

Avaliação do estresse oxidativo e contaminação por chumbo em praticantes de tiro esportivo

Marco Aurélio Echart Montano, Daniele Grazziotin Soares e Mirian Salvador*

Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130 Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil. *Autor para correspondência. e-mail: msalvado@ucs.br

RESUMO. O chumbo, metal utilizado na fabricação de munições, pode depletar a glutatona e gerar espécies reativas de oxigênio capazes de desencadear reações de peroxidação lipídica. Neste trabalho, avaliou-se uma possível correlação entre chumbo e estresse oxidativo em praticantes de tiro esportivo nas modalidades ao ar livre, *indoor* e não-atiradores. A concentração de chumbo sanguínea foi determinada por absorção atômica, a peroxidação lipídica pela concentração dos produtos de reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a capacidade antioxidante total foi avaliada utilizando-se o kit *Total Antioxidant Status* (RANDOX®). Os resultados mostraram que 12,5% dos atiradores ao ar livre e 20,8% *indoor* apresentaram valores sanguíneos de chumbo acima dos considerados normais para grupos não-expostos. Os valores de TBARS mostraram-se significativamente maiores nos praticantes de tiro. A capacidade antioxidante total medida no soro dos indivíduos dos três grupos amostrados não se mostrou alterada.

Palavras-chave: chumbo, peroxidação lipídica, praticantes de tiro.

ABSTRACT. Oxidative stress evaluation and lead contamination in marksmen. Lead is a toxic metal used in munitions. Recent studies have shown indications of oxidative stress in mice treated with lead acetate. Our work had the goal of evaluating the possible correlation of lead and oxidative stress in human outdoor and indoor marksmen. The lead concentration was measured by atomic absorption. Oxidative stress was accessed through the reaction products with tiobarbituric acid (TBARS) and the total antioxidant capacity was appraised using Total Antioxidant Status (RANDOX®). The results show that 12,5% of the outdoor and 20,8% of the indoor marksmen present lead values over what is considered normal in non-exposed groups. TBARS were significantly higher for marksmen than for the control group. No statistically significant differences in the total serum antioxidant capacity were observed in individuals tested.

Key words: lead, lipid peroxidation, marksmen.

Introdução

O chumbo é um metal não-essencial para o homem e altamente tóxico, mesmo em baixas concentrações (Roy e Rossmann, 1992; Larini, 1993; Kerper e Hinkle, 1997; Erdahl *et al.*, 1999). É amplamente utilizado na fabricação de baterias, tubulações, tintas e munições (Fairfax, 1997) e seus efeitos tóxicos podem estar associados a exposição aguda a altas doses ou à exposição crônica a baixas concentrações desse elemento. Em vista disso, trabalhadores de muitas indústrias são regularmente monitorados quanto à exposição crônica a este metal.

A contaminação por chumbo pode ocorrer tanto por inalação e ingestão quanto pela pele (Mayer e Wilson, 1998). Os praticantes de tiro esportivo estão sujeitos à contaminação por chumbo quando o

esporte é praticado ao ar livre e também em ambiente fechado, tornando-se particularmente importante em *stand indoor* devido à deficiência de ventilação. Nas munições, o chumbo está presente na forma de estifinato de chumbo, que sofre volatilização no momento do disparo da arma, podendo ser inalado pelo atirador e/ou depositado sobre a pele. Além disso, quando o projétil atinge o anteparo do alvo, parte da massa de chumbo que esse possui é convertida em um *spray*, aumentando as possibilidades de contaminação (Fairfax, 1997). Embora os praticantes de tiro esportivo utilizem, regularmente, equipamentos de proteção para olhos e ouvidos, normalmente, nenhuma medida de precaução é tomada a fim de evitar a contaminação por chumbo (Munden e Casey, 1990).

