{11,12}

$$EPR = \frac{CME \times 100}{CT} \quad (1)$$

$$DPR \text{ ou } CV = \frac{DP \times 100}{CMD} \quad (2)$$

Onde EPR é o erro padrão relativo; CME é a concentração média experimental; CT é a concentração teórica; DPR é o desvio padrão relativo; CV é o coeficiente de variação; DP é o desvio padrão; e CMD é a concentração média determinada.^{11,12}

De acordo com as resoluções, foi considerado como máximo aceitável valores de até 15% de DPR para precisão e, para a exatidão, valores que não excedam +/- 15%.^{11,12}

Na avaliação do LIQ para ambos os parâmetros, utilizou-se como critério de aceitação valores menores ou iguais a 20%.¹²

Limite de detecção e limite de quantificação

Para a avaliação do limite de detecção (LID) e do LIQ foram utilizadas as Equações 3 e 4 respectivamente, as quais são determinadas com base na relação de 3 a 10 vezes o ruído da linha de base.¹²

$$LID = \frac{DPa \times 3}{IC} \quad (3)$$

$$LIQ = \frac{DPa \times 10}{IC} \quad (4)$$

Onde, DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de no mínimo 3 curvas de calibração e IC é inclinação da curva de calibração.¹²

Seletividade

O teste de seletividade foi utilizado para avaliar se a presença de outros componentes na amostra poderiam interferir na determinação de cádmio no plasma.¹³ Para isso, foi realizada a análise de amostras de quatro plasmas normais, um lipêmico e um hemolisado, todos sem adição de padrão, e seus resultados foram comparados com amostra analisada do LIQ. Foram consideradas aprovadas as repostas dos picos interferentes quando essas foram inferiores a 5% da resposta do LIQ.¹²

Efeito residual

Esse teste foi utilizado para verificar se não ocorria acúmulo residual de material entre as análises das amostras processadas, o que poderia, conseqüentemente, levar ao aumento do sinal do analito.¹³ Para isso, foi aspirada uma seqüência de quatro amostras de plasma na seguinte ordem: primeiramente a amostra branco (plasma sem adição de padrão), na seqüência um padrão preparado com o limite superior de quantificação (LSQ) de 3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e, por mais duas vezes, a amostra branco. O resultado foi considerado satisfatório quando as repostas da amostra branco foram inferiores a 20% quando comparadas à resposta do valor de LIQ.¹²

Efeito matriz

Foram analisadas amostras de plasma normal, lipêmico e hemolisado com o objetivo de verificar se os constituintes da matriz biológica presentes na amostra poderiam interferir na quantificação do cádmio.¹² As amostras foram analisadas em uma concentração de cádmio de 2,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (CQB) e 2,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (CQA) e seus resultados foram comparados com a leitura da amostra em água ultrapura nas mesmas concentrações. Com essas leituras, é possível determinar o fator de matriz normalizado (FMN), conforme Equação 5, para cada amostra.

Em seguida, é calculado o coeficiente de variação (CV) dos FMNs de todas as amostras e esse é considerado satisfatório quando estiver abaixo de 15%.¹²

$$FMN = \frac{\text{resposta do analito em matriz}}{\text{resposta do analito em solução}} \quad (5)$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na otimização realizada para a determinação da temperatura ideal de pirólise e atomização para amostra plasma, foi definido o programa de aquecimento conforme Tabela 2, onde se obteve como temperatura ideal para pirólise e atomização 550 e 1800°C, respectivamente. Outra pesquisa com determinação de cádmio em plasma em GFAAS determinou a temperatura de pirólise de 350°C e a temperatura de atomização de 1500°C.¹⁴

A linearidade foi determinada utilizando as seguintes faixas de concentração de cádmio: 0,1 a 3,0 µg.L⁻¹ para água ultrapura e 0,5 a 3,0 µg.L⁻¹ para plasma na diluição 1:5. Os gráficos representados na Figura 1 e 2 representam a linearidade entre a concentração do analito e a resposta do equipamento para água ultrapura e plasma, respectivamente. Observa-se que, em ambos os momentos, preserva-se a linearidade dos métodos avaliados, apresentando $R \geq 0,99$, estando, portanto, aprovados. Outra pesquisa utilizando GFAAS trabalhou com a faixa de trabalho em plasma de 0,13 a 0,71 µg.L⁻¹.¹⁵

A Tabela 3 expõe os resultados da avaliação dos parâmetros de exatidão e precisão intra e intercorrida em água ultrapura. No teste de exatidão intracorrida, o maior valor encontrado foi de 12,28% para o LIQ, o qual também apresentou a maior exatidão intercorrida (11,18%). O mesmo ocorreu na avaliação da precisão intracorrida, o maior valor encontrado foi de 16,37% na análise do LIQ, porém, na precisão intercorrida, o maior valor foi de 2,61% do CQM. Os resultados dos testes de exatidão e precisão intra e intercorrida em plasma encontram-se na Tabela 4. Na avaliação da exatidão intracorrida, o CQB obteve o maior valor de EPR de 8,36%, já na análise intercorrida, o maior valor foi de 2,53% do LIQ. No teste de precisão intracorrida, o LIQ obteve o maior EPR, de 3,45%, diferentemente do que foi encontrado na precisão intracorrida, do qual o maior valor foi de 6,43%, na análise do CQA.

Tanto na avaliação em água ultrapura quanto em plasma, os testes de exatidão e precisão intra e intercorrida demonstram que os erros relacionados aos resultados se revelaram menores do que os valores máximos preconizados (15% para precisão e +/- 15% para exatidão), estando, desse modo, aprovados. O método proposto é, portanto, exato e preciso.

O valor do limite de detecção da análise das curvas de calibração em água ultrapura foi de $0,40 \mu\text{g.L}^{-1}$ enquanto que, no plasma, foi de $0,46 \mu\text{g.L}^{-1}$. Em outros dois estudos utilizando GFAAS, o valor do limite de detecção encontrado foi de $0,3 \mu\text{g.L}^{-1}$ em ambas as pesquisas.¹⁶ ¹⁷ O valor do limite de quantificação da análise das curvas de calibração em água ultrapura foi de $1,2 \mu\text{g.L}^{-1}$ enquanto que, no plasma, foi de $1,5 \mu\text{g.L}^{-1}$. Outro estudo utilizando sangue total como amostra apresentou menor valor para LIQ, sendo esse de $0,40 \mu\text{g.L}^{-1}$.¹⁸ Analisando esses valores de limites, percebe-se que o menor valor da faixa de concentração das curvas de calibração, tanto para água ultrapura quanto para o plasma, encontram-se dentro dos limites de detecção do método proposto.

Na avaliação da seletividade do método, observou-se que a resposta das 6 amostras de plasma analisadas (quatro normais, uma lipêmica e uma hemolisada) foi, em média, 0,017 de absorvância, valor esse que se encontra dentro do limite de 5% inferior à resposta do LIQ. O método escolhido é, portanto, seletivo, pois a presença de outros componentes não interfere na determinação do cádmio no plasma.

Tratando-se da verificação do efeito residual foi possível observar que, após a análise sequencial da amostra branco sem adição de padrão, do LSQ e por mais duas vezes análise da amostra branco (Figura 3), o método empregado não apresentou efeito residual entre as amostras processadas, garantindo que não há aumento do sinal do analito e, portanto, não há interferência na leitura de amostras com concentrações diferentes analisadas continuamente.

Para o teste do efeito matriz, o valor da hemoglobina do plasma hemolisado foi de $0,23 \text{ g.dL}^{-1}$ e os valores de triglicérides e colesterol do plasma lipêmico foram de 1.197 mg.dL^{-1} e 199 mg.dL^{-1} , respectivamente. A Tabela 5 representa os valores de FMN determinados para todas as amostras e o CV apresentado entre elas, que foi de 26,59%. Esse resultado demonstra que existe interferência dos constituintes da matriz biológica na quantificação do cádmio, pois o CV se apresenta acima do valor máximo permitido de 15%. Portanto, amostras de plasma que

se apresentavam hemolisadas e lipêmicas não poderiam ser utilizadas no processo de quantificação.

CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos na validação do método para a quantificação de Cd, utilizando espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite, conclui-se que a execução prática satisfaz os requisitos recomendados de acordo com as Resoluções 27/2012 e 899/2003, e se mostra adequada para os fins pretendidos. A metodologia empregada representa, portanto, um importante meio para avaliar a exposição ao cádmio e os resultados evidenciam que o método avaliado é confiável, pois este é linear, preciso, exato, seletivo para o cádmio, não apresenta efeito residual e dispõe de limites de detecção e quantificação adequados.

MATERIAL SUPLEMENTAR**Tabela 1S.** Programa de aquecimento empregado para validação em água ultrapura

Etapa (s)	Temperatura (°C)	Permanência (s)	Fluxo de Ar (L.min ⁻¹)
1	85	5	0,3
2	95	40	0,3
3	120	10	0,3
4	250	5	0,3
5	250	4,1	0,3
6	250	4,1	0,0
7	1800	0,8	0,0
8	1800	2	0,0
9	1800	2	0,3

Tabela 2S. Programa de aquecimento empregado para validação em plasma

Etapa (s)	Temperatura (°C)	Permanência (s)	Fluxo de Ar (L.min ⁻¹)
1	85	5	0,3
2	95	40	0,3
3	120	10	0,3
4	550	5	0,3
5	550	4,1	0,3
6	550	4,1	0,0
7	1800	0,8	0,0
8	1800	2	0,0
9	1800	2	0,3

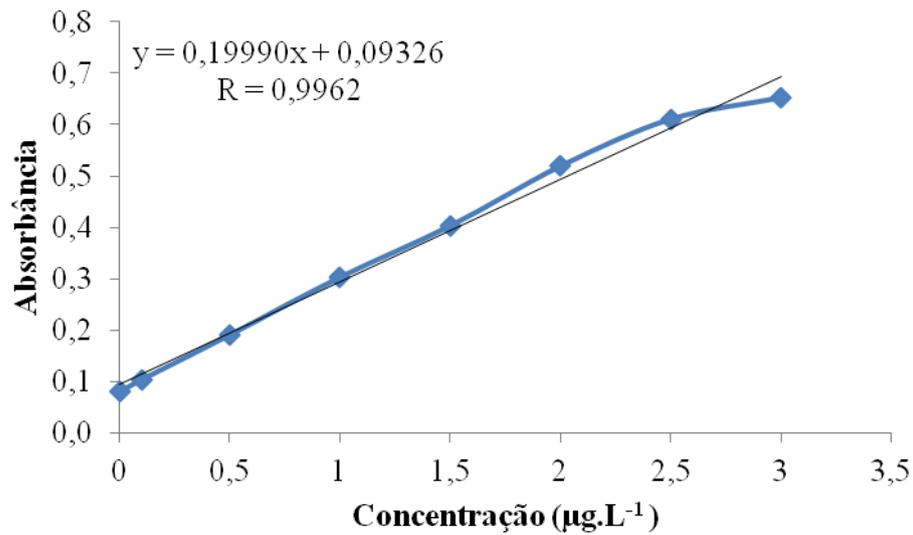


Figura 1S. Análise da linearidade da amostra de solução aquosa, contemplando a faixa de concentração de 0,1, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$, utilizando GFAAS e comprimento de onda de 228,8 nm

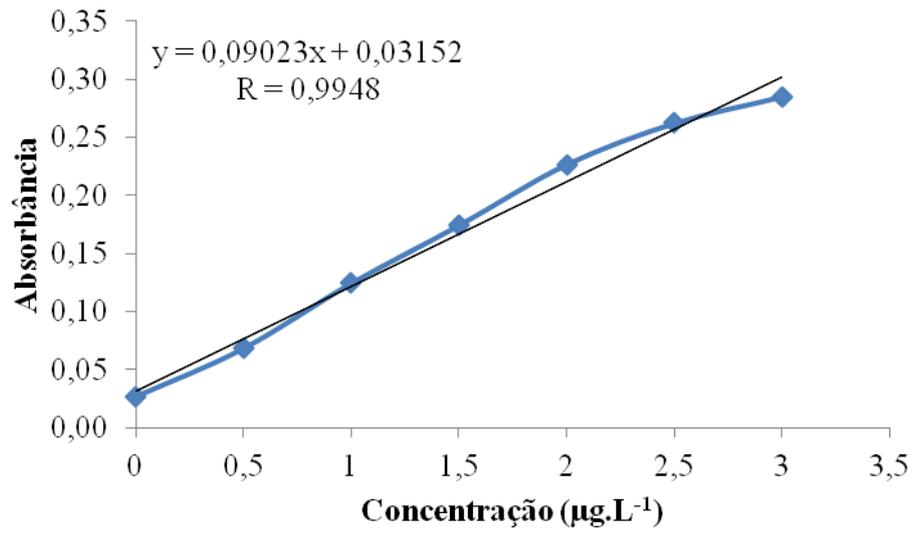


Figura 2S. Análise da linearidade da amostra de plasma, contemplando a faixa de concentração de 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$, utilizando GFAAS e comprimento de onda de 228,8 nm

