

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE  
PORTO ALEGRE – UFCSPA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA  
SAÚDE

Jéssica Ferrari

**Influência do citrato de sódio na  
deposição de chumbo em tecidos de  
ratos expostos**

**UFCSPA**

Universidade Federal de Ciências da Saúde  
de Porto Alegre

Porto Alegre

2020

**Jéssica Ferrari**

# **Influência do citrato de sódio na deposição de chumbo em tecidos de ratos expostos**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Dra. Eliane Dallegrove

Coorientadoras:

Emilene Mendes Becker

Denise Bohrer do Nascimento

**Porto Alegre**

**2020**

#### Catálogo na Publicação

Ferrari, Jéssica

Influência do citrato de sódio na deposição de chumbo em tecidos de ratos expostos. / Jéssica Ferrari. -- 2020. 70 p. : 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2020.

Orientador(a): Profa. Dra. Eliane Dallegrave ;  
coorientador(a): Profa. Dra. Denise Bohrer do Nascimento, Profa. Dra. Emilene Mendes Becker.

1. Chumbo. 2. Citrato de sódio. 3. Hemoterapia. 4. Hemocomponentes. 5. Plastificantes. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, Profa. Eliane Dallegrave, por todos os ensinamentos e por toda a orientação, confiança, dedicação e apoio durante o tempo do meu trabalho de mestrado. Muito obrigada por acreditar que eu seria capaz de chegar até aqui e por me guiar.

Às minhas coorientadoras Profa. Denise Bohrer do Nascimento e Profa. Emilene Mendes Becker por todo apoio na execução do trabalho, na realização da parte química e também pelos aprendizados, dedicação e paciência.

A CAPES e ao CNPQ pelo apoio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde por todo apoio e conhecimentos transmitidos nestes dois anos.

Aos colegas dos laboratórios: Laboratório de Pesquisa em Toxicologia (LaPeTox) da UFCSPA; Laboratório de Espectrometria Atômica, Laboratório de Investigações em Bioanalítica e Contaminantes (LIBC) e Laboratório de Toxicologia (LATOX) da UFRGS por toda a ajuda na execução do trabalho e também pelos conhecimentos transmitidos.

A todos meus amigos por todo apoio e por sempre estarem ao meu lado.

Aos meus pais, Luiz Carlos e Odete, e ao meu irmão, Fernando, a quem eu devo tudo o que eu sou, por sempre apoiarem meus sonhos e nunca deixarem nada me faltar. Agradeço por todos os ensinamentos, pelo amor incondicional, apoio e compreensão sempre que não pude estar presente.

## RESUMO

A hemoterapia é uma tecnologia de extrema relevância na terapêutica atual, entretanto, este processo envolve risco sanitário. Para garantir a eficácia e segurança transfusional é importante considerar a qualidade dos insumos utilizados no processo, dentre estes, as bolsas com possíveis contaminantes químicos como plastificantes e metais, que podem ser lixiviados para o conteúdo ao longo do prazo de validade. As bolsas utilizadas no Brasil para coleta, armazenamento e transferência de hemocomponentes ou células progenitoras de medula óssea são confeccionadas com policloreto de vinila (PVC) plastificado com o di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) ou etileno vinil acético (EVA) e são regulamentadas pela ANVISA. Na produção, também são adicionados estabilizantes a base de chumbo, proporcionando maior estabilidade aos polímeros. Os metais podem causar efeitos adversos à saúde, incluindo alterações sobre o sistema reprodutor, imunológico, nervoso e hematopoiético, entre outros. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do citrato de sódio na biodisponibilidade e deposição de chumbo em diferentes tecidos de ratos inoculados com solução contendo chumbo, uma vez que este anticoagulante se complexa ao mesmo. Para tanto, foram utilizados 20 ratos Wistar alocados em 4 grupos, que receberam por via intraperitoneal, 1 mL/kg de solução fisiológica (controle), 2,2 mg/kg de citrato de sódio, 3,0 mg/kg de acetato de chumbo ou acetato de chumbo + citrato de sódio. Foram observados sinais clínicos indicativos de toxicidade, letalidade até 48 horas após, quando foi realizada a eutanásia e coleta de amostras para avaliação da concentração de chumbo no sangue, urina e órgãos (cérebro, fígado e rins) por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite. Além disso, parâmetros bioquímicos e análise de micronúcleos também foram realizados. Os resultados indicam que o citrato induz aumento significativo da excreção urinária e, embora não atinja significância estatística, essa redução parece estar relacionada a menores concentrações sanguíneas e deposição hepática; no entanto, o citrato foi capaz de aumentar a concentração cerebral de chumbo, mesmo em concentrações em que não houve alterações bioquímicas de função renal e hepática nem nos marcadores de exposição ao chumbo. Estes resultados reforçam a necessidade de monitorar as concentrações de chumbo presentes nas bolsas utilizadas em hemoterapia, o tipo

de anticoagulante, bem como a possibilidade de doadores terem níveis elevados deste metal, permitindo assim, avaliar melhor o risco ao qual pacientes transfundidos poderão estar expostos e propor melhorias no controle de qualidade da hemoterapia no Brasil.

