

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**Faculdade de Farmácia**  
**Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia**

**POSSÍVEIS EFEITOS DO COBRE SANGUÍNEO SOBRE PARÂMETROS  
HEMATOLÓGICOS EM IDOSAS**

**Marília Baierle**

**Porto Alegre, junho de 2010.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**Faculdade de Farmácia**  
**Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia**

**POSSÍVEIS EFEITOS DO COBRE SANGUÍNEO SOBRE PARÂMETROS  
HEMATOLÓGICOS EM IDOSAS**

**Marília Baierle**

Trabalho de Conclusão  
da Disciplina de Estágio Curricular em Farmácia

**Profa. Dra. Solange Cristina Garcia**  
**Orientadora**

**Porto Alegre, junho de 2010.**

## RESUMO

**Introdução:** O cobre é um elemento traço essencial, e sua homeostase é importante, principalmente em idosos, uma vez que seu metabolismo está associado a doenças neurodegenerativas e distúrbios na eritropoiese, entre outros. Neste intuito, o presente estudo avaliou a associação da cupremia, parâmetros hematológicos e estresse oxidativo. **Materiais e Métodos:** Amostras de sangue de 39 mulheres idosas foram coletadas, as concentrações de cobre sérico foram quantificadas por ICP-MS, a atividade e o índice de reativação da enzima ALA-D foram determinados por espectrofotometria e parâmetros sanguíneos foram analisados em sistema automatizado. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. **Resultados:** As concentrações de cobre ( $130,25 \pm 22,83 \mu\text{g.dL}^{-1}$ ), parâmetros hematológicos e índice de reativação da ALA-D ( $23,59 \pm 23,30 \%$ ) encontraram-se dentro dos valores de referência. Porém, a atividade da ALA-D ( $11,47 \pm 2,81 \text{ U.L}^{-1}$ ) foi significativamente inferior aos valores reportados para controles. Correlações de *Spearman* entre as concentrações de cobre versus hemoglobina, hematócrito e atividade da ALA-D, foram  $-0,384$ ;  $-0,408$  e  $-0,395$ , respectivamente ( $p < 0,05$ ). O índice de reativação da ALA-D não apresentou correlação com a cupremia. **Discussão e Conclusão:** Os resultados mostraram que o cobre, mesmo estando dentro dos limites considerados valores de referência, pode estar envolvido na inibição da ALA-D, o que pode alterar parâmetros hematológicos, como a síntese de hemoglobina. Neste sentido, sugere-se que os níveis de referência para o cobre em idosos sejam reavaliados.

**Unitermos:** Idosos, cobre, parâmetros hematológicos, ICP-MS, estresse oxidativo, ALA-D.

## POSSIBLE EFFECTS OF BLOOD COPPER ON HEMATOLOGICAL PARAMETERS IN ELDERLY

### ABSTRACT

**Introduction:** Copper is an essential trace element, and its homeostasis is important, especially in the elderly, since their metabolism is associated with neurodegenerative diseases and disorders in erythropoiesis, among others. To this end, this study examined the association among cupremia, hematological parameters and oxidative stress. **Material and Methods:** Blood samples from 39 elderly women were collected, levels of serum copper were quantified by ICP-MS, the activity and the rate of reactivation of the enzyme ALA-D were determined by spectrophotometry and blood parameters were analyzed in an automated system. The results were expressed as median  $\pm$  standard deviation. **Results:** Copper levels ( $130.25 \pm 22.83 \mu\text{g.dL}^{-1}$ ), hematological parameters and index of ALA-D reactivation ( $23.59 \pm 23.30 \%$ ) were within reference values. However, the activity of ALA-D ( $11.47 \pm 2.81 \text{ U L}^{-1}$ ) was significantly lower than the values reported for controls. *Spearman* correlations between copper concentration versus hemoglobin, hematocrit and activity of ALA-D, were  $-0.384$ ,  $-0.408$  and  $-0.395$ , respectively ( $p < 0.05$ ). The index of ALA-D reactivation did not correlate with cupremia. **Discussion and Conclusion:** The results showed that although copper is within accepted reference values, it could be involved in the inhibition of ALA-D, which could alter hematological parameters, such as the synthesis of hemoglobin. In this sense, it is suggested that the reference levels for copper in the elderly should be reviewed.

**Key words:** Elderly; Copper; Hematological parameters; ICP-MS; oxidative stress; ALA-D activity.

## **APRESENTAÇÃO**

Este trabalho encontra-se na forma de artigo, o qual foi elaborado segundo as normas do “Jornal Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial”, apresentadas em anexo (ANEXO I).

**Possíveis efeitos do cobre sanguíneo sobre parâmetros hematológicos  
em idosas**

**Possible Effects Of Blood Copper On Hematological Parameters In Elderly**

Marília Baierle<sup>1</sup>; Juliana Valentini<sup>2</sup>; Clóviz Paniz<sup>3</sup>; Angela Maria Moro<sup>4</sup>;  
Fernando Barbosa Junior<sup>5</sup>; Solange Cristina Garcia<sup>6</sup>

1. Acadêmica do Curso de Farmácia, Departamento de Análises, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
2. Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.
3. Farmacêutico-Bioquímico do Hospital Universitário de Santa Maria, RS.
4. Doutoranda do Programa de Pós Graduação de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
5. Professor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.
6. Professora do Departamento de Análises, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

**Endereço para correspondência**

Solange Cristina Garcia  
Departamento de Análises  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)  
CEP 90610-000 – Porto Alegre-RS  
Tel.: (51) 3308-5297  
e-mail: garciapomblum@yahoo.com.br

## 1. INTRODUÇÃO

O cobre (Cu) é amplamente distribuído na natureza e é considerado um elemento traço essencial<sup>(32)</sup>, o qual atua em diversas funções fisiológicas e bioquímicas<sup>(30)</sup>, sendo constituinte de muitas metaloproteínas e metaloenzimas<sup>(5)</sup>. Para a população em geral, a maior parte deste micronutriente é obtida da dieta, através de legumes, carnes, frutos secos e bebidas, inclusive da água<sup>(49)</sup>. O consumo diário de cobre em adultos varia entre 0,9 e 2,2 mg. Por outro lado, a exposição ocupacional se dá em trabalhadores de usinas, minas, e nos que realizam operações de soldagem, fundição de metais e atividades afins<sup>(21)</sup>.