Tabela 3S. Determinações da exatidão e precisão intra e intercorrida em água ultrapura

Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	LIQ (1,2)	CQB (1,5)	CQM (2,0)	CQA (3,0)
Exatidão intracorrida (EPR%)	12,28	1,64	2,23	0,05
Exatidão intercorrida (EPR%)	11,18	0,05	2,84	3,47
Precisão intracorrida (DPR%)	16,37	1,91	2,72	1,85
Precisão intercorrida (DPR%)	0,49	0,79	2,61	1,7

Tabela 4S. Determinações da exatidão e precisão intra e intercorrida em plasma

Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	LIQ (1,5)	CQB (2,0)	CQM (2,25)	CQA (2,5)	CQD (2,5)
Exatidão intracorrida (EPR%)	2,52	8,36	1,7	4,55	3,11
Exatidão intercorrida (EPR%)	2,53	0,31	0,64	1,87	3,4
Precisão intracorrida (DPR%)	3,45	1,6	2,4	2,6	1,31
Precisão intercorrida (DPR%)	3,79	8	2,88	6,43	0,35

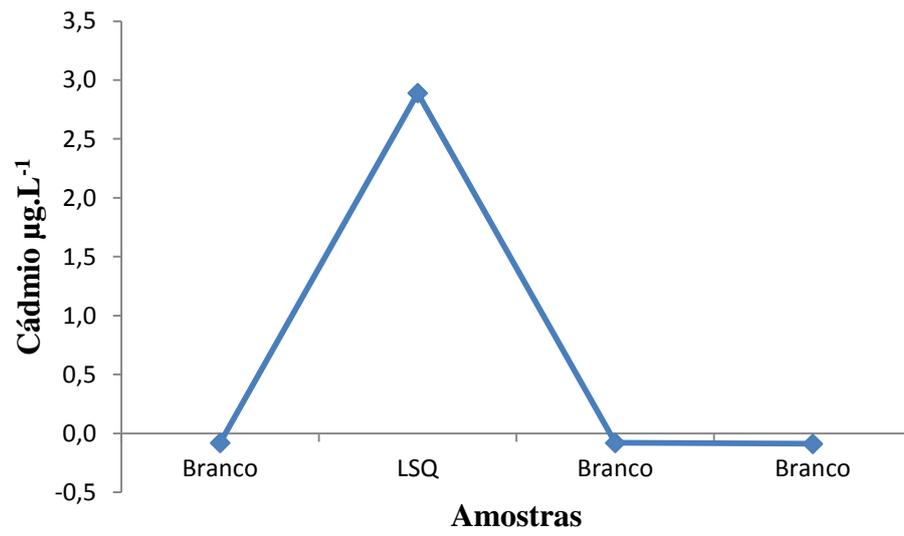


Figura 3S. Análise do efeito residual empregando branco e limite superior de quantificação (LSQ)

Tabela 5S. Determinação do efeito matriz

Amostras	2,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$	2,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$	FMN ¹	FMN ²
Água ultrapura	2,54	2,76		
Plasma normal	2,15	2,45	0,85	0,89
Plasma normal	2,04	2,56	0,80	0,92
Plasma normal	2,02	2,54	0,80	0,92
Plasma normal	2,09	2,51	0,82	0,91
Plasma lipêmico	1,00	1,24	0,39	0,45
Plasma lipêmico	1,01	1,04	0,40	0,38
Plasma hemolisado	1,64	2,08	0,65	0,75
Plasma hemolisado	1,62	2,12	0,64	0,77

CV = 26,59%

FMN¹ refere-se às amostras de 2,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e FMN² refere-se às amostras de 2,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

REFERÊNCIAS

- ¹Li, X.; Jiang, X.; Sun, J.; Zhu, C.; Li, X.; Tian, L.; Liu, L.; Bai, W.; *Annals of the New York Academy of Sciences* **2017**, *1*, 5.
- ²ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry; *Public Health Statement Cadmium*, ATSDR: Atlanta, 2012.
- ³Bertin, G.; Averbeck, D.; *Biochimie* **2006**, *88*, 1549.
- ⁴Rani, A.; Kumar, A.; Lal, A.; Pant, M.; *International Journal of Environmental Health Research*, **2014**, *24*, 378.
- ⁵Johri, N.; Jacquillet, G.; Unwin, R.; *Biometals* **2010**, *23*, 783.
- ⁶Luevano, J.; Damodaran, C.; *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, **2014**, *33*, 183.
- ⁷Skoog, D.A.; Holler, F. J.; Crouch, S. R.; *Fundamentos da Química Analítica*, 8^a ed. norte-americana, Thomson: São Paulo, 2006.
- ⁸Naz, S.; Vallejo, M.; García, A.; Barbas, C.; *Journal of Chromatography A*, **2014**, *1353*, 99.
- ⁹Taverniers, I.; De Loose, M.; Bockstaele, E. V.; *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2004**, *23*, 535.
- ¹⁰Bridwell, H.; Dhingra, V.; Peckman, D., Roark, J.; Lehman, T.; *The Quality Assurance Journal* **2010**, *13*, 72.
- ¹¹Brasil, Ministério da Saúde, ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária; RE nº 899, de 29/05/2003, Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, MS: Brasília, 2003.
- ¹²Brasil, Ministério da Saúde, ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Resolução RDC 27, de 17/05/2012, MS: Brasília, 2012.
- ¹³Moreau, R. L. M; Siqueira, M. E. P B.; *Toxicologia Analítica*, 1^a ed. Guanabara Koogan Ltda: Rio de Janeiro, 2008.
- ¹⁴Zheng, L.; Wu, K.; Li, Y.; Qi, Z.; Han, D.; Zhang, B.; Gu, C.; Chen, G.; Liu, J.; Chen, S.; Xu, X.; Huo, X.; *Environmental Research*, **2008**, *108*, 15.
- ¹⁵Kummrow, F.; Silva, F. F.; Kuno, R.; Souza, A. L.; Oliveira, P. V.; *Talanta*, **2008**, *75*, 247.
- ¹⁶Hwangbo, Y.; Weaver, V. M.; Tellez-Plaza, M.; Guallar, E.; Lee, B.; *Environmental Health Perspectives*, **2011**, *119*, 1800.
- ¹⁷Choi, Y.; Hu, Howard.; Murkherjee, B.; Miller, J.; Park, S. K.; *Environmental Health Perspectives* **2012**, *120*, 1544.

¹⁸Sakellare, A.; Karavoltsos, S.; Kalogeropoulos, N.; Theodorou, D.; Dedoussis, G.; Chrysohoou, C.; Dassenakis, M.; Scoullou, M.; *Science of the Total Environment*, **2016**, 568, 263.

4.2 ARTIGO 2

EFEITO PROTETOR DA N-ACETILCISTEÍNA SOBRE A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA INDUZIDA PELO CÁDMIO EM RIM DE RATOS WISTAR

Priscila Da Caz, Fernanda C. Silva, Carla Brugin Marek e Ana Maria Itinose

Artigo a ser submetido para a Revista Food and Chemical Toxicology



ISSN: 0278-6915

Food and Chemical Toxicology

> [Supports Open Access](#)

Editor-in-Chief: [José L. Domingo](#)

> [View Editorial Board](#)

Efeito protetor da N-acetilcisteína sobre a peroxidação lipídica induzida pelo cádmio em rim de ratos Wistar

Priscila Da Caz^a , Fernanda Coleraus Silva^b , Carla Brugin Marek^b e Ana Maria Itinose^{c,*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Rua Universitária, 2069, CEP 85.819 – 110, Cascavel, Paraná, Brasil. Email: pridacaz@hotmail.com

^bLaboratório de Toxicologia Celular. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Avenida Tancredo Neves, 3224, CEP 85.506-470, Cascavel, Paraná, Brasil. Emails: fercoleraus@gmail.com, carla.marek@unioeste.br

^cCentro de Assistência em Toxicologia (CEATOX). Hospital Universitário do Oeste do Paraná. Avenida Tancredo Neves, 3224, CEP 85.506-470, Cascavel, Paraná, Brasil

*Correspondência ao autor: Avenida Tancredo Neves, 3225, CEP 85.506-470, Cascavel, Paraná, Brasil. Telefone: +55 (45) 3321 5429. Email: ana.itinose@unioeste.br

Efeito protetor da N-acetilcisteína sobre a peroxidação lipídica induzida pelo cádmio em rim de ratos Wistar

Com propriedades antioxidante e quelante, a N-acetilcisteína (NAC) exerce uma função importante como agente protetor em células expostas à toxicidade por metais. O cádmio (Cd) é um metal nocivo à saúde e está associado à toxicidade nos rins, principalmente via estresse oxidativo, onde promove o desequilíbrio entre a geração e a eliminação de espécies reativas a oxigênio, levando a um aumento dos níveis de malondialdeído (MDA), consequente peroxidação lipídica e dano tecidual. Este estudo, portanto, avaliou a função protetora da NAC em rins de ratos expostos à intoxicação crônica pelo metal. Quatro grupos de ratos machos da linhagem Wistar, com 6 animais divididos aleatoriamente, foram tratados via oral por 70 dias com: 1. Controle: água; 2. Cádmio: Cd diluído em água ($50\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$); 3. N-acetilcisteína: $120\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de peso corporal, de NAC por gavagem e 4. Cádmio + N-acetilcisteína: Cd diluído em água ($50\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e $120\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de peso corporal, de NAC por gavagem. No sangue, foram realizadas dosagens de cádmio e marcadores da função renal enquanto que, nos rins, dosagens de cádmio, tióis, catalase, superóxido dismutase e peroxidação lipídica. Foram também realizadas as dosagens de cádmio no fígado, pulmão, cérebro e fêmur, a fim de entender mais sobre a distribuição do metal. No grupo tratado com cádmio, a produção de MDA apresentou-se 1,5 vezes maior que a do grupo controle ($p < 0,05$) e, no grupo tratado com cádmio associado à N-acetilcisteína, ocorreu diminuição dos níveis de MDA com valores próximos aos do grupo controle. Os resultados mostraram que a NAC influencia na distribuição de cádmio no organismo e apresenta efeito protetor ao reverter a peroxidação lipídica causada pelo cádmio.

Palavras-chave: enzimas antioxidantes, estresse oxidativo, malondialdeído, NAC, metais pesados, GFAAS.

Abreviações:

Cd, cádmio; CEUA/UNIOESTE, Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná; ERO, espécies reativas de oxigênio; GFAAS, espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite; GSH, glutathiona redutase; IARC, International Agency for Research on Cancer; MDA, malondialdeído; NAC, N-acetilcisteína; p.a., peso animal; SH, tiol; SOD, superóxido dismutase; TBA, ácido tiobarbitúrico; UNIOESTE, Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

1.Introdução

O cádmio (Cd) é um perigoso poluente ambiental, classificado como carcinogênico tipo 1 pela Internacional Agency for Research on Cancer (IARC) (IARC, 1993), que se acumula em quase todos os tecidos do corpo, como fígado, pulmões, testículos, cérebro, sistema nervoso central e principalmente nos rins (Bernard, 2008; Rani *et al.*, 2014) mostrando um tempo de meia-vida biológica superior a 20 anos (Sugita and Tsuchiya, 1995). Está associado ao desenvolvimento de anemia (Johri *et al.*, 2010), osteoporose (Rani *et al.*, 2014), fatores de risco cardiovasculares (Johri *et al.*, 2010; Kukongviriyapan *et al.*, 2016), disfunção renal (Järup *et al.*, 2000), além de alterar o metabolismo energético (Rani *et al.*, 2014).