**Palavras-chave:** hemocomponentes, chumbo, plastificante, citrato, hemoterapia.

## **ABSTRACT**

Hemotherapy is a technology of extreme relevance in current therapy, however, this process involves health risk. To ensure transfusion efficacy and safety, it is important to consider the quality of the supplies used in the process, including bags with possible chemical contaminants such as plasticizers and metals, which can be leached into the content over the expiration date. The bags used in Brazil for the collection, storage and transfer of blood components or bone marrow progenitors are made with polyvinyl chloride (PVC) plasticized with di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) or ethylene vinyl acetate (EVA) and are regulated by ANVISA. In addition, lead-based stabilizers are added to bags, providing greater stability to polymers. Metals can cause adverse health effects, including changes on the reproductive, immune, nervous and hematopoietic systems, among others.

The aim of this study was to evaluate the influence of sodium citrate on bioavailability and lead deposition in several tissues of rats exposed to lead, since this anticoagulant form complex with them. For this purpose, 20 Wistar rats were used, allocated in 4 groups, which received intraperitoneally, 1mL/kg of saline solution (control), 2.2 mg/kg of sodium citrate, 3.0 mg/kg of lead acetate or citrate sodium + lead acetate. Clinical signs indicative of toxicity and lethality were observed up to 48 hours after, when euthanasia was performed and samples were collected to assess the concentration of lead in the blood, urine and organs (brain, liver and kidneys) by atomic absorption spectrometry with a graphite furnace. In addition, biochemical parameters and micro-nucleus analysis were also performed. The results indicate that citrate induces an increase in urinary excretion and, although it does not reach statistical significance, this increase seems to be related to lower blood concentrations and hepatic deposition; however, citrate was able to increase brain lead concentration even at concentrations that did not cause biochemical changes in kidney and liver function or lead exposure markers.

These findings reinforce the need to monitor the concentrations of lead present in the bags used in hemotherapy, the type of anticoagulant, as well as the possibility of donors having high levels of this metal, thus allowing a better assessment of the risk to which transfused patients may be exposed and propose improvements in hemotherapy quality control in Brazil.

**Keywords:** blood components, lead, plasticizer, citrate, hemotherapy.

## **LISTA DE FIGURAS**

**Figura 1:** Fracionamento do sangue.

**Figura 2:** Sangue total após a centrifugação.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ACD - Citrato ácido dextrose

ALA-D – Ácido delta-aminolevulínico desidratase

ALA-U – Ácido delta-aminolevulínico

ALT – Alanina aminotransferase

AST – Aspartato aminotransferase

ATP – Adenina Trifosfato

CPD e CP2D - Citrato fosfato dextrose

CPDA-1 - Citrato fosfato dextrose adenina

DECHT – Doença enxerto contra hospedeiro transfusional

DEHP - Di (2-etilhexil) ftalato

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EPO – Eritropoetina

EVA - Etileno vinil acético

HCl – Ácido Clorídrico

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

Pb – Chumbo

PbS – Concentração de Chumbo no sangue

PC – Policarbonato

PE - Polietileno

PMMA – Polimetilmetacrilato

PS – Poliestireno

PU - Poliuretano

PVC - Policloreto de vinila

RNA – Ácido Ribonucleico

SR – Borracha silicone

TOTM – Triociltrimelitato

## SUMÁRIO

<b>1 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>11</b>
1.1 História da Hemoterapia .....	11
1.2 Processamento e Armazenamento do Sangue .....	13
1.3 Bolsas de coleta e armazenamento.....	17
1.4 Citrato de Sódio .....	21
1.5 Chumbo .....	22
1.6 Interação Chumbo - Citrato.....	26
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>28</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
3.1 Objetivo Geral.....	30
3.2 Objetivos Específicos.....	30
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>31</b>
<b>5. ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>	<b>37</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>57</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>58</b>
8.1 Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais. ....	58
8.2 Anexo 2: Normas da Revista .....	62

## **1 REFERENCIAL TEÓRICO**

A hemoterapia é o emprego terapêutico do sangue, que pode ser transfundido com seus hemocomponentes e hemoderivados. A transfusão de sangue e de seus hemocomponentes e hemoderivados é uma tecnologia muito relevante na terapêutica moderna, contribuindo em intervenções médicas e cirúrgicas de rotina, na emergência, bem como em procedimentos complexos, melhorando drasticamente a expectativa e a qualidade de vida dos pacientes e permitindo intervenções médicas cada vez mais complexas (WHO, 2010).