É um metal redox fortemente ativo, predominantemente encontrado na forma de íon cúprico (Cu II) podendo também apresentar-se na forma de íon cuproso (Cu I) no interior das células<sup>(30)</sup>. Esta capacidade redox é o que o torna útil em diversas etapas da geração de energia. Mas é também o que lhe permite catalisar, quando em seu estado “livre”, a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) que são prejudiciais ao organismo<sup>(7)</sup>. Cerca de 85 a 95% do Cu sérico está ligado covalentemente a ceruloplasmina<sup>(7)</sup>, por isso, sua quantificação é realizada preferencialmente no soro na maioria dos estudos<sup>(30)</sup>.

Há diversos trabalhos demonstrando que o cobre é co-fator de enzimas<sup>(20)</sup> como superóxido dismutase (SOD)<sup>(30)</sup>, lisil oxidase<sup>(11)</sup>, citocromo c oxidase e ceruloplasmina<sup>(40)</sup>. Estudos experimentais em animais têm mostrado que a deficiência de cobre pode reduzir, significativamente, a atividade da lisil oxidase nos ossos prejudicando a formação de colágeno e elastina. Em humanos, há evidências sobre a deficiência de cobre estar relacionada à idade e osteoporose<sup>(11)</sup>.

A deficiência de cobre é rara em humanos<sup>(49,32)</sup>, uma vez que esse nutriente é facilmente consumido e tem uma dose diária requerida muito baixa<sup>(49)</sup>. No entanto, quando há carência, a função de diferentes órgãos<sup>(5)</sup> e de

vários sistemas de defesa do organismo fica comprometida, como no caso da SOD, uma enzima antioxidante que apresenta sua atividade diminuída nesta situação<sup>(41)</sup>. Dentre as patologias associadas à deficiência de cobre, destaca-se a doença de Menkes, uma doença hereditária, na qual a codificação genética errada na produção da proteína ATP7A provoca um defeito no transporte intracelular de cobre, fazendo com que ocorra menor absorção do metal e inversão da distribuição do mesmo pelos órgãos, principalmente durante a infância, período crítico para o desenvolvimento do cérebro, provocando como consequência, graves efeitos neurológicos<sup>(15)</sup>.

Pacientes com deficiência de cobre podem ainda desenvolver déficits hematopoiéticos, resultando em anemia hipocrômica microcítica<sup>(47,24)</sup> associada à leucopenia<sup>(49,28,32)</sup> e neutropenia<sup>(19,32)</sup>. Como já foi dito, o cobre atua como um co-fator da ceruloplasmina, enzima que oxida o ferro, permitindo assim sua mobilização e seu transporte de estoques hepáticos para a medula óssea a fim de ser usado na eritropoiese<sup>(32,49,21,16)</sup>. Dessa forma, a deficiência de cobre resulta em excesso de ferro no fígado e insuficiência de ferro na medula, impossibilitando uma eficaz eritropoiese<sup>(49)</sup>. Alterações hematológicas, causadas pela deficiência de cobre, também podem ser observadas em pacientes que, devido a alguma doença crônica, tornaram-se dependentes de nutrição enteral ou parenteral, fazendo uso das mesmas por um longo prazo, sem, no entanto, realizar concomitante suplementação de cobre<sup>(32,27)</sup>.

Mais recentemente, tem sido demonstrado o papel da deficiência de cobre na patogênese de hipertensão arterial e doenças cardiovasculares<sup>(20,28)</sup>, e o que se sabe é que a concentração plasmática desse metal modifica significativamente a atividade de sistemas de transporte de sódio na membrana de eritrócitos, fato que está diretamente associado à referida patologia<sup>(20)</sup>.

Embora seja um elemento traço essencial para o organismo, quando em excesso pode causar efeitos tóxicos. Um dos distúrbios associados à hipercupremia é a doença de Wilson, uma enfermidade causada por herança



autossômica recessiva no cromossomo 13, e que pode surgir mesmo depois dos 50 anos de idade<sup>(4)</sup>. O mecanismo desta doença consiste basicamente no acúmulo de cobre nos hepatócitos provocando alterações cerebrais e hepáticas irreversíveis já bem estabelecidas<sup>(4)</sup>. Outra característica dessa doença é a deposição de cobre na córnea formando os anéis de Kayser-Fleischer<sup>(4)</sup>.

Atualmente, tem surgido certa preocupação com os limites da homeostase do cobre, uma vez que a auto-administração de microminerais e suplementos vitamínicos, tornou-se uma prática comum mundialmente<sup>(2,3)</sup>. Nessa linha, há relatos de que pessoas, mesmo apresentando concentrações dentro dos valores de referência para o cobre no sangue, podem desenvolver toxicidade ao longo da vida<sup>(7)</sup> devido a sua relação com doenças crônico-degenerativas. Diversos estudos relatam a função do cobre em doenças neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer e o Mal de Parkinson, que geralmente acometem idosos, demonstrando que a ingestão elevada de cobre pode estar associada a um declínio cognitivo acelerado, principalmente, se em conjunto, houver uma dieta rica em gordura saturada e gorduras trans<sup>(6,7,26,31,40)</sup>. Além disso, a maioria das doenças neurodegenerativas têm sua origem em reações com radicais livres ou espécies reativas<sup>(38,46)</sup>. A elevação de cobre também causa toxicidade relacionada com a peroxidação lipídica de membranas, uma vez que, quando encontrado na forma monovalente (Cu I), o metal está disponível para transferir um elétron, gerando assim, espécies reativas de oxigênio (EROS), tais como radicais hidroxila, peróxido de hidrogênio e íons superóxido, que estão intimamente ligados ao estresse oxidativo, provocando dano celular, oxidação protéica e danos ao DNA<sup>(30)</sup>.

Em suma, é sabido que o estresse oxidativo está associado a doenças crônico-degenerativas observadas com o envelhecimento<sup>(22,25,26,37)</sup>, e que o cobre pode estar implicado na etiologia dessas doenças. No entanto, existem poucos e contraditórios estudos sobre a homeostase desse metal em idosos<sup>(5,26,38)</sup>. Assim sendo, o objetivo do presente estudo foi avaliar as concentrações séricas de cobre, parâmetros hematológicos, atividade e

reativação da  $\delta$ -aminolevulinato desidratase (ALA-D) em idosas e verificar possíveis correlações.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Seleção e coleta das amostras**

O estudo foi realizado com amostras de 39 mulheres idosas, com idade média de 72 anos ( $\pm 6,7$  anos), residentes em Santa Maria – RS.