Os mecanismos para a nefrotoxicidade do cádmio são o estresse oxidativo que ativa as vias de morte celular (Johri *et al.*, 2010), alterando a taxa de filtração glomerular (Yang and Shu, 2015) e o distúrbio no metabolismo do cálcio que leva a formação de cálculos renais (Bernard, 2008; WHO, 2010). O desequilíbrio entre a geração e eliminação de espécies reativas de oxigênio (ERO) no rim tem um papel fundamental na nefrotoxicidade, em que o malondialdeído (MDA) pode ser usado como indicador de danos na membrana celular. O nível de MDA mostra, de forma direta, o processo de lesão tecidual causada pelos radicais livres. O aumento de MDA indica falha no sistema antioxidante celular, presença desequilibrada de radicais livres e ocorrência de peroxidação lipídica (Kosem *et al.*, 2007).

A melhora na atividade antioxidante ou a inibição da geração de radicais livres têm um papel fundamental na proteção contra a nefrotoxicidade induzida por substâncias geradoras de ERO no rim (Ghoniem *et al.*, 2012). Assim, a utilização de agentes protetores contra os radicais livres pode ser uma terapia útil para evitar a nefrotoxicidade causada por metais pesados como o cádmio.

Muitas substâncias que agem como antioxidantes, complexantes ou quelantes têm sido usadas experimentalmente para prevenir ou tratar o dano tecidual induzido por radicais livres. Muitos autores experimentaram o dialil-tetrasulfito (Mitsumori *et al.*, 1998), o picroliv (Yadav and Khandelwal, 2006) e o selênio (Newairy *et al.*, 2007) contra a citotoxicidade por cádmio.

A N-acetilcisteína (NAC), uma pequena molécula contendo um grupo tiol (SH) (Ziment, 1988), e um precursor da glutathiona redutase (GSH) (Issels *et al.*, 1988), tem sido clinicamente usada como agente mucolítico, como protetor para doenças neurodegenerativas (Rushworth and Megson, 2014), para o tratamento de câncer de fígado (Mokhtari *et al.*, 2017) e como antídoto nas intoxicações por paracetamol devido a sua atividade hepatoprotetora (Dhouib *et al.*, 2016; Mokhtari *et al.*, 2017). Além disso, também tem utilidade clínica no tratamento de intoxicação por metais pesados. Seu grupo tiol atua como agente quelante na eliminação dos metais e como antioxidante na proteção do fígado e do rim (Kaplan *et al.*, 2008). Neste estudo, o efeito protetor da NAC foi investigado sobre a peroxidação lipídica no tecido renal, sua influência sobre o sistema enzimático antioxidante e sobre parâmetros renais de ratos tratados com cádmio.

2. Materiais e métodos

2.1 Animais

Foram utilizados 24 ratos machos, adultos, albinos da linhagem Wistar, pesando aproximadamente 250 g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE). Os ratos foram mantidos em caixas de polipropileno, com no máximo 4 animais por caixa, a $22^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C em ciclo claro-escuro de 12 horas e exaustão de ar. Os ratos foram alimentados *ad libitum* com dieta padrão de laboratório (Biolab[®]) e água potável durante todo o período de experimento. Todos os procedimentos experimentais foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (CEUA/UNIOESTE).

2.2 Procedimento experimental

Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais com 6 animais em cada grupo. Os animais receberam o tratamento diariamente durante 70 dias, conforme abaixo:

Grupo Controle – o grupo recebeu apenas água à vontade;

Grupo Cd – o grupo recebeu sulfato de cádmio na água de beber, dose de 50 mg.L^{-1} ;

Grupo CdNAC – o grupo recebeu sulfato de cádmio na água de beber, dose de 50 mg.L^{-1} e N-acetilcisteína na dose de 120 mg. kg^{-1} de peso corporal por gavagem;

Grupo NAC – o grupo recebeu, através de gavagem, 120 mg. kg^{-1} de peso corporal de N-acetilcisteína.

A concentração de cádmio e a dose de N-acetilcisteína foram selecionadas conforme Wang *et al.* (2009), onde o tratamento com cádmio simula uma situação de ingestão natural diária de água potável poluída com cádmio. Durante todo o período experimental os animais receberam água e alimento à vontade. Todos os animais foram observados diariamente durante todo o experimento. No último dia do experimento foi realizada a coleta de sangue e a retirada dos órgãos (rins, fígado, pulmões, cérebro e fêmur). No sangue foram dosados o cádmio, a ureia e creatinina. Em todos os órgãos foram dosados o cádmio e, nos rins, os níveis de malondialdeído, tióis, a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase. Nos rins foi também realizada a análise histopatológica.

2.3 Coleta de sangue e retirada dos órgãos

Para a coleta do sangue e retirada dos órgãos, os animais foram mantidos em jejum de 12 horas. Foram anestesiados com 100 mg.Kg^{-1} de cloridrato de quetamina por peso animal (p.a.) e 15 mg.Kg^{-1} p.a. de cloridrato de xilasina por via intraperitoneal. Com o animal sedado foi feita a coleta intracardíaca de sangue, caracterizando o óbito do animal. O abdome e a caixa torácica foram abertos para a retirada do fígado, pulmões e rins. Em seguida, o animal foi decapitado e o cérebro retirado. Todos os órgãos foram pesados e clampeados com nitrogênio líquido. O rim foi dividido em três porções; uma para o preparo dos homogenatos, outra para a digestão ácida e, por fim, outra para a análise histológica.

2.4 Índice do peso dos órgãos

Após a retirada dos órgãos, os rins, fígado, pulmões, cérebro e fêmur foram observados macroscopicamente e pesados. O índice do peso dos órgãos foi

realizado para avaliar alterações no tamanho dos órgãos e é calculado de acordo com a Equação 1.

$$I = \frac{\text{Peso do órgão}}{\text{Peso do rato}} \times 100 \quad (1)$$

Os resultados foram expressos em (%).

2.5 Preparo dos homogenatos do rim

Os rins foram retirados com o auxílio de pinças e tesouras cirúrgicas, pesados, clampeados e seus homogenatos preparados de acordo com metodologia adaptada pelo laboratório descrita por Cimasoni (1966). Em banho de gelo, o tecido foi picotado em pequenos pedaços e homogeneizado em homogeneizador de *Dounce* com diferentes tampões. Para a análise de cada enzima, foram utilizadas diferentes soluções tampão. Para a SOD, foi utilizada sacarose 0,25 M com triton X-100 0,5% (pH 8,5). Para tióis, catalase e peroxidação lipídica foi utilizado tampão fosfato 100 mM com KCl 1,15% (pH 7,4). Em ambos os métodos a solução foi centrifugada a 2377 G por 10 min e as frações sobrenadantes de cada amostra foram separadas para as análises. O conteúdo de proteína do homogenato foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Lowry *et al.* (1951), utilizando o reagente de Folin e albumina bovina como padrão. O resultado foi expresso em mg de proteína por mL de homogenato.

2.6 Digestão das amostras

Amostras de rim, fígado, pulmão, cérebro e fêmur foram digeridas usando o método de radiação micro-ondas em sistema fechado no digestor modelo ETHOS D, por meio de metodologia adaptada de Gonzalez *et al.* (Gonzalez *et al.*, 2009). Massas de 0,1000 g de amostras foram pesadas e transferidas para os frascos de digestão

usando 2 ml de solução de ácido nítrico 65% para rim, fígado, pulmão e cérebro; e 2,5 ml para o fêmur. O programa de aquecimento empregado consistia em 3 etapas: 5 min aplicando-se potência de 300 W em temperatura entre 40 e 80°C e pressão de 20 bar; 5 min aplicando-se potência de 300 W, em temperatura entre 80 e 100°C e pressão de 30 bar e, por fim, 15 min potência de 400 W, em temperatura de 100°C e pressão de 40 bar. No final, as amostras ficaram 40 minutos sob ventilação. Após resfriamento, os digeridos foram transferidos para frascos volumétricos e avolumados a 10 ml de água ultrapura. Controles analíticos foram preparados pelo mesmo procedimento.

2.7 Análise histológica do rim

Os rins foram imersos em solução fixadora de formol 10%. Após 24 horas de fixação, as peças foram cortadas e armazenadas em álcool 80%. Depois, os órgãos foram cortados a 5 µm de espessura e corados com hematoxilina e eosina. As lâminas histológicas foram avaliadas em ensaio cego, com o auxílio de microscópio óptico, nos aumentos de 100, 200 e 400X (Mirsky *et al.*, 2011).

2.8 Dosagem de cádmio

O cádmio foi dosado no sangue e nos órgãos (rim, fígado, pulmão, cérebro e fêmur) por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (GFAAS), da marca VARIAN, modelo *Zeeman* AA240Z GTA120, com dispensador automático de amostra modelo PSD 120 e suporte do *software Version* 5.1 PRO. As análises foram realizadas utilizando a curva de validação em água ultrapura, com comprimento de onda de 228,8 nm, lâmpada de cátodo oco de cádmio 4 mA, tubos pirolíticos de partição e corretor de fundo com efeito *Zeeman*.

2.9 Determinação da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi medida nos rins, utilizando ácido tiobarbitúrico (TBA) em meio ácido que mede a quantidade de malondialdeído que se complexa com o TBA. Para a reação o homogenato, foi diluído em água (1:4) e 8,1% de dodecil sulfato de sódio, e misturado com TBA a 0,67% durante 60 minutos a 95 °C. Em seguida, extraiu-se com n-butanol piridina (15:1) e centrifugou-se por 10 minutos a 3667G. A fase orgânica foi lida em 535 nm acompanhada da leitura de padrão de MDA 200 µM. O resultado foi expresso em nmol de MDA por miligrama de proteína.

3.0 Determinação de tióis e da atividade da catalase e SOD

Os tióis foram determinados pelo método de Ellman *et al.* (1964), a atividade da catalase foi medida de acordo com o procedimento descrito por Aebi (1984) e a superóxido dismutase foi determinada pela inibição da autooxidação do pirogalol conforme Nandi e Chatterjee (1988). Os resultados foram expressos em nanomol por minuto por miligrama de proteína.

3.1 Determinação de marcadores de função renal

A creatinina e a ureia foram dosadas por kits comerciais Laborclin, conforme recomendação do fabricante.

3.2 Métodos estatísticos

As análises estatísticas foram determinadas e avaliadas pelo *software* Statistica7®. Os resultados obtidos com os diferentes grupos foram avaliados pelo método de análise de variâncias *One-way ANOVA*, acompanhado pelo teste *post-hoc de Fisher*, sendo utilizado para a análise das variáveis não paramétricas o teste de *Kruskal-*

Wallis. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão médio (SEM) de *n* que reflete o número de animais, e foram aceitos como estatisticamente significativos aqueles que apresentaram $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1 Efeito da N-acetilcisteína sobre a concentração de cádmio nas amostras e nas alterações no peso relativo dos órgãos

A N-acetilcisteína mostrou influência na distribuição de cádmio no organismo dos animais, assim como a elevada quantidade de cádmio administrada (50 mg.L^{-1}), Tabela 1. O plasma, em todos os grupos, manteve-se como o local de menor quantidade, enquanto que o rim foi o órgão que apresentou maior nível deste metal, com exceção para o grupo NAC, onde o fígado mostrou maior quantidade de cádmio. Já o cérebro, que no grupo controle era o segundo órgão com mais cádmio (23,2% do cádmio total), passou a ocupar o penúltimo lugar nos demais grupos com 10,1%, 0,66% e 0,53% do cádmio total para os grupos NAC, CdNAC e Cd, respectivamente. Foi observado, também, que o peso relativo do cérebro foi significativamente maior nos grupos Cd ($p < 0,05$) e CdNAC ($p < 0,05$), quando comparado com o grupo controle. O mesmo acontecendo com o rim ($p < 0,05$) do grupo CdNAC, que teve o seu peso relativo aumentado (Tabela 2).