Quando ocorre intoxicação por chumbo, esse metal é distribuído no sangue e nos tecidos, sendo que cerca de 95% desse metal é armazenado nos eritrócitos (Larini, 1993). Os mecanismos de toxicidade do chumbo incluem a inibição da enzima δ -ácido aminolevulínico desidratase, que catalisa o primeiro passo da biossíntese do heme, levando ao acúmulo de 5-ácido aminolevulínico (ALA) que, em presença de metais, pode levar à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Hermes-Lima et al., 1991; Bechara, 1996; Costa et al., 1997). Em condições normais, as ERO produzidas em uma célula reagem com as defesas antioxidantes enzimáticas e/ou não-enzimáticas. Entretanto, quando ocorre um desequilíbrio entre os compostos oxidantes e antioxidantes do organismo, estabelece-se uma condição denominada de estresse oxidativo, em que os radicais livres em excesso começam a produzir danos a macromoléculas biológicas como lipídios, proteínas e DNA (Beckman e Ames, 1998), gerando alterações teciduais que estão implicadas em inúmeros processos patológicos, como por exemplo: câncer, arteriosclerose, doenças neurodegenerativas, diabetes, cirrose, artrite reumatóide etc. (Halliwell e Gutteridge, 2000).

Considerando que os praticantes de tiro esportivo não constituem uma categoria ocupacionalmente exposta, não sendo, portanto, monitorada, o objetivo deste trabalho foi o de determinar a concentração sanguínea de chumbo, a concentração dos produtos resultantes da peroxidação lipídica e a capacidade antioxidante total no sangue de praticantes de tiro esportivo nas modalidades *indoor* e ao ar livre.

Material e métodos

Para este estudo foram selecionados indivíduos saudáveis da região Nordeste do Estado do Rio Grande do Sul, ocupacionalmente não-expostos ao chumbo, do sexo masculino, e com idade entre 19 e 64 anos. Foram coletadas amostras de 24 praticantes de tiro da modalidade ao ar livre, 24 da modalidade *indoor* (ambiente fechado) e 13 não-praticantes de tiro (grupo controle). Todos os indivíduos assinaram "Termo de Consentimento Informado". A coleta foi realizada imediatamente após o término da prática de tiro. Para determinação de chumbo, foram utilizados tubos heparinizados para análise de metais traços (Vacutainer®). Para os demais ensaios, as amostras de sangue não-heparinado foram centrifugadas e o soro armazenado a -20°C , por, no máximo, 15 dias até a realização dos testes.

A dosagem sanguínea de chumbo foi realizada imediatamente após a coleta em espectrofotômetro

de absorção atômica com forno de grafite (Perkin Elmer®, modelo 4110, com corretor Zeeman). Para essa determinação, amostras de 50 μL de sangue total heparinado foram diluídas em 450 μL de água deionizada e lidas imediatamente a 2200°C (Miller et al., 1987).

A avaliação do estresse oxidativo foi realizada através da determinação dos produtos resultantes da peroxidação lipídica. Foram medidos os produtos resultantes da reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) conforme descrito por Wills (1966). Amostras de 250 μL soro foram tratadas com ácido tricloroacético 5%, ácido tiobarbitúrico 0,37% e ácido clorídrico 0,25 N por 30 minutos a 90°C . Após a centrifugação, a absorbância do sobrenadante foi determinada em 530nm. Como padrão utilizou-se uma solução de malondialdeído (MDA), E-Merck® 30nm/ml.

A avaliação da capacidade antioxidante total foi realizada utilizando-se o teste *Total Antioxidant Status* (RANDOX®, NX 2332). Nesta determinação, 610 $\mu\text{mol/L}$ de ABTS (2,2 azino-di-3-etilbenzotiazolina sulfonato) foram adicionados a 6,1 $\mu\text{mol/L}$ de peroxidase-metamioglobina e a 250 $\mu\text{mol/L}$ de peróxido de hidrogênio, em presença e em ausência das amostras. A geração do radical ABTS• foi medida espectrofotometricamente a 600nm. O resultado foi expresso em mM de antioxidantes no soro.