Foram excluídas do estudo, idosas com doenças neurológicas ou psiquiátricas congênitas e adquiridas graves; doenças metabólicas; doenças agudas ou crônicas graves; fumantes; etilistas; usuárias de suplementação vitamínica e/ou antioxidantes.

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria (131/06) e as participantes ou responsáveis preencheram um termo de consentimento livre e esclarecido.

Para o estudo foram coletados 10 mL de sangue com e sem anticoagulante. Após a coleta, o sangue foi centrifugado a 1500 g por 10 minutos a 4 °C, sendo o soro para quantificação de Cu separado e acondicionado (-20 °C) em eppendorfs previamente descontaminados até o momento da análise. Para a atividade da ALA-D foi utilizado sangue total com heparina, o qual foi mantido a -80°C até a análise. Para as análises hematológicas foi usado sangue com EDTA, e estas realizadas no mesmo dia da coleta.

## **Quantificação do Cobre**

A concentração total de Cobre no sangue foi determinada por espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado (ICP-MS), de acordo com o método publicado por Palmer et al., 2006<sup>(33)</sup>.

## **Atividade e reativação da $\delta$ -aminolevulinato desidratase (ALA-D)**

A atividade e o índice de reativação da enzima  $\delta$ -aminolevulinato desidratase foram dosados em sangue total por espectrofotometria de acordo com o método de Sassa, 1982<sup>(36)</sup>, com algumas modificações. A atividade da enzima foi determinada pela taxa de formação de porfobilinogênio (PBG) na presença (concentração de 2mM) e ausência do agente redutor ditioneitol (DTT). Assim, para a atividade da ALA-D houve uma pré-incubação de 10 min da amostra previamente hemolisada, e a reação enzimática foi iniciada pela adição de 4 mM de ácido  $\delta$ -aminolevulinico ( $\delta$ -ALA) em solução tampão fosfato de potássio (TFK) pH 6,8, perfazendo 1h a 37 °C. Para o índice de reativação da enzima, a única diferença foi a adição de DTT 2 mM aos tubos, antes do período de pré-incubação. O produto de ambas as reações foi quantificado a 555 nm. O índice de reativação da ALA-D foi estimado através da equação:  $A - B / A \times 100$ , onde A= absorbância da ALA-D com DTT; B = absorbância da ALA-D sem DTT. A atividade da ALA-D foi expressa em U.L<sup>-1</sup> (nmol PBG/h/mg Hb) e o índice de reativação em porcentagem (%).

## **Análises Hematológicas**

Os hemogramas foram realizados por método automatizado através de contador de células Coulter T-890 (Coulter Co., EUA) e microscopia complementar (para contagem diferencial de leucócitos).

## Análise Estatística

A análise estatística foi realizada pelo programa Statistica versão 6.0 e os resultados obtidos foram expressos na forma de média  $\pm$  desvio padrão (DP). Devido à distribuição não-normal das variáveis foi utilizado um teste de correlação não paramétrico, o teste de *Spearman*. Resultados com  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## 3. RESULTADOS

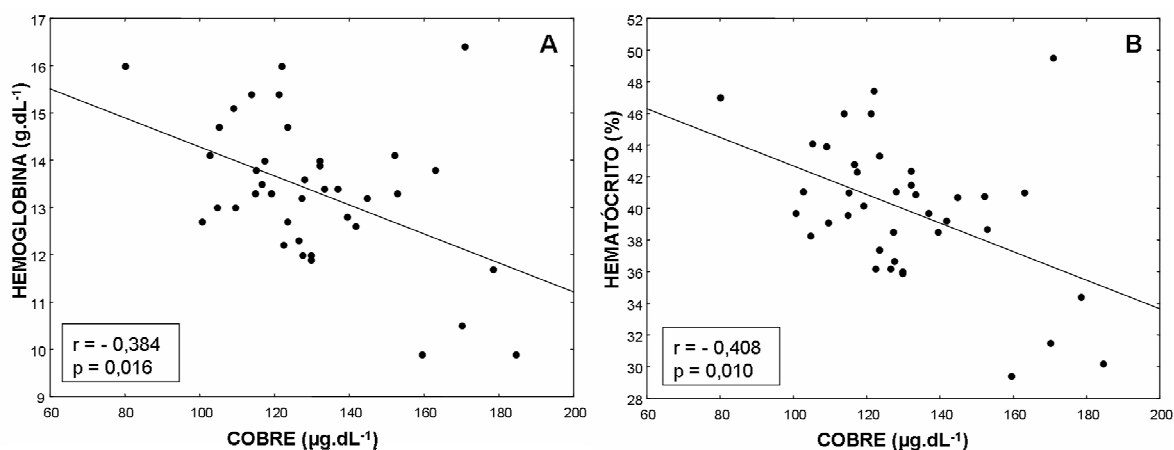
A média da concentração de cobre encontrada no soro das idosas participantes foi de  $130,25 \pm 22,83 \mu\text{g.dL}^{-1}$  e os valores de referência para mulheres adultas são de 80,00 a  $155,00 \mu\text{g.dL}^{-1(10)}$ .

Os resultados obtidos para os parâmetros hematológicos e os respectivos valores de referência para idosas com idade acima de 70 anos<sup>(13)</sup> são mostrados na Tabela 1.