4.2 Efeito da N-acetilcisteína sobre a peroxidação lipídica e grupos tióis no tecido renal

A Tabela 3 mostra o efeito protetor da N-acetilcisteína sobre a peroxidação lipídica causada pelo cádmio. Na dose de 50 mg.L^{-1} de cádmio, a quantidade de malondialdeído formado foi 1,5 vezes maior que a do grupo controle ($p < 0,05$) e a

N-acetilcisteína diminuiu a formação deste biomarcador ($p < 0,05$), trazendo-o para valores próximos ao do grupo controle. O mesmo foi observado no grupo NAC ($p < 0,05$). A tabela em questão mostra, também, que o estado altamente oxidante observado no grupo Cd ($p < 0,0001$), por meio da medida dos grupos tióis, foi neutralizado pela N-acetilcisteína, retornando a valores semelhantes ao grupo controle.

4.3 Efeito da N-acetilcisteína sobre a SOD e catalase no tecido renal

A N-acetilcisteína aumentou, embora não significativamente, a SOD nos grupos CdNAC e NAC se comparados tanto com o grupo controle quanto com o grupo Cd. No entanto, em relação à catalase, houve diminuição significativa em ambos grupos, CdNAC ($p < 0,05$) e NAC ($p < 0,05$) quando comparados com os grupos controle e Cd (Tabela 3).

4.4 Efeito da N-acetilcisteína sobre o tecido e função renal

A análise histopatológica do rim de todos os grupos, inclusive do grupo tratado com cádmio, mostrou túbulos e glomérulos intactos (Figura 1), corroborando com os achados bioquímicos de creatinina e ureia que se apresentaram normais (Tabela 4).

5. Discussão

O cádmio é um poluente ambiental que produz sérios danos aos órgãos de animais e de humanos. Estudos têm mostrado que o rim é um alvo tanto para o acúmulo desse metal quanto para uma ação tóxica (Mezynska and Brzóska, 2017). O cádmio produz danos oxidativos pela indução da peroxidação lipídica que pode levar à disfunção renal (Luevano and Damodaran, 2014). A medida do nível de tióis para avaliar indiretamente o estado redox da célula; o MDA como indicador de dano na

membrana celular e o nível de enzimas antioxidantes para avaliar o sistema antioxidante da célula são parâmetros que, juntos, têm capacidade de mostrar o estresse oxidativo causado pelos metais pesados (Alfanie *et al.*, 2015).

Com base no presente estudo, observou-se que a administração oral de água potável poluída com 50 mg.L^{-1} de cádmio durante dois meses e meio deu início à uma ação tóxica, sem, no entanto, acarretar aparentes danos ao tecido renal. O aumento na peroxidação lipídica e aumento nos grupos tióis são resultantes do estresse oxidativo, uma vez que o cádmio gera radicais livres. Por conta dessa ação tóxica, alguns autores postulam que os antioxidantes devem ser um dos componentes no tratamento da intoxicação por cádmio (Mitsumori *et al.*, 1998; Yadav and Khandelwal, 2006). A N-acetilcisteína é uma pequena molécula que contém um grupo tiol que lhe confere uma ação antioxidante, e que tem sido apontada como uma droga promissora no tratamento da intoxicação aguda por metais devido a uma possível ação quelante (Giampreti *et al.*, 2016).

Naturalmente se tem no organismo uma concentração baixa de cádmio proveniente da contaminação do ar, água e alimentos, que foi comprovada pela presença de cádmio no grupo controle. O perfil de distribuição de cádmio no organismo nos grupos Cd, CdNAC e NAC alterado em relação ao grupo controle estão em conformidade com outros autores que relatam que a cinética de absorção e distribuição do cádmio são influenciadas tanto pela sua concentração quanto pela presença de outras substâncias na dieta ou na corrente sanguínea (Asagba *et al.*, 2006; Szczurek *et al.*, 2009). No presente estudo, acredita-se que os grupos tióis da N-acetilcisteína tenham complexado o cádmio da corrente sanguínea, deslocando a sua distribuição para o fígado e rins, além de possivelmente diminuir a sua passagem para o cérebro.

Embora o cádmio não tenha alterado os indicadores de comprometimento da função renal, creatinina e ureia e, não tenha causado mudanças estruturais no tecido renal, também observado por outros autores (Groten *et al.*, 1990), a elevação dos níveis de MDA, produto final da peroxidação lipídica e de tióis, indica aumento no estresse oxidativo no tecido renal. Claramente os tióis encontrados no grupo Cd são provenientes de proteínas e de substâncias endógenas livres que possuem grupo SH, como a glutathiona e coenzimas que atuam em conjunto para a redução ou eliminação dos radicais livres. Segundo Erel (2004), proteínas que contêm grupo SH constituem um importante componente antioxidante, contribuindo com 52,9% da capacidade antioxidante total sérica em indivíduos saudáveis. Apesar dos tióis permitirem o reparo de moléculas danificadas oxidativamente pela peroxidação lipídica (Di Giacomo *et al.*, 2003), o excesso de radicais livres leva ao comprometimento funcional das proteínas portadoras de SH (Wlodek, 2002). Assim sendo, o significativo decréscimo nos níveis de MDA e de tióis no rim dos ratos CdNAC indica a forte capacidade da N-acetilcisteína em atenuar a peroxidação lipídica. Seu efeito protetor sobre o dano celular se sustenta ao observar que os níveis de MDA também diminuíram no grupo NAC, onde a quantidade de cádmio estava próxima ao grupo controle; havendo, inclusive, a manutenção dos níveis de tióis nesse grupo.

Os grupos CdNAC e NAC não tiveram aumento importante na SOD e mostraram significativa diminuição na catalase, diferente de Kaplan *et al.* (2008) em que a N-acetilcisteína aumentou significativamente a SOD e não alterou a catalase. Alguns trabalhos indicam que a N-acetilcisteína apresenta especificidade de ação para determinados tipos de tecidos, podendo ser que as células renais não sofram influência (Kaplan *et al.*, 2008; Odewumi *et al.*, 2011). Tanto a SOD quanto a catalase são consideradas defesas de primeira linha contra os radicais livres. A

SOD, uma metaloenzima, converte os radicais superóxidos a oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio, enquanto que a catalase converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular. Apesar de o cádmio, pela afinidade aos grupamentos sulfidrilas, poder se ligar a SOD e alterar a sua atividade, no presente estudo o cádmio não interferiu, assim como também não alterou a catalase em conformidade com o trabalho de Odewumi *et al.* (2011).

Assim, conclui-se, com os resultados, que a N-acetilcisteína tem capacidade de reverter a peroxidação lipídica induzida pelo cádmio em níveis de concentração poluentes. Sua atividade antioxidante, por meio da doação dos grupos SH, neutraliza os radicais livres, protegendo o tecido renal, principal órgão alvo da toxicidade do cádmio. Outro ponto importante é que os grupos SH podem, na corrente sanguínea, quelar o cádmio, diminuindo a entrada desse metal no tecido cerebral, sugerindo também um efeito neuroprotetor.

6. Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES pelo apoio financeiro e ao PCF – UNIOESTE e ao CEATOX por todo o suporte concedido.

Grupos	Cádmio (ug.L ⁻¹) (%)						
	Cd total	Plasma	Cérebro	Fígado	Fêmur	Pulmão	Rim
Controle (5)	9,87 ± 0,067	0,65 ± 0,084 (6,6 ± 0,88)	2,33 ± 0,187 (23,2 ± 2,16)	1,66 ± 0,17 (17,1 ± 2,05)	1,00 ± 0,11 (10,0 ± 1,10)	1,38 ± 0,074 (14,1 ± 0,92)	2,85 ± 0,31 (29,0 ± 3,16)
Cd (4)	182,87 ± 4,06	0,50 ± 0,13 (0,27 ± 0,08) ^{****}	0,98 ± 0,025 (0,52 ± 0,003) ^{****}	73,82 ± 0,49 (40,1 ± 0,63) ^{****}	1,32 ± 0,069 (0,72 ± 0,021) ^{****}	5,68 ± 0,143 (3,10 ± 0,011) ^{***}	100,58 ± 3,47 (55,1 ± 0,68) ^{****}
CdNAC (4)	161,43 ± 7,67	0,53 ± 0,101 (0,33 ± 0,079) ^{****}	1,07 ± 0,025 (0,66 ± 0,014) ^{****}	69,70 ± 6,47 (43,1 ± 1,95) ^{****}	2,10 ± 0,18 (1,01 ± 0,16) ^{****}	3,59 ± 0,53 (2,2 ± 0,24) ^{****}	84,92 ± 0,92 (52,7 ± 1,93) ^{***}
NAC (4)	7,95 ± 0,18	0,31 ± 0,040 (3,8 ± 0,60) ^{**}	0,81 ± 0,09 (10,1 ± 0,89) ^{***}	2,86 ± 0,28 (35,7 ± 2,56) ^{***}	2,10 ± 0,30 (12,1 ± 3,93)	1,22 ± 0,22 (15,3 ± 2,38)	1,79 ± 0,070 (23,0 ± 1,31)
Resumo	Controle: Rim > Cérebro > Fígado > Pulmão > Ossos > Plasma Cd: Rim > Fígado > Pulmão > Ossos > Cérebro > Plasma CdNAC: Rim > Fígado > Pulmão > Ossos > Cérebro > Plasma NAC: Fígado > Rim > Pulmão > Ossos > Cérebro > Plasma						

Tabela 1. Nível de cádmio no plasma e em órgãos de ratos com diferentes tipos de tratamento.

Valores representam a média ± o erro padrão. O número entre parênteses representa o número de animais.

** p < 0,01; *** p < 0,005; **** p < 0,001 em relação ao grupo Controle.

Grupos	Órgãos (%)				
	Cérebro	Fígado	Ossos	Pulmão	Rim
Controle (6)	0,32 ± 0,00	2,96 ± 0,05	0,37 ± 0,02	0,44 ± 0,02	0,73 ± 0,02
Cd (6)	0,39 ± 0,02*	3,04 ± 0,07	0,36 ± 0,02	0,47 ± 0,04	0,79 ± 0,03
CdNAC (5)	0,50 ± 0,13*	2,98 ± 0,11	0,37 ± 0,03	0,52 ± 0,06	0,82 ± 0,02*
NAC (5)	0,34 ± 0,02	3,08 ± 0,08	0,41 ± 0,01	0,47 ± 0,01	0,77 ± 0,03

Tabela 2. Índice de peso dos órgãos de ratos com diferentes tipos de tratamento. Valores representam a média ± o erro padrão. O número entre parênteses representa o número de animais. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle

Dosagens	Grupos			
	Controle	Cd	CdNAC	NAC
MDA (nmol.mg ptna ⁻¹)	5,40 ± 0,44 (5)	8,46 ± 1,29* (5)	6,02 ± 0,99 (5)	4,52 ± 0,54* (4)
Tióis (nmol.min.mg ptna ⁻¹)	0,72 ± 0,09 (6)	1,80 ± 0,13**** (5)	0,83 ± 0,10 (5)	0,87 ± 0,15 (4)
Catalase (nmol.min.mg ptna ⁻¹)	83,37 ± 4,15 (6)	87,50 ± 4,53 (6)	70,01 ± 5,15* (5)	67,30 ± 2,40* (5)
SOD (nmol.min.mg ptna ⁻¹)	0,88 ± 0,10 (6)	1,12 ± 0,07 (6)	1,29 ± 0,06 (5)	1,24 ± 0,10 (5)

Tabela 3. Peroxidação lipídica, grupos tióis e enzimas antioxidantes no rim de ratos com diferentes tipos de tratamento.

Valores representam a média ± o erro padrão. O número entre parênteses representa o número de animais. * p < 0,05; **** p < 0,001 em relação ao grupo Controle.