O acesso a sangue seguro pode ajudar a prevenir até um quarto das mortes maternas a cada ano, e a transfusão de sangue foi identificada como uma das oito funções que salvam vidas, devendo estar disponíveis em emergências e nos sistemas de saúde, sendo um dos fatores determinantes da sobrevivência de vários pacientes (TAPKO et al, 2009; WHO, 2010).

### **1.1 História da Hemoterapia**

O sangue sempre teve importância destacada na história da medicina e o seu uso, com finalidade terapêutica, foi empregado pelo homem há muitos séculos (BRASIL, 2013).

A transfusão sanguínea é classicamente dividida em três períodos: pré-histórico, pré-científico e científico. O período pré-histórico teve início do século XVII, após a descoberta da circulação sanguínea por William Harvey, possibilitando o uso de injeções intravenosas de sangue animal na veia dos pacientes (BRASIL, 2013; FUNDAÇÃO HEMOMINAS, 2014), sendo esta prática proibida na Europa durante longo tempo em decorrência das inúmeras mortes ocasionadas (BRASIL, 2013). O período pré-científico, compreendido entre 1616 até o início do século XX, caracterizou-se pela descoberta do grupo sanguíneo ABO em 1900 por Karl Landsteiner, explicando certas reações graves ou fatais decorrentes de transfusões (FUNDAÇÃO HEMOMINAS, 2014; JUNQUEIRA, 2005). Em 1940, Landsteiner e Wiener anunciaram a descoberta do fator Rh, complementando o entendimento sobre a compatibilidade sanguínea, viabilizando a introdução dos testes de compatibilidade (BRASIL, 2013), sendo este considerado o período científico, que se estende até os dias atuais (FUNDAÇÃO HEMOMINAS, 2014).

Na fase científica da hemoterapia, postulou-se que somente o sangue de humanos poderia ser utilizado em humanos e que a transfusão de sangue fresco serviria para corrigir a tendência de sangramento em pacientes hemofílicos. Outras descobertas aconteceram nesse século como o desenvolvimento de tubos específicos e o uso do citrato de sódio como anticoagulante, o que veio permitir a estocagem do sangue (BRASIL, 2013).

Os serviços de transfusão surgiram no Brasil na década de 1930, mas a hemoterapia como especialidade médica concretizou-se na década de 1940, com a criação do Banco de Sangue do Hospital Fernandes Figueira no Rio de Janeiro (1941), do Banco de Sangue da Santa Casa de Porto Alegre e do Banco de Sangue do Pronto Socorro de Recife, ambos em 1942 (BRASIL, 2013).

A hemoterapia no Brasil nas últimas décadas obteve importantes avanços na busca de um sistema hemoterápico que oferecesse para a população em geral um produto com segurança e qualidade. Isso foi possível graças à reestruturação dos serviços, a legitimação da doação de sangue como ato voluntário, altruísta e não remunerado, além dos avanços tecnológicos, legislações, normatizações técnicas, capacitações e modernização da gestão (BRASIL, 2015a; WHO, 2010).

A Hemorrede Pública Brasileira assumiu a missão de garantir o fornecimento de sangue para a população de forma segura e sustentável, uma vez que, os pacientes que necessitam de transfusão como parte de seu tratamento clínico têm o direito de esperar que haja sangue suficiente disponível para atender às suas necessidades e receber o sangue mais seguro possível. No entanto, muitos pacientes ainda morrem ou sofrem desnecessariamente porque não têm acesso a transfusões de sangue seguras. A disponibilidade oportuna de sangue e produtos sanguíneos seguros é essencial em todas as unidades de saúde em que a transfusão é realizada, mas em muitos países em desenvolvimento há um déficit generalizado (BRASIL, 2015b; WHO, 2010).

Com o surgimento da Aids, na década de 1980, a situação da hemoterapia no Brasil foi consideravelmente afetada. O grande número de casos de contaminação pelo vírus de imunodeficiência humana (HIV) devido a transfusões repercutiu na sociedade, e a concreta possibilidade de transmissão deste vírus de uma pessoa para outra por meio da transfusão de sangue obrigou dirigentes a incrementar as políticas do sangue, levando à busca da qualidade dos serviços de hemoterapia, monitorando desde o candidato à doação até a qualidade do

hemocomponente produzido. Somente, então, foi incluído o artigo 199 da Constituição Federal, promulgada em 1988, proibindo toda e qualquer forma de comercialização do sangue ou de seus derivados (BRASIL, 2015b; REDSANG – SIBRANTEC, 2011).