**Tabela 1 – Resultados dos parâmetros hematológicos e valores de referência, apresentados como média  $\pm$  DP**

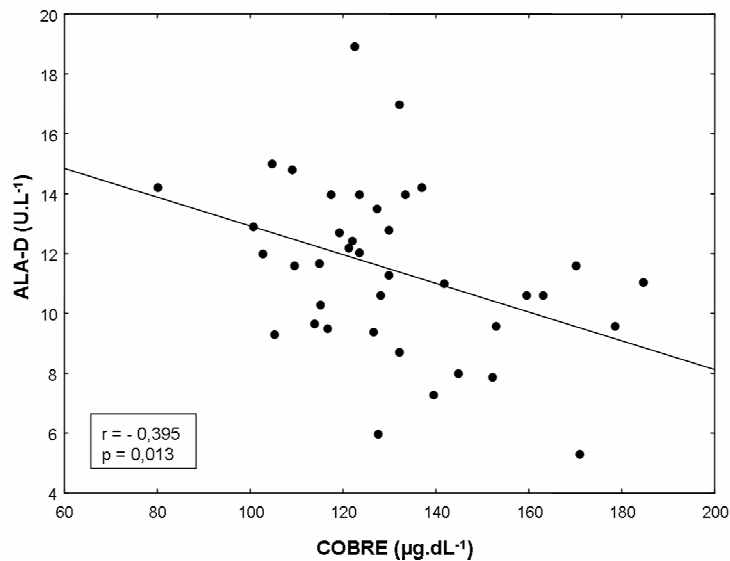
<i>Parâmetro</i>	<i>Resultado</i>	<i>Valores de referência<sup>(13)</sup></i>
Eritrócitos ( $\text{M} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	$4,4 \pm 0,4$	$4,6 \pm 0,7$
Hemoglobina ( $\text{g.dL}^{-1}$ )	$13,3 \pm 1,5$	$13,5 \pm 2,5$
Hematócrito (%)	$39,9 \pm 4,4$	$41,0 \pm 6,0$
VCM (fL)	$90,5 \pm 3,7$	$89,0 \pm 9,0$
Plaquetas (nº plaquetas/ $\text{mm}^3$ )	$230.154 \pm 55.361$	140.000 a 360.000
Leucócitos (nº leucócitos/ $\text{mm}^3$ )	$6.562 \pm 1.707$	3.600 a 11.000

A Figura 1 mostra as correlações significativamente negativas ( $p < 0,05$ ) observadas entre as concentrações de cobre *versus* concentrações de hemoglobina e concentrações de cobre *versus* porcentagem do hematócrito.



**Figura 1.** Correlação entre níveis séricos de cobre *versus* concentrações de hemoglobina (A) e valores de hematócrito (B) ( $n = 39$ ).

A atividade da enzima ALA-D foi de  $11,47 \pm 2,81 \text{ U.L}^{-1}$ , ou seja, as idosas participantes do estudo apresentaram uma menor atividade para essa enzima quando comparada com os resultados reportados por Valentini et al., 2007<sup>(45)</sup> ( $20,13 \pm 4,80 \text{ U.L}^{-1}$ ) e Hernandez et al., 2005<sup>(18)</sup> ( $22,38 \pm 5,63 \text{ U.L}^{-1}$ ) para indivíduos jovens saudáveis. O índice de reativação da ALA-D foi de  $23,59 \pm 23,30 \%$ , valor esse não significativamente diferente de indivíduos jovens saudáveis reportados por Valentini et al., 2008, e Gonçalves et al., 2005, ( $18,90 \pm 2,05$  e  $22,80 \pm 2,30 \%$ , respectivamente)<sup>(44,14)</sup>. Com esse índice de reativação a nova atividade da ALA-D seria de  $13,90 \pm 3,23 \text{ U.L}^{-1}$ . Adicionalmente, a atividade da enzima foi negativamente correlacionada com a concentração de cobre sérico (Figura 2).



**Figura 2:** Correlação entre concentração de cobre sérico versus enzima  $\delta$ -aminolevulinato desidratase (n=39).

#### 4. DISCUSSÃO

Uma vez que a expectativa de vida populacional tem aumentado continuamente ao longo do tempo<sup>(48)</sup> e que o envelhecimento é uma preocupação mundial, o qual tem se tornado motivo de muita discussão na última década, é de extrema importância a investigação e o entendimento das inevitáveis mudanças fisiológicas que acompanham o processo de envelhecimento humano. Nesse estudo os valores de cobre sérico, hemoglobina e hematócrito das idosas avaliadas encontraram-se dentro dos valores de referência para indivíduos saudáveis. Apesar disso, correlações negativas foram observadas entre concentração de cobre sérico com hemoglobina e hematócrito, respectivamente. Sabe-se que o cobre atua na eritropoiese, sendo co-fator da ceruloplasmina, a qual é responsável pela oxidação do ferro necessário para a produção de hemoglobina<sup>(32,49)</sup>.

Assim, a associação negativa entre concentração de cobre e os parâmetros hematológicos aqui analisados (Figura 1) parece ter relação com a reduzida atividade da  $\delta$ -aminolevulinato desidratase (ALA-D) (Figura 2). A referida enzima faz parte da via biossintética do grupo prostético heme, sendo essencial para a produção de hemoglobina. É, além disso, altamente sensível a elementos pró-oxidantes, os quais agem nos grupamentos sulfidríla (-SH) da mesma, resultando em redução da sua atividade e conseqüentemente, prejudicando a síntese do heme. Além disso, o acúmulo do substrato da enzima, o ácido  $\delta$ -aminolevulínico ( $\delta$ -ALA) no sangue, exacerba a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) contribuindo para o estresse oxidativo<sup>(45,34,39)</sup>. Quando foi avaliado o envolvimento dos grupos -SH na inibição da enzima, através da reação com DTT, notou-se que a porcentagem de reativação média na atividade da ALA-D não foi capaz de restaurar os valores da atividade enzimática até sua normalidade, o que nos leva a sugerir que outros grupos essenciais da enzima e não reativáveis pelo DTT estão envolvidos na inibição da ALA-D. Corrobora para esse fato a ausência de associação entre as concentrações séricas de cobre e a reativação enzimática, uma vez que, se a inibição dos grupos -SH da enzima fosse o único alvo do cobre a restauração da atividade enzimática pelo DTT (agente redutor) seria total.

A inibição da ALA-D por diferentes metais é bem descrita na literatura, tanto *in vitro* quanto *in vivo*<sup>(1,23,35)</sup>. Particularmente para o cobre, desde 1977<sup>(42)</sup> já é reportado ação inibitória sobre a atividade da ALA-D *in vivo*. Além disso, estudos *in vitro* do grupo de Despau et al., 1977<sup>(12)</sup> equiparam o potencial inibidor sobre a ALA-D do cobre e do chumbo, um clássico inibidor da ALA-D. Outros estudos *in vitro* contribuem para esses achados, uma vez que Tomokuni, 1979<sup>(43)</sup> investigou o efeito de quinze metais sobre a atividade da ALA-D eritrocitária, e o cobre estava entre os quatro metais que ocasionaram um grau de inibição da atividade da enzima similar à inibição causada pelo

chumbo. Porém, nenhum destes estudos reportou o índice de reativação da ALA-D, sendo os achados dessa análise aqui discutidos, um diferencial.