Os valores obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tuckey com nível de significância de 5%. Foram determinados também os coeficientes de correlação de Person para cada grupo específico, através do programa SPSS 10.0 for windows.

Resultados e discussão

A maioria dos laboratórios brasileiros adota o valor de 40 $\mu\text{g/dL}$ como limite máximo para concentração sanguínea de chumbo para categorias ocupacionalmente expostas, de acordo com a Norma Regulamentadora de Segurança e Saúde no Trabalho (NR-7) da Legislação Brasileira (2003). Assim sendo, esse valor foi considerado como referência em nosso trabalho.

As Tabelas 1, 2 e 3 apresentam os valores dos parâmetros obtidos nos indivíduos amostrados. Verificou-se que a concentração sanguínea de chumbo em 3 (12,5 %) dos atiradores ao ar livre e 5 (20,8%) dos da categoria *indoor* estão acima do considerado aceitável para grupos ocupacionalmente não-expostos (40 $\mu\text{g/dL}$). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as

médias das concentrações de chumbo do grupo de atiradores *indoor* e ao ar livre. No entanto, ambas foram significativamente mais elevadas do que a observada no grupo controle (Figura 1).

Tabela 1. Concentrações de chumbo, capacidade antioxidante total e níveis de TBARS do grupo controle (não-praticantes de tiro).

Nº da Amostra	Concentração de chumbo (µg/dL)	Capacidade antioxidante total (mmol/L)	TBARS (nmol/L)
1	7,40	1,54	7,87
2	9,30	1,58	9,70
3	10,20	1,58	6,58
4	10,00	1,58	8,14
5	7,90	1,60	9,02
6	8,20	1,61	9,02
7	0,30	1,38	5,02
8	2,10	1,38	4,81
9	0,40	1,42	4,75
10	3,10	1,50	3,19
11	1,20	1,38	2,30
12	11,20	1,48	5,36
13	2,00	1,36	5,42
Valores de referência	40,00	1,28 – 1,83	3,60-12,40

Tabela 2. Concentrações de chumbo, capacidade antioxidante total e níveis de TBARS nos praticantes de tiro esportivo da categoria *indoor*.

Nº da Amostra	Concentração de chumbo (µg/dL)	Capacidade antioxidante total (mmol/L)	TBARS (nmol/L)
1	63,40	1,34	10,72
2	17,90	1,65	14,52
3	12,00	1,54	12,96
4	43,60	1,33	15,40
5	74,10	1,24	15,95
6	37,20	1,68	12,28
7	2,00	1,69	9,29
8	20,20	1,45	8,95
9	18,30	1,51	14,59
10	24,90	1,42	8,68
11	18,60	1,24	12,82
12	21,60	1,39	6,99
13	47,70	1,38	13,64
14	21,20	1,58	15,67
15	28,70	1,45	12,55
16	14,60	1,48	13,57
17	26,50	1,39	9,84
18	43,40	1,43	8,00
19	6,90	1,53	14,04
20	6,00	1,27	4,14
21	12,40	1,52	5,22
22	11,70	1,54	5,02
23	4,80	1,44	3,73
24	8,60	1,37	3,80
Valores de referência	40,00	1,28 – 1,83	3,60-12,40

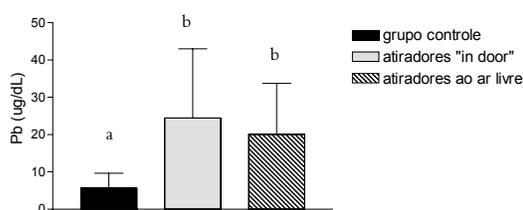


Figura 1. Valores médios da concentração de chumbo sanguínea (µg/dL) nos grupos amostrados.

* Letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste de Tuckey (p ≤ 0,05).

Tabela 3. Concentrações de chumbo, capacidade antioxidante total e níveis de TBARS nos praticantes de tiro esportivo da categoria ao ar livre.