## **1.2 Processamento e Armazenamento do Sangue**

O processamento do sangue trata-se de um conjunto de procedimentos físicos ou mecânicos utilizados na obtenção de hemocomponentes e hemoderivados a partir de unidades de sangue total. O sangue e seus componentes liberados para utilização são armazenados adequadamente de acordo com a sua classificação e seu prazo de validade (BRASIL, 2015b; BRASIL, 2014a).

O processo de coleta do sangue mais comum se dá por meio da coleta do sangue total. O sangue total é coletado em uma bolsa descartável, estéril e múltipla - a tripla é a mais comumente utilizada e é constituída de uma bolsa primária de 450 mL e duas bolsas secundárias que são utilizadas após o processamento e fracionamento da bolsa primária para armazenar os hemocomponentes - em um volume entre 405 e 495 mL. Também são coletadas nesse momento, amostras de sangue que se destinarão aos exames imuno-hematológicos e sorológicos. Concluída a coleta, as bolsas de sangue serão encaminhadas para o processamento (BRASIL, 2005; BRASIL, 2014b).

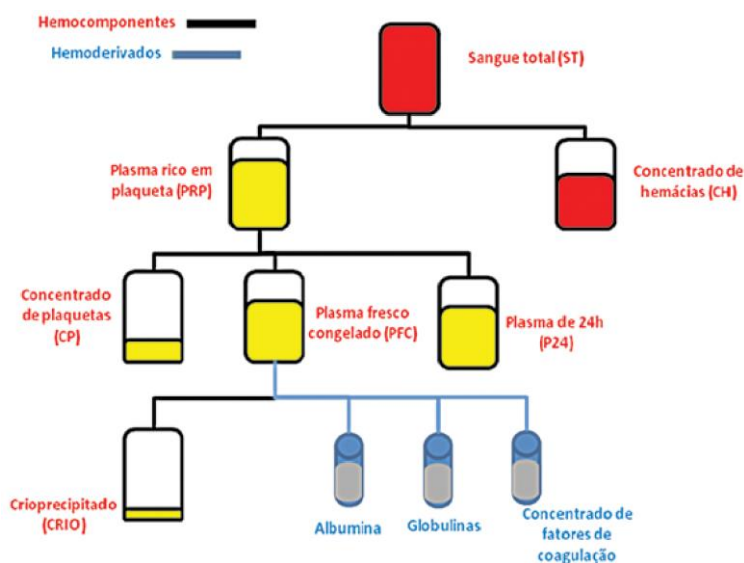
A hemoterapia moderna se desenvolveu baseada no preceito de transfundir-se somente o componente que o paciente necessita, baseado em avaliação clínica e/ou laboratorial, não havendo indicações de sangue total. A maioria das padronizações de indicação de hemocomponentes está baseada em evidências determinadas através de análise de grupos de pacientes, nunca devendo ser empíricas ou baseadas somente na experiência do profissional médico envolvido. As indicações básicas para transfusões são restaurar ou manter a capacidade de transporte de oxigênio, o volume sanguíneo e a hemostasia (HOFFMAN, 2012; BRASIL, 2015b).

Os hemocomponentes e hemoderivados se originam da doação de sangue por um doador. No Brasil, este processo está regulamentado pela Lei nº 10.205, de 21 de março de 2001, e por regulamentos técnicos editados pelo Ministério da Saúde. Toda doação de sangue deve ser altruísta, voluntária e não gratificada direta ou indiretamente, assim como o anonimato do doador deve ser garantido.

Para obtenção dos hemocomponentes sanguíneos o sangue total passa por processos físicos (centrifugação, congelamento). Já os hemoderivados são obtidos em escala industrial, a partir do fracionamento do plasma por processos físico-químicos. No Brasil, as bolsas de sangue total coletadas devem ser 100% processadas de acordo com a legislação vigente (BRASIL, 2015b; REDSANG – SIBRANTEC, 2011).

Os hemocomponentes devem ser obtidos por centrifugação refrigerada do sangue total ou por coleta seletiva de hemocomponentes em máquina de aférese, com processos validados e equipamentos qualificados, de acordo com os critérios técnicos definidos pelo Ministério da Saúde e pelas boas práticas aplicadas ao ciclo produtivo do sangue (BRASIL, 2014a). O processamento feito por meio da centrifugação refrigerada, minimiza a contaminação e proliferação microbiana, nos quais se separa o sangue total em hemocomponentes (Figura 1) eritrocitários, plasmáticos e plaquetários. (BRASIL, 2015b; REDSANG – SIBRANTEC, 2011).