A ligação de metais às proteínas já foi objeto de uma grande revisão sobre a biologia molecular e toxicologia de metais<sup>(21)</sup>. Enzimas são os alvos de toxicidade mais bem documentados, entretanto, elas também podem desempenhar um papel protetor, reduzindo a atividade (toxicidade) do metal, como é o caso das metalotioneínas. Diversos tipos de interações proteína-metal podem ser considerados, isto é possível porque muitas dessas proteínas são, geralmente, não específicas, ou seja, aceitam substratos que diferem consideravelmente em sua estrutura química e não são capazes de discriminar entre os substratos, cuja única alteração é a colocação de um íon metálico<sup>(21)</sup>.

Dessa forma, sugere-se que o cobre pode possuir afinidade tanto pelos grupamentos –SH da ALA-D como por outros sítios de ligação não responsivos a ação redutora do DTT. Como essa enzima é necessária para a síntese do heme, sua inibição implica uma menor produção de hemoglobina, fato esse demonstrado pela correlação negativa entre o cobre e parâmetros hematológicos aqui analisados.

É sabido que o cobre em fluidos biológicos e tecidos pode manifestar-se sob formas físico-químicas variadas, tais como íons livres ( $\text{Cu}^{1+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ), complexos de baixo peso molecular e/ou macromoleculares<sup>(29)</sup>. Além disso, no organismo humano a farmacocinética do cobre orgânico e inorgânico são também diferentes. O cobre orgânico, presente nos alimentos, onde se encontra ligado às proteínas, é primeiro processado pelo fígado e capturado em formas não-tóxicas por moléculas como a ceruloplasmina, metalotioneína e chaperonas<sup>(9)</sup>, o que não permite a liberação excessiva no total de cobre livre no sangue. Já, o cobre inorgânico, consumido na água potável ou em suplementos minerais, em grande parte, ignora o fígado e entra na circulação como cobre livre<sup>(9)</sup> contribuindo imediatamente para o total de cobre livre no sangue<sup>(7)</sup>. Isso se torna importante quando discutimos os efeitos negativos do



cobre na água potável e em suplementos de vitaminas e minerais sobre a cognição na doença de Alzheimer e outras doenças neurodegenerativas, como Parkinson<sup>(7)</sup>.

No que se refere à toxicidade do cobre durante o envelhecimento, Brewer, 2010<sup>(7)</sup>, reafirma a hipótese de correlação positiva entre cobre livre com comprometimento cognitivo leve e doença de Alzheimer, respectivamente. Vale ressaltar que, nos últimos anos, a doença de Alzheimer tem se tornado uma epidemia principalmente, em países desenvolvidos que utilizam encanamentos de cobre<sup>(8)</sup>. Outros estudos em humanos, porém avaliando cobre proveniente de suplementos alimentares, também associam a concentração de cobre livre com a diminuição da capacidade cognitiva<sup>(31)</sup>.

Embora o conhecimento do conteúdo total do metal, numa dada amostra, seja insuficiente para a compreensão da farmacocinética e farmacodinâmica desse em humanos, uma vez que estes aspectos dependem da análise de especiação<sup>(29)</sup>, foi possível observar que essa quantificação é útil para apontar alterações que mereçam uma investigação mais abrangente. Além disso, com os resultados observados nesse trabalho pode-se sugerir que os valores de referência da concentração sérica de cobre para adultos podem não ser adequados para idosos.

## **5. CONCLUSÃO**

A investigação laboratorial tem um papel crucial na avaliação de doenças hematológicas<sup>(17)</sup>, sendo assim, deve-se sempre procurar empregar parâmetros mais recentes de análise, além dos já bem estabelecidos, o que permitirá a detecção precoce de doenças e conseqüentemente a sua prevenção. Baseado nos resultados apresentados, conclui-se que o conhecimento do status de cobre em idosos aliado a biomarcadores do estresse oxidativo, como a ALA-D, fornecem informações relevantes para

profissionais de saúde, pois mesmo em concentrações consideradas normais esse metal pode afetar o desempenho de rotas biológicas essenciais, como a síntese de hemoglobina. No entanto, estudos que avaliem os mecanismos envolvidos na inibição da referida enzima na presença de cobre são ainda necessários.

Além disso, é preciso um entendimento melhor da relação entre o cobre e suas espécies e os efeitos sobre a saúde humana, de modo que possa ocorrer uma avaliação de risco mais precisa. A análise de especiação do cobre no soro é essencial para identificar as espécies formadas, entender e estimar os mecanismos de interação entre o analito e seus alvos biológicos e, conseqüentemente, calcular mais acuradamente os riscos à saúde em diferentes etapas da vida, como no processo de envelhecimento.

## 6. REFERÊNCIAS

1. ALLAIN, P.; PREMEL-CABIC, A. Influence of metals and non-steroid anti-inflammatory drugs on the activity of human red cell ALA dehydratase "in vitro". *Pathol Biol*, v. 25, n. 8, p. 535-40, 1977.
2. ALVES, C.; LIMA, R.V.B. Dietary supplement use by adolescents. *J Pediatr*, v. 85, n. 4, p. 287-94, 2009.
3. ARAYA, M. et al. Supplementing Copper at the Upper Level of the Adult Dietary Recommended Intake Induces Detectable but Transient Changes in Healthy Adults. *J Nutr*, v. 135, p. 2367-71, 2005.
4. BALKEMA, S. et al. Haemolytic anaemia as a first sign of Wilson's disease. *J Med*, v. 66, n. 8, p. 344-47, 2008.
5. BELBRAOUE, S. et al. Serum Zinc and Copper Status in Hospitalized vs. Healthy Elderly Subjects. *J Am Coll Nutr*, v. 26, n. 6, p. 650-54, 2007.
6. BHATTACHARYA, J. et al. Interaction of hemoglobin and copper nanoparticles: implications in hemoglobinopathy. *Nanomedicine*, v. 2, p. 191-99, 2006.
7. BREWER, G.J. Risks of Copper and Iron Toxicity during Aging in Humans. *Chem. Res Toxicol*, v. 23, p. 319-26, 2010.
8. BREWER, G.J. The risks of copper toxicity contributing to cognitive decline in the aging population and to Alzheimer's disease. *J Am Coll Nutr*, v. 28, n. 3, p. 238-42, 2009.