Nº da Amostra	Concentração de chumbo (µg/dL)	Capacidade antioxidante total (mmol/L)	TBARS (nmol/L)
1	18,40	1,39	10,92
2	45,20	1,42	11,13
3	21,60	1,42	9,23
4	30,30	1,00	11,13
5	28,80	1,40	13,23
6	28,00	1,47	10,31
7	42,40	1,62	14,32
8	26,10	1,37	9,70
9	29,30	1,51	13,84
10	47,80	1,37	13,84
11	17,40	1,25	10,45
12	5,60	1,12	3,86
13	1,90	1,27	5,50
14	11,00	1,60	10,58
15	4,60	1,43	8,00
16	3,60	1,37	13,64
17	3,80	1,40	12,69
18	2,80	1,50	9,84
19	27,00	1,51	4,75
20	17,50	1,40	11,94
21	29,60	1,48	16,50
22	8,70	1,54	16,49
23	14,40	1,51	14,52
24	16,20	1,44	14,45
Valores de referência	40,00	1,28 – 1,83	3,60-12,40

Os níveis de estresse oxidativo, avaliados pela concentração dos produtos de reação do ácido tiobarbitúrico (TBARS), apresentaram-se aumentados em 10 (41,6%) atiradores ao ar livre e em 11 (45,8%) da categoria *indoor* (Tabelas 2 e 3). As médias dos valores obtidos nos diferentes grupos mostraram valores significativamente maiores para os atiradores. À semelhança dos resultados obtidos para a concentração sanguínea de chumbo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de atiradores ao livre e *indoor* (Figura 2). Níveis elevados de produtos da reação com o ácido tiobarbitúrico foram encontrados em cérebro de ratos tratados com ALA (Bechara, 1996). Populações expostas a pesticidas organoclorados (Videla, 1995) e ratos tratados com tetracloreto de carbono e benzeno (Halliwell e Guteridge, 2000) também mostraram concentrações elevadas de MDA.

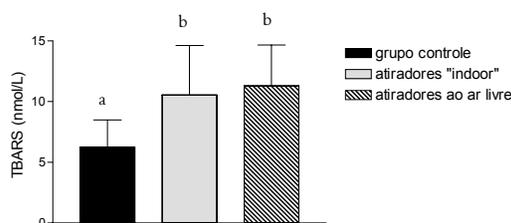


Figura 2. Valores médios obtidos no teste de TBARS (nmol/L) nos grupos amostrados.

* Letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste de Tuckey (p ≤ 0,05).

A capacidade antioxidante total medida no soro dos indivíduos amostrados apresentou-se diminuída em 4 (16,66%) atiradores ao ar livre e em 3 (12,5%) da categoria *indoor* (Tabelas 2 e 3). Entretanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados (Figura 3). O teste empregado neste trabalho para determinação da capacidade antioxidante baseia-se na doação de elétrons de compostos antioxidantes não-enzimáticos para o radical livre ABTS. Ratos tratados com chumbo mostraram diminuição dos níveis séricos de glutatona (Alexander et al., 1986), composto que poderia estar envolvido nos mecanismos de defesa contra as espécies reativas de oxigênio geradas pelo chumbo.

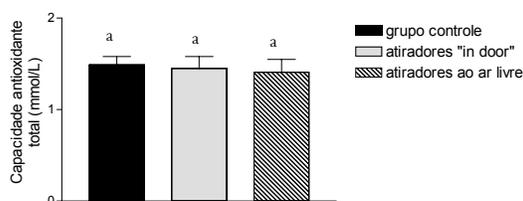


Figura 3. Valores médios da capacidade antioxidante total (nmol/L) nos grupos amostrados.

* Letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste de Tuckey ($p \leq 0,05$).