**Figura 1: Fracionamento do sangue.**

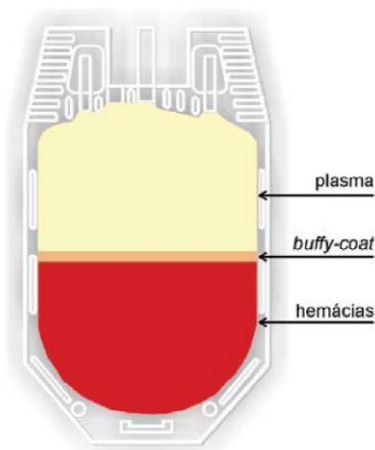


Fonte: BRASIL, 2015b.

A separação do sangue total é possível em função das diferentes densidades e tamanhos das células sanguíneas, possibilitando a separação em camadas (Figura 2), sendo que as hemácias ficam depositadas no fundo da bolsa. Acima delas forma-se o *buffy coat* (camada leucoplaquetária), ou seja, uma camada de

leucócitos e plaquetas. Acima do *buffy coat* fica a camada de plasma que contém plaquetas dispersas (BRASIL, 2015b; REDSANG – SIBRANTEC, 2011).

**Figura 2: Sangue total após a centrifugação.**



Fonte: BRASIL, 2015b.

Os hemocomponentes podem também ser modificados para atender as necessidades especiais de alguns pacientes. Os concentrados de hemácias e de plaquetas podem ter seus leucócitos reduzidos (leucorredução/filtração) para atendimento de pacientes que apresentam reações transfusionais febris não hemolíticas, de pacientes com o sistema imunológico deprimido e atendimento de pacientes candidatos a múltiplas transfusões para evitar que sejam sensibilizados aos antígenos leucocitários humanos e suas transfusões se tornem ineficazes. Podem, ainda, ser irradiados para inativar os linfócitos presentes e assim, evitar que o hemocomponente rejeite o hospedeiro (receptor da transfusão), configurando a reação do enxerto contra hospedeiro pós-transfusional (DECHT). Outra modificação que pode ser realizada no concentrado de hemácias é a lavagem com solução fisiológica para retirar as proteínas do plasma com o objetivo de evitar reações alérgicas nos pacientes (BRASIL, 2015b; REDSANG – SIBRANTEC, 2011).

As bolsas utilizadas na coleta e armazenamento do sangue são estéreis e de diversas configurações, porém todas contêm uma solução anticoagulante preservadora que visa a melhor preservação dos hemocomponente, e, em alguns casos, soluções aditivas que ficarão em contato com as hemácias após a separação do sangue (BRASIL, 2015b).

As soluções anticoagulantes presentes nas bolsas-satélite conservam os produtos sanguíneos impedindo a formação de coágulos, mantendo a viabilidade das células sanguíneas durante o processamento e armazenamento e prevenindo alterações físicas prejudiciais e a proliferação bacteriana. No caso das soluções aditivas, elas são compostas por substâncias que contribuem para aumentar a sobrevivência das hemácias possibilitando que elas sejam utilizadas por um tempo maior (BRASIL, 2015b).

De modo geral, os diversos tipos de bolsas possuem entre 60 mL e 65 mL de anticoagulante e, dessa forma, é possível coletar um volume de aproximadamente 450 mL de sangue total. No caso das soluções aditivas, elas podem estar presentes em diferentes posições dependendo da configuração das bolsas, sendo seu volume de aproximadamente 100 mL (BRASIL, 2013 e 2015b).

Os anticoagulantes mais frequentemente utilizados são o citrato fosfato dextrose adenina (CPDA-1), o citrato ácido dextrose (ACD), o citrato fosfato dextrose (CPD e CP2D), o citrato de sódio e a heparina. Os três primeiros contêm fatores nutricionais para hemácias, portanto, são os utilizados quando se pretende estocar o sangue. O sangue total coletado em solução CPDA-1 (ácido cítrico, citrato de sódio, fosfato de sódio, dextrose e adenina) tem validade de 35 dias a partir da coleta e de 21 dias quando coletado em ACD (ácido cítrico, citrato de sódio, dextrose), CPD (ácido cítrico, citrato de sódio, fosfato de sódio, dextrose) e CP2D (citrato, fosfato e dextrose-dextrose) (BRASIL, 2015b).

O citrato de sódio utilizado é um anticoagulante que age sequestrando o cálcio presente e impedindo a coagulação sanguínea, bem como promovendo a estabilização da membrana eritrocitária, auxiliando na manutenção do pH intracelular do hemocomponente. O fosfato é o substrato para a produção do 2,3 difosfoglicerato no interior dos eritrócitos, que é um componente orgânico responsável pela captura e liberação de O<sub>2</sub> pela hemoglobina aos tecidos (HOGMAN et al, 1985; TOMCZAK, 2008).