9. BREWER, G.J. The risks of free copper in the body and the development of useful anticopper drugs. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, v. 11, p. 727-32, 2008.
10. BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R. Fundamentos de Química Clínica. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 1998.
11. CASHMAN, K.D. et al. No effect of copper supplementation on biochemical markers of bone metabolism in healthy young adult females despite apparently improved copper status. *Eur J Clin Nutr*, v. 55, p. 525-31, 2001.
12. DESPAUX, N. et al. Postulated mode of action of metals on purified human ALA-dehydratase. *Biomedicine*, v. 27, p. 358-61, 1977.
13. FAILACE, R. Hemograma. Manual de Interpretação. Porto Alegre, RS: Artmed Editora, 2003.
14. GONÇALVES, T.L. et al. Involvement of oxidative stress in the pre-malignant and malignant states of cervical cancer in women. *Clin Biochem*, v. 38, p. 1071-75, 2005.
15. GYBINA, A.A.; TKAC, I.; PROHASKA, J.R. Copper deficiency alters the neurochemical profile of developing rat brain. *Nutr Neurosci*, v. 12, n. 3, p. 114–22, 2009.
16. HALFDANARSON, T.R. et al. Hematological manifestations of copper deficiency: a retrospective review. *Eur J Haematol*, v. 80, p. 523-31, 2008.
17. HERKLOTZ, R.; RISCH, L.; HUBER, A.R. Conventional and new laboratory parameters in the evaluation of hematologic disease. *Ther Umsch*, v. 61, n. 2, p. 93-102, 2004.
18. HERNANDEZ, A.F. et al. Changes in erythrocyte enzymes in humans long-term exposed to pesticides Influence of several markers of individual susceptibility. *Toxicol Lett*, v. 159, p. 13–21, 2005.
19. HIGUCHI, T. et al. Correction of Copper Deficiency Improves Erythropoietin Unresponsiveness in Hemodialysis Patients with Anemia. *Intern Med*, p. 271-73, 2006.
20. KEDZIERSKA, K. et al. Trace elements modify the activity of sodium transporting systems in erythrocyte membrane in patients with essential hypertension—preliminary study. *Nephrol Dial Transplant*, v. 20, p. 469-71, 2005.
21. KLAASSEN, C.D.; Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons. New York: McGraw-Hill, 2001.
22. MARIANI, E. et al. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, v. 827, p. 65-75, 2005.
23. MELGAARD, B.; CLAUSEN, J.; RASTOGI, S.C. Heavy metal levels and delta-amino-levulinic acid dehydrase levels in peripheral polyneuropathy. *Acta Neurol Scand*, v. 53, n. 4, p. 291-307, 1976.
24. MENÉNDEZ, A.M. et al. Relación entre las cantidades de cobre y zinc administradas a pacientes graves con nutrición parenteral total y los niveles de cobre y zinc en plasma y eritrocitos. *Nutr Hosp*, v. 23, n. 4, p. 373-82, 2008.

25. MEYDANI, M. Antioxidants e cognitive function. *Nutr Rev*, v. 59, n. 8, 75S-80S, 2001.
26. MEZZETTI, A. et al. Copper/zinc ratio and systemic oxidant load: effect of aging and aging-related degenerative diseases. *Free Radic Biol Med*, v. 25, n. 6, p. 676–81, 1998.
27. MILNE, D.B.; JOHNSON, P.E. Assessment of Copper Status: Effect of Age and Gender on Reference Ranges in Healthy Adults. *Clin Chem*, v. 39, n. 5, p. 883-87, 1993.
28. MILNE, D.B.; NIELSEN, F.H. Effects of a diet low in copper on copper-status indicators in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*, v. 63, p. 358-64, 1996.
29. MOREIRA, F.R.; MOREIRA, J.C. A importância da análise de especiação do chumbo em plasma para a avaliação dos riscos à saúde. *Quim Nova*, v. 27, n. 2, p. 251-60, 2004.
30. MORO, A.M. et al. Quantificação laboratorial de cobre sérico por espectrofotometria Vis comparável à espectrometria de absorção atômica com chama. *J Bras Patol Med Lab*, v. 43, n. 4, p. 251-56, 2007.
31. MORRIS, M.C. et al. Dietary Copper and High Saturated and *trans* Fat Intakes Associated With Cognitive Decline. *Arch Neurol*, v. 63, p. 1085-88, 2006.
32. NAGANO, T. et al. Clinical Features of Hematological Disorders Caused by Copper Deficiency during Long-Term Enteral Nutrition. *Intern Med*, v. 44, n. 6, p. 554-59, 2005.
33. PALMER, C.D. et al. Determination of lead, cadmium and mercury in blood for assessment of environmental exposure: A comparison between inductively coupled plasma–mass spectrometry and atomic absorption spectrometry. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc*, v. 61, p. 980–90, 2006.
34. PANIZ, C. Avaliação do estado micronutricional e de estresse oxidativo em idosos. Santa Maria, 2007. Dissertação de mestrado – Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria.
35. RODRIGUES, A.L.; BELLINASSO, M.L.; DICK, T. Effect of some metal ions on blood and liver delta-aminolevulinic acid dehydratase of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Pimelodidae). *Comp Biochem Physiol B*, v. 94, n.1, p. 65-9, 1989.
36. SASSA, S. δ-Aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme*, v. 28, p.133–45, 1982.
37. SERRA, J.A. et al. Systemic Oxidative Stress Associated with the Neurological Diseases of Aging. *Neurochem Res*, v. 34, p.2122–32, 2009.
38. SFAR, S. et al. Zinc, copper and antioxidant enzyme activities in healthy elderly Tunisian subjects. *Exp Gerontol*, v. 44, p. 812–17, 2009.
39. SOUZA, J.B. et al. Delta-aminolevulinic acid dehydratase (δ-ALA-D) activity in diabetes and hypothyroidism. *Clin Biochem*, v. 40, p. 321–25, 2007.
40. SQUITTI, R. et al. Ceruloplasmin fragmentation is implicated in ‘free’ copper deregulation of Alzheimer’s disease. *Prion*, v. 2, n. 1, p. 23-27, 2008.