Índices de correlação positiva entre TBARS e concentração sanguínea de chumbo foram obtidos no grupo controle ($r=0,602$) e no de atiradores *indoor* ($r=0,432$), corroborando resultados obtidos em ratos tratados com chumbo (Sandhir et al., 1993; Neal et al., 1998; Adonaylo e Oteiza, 1999; Gurer et al., 1999), em trabalhadores de minas de chumbo (Ye et al., 1999) e em indivíduos com concentrações sanguíneas de chumbo superiores a $35\mu\text{g/dL}$ (Jiun e Hsien, 1994). O chumbo inibe a biossíntese do heme, resultando num acúmulo de ALA, que, em pH fisiológico, autooxida-se, levando à formação de radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^{\bullet}) e um radical de carbono, provavelmente o radical livre do ALA (Rivarov e Bochev, 1982; Hermes-Lima et al., 1991). Essas ERO poderiam ser responsáveis pela peroxidação das membranas celulares levando à produção de MDA (produto de reação com o ácido tiobarbitúrico) e conseqüente aumento do estresse oxidativo observado.

Outros fatores, que não exclusivamente a contaminação por chumbo, podem levar a um aumento na concentração de MDA, como, por exemplo, o fumo, o estresse, algumas doenças e os medicamentos (Halliwell e Gutteridge, 2000). Embora nosso trabalho tenha excluído os fumantes, outros fatores podem ter sido responsáveis pelos

valores aumentados de TBARS observados no grupo *indoor* e ao ar livre (Tabelas 2 e 3). No entanto, os valores médios de TBARS são significativamente maiores nos praticantes de tiro do que no grupo controle, reforçando a provável participação do chumbo na indução do estresse oxidativo em parte do grupo de atiradores estudados.

Os praticantes de tiro esportivo foram questionados também em relação a periodicidade, ao número de anos de prática de tiro, a periodicidade e ao número de disparos efetuados antes da coleta de sangue (dados não mostrados). Essas variáveis não mostraram correlação com nenhum dos parâmetros estudados. A ausência de correlação entre o número de anos de prática de tiro e os níveis sanguíneos de chumbo pode ser explicada, já que a determinação da concentração sanguínea de chumbo avalia exposições recentes a esse metal, que é armazenado no tecido ósseo (Gregory, 1990).

Os radicais livres e as ERO têm sido amplamente estudados em função da sua implicação em diversos processos normais e patológicos do organismo (Beckman e Ames, 1998; Halliwell e Gutteridge, 2000). Os resultados obtidos neste trabalho podem contribuir para o esclarecimento dos mecanismos de toxicidade do chumbo e, conseqüentemente, de possíveis formas de prevenção/tratamento. Embora outros estudos sejam necessários, os dados mostrados chamam a atenção, também, para a exposição ao chumbo de praticantes de tiro tanto *indoor* quanto ao ar livre, uma categoria considerada ocupacionalmente não-exposta e, portanto, não-sujeita ao monitoramento regular.

Referências

- ADONAYLO, V.N.; OTEIZA, P.I. Lead intoxication: antioxidant defenses and oxidative damage in rat brain. *Toxicology*, Oxford, v. 135, N. 2-2, p. 77-85, 1999.
- ALEXANDER, J. et al. Excretion of lead in rat bile: the role of glutathione. *Acta. Pharmacol. Toxicol.*, Calgary, v. 59, n.2, p. 486-489, 1986.
- BECHARA, E. J. Oxidative stress in acute intermittent porphyria and lead poisoning may be triggered by 5-aminolevulinic acid. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, Ribeirão Preto, v. 29, n. 7, p. 841-851, 1996.
- BECKMAN, K. B.; AMES, B.N. The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.*, Bethesda, v.78, n. 2, p. 547-581, 1998.
- COSTA, C. A. et al. Correlation between plasma 5-aminolevulinic acid concentrations and indicators of oxidative stress in lead-exposed workers. *Clinical Chem.*, Washington, DC, v. 43, n. 7, p. 1196-1202, 1997.
- ERDAHL, W.L. et al. Ionomycin, a carboxylic acid ionophore, transports Pb^{2+} with high selectivity. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, v. 275, n. 10, p. 7071-7079, 1999.