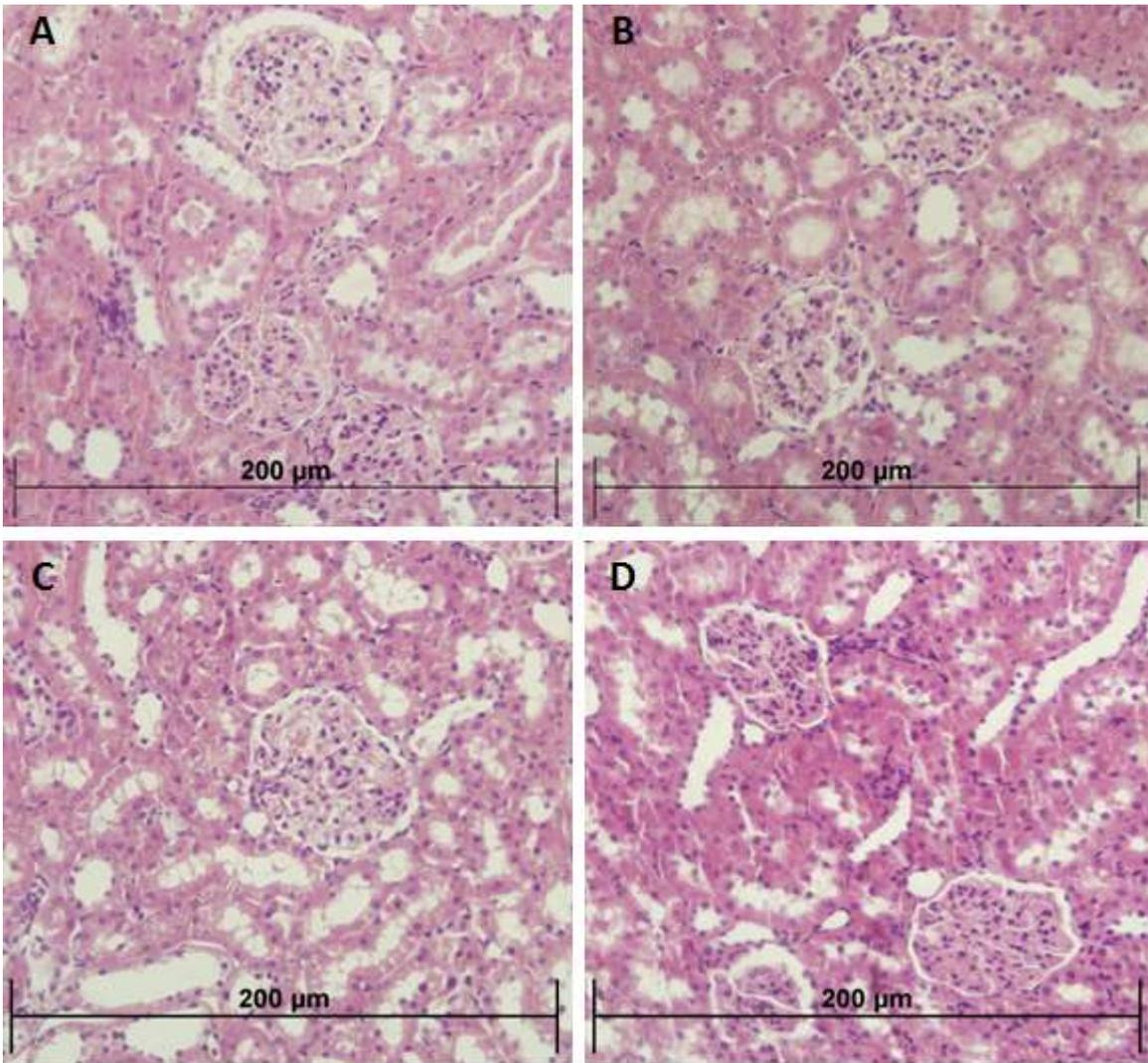


Figura 1. Análise histopatológica dos rins onde: (A) Grupo controle; (B) Grupo Cd; (C) Grupo CdNAC e (D) Grupo NAC.

Dosagens	Grupos			
	Controle	Cd	CdNAC	NAC
Creatinina (mg/dL)	0,54 ± 0,01 (6)	0,55 ± 0,01 (5)	0,54 ± 0,01 (5)	0,56 ± 0,02 (5)
Ureia (mg/dL)	47,60 ± 1,18 (6)	48,78 ± 1,39 (5)	50,12 ± 3,57 (5)	44,38 ± 2,74 (4)

Tabela 4. Marcadores de função renal de ratos com diferentes tipos de tratamento. Valores representam a média ± o erro padrão. O número entre parênteses representa o número de animais.

8. Referências

Aebi, H., 1974. Catalase. In: Bergmeyer HU editor. Methods of enzymatic analysis, 2th ed.

Alfanie, I., Muhyi, R., Suhartono, E., 2015. Effect of Heavy Metal on Malondialdehyde and Advanced Oxidation Protein Products Concentration A Focus on Arsenic, Cadmium, and Mercury. Journal of Medical and Bioengineering Vol 4.

Asagba, S.O., Eriyamremu, G.E., Onyeneke, E.C., Suru, M., 2006. Influence of a Nigerian-like diet on calcium, phosphate and alkaline phosphatase levels in the plasma and bone of cadmium exposed rats. J. Med. Sci 6, 758-764.

Bernard, A., 2008. Cadmium & its adverse effects on human health. Indian Journal of Medical Research 128, 557.

Cimasoni, G., 1966. Inhibition of cholinesterases by fluoride in vitro. Biochemical Journal 99, 133.

Dhouib, I.E., Jallouli, M., Annabi, A., Gharbi, N., Elfazaa, S., Lasram, M.M., 2016. A minireview on N-acetylcysteine: an old drug with new approaches. Life sciences 151, 359-363.

Di Giacomo, C., Acquaviva, R., Lanteri, R., Licata, F., Licata, A., Vanella, A., 2003. Nonproteic antioxidant status in plasma of subjects with colon cancer. Experimental biology and medicine 228, 525-528.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Jr., Feather-Stone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol 7, 88-95.

Erel, O., 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. Clinical biochemistry 37, 277-285.

Ghoniem, M.H., El-Sharkawy, N.I., Hussein, M.M., Moustafa, G.G., 2012. Efficacy of curcumin on lead induced nephrotoxicity in female albino rats. *Journal of American Science* 8.

Giampreti, A., Lonati, D., Ragghianti, B., Ronchi, A., Petrolini, V.M., Vecchio, S., Locatelli, C.A., 2016. N-Acetyl-Cysteine as Effective and Safe Chelating Agent in Metal-on-Metal Hip-Implanted Patients: Two Cases. *Case reports in orthopedics* 2016.

Gonzalez, M.H., Souza, G.B., Oliveira, R.V., Forato, L.A., Nóbrega, J.A., Nogueira, A.R.A., 2009. Microwave-assisted digestion procedures for biological samples with diluted nitric acid: Identification of reaction products. *Talanta* 79, 396-401.

Groten, J., Sinkeldam, E., Luten, J., Van Bladeren, P., 1990. Comparison of the toxicity of inorganic and liver-incorporated cadmium: A 4-wk feeding study in rats. *Food and Chemical Toxicology* 28, 435-441.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans, Beryllium, Cadmium, Mercury and Exposure in the Glass Manufacturing Industry. IARC Scientific Publications; Lion: 1993. P.119-238.

Issels, R.D., Nagele, A., Eckert, K.-G., Wilmanns, W., 1988. Promotion of cystine uptake and its utilization for glutathione biosynthesis induced by cysteamine and N-acetylcysteine. *Biochemical pharmacology* 37, 881-888.

Järup, L., Hellström, L., Alfvén, T., Carlsson, M.D., Grubb, A., Persson, B., Pettersson, C., Spång, G., Schütz, A., Elinder, C.-G., 2000. Low level exposure to cadmium and early kidney damage: the OSCAR study. *Occupational and environmental medicine* 57, 668-672.

Johri, N., Jacquillet, G., Unwin, R., 2010. Heavy metal poisoning: the effects of cadmium on the kidney. *Biometals* 23, 783-792.

Kaplan, M., Atakan, I.H., Aydogdu, N., Aktoz, T., Ozpuyan, F., Seren, G., Tokuc, B., Inci, O., 2008. Influence of N-acetylcysteine on renal toxicity of cadmium in rats. *Pediatr Nephrol* 23, 233-241.

Kosem, N., Han, Y.-H., Moongkarndi, P., 2007. Antioxidant and cytoprotective activities of methanolic extract from *Garcinia mangostana* hulls. *Science Asia* 33, 283-292.

Kukongviriyapan, U., Apaijit, K., Kukongviriyapan, V., 2016. Oxidative stress and cardiovascular dysfunction associated with cadmium exposure: beneficial effects of curcumin and tetrahydrocurcumin. *The Tohoku journal of experimental medicine* 239, 25-38.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.

Luevano, J., Damodaran, C., 2014. A review of molecular events of cadmium-induced carcinogenesis. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 33.

Mezynska, M., Brzóska, M.M., 2017. Environmental exposure to cadmium—a risk for health of the general population in industrialized countries and preventive strategies. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-22.

Mirsky, M.L., Sivaraman, L., Houle, C., Potter, D.M., Chapin, R.E., Cappon, G.D., 2011. Histologic and cytologic detection of endocrine and reproductive tract effects of exemestane in female rats treated for up to twenty-eight days. *Toxicol Pathol* 39, 589-605.

Mitsumori, K., Shibutani, M., Sato, S., Onodera, H., Nakagawa, J., Hayashi, Y., Ando, M., 1998. Relationship between the development of hepato-renal toxicity and cadmium accumulation in rats given minimum to large amounts of cadmium chloride in the long-term: preliminary study. *Archives of toxicology* 72, 545-552.

Mokhtari, V., Afsharian, P., Shahhoseini, M., Kalantar, S.M., Moini, A., 2017. A Review on Various Uses of N-Acetyl Cysteine. *Cell Journal (Yakhteh)* 19, 11.

Nandi, A., Chatterjee, I.B., 1988. Assay of superoxide dismutase activity in animal tissues. *J. Biosci* 13, 305-315.

Newairy, A., El-Sharakly, A., Badreldeen, M., Eweda, S., Sheweita, S., 2007. The hepatoprotective effects of selenium against cadmium toxicity in rats. *Toxicology* 242, 23-30.

Odewumi, C.O., Badisa, V.L., Le, U.T., Latinwo, L.M., Ikediobi, C.O., Badisa, R.B., Darling-Reed, S.F., 2011. Protective effects of N-acetylcysteine against cadmium-induced damage in cultured rat normal liver cells. *Int J Mol Med* 27, 243-248.

Rani, A., Kumar, A., Lal, A., Pant, M., 2014. Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a review. *International journal of environmental health research* 24, 378-399.

Rushworth, G.F., Megson, I.L., 2014. Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: the need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. *Pharmacology & therapeutics* 141, 150-159.

Sugita, M., Tsuchiya, K., 1995. Estimation of variation among individuals of biological half-time of cadmium calculated from accumulation data. *Environmental research* 68, 31-37.

Szczurek, E.I., Bjornsson, C.S., Noto, A.D., Taylor, C.G., 2009. Renal metallothionein responds rapidly and site specifically to zinc repletion in growing rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 23, 176-182.

Wlodek, L., 2002. Beneficial and harmful effects of thiols. *Pol. J. Pharmacol* 54, 215-223.

Wang, L., Chen, D., Cao, J., Liu, Z., 2009. Protective effect of N-acetylcysteine on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in immature female rats. *Hum Exp Toxicol* 28, 221-229.

World health organization (WHO). Exposure to cadmium: a major public health concern. *Preventing Disease Through Healthy Environments*, 2010

Yadav, N., Khandelwal, S., 2006. Effect of Picroliv on cadmium-induced hepatic and renal damage in the rat. *Human & experimental toxicology* 25, 581-591.

Yang, H., Shu, Y., 2015. Cadmium transporters in the kidney and cadmium-induced nephrotoxicity. *International journal of molecular sciences* 16, 1484-1494.

Ziment, I., 1988. Acetylcysteine: a drug that is much more than a mucokinetic. *Biomedicine & pharmacotherapy= Biomedecine & pharmacotherapie* 42, 513-519.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A metodologia validada para a quantificação de cádmio em plasma, utilizando a técnica GFAAS, mostrou-se adequada, confiável e segura. Os resultados satisfazem os requisitos recomendados, sendo, desse modo, um método aprovado para quantificar cádmio plasmático em ratos tratados. Os outros resultados desse estudo destacaram a forte capacidade da NAC de proteger os rins dos danos causados pelo cádmio, ao diminuir os níveis de tióis e peroxidação lipídica e inibir, indiretamente, a ação oxidante do metal.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AASETH, J. et al. Chelation in metal intoxication--Principles and paradigms. **J Trace Elem Med Biol**, v. 31, p. 260-6, 2015.