A dextrose é adicionada à solução como fonte de energia, uma vez que é um carboidrato, sendo consumida lentamente pela célula quando ela é submetida a condições de baixas temperaturas ( $4 \pm 2$  °C), contribuindo com a manutenção de níveis adequados de adenosina trifosfato (ATP). A adenina promove um aumento do adenilato, importante para a síntese de ATP ao aumentar as reservas desses

nucleotídeos no interior das células estocadas, reduzindo a fragilidade osmótica e garantindo maior sobrevivência das hemácias armazenadas (HESS et al., 2002).

O tipo de solução anticoagulante utilizada na bolsa irá influenciar na validade do hemocomponente. No caso dos concentrados de hemácias, a validade é de 35 dias quando o anticoagulante é o CPDA1 e 42 dias quando houver uma associação de CPD + solução aditiva. No caso dos concentrados de plaquetas, a validade é de 3 a 5 dias, dependendo do plastificante da bolsa (BRASIL, 2013; BRASIL, 2014a).

### **1.3 Bolsas de coleta e armazenamento**

As técnicas de processamento atuais permitem o armazenamento de diferentes hemocomponentes e derivados em condições adequadas para preservação de suas características terapêuticas, possibilitando que o receptor receba, em menor volume, somente hemocomponentes ou derivados dos quais necessita, o que minimiza os riscos inerentes à terapêutica transfusional. Dessa forma, a partir de uma única doação, vários pacientes podem ser beneficiados de forma segura. (BRASIL, 2015b; REDSANG – SIBRANTEC, 2011). Para isso, utilizam-se bolsas de sangue para coletar, fracionar, transferir e armazenar o sangue e os hemocomponentes de forma eficiente e segura, para uma posterior transfusão sanguínea.

Conforme descrição da norma brasileira NBR ISO 3821/2013, o produto bolsa de sangue consiste em bolsas plásticas estanques e estéreis, completas com tubo de coleta, tubos de saída e agulha de coleta, armazenamento, processamento, transporte, separação e administração de sangue e seus componentes (ABNT, 2013).

As bolsas apresentam como finalidade: manter a qualidade do sangue e seus componentes; permitir coleta, identificação, armazenamento, fracionamento e transfusão de sangue eficiente e segura; possibilitar compatibilidade funcional com os equipamentos para transfusão de sangue; fornecer resistência à ruptura e deterioração;

O principal material utilizado para a composição das bolsas de sangue é o PVC (policloreto de vinila), um polímero que, com certas exigências quanto à composição (Farmacopeia Europeia), tem suprido as necessidades de conservação e processamento do sangue e seus componentes e que possui as características necessárias para melhor fracionamento e armazenamento dos hemocomponentes (VERCEZE et al., 2006).

As bolsas de sangue devem ser translúcidas para permitir uma melhor visualização do volume no seu interior e facilitar a identificação das linhas de separação no momento de fracionar os hemocomponentes. Devem também, ser flexíveis para que possam ser colocadas de forma adequada nas centrífugas e permeáveis aos gases (o fluxo de oxigênio para dentro da bolsa permite a sobrevivência das plaquetas, e a saída de gás carbônico mantém o pH dentro dos valores aceitáveis) (BORDIN, 2007).

A Resolução RDC nº 35, de 12 de junho de 2014 estabelece os requisitos gerais e específicos e os ensaios para bolsas plásticas para coleta, armazenamento e transferência de sangue humano e seus componentes, fixando as condições exigíveis, inclusive aquelas pertinentes ao desempenho do plástico policloreto de vinila (PVC) plastificado com o di(2-etilhexil)ftalato (DEHP), trietiltrimelitato (TOTM) ou outros que venham a ser aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa (BRASIL, 2014b).

Apesar da evolução das técnicas de preservação dos hemocomponentes, a contaminação destes produtos é ainda, uma realidade, assim como a referida em relação a outros produtos farmacêuticos. Esta, pode ser resultante de componentes de materiais poliméricos que constituem as embalagens utilizadas nos produtos destinados à saúde, podendo migrar para dentro da formulação, contaminando o produto.

As propriedades requeridas para os biomateriais poliméricos utilizados em aplicações biomédicas são semelhantes a outros biomateriais, isto é, a biocompatibilidade, a capacidade de ser esterilizado por diversos métodos, adequadas propriedades mecânicas e físicas, e diversos mecanismos de processamento para fabricação (PARK, 2003).

Os materiais poliméricos são geralmente leves, isolantes elétricos e térmicos, flexíveis e apresentam boa resistência à corrosão e baixa resistência ao calor (RODRIGUES, 2013). Alguns dos polímeros mais utilizados em aplicações biomédicas são: polietileno (PE), poliuretano (PU), polimetilmetacrilato (PMMA), policloreto de vinila (PVC), policarbonato (PC), poliestireno (PS) e a borracha silicone (SR) (CALLISTER, 2012; RODRIGUES, 2013).