- FAIRFAX, R. Airborne lead and noise exposures during police firearms qualification. *Appl. Occup. Environ. Hyg.*, Oxford, v. 10, n. 1, p. 633-637, 1997.
- GREGORY, M. Risks of lead poisoning in firearms instructors and their students. *ASLET. J.*, Indianapolis, v. 4, n. 2, p. 1-6, 1990.
- GURER, H. *et al.* Antioxidant role of α -lipoic acid in lead toxicity. *Free. Radical. Biol. Med.*, Newton, v. 27, n.1, p. 75-81, 1999.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. *Free radicals in Biology and Medicine*. 3 ed. Oxford: Oxford University Press, 2000.
- HERMES-LIMA, M. *et al.* Are free radicals involved in lead poisoning? *Xenobiotica*, Surrey, v. 21, n. 8, p. 1085-1090, 1991.
- JIUN, Y.S.; HSIEN, L.T. Lipid peroxidation in workers exposed to lead. *Arch. Environ. Health*, Secaucus, v. 49, n. 1, p. 250-259, 1994.
- KERPER, L.E.; HINKLET, P.M. Cellular uptake of lead activated by depletion of intracellular calcium stores. *J. Biol. Chem.*, London, v. 272, n. 3, p. 8346-8352, 1997.
- LARINI, L. *Toxicologia*. 2 ed. São Paulo: Manole, 1993.
- MAYER, M.G.; WILSON, D.N. Health and safety—the downward trend in lead levels. *J. Power. Sources.*, London, v. 73, n. 1, p. 17-22, 1998.
- MILLER, D. T. *et al.* Determination of lead in blood using electrothermal atomisation atomic absorption spectrometry with L'vov platform and matrix modifier. *Analyst*, New York, 112:1701-1704, 1987.
- MUNDEN, S.; CASEY, P. Hazards of lead exposure. *ASLET J.*, Indianapolis, v. 4, n. 2, p. 359-363, 1990.
- NEAL, R. *et al.* Effects of some sulfur-containing antioxidants on lead-exposed lenses. *Free. Radical. Biol. Med.*, Newton, v. 39, n. 1, p. 211-243, 1998.
- NR-7 -Norma Regulamentadora de Segurança e Saúde no Trabalho. Disponível em: <<http://www.mte.gov.br/temas/segsau/comissoestri/oquee/conteudo/nr7/default.asp>>. Acesso em: 06 mai.2003.
- RIVAROV, S. R.; BOCHEV, P.G. The effect of the lead on hemoglobin-catalyzed lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, Calgary, v. 213, p. 288-292, 1982.
- ROY, N.K.; ROSSMAN, T.G. Mutagenesis and comutagenesis by lead compounds. *Mutat. Res.*, Oxford, v. 298, n.1, p. 97-103, 1992.
- SANDHIR, R. *et al.* Lipoperoxidative damage on lead exposure in rat brain and its implications on membrane bound enzymes. *Pharmacol. Toxicol.*, Palo Alto, v. 74, n. 4, p. 66-71, 1993.
- VIDELA, L. A. Influence of hyperthyroidism on lindane-induced hepatotoxicity in the rat. *Biochem. Pharmacol.*, Liège, vol. 50, n. 10, p. 1557-1565, 1995.
- WILLS, E.D. Mechanism of lipid peroxide formation in animal tissues. *Biochem. J.*, Calgary, v. 99, n. 5, p. 667-676, 1966.
- YE, X. *et al.* A study on oxidative stress in lead-exposed workers. *J. Toxicol. Env. Health.*, Washington, DC, v. 57, n. 3, p. 161-172, 1999.

Received on January 20, 2003.

Accepted on May 25, 2003.