AEBI, H. **Catalase**. In: **Bergmeyer HU editor. Methods of enzymatic analysis**. 2 1974.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA) BRASIL. Resolução nº 27, de 17 de maio de 2012. **Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos**. Diário Oficial da União, 22 de maio de 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA) BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Diário Oficial da União, 02 de junho de 2003.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). CAS 7440-42-9. **Cadmium**. Department of Health and Human Services, Public Health Statement, Sep 2012.

ALFANIE, I.; MUHYI, R.; SUHARTONO, E. Effect of Heavy Metal on Malondialdehyde and Advanced Oxidation Protein Products Concentration A Focus on Arsenic, Cadmium, and Mercury. **Journal of Medical and Bioengineering Vol**, v. 4, n. 4, 2015.

ASAGBA, S. O. et al. Influence of a Nigerian-like diet on calcium, phosphate and alkaline phosphatase levels in the plasma and bone of cadmium exposed rats. **J. Med. Sci**, v. 6, n. 5, p. 758-764, 2006.

BERNARD, A. Cadmium & its adverse effects on human health. **Indian Journal of Medical Research**, v. 128, n. 4, p. 557, 2008.

BERTIN, G.; AVERBECK, D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). **Biochimie**, v. 88, n. 11, p. 1549-1559, 2006.

BRIDWELL, H. et al. Perspectives on method validation: importance of adequate method validation. **The Quality Assurance Journal**, v. 13, n. 3-4, p. 72-77, 2010.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman-12**. AMGH Editora, 2012. ISBN 858055117X.

CHEN, S. et al. N-acetyl-L-cysteine protects against cadmium-induced neuronal apoptosis by inhibiting ROS-dependent activation of Akt/mTOR pathway in mouse brain. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 40, n. 6, p. 759-77, Oct 2014.

CHOI, Y.-H. et al. Environmental cadmium and lead exposures and hearing loss in US adults: the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999 to 2004. **Environmental health perspectives**, v. 120, n. 11, p. 1544, 2012.

CIMASONI, G. Inhibition of cholinesterases by fluoride in vitro. **Biochemical Journal**, v. 99, n. 1, p. 133, 1966.

DHOUIB, I. E. et al. A minireview on N-acetylcysteine: an old drug with new approaches. **Life sciences**, v. 151, p. 359-363, 2016.

DI GIACOMO, C. et al. Nonproteic antioxidant status in plasma of subjects with colon cancer. **Experimental biology and medicine**, v. 228, n. 5, p. 525-528, 2003.

DODD, S. et al. N-acetylcysteine for antioxidant therapy: pharmacology and clinical utility. **Expert opinion on biological therapy**, v. 8, n. 12, p. 1955-1962, 2008.

DUSSE, L.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. D. G. Revisão sobre óxido nítrico. **J Bras Patol Med Lab**, v. 39, n. 4, p. 343-50, 2003.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem Pharmacol**, v. 7, p. 88-95, Jul 1961.

EREL, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. **Clinical biochemistry**, v. 37, n. 4, p. 277-285, 2004.

FERNANDES, L. H.; MAINIER, F. B. Os riscos da exposição ocupacional ao cádmio. **Sistemas & Gestão**, v. 9, n. 2, p. 194-199, 2014.

FERREIRA, A.; MATSUBARA, L. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da associação médica brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FLORA, S. J. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2, n. 4, p. 191-206, Sep-Oct 2009.

FLORA, S. J.; PACHAURI, V. Chelation in metal intoxication. **Int J Environ Res Public Health**, v. 7, n. 7, p. 2745-88, Jul 2010.

GHONIEM, M. H. et al. Efficacy of curcumin on lead induced nephrotoxicity in female albino rats. **Journal of American Science**, v. 8, n. 6, 2012.

GIAMPRETI, A. et al. N-Acetyl-Cysteine as Effective and Safe Chelating Agent in Metal-on-Metal Hip-Implanted Patients: Two Cases. **Case reports in orthopedics**, v. 2016, 2016.

GONZALEZ, M. H. et al. Microwave-assisted digestion procedures for biological samples with diluted nitric acid: Identification of reaction products. **Talanta**, v. 79, n. 2, p. 396-401, 2009.

GROTEN, J. et al. Comparison of the toxicity of inorganic and liver-incorporated cadmium: A 4-wk feeding study in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 28, n. 6, p. 435-441, 1990.

HWANGBO, Y. et al. Blood cadmium and estimated glomerular filtration rate in Korean adults. **Environmental health perspectives**, v. 119, n. 12, p. 1800, 2011.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans, Beryllium, Cadmium, Mercury and Exposure in the Glass Manufacturing Industry. **IARC Scientific Publications**, p. 119-238, 1993.

ISSELS, R. D. et al. Promotion of cystine uptake and its utilization for glutathione biosynthesis induced by cysteamine and N-acetylcysteine. **Biochemical pharmacology**, v. 37, n. 5, p. 881-888, 1988.

JÄRUP, L. et al. Low level exposure to cadmium and early kidney damage: the OSCAR study. **Occupational and environmental medicine**, v. 57, n. 10, p. 668-672, 2000.

JOHRI, N.; JACQUILLET, G.; UNWIN, R. Heavy metal poisoning: the effects of cadmium on the kidney. **Biometals**, v. 23, n. 5, p. 783-792, 2010.

JOSEPH, P. Mechanisms of cadmium carcinogenesis. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 238, n. 3, p. 272-279, 2009.

KAPLAN, M. et al. Influence of N-acetylcysteine on renal toxicity of cadmium in rats. **Pediatr Nephrol**, v. 23, n. 2, p. 233-41, Feb 2008.

KELLY, G. S. Clinical applications of N-acetylcysteine. **Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic**, v. 3, n. 2, p. 114-127, 1998.

KOSEM, N.; HAN, Y.-H.; MOONGKARNDI, P. Antioxidant and cytoprotective activities of methanolic extract from *Garcinia mangostana* hulls. **Science Asia**, v. 33, n. 1, p. 283-292, 2007.

KUKONGVIRIYAPAN, U.; APAIJIT, K.; KUKONGVIRIYAPAN, V. Oxidative stress and cardiovascular dysfunction associated with cadmium exposure: beneficial effects of curcumin and tetrahydrocurcumin. **The Tohoku journal of experimental medicine**, v. 239, n. 1, p. 25-38, 2016.

KUMMROW, F. et al. Biomonitoring method for the simultaneous determination of cadmium and lead in whole blood by electrothermal atomic absorption spectrometry for assessment of environmental exposure. **Talanta**, v. 75, n. 1, p. 246-252, 2008.

LI, X. et al. Cytoprotective effects of dietary flavonoids against cadmium-induced toxicity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 2017.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-75, Nov 1951.

LUEVANO, J.; DAMODARAN, C. A review of molecular events of cadmium-induced carcinogenesis. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 33, n. 3, 2014.

MEZYNSKA, M.; BRZÓSKA, M. M. Environmental exposure to cadmium—a risk for health of the general population in industrialized countries and preventive strategies. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-22, 2017.

MIRSKY, M. L. et al. Histologic and cytologic detection of endocrine and reproductive tract effects of exemestane in female rats treated for up to twenty-eight days. **Toxicol Pathol**, v. 39, n. 4, p. 589-605, Jun 2011.

MITSUMORI, K. et al. Relationship between the development of hepato-renal toxicity and cadmium accumulation in rats given minimum to large amounts of cadmium chloride in the long-term: preliminary study. **Archives of toxicology**, v. 72, n. 9, p. 545-552, 1998.

MOKHTARI, V. et al. A Review on Various Uses of N-Acetyl Cysteine. **Cell Journal (Yakhteh)**, v. 19, n. 1, p. 11, 2017.

MOREAU, R. L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B. **Toxicologia Analítica**. Guanabara Koogan Ltda, 2008.

NANDI, A.; CHATTERJEE, I. B. Assay of superoxide dismutase activity in animal tissues. **J. Biosci**, v. 13, n. 3, p. 305-315, 1988.

NAZ, S. et al. Method validation strategies involved in non-targeted metabolomics. **Journal of Chromatography A**, v. 1353, p. 99-105, 2014.

NEWAIRY, A. et al. The hepatoprotective effects of selenium against cadmium toxicity in rats. **Toxicology**, v. 242, n. 1-3, p. 23-30, 2007.

NINKOV, M. et al. Toxicity of oral cadmium intake: Impact on gut immunity. **Toxicol Lett**, v. 237, n. 2, p. 89-99, Sep 2 2015.

ODEWUMI, C. O. et al. Protective effects of N-acetylcysteine against cadmium-induced damage in cultured rat normal liver cells. **Int J Mol Med**, v. 27, n. 2, p. 243-8, Feb 2011.

OGA, S. Fundamentos de toxicologia. In: (Ed.). **Fundamentos de toxicologia**: Atheneu, 1996.

RANI, A. et al. Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a review. **International journal of environmental health research**, v. 24, n. 4, p. 378-399, 2014.

RUSHWORTH, G. F.; MEGSON, I. L. Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: the need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. **Pharmacology & therapeutics**, v. 141, n. 2, p. 150-159, 2014.

SAKELLARI, A. et al. Predictors of cadmium and lead concentrations in the blood of residents from the metropolitan area of Athens (Greece). **Science of The Total Environment**, v. 568, p. 263-270, 2016.

SAMUNI, Y. et al. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 8, p. 4117-29, Aug 2013.

SATARUG, S. et al. Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. **Ciencia & saude coletiva**, v. 16, n. 5, p. 2587-2602, 2011.

SKOOG, D. et al. Fundamentos de Química Analítica. 2006. **Pioneira: São Paulo**, 2006.

SUGITA, M.; TSUCHIYA, K. Estimation of variation among individuals of biological half-time of cadmium calculated from accumulation data. **Environmental research**, v. 68, n. 1, p. 31-37, 1995.

SZCZUREK, E. I. et al. Renal metallothionein responds rapidly and site specifically to zinc repletion in growing rats. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 23, n. 3, p. 176-182, 2009.

TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; VAN BOCKSTAELE, E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 8, p. 535-552, 2004.

WANG, J. et al. N-acetylcysteine protects against cadmium-induced oxidative stress in rat hepatocytes. **J Vet Sci**, v. 15, n. 4, p. 485-93, Dec 2014.

WANG, L. et al. Protective effect of N-acetylcysteine on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in immature female rats. **Hum Exp Toxicol**, v. 28, n. 4, p. 221-9, Apr 2009.

WLODEK, L. Beneficial and harmful effects of thiols. **Pol. J. Pharmacol**, v. 54, p. 215-223, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Exposure to cadmium: a major public health concern**. Preventing Disease Through Healthy Environments, 2010.

YADAV, N.; KHANDELWAL, S. Effect of Picroliv on cadmium-induced hepatic and renal damage in the rat. **Human & experimental toxicology**, v. 25, n. 10, p. 581-591, 2006.

YANG, H.; SHU, Y. Cadmium transporters in the kidney and cadmium-induced nephrotoxicity. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 1, p. 1484-1494, 2015.

ZHENG, L. et al. Blood lead and cadmium levels and relevant factors among children from an e-waste recycling town in China. **Environmental Research**, v. 108, n. 1, p. 15-20, 2008.

ZIMENT, I. Acetylcysteine: a drug that is much more than a mucokinetic. **Biomedicine & pharmacotherapy= Biomedecine & pharmacotherapie**, v. 42, n. 8, p. 513-519, 1988.

7. ANEXOS

7.1 Normas Revistas

7.1.1 Revista Química Nova



1. GERAL

Serão considerados para publicação na Revista Química Nova manuscritos em Português, Inglês e Espanhol, que cubram as áreas tradicionais da Química bem como artigos sobre Ensino de Química, História da Química, Política Científica, etc, além de artigos de áreas afins, desde que tenham acentuado conteúdo químico (clique aqui para acessar as normas de restrição). Os trabalhos devem se encaixar dentro de uma das modalidades abaixo:

Artigos Originais: refere-se a trabalhos inéditos de pesquisa. Devem seguir a forma usual de apresentação, contendo as seções *Introdução, Parte Experimental, Resultados e Discussão, Conclusão e Referências*, de acordo com as peculiaridades de cada trabalho. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas e outros elementos.

Artigos sobre Educação: trabalhos de pesquisas relacionadas ao ensino de graduação em Química e divulgação de experiências inovadoras no ensino de graduação e pós-graduação. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, e outros elementos.