41. SUKALSKI, K.A.; LABERGE, T.P.; JOHNSON, W.T. In vivo oxidative modification of erythrocyte membrane proteins in copper deficiency. *Free Radic Biol Med*, v. 22, n. 5, p. 835–42, 1997.
42. THOMPSON, J.; JONES, D.D.; BEASLEY, W.H. The effect of metal ions on the activity of  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase. *Br J Ind Med*, v. 34, p. 32-36, 1977.
43. TOMOKUNI, K. The in vitro effect of metal ions on the activity of erythrocyte delta-aminolevulinic acid dehydratase. *Sangyo Igaku*, v. 21, n. 3, p. 240-45, 1979.
44. VALENTINI, J. et al. The influence of the hemodialysis treatment time under oxidative stress biomarkers in chronic renal failure patients. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 62, p. 378-82, 2008.
45. VALENTINI, J. et al. Human erythrocyte  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase activity and oxidative stress in hemodialysis patients. *Clinical Biochemistry*, v. 40, p. 591–94, 2007.
46. VALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M.T.D. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Curr Med Chem*, v. 12, n. 10, p. 1161-208, 2005.
47. WILLIAMS, M.D.D.M. Racial differences of hemoglobin concentration: measurements of iron, copper, and zinc. *Am J Clin Nutr*, v. 34, p. 1694-700, 1981.
48. WORLD POPULATION PROSPECTS: The 2008 Revision Population Database. UN home. Disponível em: <http://esa.un.org/unpp/index.asp?panel=2>. Acesso em: 10 jun. 2010.
49. WU, J.; RICKER, M.; MUENCH, J. Copper Deficiency as Cause of Unexplained Hematologic and Neurologic Deficits in Patient with Prior Gastrointestinal Surgery. *J Am Board Fam Med*, v. 19, p.191– 4, 2006.

## 7. ANEXOS

### Anexo I - Normas para publicação no “Jornal Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial”.



Comunicação > **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**

#### **Instruções aos Autores**

O Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, continuação do Jornal Brasileiro de Patologia, de periodicidade bimestral (fevereiro, abril, junho, agosto, outubro e dezembro), é o órgão oficial da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica; Medicina Laboratorial, da Sociedade Brasileira de Patologia e Sociedade Brasileira de Citopatologia, indexado no Lit. Latino-Americana – LILACS, no Periódica e no Chemical Abstracts e é integrante da base de dados SciELO. Destina-se à publicação de trabalhos científicos que contribuam para o desenvolvimento da área de Medicina Laboratorial e aceita as seguintes categorias: artigos originais, de revisão, relatos de casos, comunicações breves, de atualização, experimentais, cartas aos editores e resenhas. Os trabalhos podem ser submetidos nos idiomas português, inglês ou espanhol.

#### **Análise dos trabalhos**

O manuscrito recebido será enviado para, pelo menos, dois avaliadores independentes, pares científicos, de renome e com conhecimento específico na área contemplada pelo artigo. Após análise dos avaliadores, o Editor Chefe do JBPML entrará em contato com o autor principal comunicando os passos a serem seguidos para a aceitação do trabalho para publicação ou eventual rejeição.

#### **Direitos autorais**

Os autores devem enviar um termo de responsabilidade, assumindo, formalmente, a autoria do trabalho e formalizando a transferência de direitos autorais (Copyright Transfer Statement).

O Sistema de Gestão de Publicações (SGP) do JBPML possui o modelo desse documento e as instruções para preenchê-lo e enviá-lo.

#### **Ética**

Estudos realizados com seres humanos, incluindo órgãos e/ou tecidos isoladamente, bem como prontuários clínicos ou resultados de exames clínicos, deverão estar de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Quando pertinente, o trabalho enviado deverá ser acompanhado de consentimento, por escrito, do paciente e de cópia da aprovação (certificado) do Comitê de Ética da Instituição onde foi realizada a pesquisa, em consonância com a Declaração de Helsinki, 1989.

Nos trabalhos experimentais envolvendo animais, devem ser respeitados os princípios éticos de experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e as normas estabelecidas no Guide for Care and Use of Laboratory Animals (Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council, Washington, D.C., 1996).

As drogas e substâncias químicas eventualmente utilizadas na realização do trabalho devem ser identificadas com precisão.

Não devem ser utilizados nomes ou iniciais do paciente nem informar nomes comerciais, de empresas e/ou registros de hospitais.

### **Resumos e unitermos**

Independentemente do idioma no qual o trabalho foi escrito, devem constar dois resumos: um em português (Resumo) e outro em inglês (Abstract). Os resumos devem identificar os objetivos, os procedimentos e as conclusões do trabalho (máximo de 250 palavras para Artigos originais, Artigos de revisão e Artigos de atualização; e máximo de 100 palavras para Relatos de caso e Comunicações breves). Caso o trabalho tenha sido escrito em espanhol, deverá haver um resumo também neste idioma.

Os unitermos, palavras que representam o assunto tratado no trabalho, devem ser em número de três a seis, utilizando o vocabulário controlado Decs – Descritores em Ciências da Saúde (Bireme), acrescidos de outros termos, quando necessário. Devem ser apresentados em português e inglês. Caso o trabalho tenha sido escrito em espanhol, deverá haver descritores também neste idioma.

### **Agradecimentos**

Devem ser breves, diretos e dirigidos apenas à pessoa ou à instituição que contribuiu substancialmente para a elaboração do trabalho. Devem ser incluídas após as conclusões do trabalho e antes das referências bibliográficas.

### **Estrutura do texto**

#### **Artigos originais**

São contribuições destinadas a divulgar resultados de pesquisa original, inédita, que possam ser replicados ou generalizados. Os artigos podem conter até 4 mil palavras. A sua estrutura formal deve seguir o esquema de apresentação do texto para esse tipo de artigo:

Introdução, Objetivos, Material e Método, Resultados, Discussão. Conclusões e Referências Bibliográficas.

O uso de subtítulos é recomendado, particularmente, na Discussão do artigo. Implicações clínicas e limitações do estudo devem ser claramente apontadas. Sugere-se o detalhamento do tópico Material e Método. Para esses artigos, exige-se a apresentação de um resumo estruturado em português e inglês, com cabeçalhos obedecendo à apresentação formal do artigo: Introdução (Background), Objetivos (Objectives), Material e método (Material and method), Resultados (Results), Discussão (Discussion), Conclusões (Conclusions) e Bibliografia (Bibliography). O Abstract (resumo em inglês) deve ser precedido pelo título em inglês. As referências bibliográficas devem aparecer no final do texto, obedecendo às normas especificadas abaixo.

#### **Comunicações breves**

São relatos curtos que devem apresentar: 1) dados de estudos preliminares com achados sugestivos que garantam uma investigação mais definitiva; 2) estudos de replicação; e 3) estudos negativos de tópicos importantes. Esses artigos devem ter até 1.500 palavras, incluir resumo não-estruturado e, no máximo, uma tabela ou figura, além das referências bibliográficas.