O policloreto de vinila (PVC) foi descoberto em 1872 pelo cientista Eugen Baumann, e o avanço no processamento bem como da estabilidade térmica do PVC veio em 1932, quando Semon descobriu os plastificantes (COAKER, 2000; ENDO,

2002). O PVC é um polímero com ampla utilização no mundo inteiro e devido a suas propriedades e características particulares é o principal material utilizado para a composição das bolsas de sangue, soluções de infusão e nutrição parenteral (OLIVEIRA, 2012). Possui certas exigências quanto à composição (Farmacopeia Europeia), mas tem suprido as necessidades de conservação e processamento do sangue e seus componentes (BRASIL, 1998).

O policloreto de vinila - PVC é considerado um dos polímeros mais versáteis e devido à essa versatilidade, algumas características únicas de desempenho, custo relativamente baixo e o comportamento de processamento em certos tipos de equipamento de conformação, o PVC tornou-se o polímero de escolha em diversas aplicações (MULDER, 2001). Quando feita a escolha e a dosagem adequada de PVC e de aditivos, que alteram suas características dentro de um amplo espectro de propriedades, variando do rígido ao extremamente flexível, pode-se obter um polímero adequado às necessidades e características para aplicações específicas. Desta forma, sua utilização vai de tubos e perfis rígidos para uso na Construção Civil até brinquedos e polímeros flexíveis (para o acondicionamento de alimentos, sangue, soro e plasma) (OLIVEIRA, 2012).

Há mais de 50 anos o PVC contribui significativamente para a evolução da medicina, uma vez que, sua boa relação custo-benefício possibilita o seu uso para as mais variadas finalidades. Através da descoberta de estabilizadores adequados e outros aditivos utilizados para alterar as propriedades dos compostos que ocorreu o sucesso comercial do PVC. São milhões de produtos à base de PVC utilizados anualmente, entre bolsas de sangue e de soro, cateteres cardiovasculares, tubos para transfusão de hemodiálise e circulação sanguínea extracorpórea, tubos endotraqueais e inúmeros outros dispositivos (ZARZAR; HOLANDA, 2011).

O PVC é sintetizado a partir do cloro (56,8%), do carbono (38,4%) e hidrogênio (4,8%). A presença do átomo de cloro em sua estrutura molecular torna o PVC um polímero naturalmente resistente à propagação de chamas (RODOLFO Jr., 2006). Ao mesmo tempo, estudos demonstram que são as estruturas químicas irregulares, como o cloro alílico ou o cloro ligado a carbonos terciários as principais responsáveis pela degradação térmica do PVC (VINHAS et al, 2005).

A fim de melhorar as propriedades físicas dos polímeros, especialmente as mecânicas e térmicas, são adicionados aditivos, que atuam como estabilizadores, plastificantes, pigmentos, lubrificantes, entre outros. Para prevenir a degradação

provocada pelo calor e a luz durante o processamento, além de ajudar a estender a vida útil do produto final, estabilizantes térmicos são adicionados ao PVC e ao EVA (JÚNIOR et al., 2002; SMITH; HASHEMI, 2012).

Os estabilizantes térmicos de PVC agem capturando e estabilizando os íons cloreto formados durante o processamento do composto, impedindo a propagação da reação e a consequente autocatálise do processo de degradação. Ou seja: o estabilizante não atua impedindo a degradação térmica do PVC, mas controlando a formação de HCl e evitando que o processo de degradação atinja um estágio que comprometa o desempenho do produto final (RODOLFO Jr. e MEI, 2007).

Estabilizantes metálicos e orgânicos são utilizados como estabilizantes térmicos na síntese do PVC (RODOLFO Jr. e MEI, 2007). Entre os metálicos, destacam-se os estabilizantes à base de sais de chumbo, estanho, cálcio, zinco e bário e zinco (RODOLFO Jr. et al., 2006). Os estabilizantes a base de chumbo são os mais antigos e os mais utilizados, pois proporcionam aos polímeros estabilidade de longo prazo em níveis satisfatórios, possuem uma boa relação custo-benefício e boas propriedades dielétricas. As formas mais utilizadas são os sulfatos e os fosfitos de chumbo. (RODOLFO JR. e MEI, 2007).

A presença de estabilizantes nas embalagens gera preocupação devido a possibilidade de lixiviação dos metais para o produto armazenado, uma vez que podem apresentar toxicidade dependendo das suas concentrações. Em relação a produtos farmacêuticos, a Portaria 500/97 da ANVISA estabelece que os polímeros e aditivos utilizados como matéria prima, devem cumprir as exigências da Farmacopeia Europeia. Essa por sua vez, permite a utilização de embalagens a base de PVC e teste para metais pesados são recomendados, não podendo ultrapassar 50 ppm (BRASIL, 1997; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009).