Notas Técnicas: trabalhos de comunicação de métodos, técnicas, aparelhagens ou acessórios desenvolvidos no laboratório de origem do autor do manuscrito, desde que apresentem acentuado conteúdo químico. Devem seguir a forma usual de apresentação, contendo as seções *Introdução, Parte Experimental, Resultados e Discussão, Conclusão e Referências*, de acordo com as peculiaridades de cada trabalho. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc.

Assuntos Gerais: abordagem de assuntos de interesse geral dos químicos, tais como política científica, programas de graduação e pós-graduação, história da química, etc. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas e outros elementos.

Artigos de Revisão: destinados à apresentação do progresso em uma área específica de Química, com o objetivo de dar uma visão crítica do estado da arte do ponto de vista do especialista altamente qualificado e experiente. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas e outros elementos.

Para submeter um artigo de Revisão, é imprescindível que o autor tenha publicações que comprovem a sua experiência e qualificação na referida área. Antes do envio do manuscrito, o autor deverá submeter à editoria, para quimicanova@sbq.org.br, um resumo da revisão pretendida, acompanhado de uma carta explicativa da pertinência do trabalho e lista de publicações do autor na área em que pretende publicar. O material será analisado pelos Editores e, uma vez aprovado, será solicitado ao autor o envio do manuscrito completo, dentro das normas de QN, e só então será dado início ao processo de avaliação pelos assessores. O aceite da submissão não garante a publicação do manuscrito, que passará pelo processo formal de avaliação equivalente ao das outras modalidades.

2. ANTES DA SUBMISSÃO

2.1 Direitos autorais

Ao submeter um manuscrito à revista Química Nova, assume-se que ele não foi publicado previamente, que não está sob processo de avaliação por outra entidade e que não será publicado simultaneamente em outro veículo de divulgação, no mesmo formato, sem a permissão por escrito dos Editores. Além disso, subentende-se que o autor responsável pela submissão tem o consentimento de todos os outros autores. Os autores também concordam que os direitos autorais do manuscrito serão transferidos para a Sociedade Brasileira de Química (SBQ), caso o manuscrito seja aceito para publicação. Manuscritos aceitos e ilustrações se tornarão propriedades da SBQ.

2.2 Organização do manuscrito

Os manuscritos deverão apresentar clareza e concisão. A seção *Introdução* deverá identificar de forma clara e breve, utilizando-se de referências relevantes, a natureza do problema sob investigação e o conhecimento prévio a respeito dele. Revisões extensas da literatura não serão aceitas.

A seção *Parte Experimental* pode preceder ou vir após a seção *Resultados e Discussão*, mas devem ser necessariamente separadas. A seção *Conclusões*, que resumirá brevemente as principais conclusões do trabalho, deverá ser disposta logo após a seção *Resultados e Discussão*.

A parte experimental do manuscrito deve descrever os experimentos de maneira suficientemente detalhada para que outros pesquisadores possam reproduzi-los. O grau de pureza dos materiais utilizados deve ser fornecido, bem como todas as quantidades

utilizadas. A descrição de procedimentos já estabelecidos não é necessária. A instrumentação utilizada só deve ser descrita caso não seja padrão. Deve-se referir a instrumentos disponíveis comercialmente a partir de suas marcas e modelos.

Todos os compostos novos devem ser completamente caracterizados, incluindo dados espectroscópicos e análises elementares. Espectros de massas de alta resolução poderão substituir análises elementares caso sejam acompanhados de provas inquestionáveis da pureza da amostra (pontos de fusão, cópias dos espectros RMN, etc.). Para compostos sintetizados em formas enantiomericamente puras ou enantiomericamente enriquecidas, sua rotação específica deverá ser fornecida. Nos casos em que o excesso enantiomérico for determinado por técnicas cromatográficas e/ou espectroscópicas, as cópias dos cromatogramas e/ou espectros devem ser inclusas no Material Suplementar (ver seção *Material Suplementar*).

Muitas publicações de Química Teórica e/ou Computacional utilizam rotinas baseadas em métodos bem documentados, sejam semi-empíricos ou *ab initio*. Neste caso é suficiente citar a variante utilizada, referindo-se a publicações importantes nas quais os métodos foram desenvolvidos, e o programa de computador utilizado, indicando brevemente as modificações realizadas pelo autor.

É de responsabilidade dos autores a obtenção de permissões para reprodução de gráficos e imagens retiradas de outros periódicos. Essas permissões para reprodução devem ser enviadas no momento da submissão, juntamente com os outros arquivos do manuscrito. A reprodução deve também ser informada nas respectivas legendas.

Os Editores poderão solicitar a revisão do idioma do manuscrito em qualquer etapa do processo de avaliação do manuscrito. Neste caso, os autores deverão apresentar um certificado de revisão por empresa/profissional especializado, que deve ser submetido pela plataforma ScholarOne no momento da submissão da versão revisada do manuscrito.

2.3 Preparo dos manuscritos

Geral

Deve-se utilizar a fonte Times New Roman, tamanho de 12 pt e cor preta. O espaçamento entre linhas deve ser de 1,5x. As páginas devem ser numeradas consecutivamente, no canto inferior direito. As linhas e os títulos e subtítulos das seções não devem ser enumerados. Os títulos das seções devem ser escritos em negrito e caixa alta, os subtítulos apenas em negrito e os subsubtítulos apenas em itálico.

O Material Suplementar deve ser o último elemento do manuscrito, e deve conter informações relevantes e complementares àquelas já apresentadas no manuscrito (ver seção *Material Suplementar*).

Detalhes

A primeira página deverá conter o *graphical abstract* (ver seção *Graphical Abstract*), título do trabalho, em negrito e caixa alta, nome dos autores em negrito e endereço. Se o endereço onde o trabalho foi conduzido é diferente do endereço atual de qualquer um dos autores, uma nota de rodapé indicando a posição atual pode ser incluída. Havendo autores com diferentes endereços, estes deverão ser listados em sequência e indicados utilizando-se letras sequenciais.

Um exemplo:

José A. Benício^a, Maria C. Cavalcante^b e João D. de Almeida^{a,*}

^aDepartamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, 87020-9 00 Maringá - PR, Brasil

^bDepartamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 055 08-000 São Paulo - SP, Brasil

*e-mail: jalmeida@dq.uem.br

Como mostra o exemplo, o autor para correspondência deverá ser indicado com asterisco (*) e seu e-mail colocado logo abaixo dos endereços. A menor unidade do endereço deve ser o departamento. Em seguida devem ser indicados a faculdade/instituto, a universidade, o CEP, a cidade, o estado e o país. Laboratórios, programas de pós-graduação e cursos não devem ser inclusos no endereço. A segunda página deverá conter o título e o resumo do trabalho, ambos em inglês, com no máximo 200 (duzentas) palavras, e a indicação de 3 a 5 palavras-chave (keywords), também em inglês. O texto deve se iniciar a partir da terceira página do manuscrito.

Ao longo do texto, o autor deve se atentar às seguintes regras:

- Palavras em língua estrangeira (inglês, francês, latim, etc.) deverão ser escritas em itálico.
- Nomes científicos de espécies devem ser escritos em itálico, com a primeira letra do nome em caixa alta.

Alguns exemplos:

... os experimentos foram realizados *in situ*;

A bactéria *Escherichia coli*...;

O tratamento dos dados foi realizado a partir do *software* Origin;

- Todas as unidades devem ser separadas dos valores por um espaço simples (inclusive o grau Celsius). A mesma regra é válida para o caso de unidades em sequência.

Alguns exemplos:

10 °C;

15 mg L⁻¹ (evitar mg/L);

10 m s⁻² (evitar m/s²);

Atenção: Toda a nomenclatura utilizada deverá ser consistente, clara e de acordo com as regras estabelecidas por entidades apropriadas, como IUPAC, *International Union of Biochemistry, Abstracts Service, Nomenclature Committee of the American Chemical Society*, entre outras. Símbolos e unidades deverão seguir as recomendações da IUPAC. Os autores devem evitar o uso de unidades que não fazem parte do SI.

Normas para elementos gráficos e tabelas

Gráficos e Figuras: textos, nomes dos eixos e quaisquer outros elementos textuais que acompanham os elementos gráficos devem ser consistentes ao longo de todo o trabalho em relação à fonte, ao tamanho da fonte, ao espaçamento e à cor. Para elementos gerados por computador, deve-se evitar planos de fundo ou sombreamento.

Fórmulas estruturais e equações químicas: todas as estruturas químicas ou equações devem ser escritas utilizando a mesma fonte ao longo do manuscrito.

Equações: as equações devem ser escritas utilizando-se um editor de equações (MathType, Equation, entre outros) e devem ser numeradas sequencialmente ao longo do manuscrito.

Fotografias: As fotografias devem apresentar contraste e não devem ser montagens. Caso haja necessidade de uma escala, ela deve ser desenhada sobre a figura e não abaixo. Não serão aceitas fotografias de equipamentos comerciais.

Tabelas: as tabelas devem ser formatadas de modo a fornecer informações diretas ao leitor. Sombreamentos e negritos devem ser evitados. Qualquer informação extra deve vir abaixo da tabela, na forma de nota de rodapé, utilizando-se as letras a, b, c e assim por diante.

Graphical abstract (em inglês): O *graphical abstract* deve resumir o conteúdo do trabalho de forma concisa e dedicada a capturar a atenção de um público amplo. O autor deve apresentar uma figura nova, usando como parâmetro uma estrutura chave, uma reação, uma equação, um conceito, um gráfico, um teorema, entre outras possibilidades. Recomenda-se que seja de caráter artístico e possua cores diversas. Não serão aceitas fotos de equipamentos comerciais.

Atenção: a imagem deve possuir alta resolução (em formato .tiff, .jpg ou qualquer outro de ampla utilização que possa ser editado) e tamanho de 4 cm de altura por 8 cm de largura [os elementos textuais devem ser legíveis nessas dimensões].

Junto com o *graphical abstract*, o autor deverá enviar um texto explicativo em inglês (em arquivo .txt, .rtf ou .doc) de, no máximo, 3 linhas.

Normas para citações e lista de referências

Os elementos gráficos e as tabelas devem ser numeradas e citadas no texto, utilizando-se a primeira letra em caixa alta. Não se deve abreviar as citações.

Alguns exemplos:

... como pode ser verificado na Tabela 1.

A Figura 3 mostra o sistema utilizado...

(Tab. 1, Fig. 1 e quaisquer outras abreviações dos títulos dos elementos não devem ser utilizadas)

As citações de referências devem ser feitas de forma consecutiva, na forma numérica sobrescrita (sem parênteses ou colchetes), sempre após a pontuação, quando houver. Citações de duas ou mais referências devem ser separadas por vírgulas. Citações de três ou mais referências consecutivas devem ser agrupadas, utilizando-se o hífen (-). Não utilizar espaços entre as citações ou entre a citação e o caractere sobre o qual está posicionada.

A Química Nova não publica notas de rodapé. Quaisquer notas do autor devem ser incluídas na lista de referências e, no texto, devem seguir o mesmo padrão das citações, mantendo inclusive a sequência numérica.

Alguns exemplos:

Os resultados obtidos estão de acordo com a literatura.^{3,7,8}

Existe extensa literatura a respeito do sistema utilizado,⁹⁻¹² bem como das propriedades dos materiais empregados.¹³

salicilato de sódio,¹⁻³

Nishide *et al.*,⁴

... pela redução do ácido crômico,^{4-8,12}

(Três ou mais referências consecutivas devem ser citadas utilizando-se o hífen)

Na seção Referências, as abreviações dos títulos de periódicos devem estar de acordo com as definidas no Chemical Abstracts Service Source Index (ver <http://cassi.cas.org>). Caso o periódico não esteja listado no CASSI, o título deve ser escrito por extenso.

As normas para o ano, o volume e as páginas seguem abaixo para diversos tipos de literaturas. A pontuação, os espaçamentos, os negritos e os itálicos devem ser verificados com atenção. Manuscritos com referências fora das normas da revista serão reenviados ao autor até que os erros sejam verificados e corrigidos.