### **Artigos de revisão**

Artigos de revisão serão aceitos apenas mediante convite.

Avaliação crítica sistematizada da literatura sobre determinado assunto, devendo conter conclusões. Devem conter até 5 mil palavras. A organização do texto do artigo, com exceção de Introdução, Discussão e Conclusão, fica a critério do autor. Para esses artigos, exige-se um resumo estruturado no idioma do texto e outro em inglês. Uma lista extensa de referências bibliográficas deve aparecer no final do texto.

### **Artigos de atualização**

São trabalhos descritivos e interpretativos baseados na literatura recente sobre a situação global em que se encontra determinado assunto. Devem conter até 3 mil palavras. A estrutura do texto fica a critério do autor, mas deve conter um resumo não-estruturado no idioma do texto e outro em inglês e referências bibliográficas.

### **Relatos de casos**

São trabalhos de observações clínico-laboratoriais originais, acompanhados de análise e discussão. Devem conter até 1.500 palavras. A estrutura deve apresentar, no mínimo, os seguintes tópicos: Introdução, Relato(s) dos caso(s), Discussão. Incluir um resumo não-estruturado no idioma do texto e em inglês.

### **Cartas aos Editores**

Inclui cartas que visam a discutir artigos recentes publicados na revista ou a relatar pesquisas originais ou achados científicos significativos. Cartas breves com, no máximo, 500 palavras (incluindo referências, sem tabelas ou figuras), serão consideradas se estiver explícita a frase para publicação.

### **Resenhas**

Devem ser breves, preparadas por especialistas da área, constituindo-se de um resumo comentado, com opiniões que possam nortear os leitores interessados no assunto. Antes do texto, incluir a referência bibliográfica completa da obra resenhada e, no final, identificação, titulação acadêmica e filiação institucional do autor da resenha.

### **Referências**

As referências bibliográficas devem aparecer no final do artigo, em ordem alfabética numerada. Devem seguir as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas – NBR-6023 (agosto 2000). Os títulos dos periódicos deverão ser referidos na forma abreviada de acordo com o Index Medicus (List of Journals Indexed in Index Medicus). Se a lista de referências não seguir a norma adotada, os trabalhos serão imediatamente rejeitados, sem revisão de conteúdo.

Os autores devem certificar-se de que as referências citadas no texto constam da lista de referências com datas exatas e nomes de autores corretamente grafados. A exatidão das referências bibliográficas é de responsabilidade dos autores. Comunicações pessoais, trabalhos inéditos ou em andamento poderão ser citados, quando absolutamente necessários, mas não devem ser incluídos na lista de referências bibliográficas; apenas mencionados no texto ou em nota de rodapé. A lista de referências deve seguir o estilo dos exemplos abaixo.

### **Exemplos:**

- Artigos de periódicos (um só autor):  
COTRIM, F.L.S. Coleta de sangue para dosagem de triglicerídeos. J Bras Patol, v. 33, n. 4, p. 201-02, 1997.
- Artigos de periódicos (mais de três autores):  
ABREU, E.S. et al. Doença de Hodgkin infanto-juvenil no estado do Ceará e sua relação com



o vírus Epstein-Barr: parâmetros clínicos e análise morfológica imuno-histoquímica e por hibridização in situ. J Bras Patol, v. 33, n. 4, p. 178-84, 1998.

- Artigo de periódico on-line:

YAZLE, J.S.R. et al. Assistência hospitalar como indicador da desigualdade social. Rev Saúde Publ, São Paulo, v. 31, n. 5, 1997. Disponível em: <http://www.fsp.usp.br/rsp>. Acesso em: 23 mar. 1998.

- Livros no todo (dois autores):

RINGSVEN, M.K.; BOND, D. Gerontology and leadership skills for nurses. Albany, N.Y.: Delmar Publishers, 1996.

- Capítulos ou parte de livro editado por outro autor:

– Parte de livro em meio eletrônico:

SÃO PAULO (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. Tratados e organizações ambientais em matéria de meio ambiente. In: \_\_\_\_\_. Entendendo o meio ambiente. São Paulo, 1999. v. 1. Disponível em: <http://www.bdt.org/sma/entendendo/atual/htm>. Acesso em: 8 mar.1999.

– Evento em meio eletrônico:

SILVA, R. N.; OLIVEIRA, R. Os limites pedagógicos do paradigma da qualidade total da educação. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPE, 4., 1996, Recife. Anais eletrônicos... Recife: UFPE, 1996. Disponível em: <http://www.propesq.ufpe.br/anais/educ/ce04.htm>. Acesso em: 21 jan.1997.

- Tese ou dissertação:

Oliveira, C.M. Isolamento e caracterização de estreptococos de placa dental. Rio de Janeiro, 1974. Tese (doutoramento) – Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

- Citações no texto: devem ser identificadas por algarismos arábicos (números-índice).

Podem também ser acrescentados o nome do autor e o ano. As referências com mais de um autor devem conter o sobrenome do autor seguido da expressão et al., como, por exemplo, Higashi et al.

### **Tabelas e figuras**

As tabelas deverão ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e encabeçadas por seu título, recomendando-se a não-repetição dos mesmos dados em gráficos. Na montagem das tabelas, seguir as Normas de apresentação tabular estabelecidas pelo Conselho Nacional de Estatística e publicadas pelo IBGE (1993).

As ilustrações (gráficos, fotografias, desenhos etc) deverão ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e citadas como figuras.

Devem ser suficientemente claras para permitir sua produção. Os gráficos deverão vir preparados em programa processador de gráficos. Deverão ser indicados os locais aproximados no texto onde as ilustrações serão intercaladas como figuras.

O SGP aceita a importação de tabelas, imagens e gráficos em arquivo eletrônico nos seguintes formatos: jpg, gif, psd, tif e png.

### **Abreviações e nomes de medicamentos**

As abreviações devem ser indicadas no texto no momento de sua primeira utilização.

Empregar o nome genérico de medicamentos e indicar a fonte de componentes não-disponíveis para prescrição.

As unidades de medida, inclusive suas abreviaturas, devem ser expressas no sistema métrico decimal e, quando o autor assim o desejar, também no System International (SI) entre parênteses.

Contato com a secretaria do JBPMML  
Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial  
Tel. (21) 3077-1400  
E-mail: [jbpml@sbpc.org.br](mailto:jbpml@sbpc.org.br)