1. Varma, R. S.; Singh, A. P.; *J. Indian Chem. Soc.* **1990**, 67, 518.

2. No caso especial da revista citada não ser de fácil acesso, é recomendado citar o seu número de Chemical Abstract, como segue:

Provstyanoi, M. V.; Logachev, E. V.; Kochergin, P. M.; Beilis, Y. I.; *Izv. Vyssh. Uchebn.*

Zadev.; Khim. Khim. Tekhnol. **1976**, *19*, 708. (CA 85:78051s).

3. Caso o trabalho tenha doi, mas não a referência completa, citar DOI da seguinte maneira: Vidotti, M.; Silva, M. R.; Salvador, R. P.; de Torresi, S. I. C.; Dall'Antonia, L. H.; *Electrochimica Acta* (2007), doi:10.1016/j.electacta.2007.11.029.

4. É recomendado o uso de referências compostas na medida do possível, em lugar de uma lista de referências individuais. O estilo das referências compostas é o seguinte: Varela, H.; Torresi, R. M.; *J. Electrochem. Soc.* **2000**, *147*, 665; Lemos, T. L. G.; Andrade, C. H. S.; Guimarães, A. M.; Wolter-Filho, W.; Braz-Filho, R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1996**, *7*, 123; Ângelo, A. C. D.; de Souza, A.; Morgon, N. H.; Sambrano, J. R.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 473.

Patentes:

Devem ser identificadas da seguinte forma (na medida do possível o número do Chemical Abstracts deve ser informado entre parênteses).

5. Hashiba, I.; Ando, Y.; Kawakami, I.; Sakota, R.; Nagano, K.; Mori, T.; *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* 79 73,771 **1979**. (CA 91:P193174v)

6. Kadin, S.B.; *US pat.* 4,730,004 **1988**. (CA 110:P23729y)

7. Eberlin, M. N.; Mendes, M. A.; Sparrapan, R.; Kotiaho, T.; *Br PI* 9.604.468-3, **1999**.

Livros:

com editor(es):

8. Regitz, M. Em *Multiple Bonds and Low Coordination in Phosphorus Chemistry*; Regitz, M.; Scherer, O. J., eds.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1990, cap. 2.

sem editor(es):

9. Cotton, F. A.; Wilkinson, G.; *Advanced Inorganic Chemistry*, 5th ed., Wiley: New York, 1988.

Programas de computação (Softwares):

10. Sheldrick, G. M.; *SHELXL-93; Program for Crystal Structure Refinement*; Universidade de Göttingen, Alemanha, 1993.

Teses:

11. Velandia, J. R.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, 1997.

Material apresentado em Congressos:

12. Ferreira, A. B; Brito, S. L.; *Resumos da 20a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, Brasil, 1998.

Páginas Internet:

<http://www.s bq.org.br/jbcs>, acessada em Junho 2001.

Material não publicado:

Para material aceito para publicação: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, no prelo.

Para material submetido mas ainda não aceito: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, submetido. Para trabalho não publicado ou comunicação pessoal: Magalhães, U. H.; trabalho não publicado ou Magalhães, U. H., comunicação pessoal. Resultados não publicados só poderão ser citados com a permissão explícita das pessoas envolvidas na sua obtenção.

Manuscritos contendo RMN, IV, espectros de massas, etc.

Sempre que um composto é sintetizado ou identificado (novo ou conhecido previamente), é obrigatório o envio de todos os dados espectrais (dados e espectros) como Material Suplementar (ver seção Material Suplementar) no momento da submissão do manuscrito.

Material Suplementar

Esta modalidade foi criada para que o texto principal seja objetivo e contenha o número estritamente necessário de Figuras e Tabelas.

O conteúdo do Material Suplementar (MS) deverá ser colocado no final do trabalho, após a seção REFERÊNCIAS. Quando houver MS, deve ser criada uma seção MATERIAL SUPLEMENTAR, logo após a seção CONCLUSÃO, com a descrição de seu conteúdo. O texto deve também indicar o acesso livre ao MS a partir do website da revista Química Nova (<http://quimicanova.sbq.org.br/>).

Elementos gráficos e Tabelas do Material Suplementar devem ser numeradas sequencialmente, com a letra S após a numeração. Ex: Figura 1S, Tabela 4S, etc.

Apesar de complementar a informação do manuscrito, o MS deve ser um documento completo. Caso sejam usadas referências, elas devem ser listadas ao final do próprio MS e numeradas na forma 1S, 2S, ...

Os Editores poderão solicitar aos autores, em qualquer fase da tramitação, a separação de Material Suplementar.

7.1.2 Revista *Food and Chemical Toxicology*



ISSN: 0278-6915

Food and Chemical Toxicology

> [Supports Open Access](#)

Editor-in-Chief: [José L. Domingo](#)

> [View Editorial Board](#)

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

To find out more, please visit the Preparation section below.



Introduction

Food and Chemical Toxicology (FCT), an internationally renowned journal, aspires to publish original research articles and reviews on **toxic effects**, in animals or humans, of natural or synthetic chemicals occurring in the human environment with particular emphasis on **food, drugs, and chemicals, including agricultural and industrial safety, and consumer product safety**. Areas such as safety evaluation of **novel foods and ingredients, biotechnologically-derived** products, and **nanomaterials** are included in the scope of the journal. FCT also encourages submission of papers on **inter-relationships between nutrition and toxicology** and on *in vitro* techniques, particularly those fostering the **3 Rs**.

The principal aim of the journal is to publish high impact, scholarly work and to serve as a multidisciplinary forum for research in toxicology. Papers submitted will be judged on the

basis of scientific originality and contribution to the field, quality and subject matter. Studies should address at least one of the following:

- Physiological, biochemical, or pathological changes induced by specific substances
- Techniques for assessing potential toxicity, including molecular biology
- Mechanisms underlying toxic phenomena
- Toxicological examinations of specific chemicals or consumer products, both those showing adverse effects and those demonstrating safety, that meet current standards of scientific acceptability

Manuscripts concerning materials/substances of only local interest for which the chemical composition of the material/substance is **not clearly defined** will **not** be considered. Manuscripts addressing only pharmacological properties, or only potentially beneficial effects using *in vitro* or *in vivo* systems, are not within the scope of the journal.

FCT is committed to the highest standards. Only papers that have not been previously published, that fit in the above mentioned scope, and that have been reviewed by experts in the field prior to publication will be accepted. Cover letters must state that the paper is new and original and not under consideration for publication elsewhere. Papers pending in other journals will not be considered. Co-authors should be individuals who have contributed substantially to the content of the papers.

Types of paper

The Journal's main purpose is the publication of papers reporting and interpreting original unpublished toxicological research, particularly studies promoting an understanding of the mechanisms underlying toxic effects or improvements in methods for predicting adverse effects. Papers reporting the toxicological examination of specific foods, chemicals or consumer products will be published, irrespective of the positive or negative nature of the results, provided the tests and reporting meet current standards of acceptability. In addition, Short Communications will also be considered, as will concise interpretative Reviews of toxicological topics of contemporary significance. Letters to the Editor will be limited to comments on contributions already published in the journal; if a letter is accepted, a response (for simultaneous publication) will be invited from the authors of the original contribution. All Letters to the Editor should be submitted to the Editor in Chief, Jose L. Domingo through the online submission system of the Journal.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- Email address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- Ensure all figures and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print
Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)
- Supplemental files* (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our Support Center.



Before You Begin

Ethics in publishing

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

Humand and animal rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the ARRIVE guidelines and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed.

Conflitc of interest

Food and Chemical Toxicology follows the ICMJE recommendations regarding conflict of interest disclosures. All authors are required to report the following information with each submission:

1. All third-party financial support for the work in the submitted manuscript.
2. All financial relationships with any entities that could be viewed as relevant to the general area of the submitted manuscript.
3. All sources of revenue with relevance to the submitted work who made payments to you, or to your institution on your behalf, in the 36 months prior to submission.
4. Any other interactions with the sponsor of outside of the submitted work should also be reported.
5. Any relevant patents or copyrights (planned, pending, or issued).

6. Any other relationships or affiliations that may be perceived by readers to have influenced, or give the appearance of potentially influencing, what you wrote in the submitted work.

As a general guideline, it is usually better to disclose a relationship than not. This information will be acknowledged at publication in a Transparency Document. Additional information on the ICMJE recommendations can be found at: <http://www.icmje.org>. The form for conflict of interest disclosure can be downloaded here, or at http://www.icmje.org/coi_disclosure.pdf (if this link does not display properly in your browser, please right-click the link and select "Save Target As..." or "Save Link as..." from the popup menu.)

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Each manuscript must also be accompanied by a cover letter outlining the basic findings of the paper and their significance. Furthermore, it is understood that with submission of this article the authors have complied with the institutional policies governing the humane and

ethical treatment of the experimental subjects (i.e. animals and human subjects), and that they are willing to share the original data and materials if so requested.

Preprints

Please note that preprints can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's sharing policy. Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information).

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing

Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are required to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the

author for the gold open access publication fee. Details of existing agreements are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs.
- No open access publication fee payable by authors.
- The Author is entitled to post the accepted manuscript in their institution's repository and make this public after an embargo period (known as green Open Access). The published journal article cannot be shared publicly, for example on ResearchGate or Academia.edu, to ensure the sustainability of peer-reviewed research in journal publications. The embargo period for this journal can be found below.

Gold open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- A gold open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For gold open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CCBY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The gold open access publication fee for this journal is **USD 2800**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. Find out more.

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Researcher Academy

Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Referees

The Editors require submissions by the authors of the names and addresses of 4 potential reviewers for this submission. The institutional address and e-mail address are required. At least 2 of the referees should be from a different country to the corresponding author's. The Editors reserve the right to use these or other reviewers.



Preparation

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process. As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes. Divide the article into clearly defined sections.

Please ensure the text of your paper is double-spaced– this is an essential peer review requirement.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. More information on types of peer review.

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision – numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material an methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- ***Title.*** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- ***Author names and affiliations.*** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information site.

Authors can make use of Elsevier's Illustration Services to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Highlights

Please amend your research highlights so that they consist of 3 to 5 brief bullet points which convey the core findings of your work. Please ensure EACH bullet point does NOT exceed 125 characters (including spaces). An example is given below:

RESEARCH HIGHLIGHTS EXAMPLE:

* Research highlights are a mandatory field of a submitted paper & therefore should not exceed 85 characters including spaces.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Abbreviations should be used sparingly; they should be defined when first used in the paper but also listed in alphabetical order under *Abbreviations* as a footnote to the title page (see above).

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Nomenclature and units

All measurements should be expressed in metric, preferably SI, units. Test chemicals and enzymes must be clearly identified, IUPAC and CAS names being used, wherever possible with the aid of CAS Registry and EC numbers. Pesticides should be referred to be their ISO names and human and veterinary drugs by their INNs.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.

- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):
EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.
TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your

preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication

year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/food-and-chemical-toxicology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:
 Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:
 Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:
 Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:
 Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:
 [dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. . In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in

one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions hereto find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page.

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. Before submitting your article, you can deposit the relevant datasets to *Mendeley Data*. Please

include the DOI of the deposited dataset(s) in your main manuscript file. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 500 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the Data in Brief website. Please use this template to write your Data in Brief.

MethodsX

You have the option of converting relevant protocols and methods into one or multiple MethodsX articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or setting, but often without getting credit for this part of their work. MethodsX, an open access journal, now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible. Authors are encouraged to submit their MethodsX article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will automatically be transferred over to MethodsX where it will be editorially reviewed. Please note an open access fee is payable for publication in MethodsX. Full details can be found on the MethodsX website. Please use this template to prepare your MethodsX article.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is

unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page.



After Acceptance

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Webshop. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their

final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.



Author Inquiries

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch. You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.

7.2 Protocolo Comitê de Ética Animal

Protocolo aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (CEUA / UNIOESTE):



PARECER DE PROTOCOLO

O protocolo intitulado "Investigação da ação quelante e antioxidante da N-acetilcisteína sobre o cádmio", sob vossa coordenação, foi avaliado pelo CEUA como **APROVADO** para execução.

ATENÇÃO!

O Certificado Experimental deste Protocolo, somente será emitido após o encerramento das atividades previstas e após o encaminhamento do Relatório Final ao CEUA. Este Parecer **NÃO** tem valor como Certificado Experimental.

Cascavel, 21/12/2016

Profa. Dra. Luclana Oliveira de Fariña
Coordenadora do CEUA
Portaria nº 2729/2014 - GRE