Além da possível lixiviação do chumbo presente no material para o conteúdo da bolsa, muitos doadores podem apresentar níveis mais elevados de chumbo no sangue, uma vez que, trata-se de um dos contaminantes mais comuns do ambiente, devido à sua ocorrência natural e também em fontes antrópicas (atividades industriais, agricultura, atividade veicular) (MOREIRA e MOREIRA, 2004; WHO, 1995).

#### 1.4 Citrato de Sódio

O citrato de sódio ou citrato trissódico é um sal tribásico obtido através de completa neutralização do ácido cítrico com hidróxido de sódio ou carbonato de alta pureza e subsequente cristalização e desidratação. A forma hidratada comum, citrato trissódico dihidratado, é um composto solúvel em água amplamente utilizado em alimentos, bebidas e várias aplicações técnicas. Age principalmente como agente tampão, sendo capaz de impedir variações de pH e de regular a acidez em alimentos. Além da capacidade de agir como anticoagulante, agente quelante, sequestrador, emulsificante e estabilizante natural (JUNGBUNZLAUER SUISSE AG, 2017).

Vários agentes anticoagulantes são usados na coleta de amostras sanguíneas, a fim de inibir o processo de coagulação do sangue. Os anticoagulantes mais comumente usados são heparina, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), citrato, oxalato e fluoreto de sódio. E, no caso de coleta em bolsas de sangue, solução de citrato de sódio, fosfato de sódio, ácido cítrico, dextrose e adenina (CPDA) ou citrato, fosfato, dextrose, solução salina, adenina, glicose e manitol (CPD / SAG-M) (Burtis e Ashwood, 2008; Sennbro, 2011).

A heparina é utilizada para bioquímica clínica e o citrato de sódio é necessário para estudos referentes aos tempos de coagulação e testes de agregação plaquetária.

O citrato trissódico, assim como o EDTA, atua como quelante de cálcio, reagindo com o cálcio livre do sangue formando sais insolúveis. A ausência de cálcio livre impede a efetivação do mecanismo de coagulação sanguínea (Burtis e Ashwood, 2008; Cerón et al., 2004; Mohriet al., 2007). Tem aplicação em estudos de coagulação, pois é possível reverter o seu efeito ao adicionar cálcio à amostra. Entretanto tem pouca aplicação para bioquímica clínica. A concentração de citrato varia de 54 a 181 mg/dL em concentrados de hemácias e de 384 a 436 mg/dL em plasma fresco congelado (BRASIL, 2007). Esse anticoagulante não preserva os eritrócitos, portando o sangue deve ser utilizado em até 24 horas após a coleta e é o anticoagulante mais utilizado em casos de emergência (Burtis e Ashwood, 2008).

Como os íons de cálcio são essenciais para a cascata de coagulação, assim como para as interações intercelulares, a adição desses anticoagulantes mantém a amostra de sangue na fase líquida, por um período de tempo relativamente longo,

o que favorece a possibilidade da contagem celular sanguínea (Burtis e Ashwood, 2008; Harr et al., 2005).

O citrato de sódio é rapidamente metabolizado no fígado e geralmente não se acumula na circulação. Em casos de transfusões massivas ou na presença de alterações no fígado, ele pode se acumular e exceder a capacidade hepática de metabolização, causando hipocalcemia e hipomagnesemia que levam a arritmias cardíacas, espasmos musculares entre outras alterações. Além disto, como a metabolização do citrato resulta em bicarbonato, pode ocorrer acúmulo deste último, com a consequente alcalose (BRASIL, 2007; SARAIVA E OTTA, 2007; STRYER, 2004). Adicional a isso, o citrato de sódio é um agente complexante que tem a habilidade de solubilizar diversos íons metálicos no plasma sanguíneo, aumentando a sua absorção. Alguns estudos clínicos ainda apontam que o citrato de sódio contribui para a absorção do chumbo no organismo, facilitando assim, sua excreção (Sandström et al. 1987; Nolan et al. 1994).

## **1.5 Chumbo**

O chumbo (Pb) é um metal pesado e facilmente maleável, resistente à corrosão e com baixo ponto de fusão. Ele é amplamente utilizado há muitos anos, sendo de ocorrência natural no ambiente. Está presente na natureza na forma de diversos compostos como carbonato de chumbo, sulfato e sulfeto de chumbo, e também óxido de chumbo. É um contaminante comuns devido às atividades industriais que favorecem a sua distribuição em decorrência de seu baixo ponto de fusão (327°C), grande facilidade de formar ligas e sua ductibilidade (Saryan e Zenz, 1994; CORDEIRO, 1995).

No entanto, esse metal não possui nenhuma função fisiológica no organismo humano e seus efeitos tóxicos sobre o organismo já são conhecidos há muito tempo por afetarem praticamente todos os sistemas do corpo humano (Xie et al., 1998). Trata-se de um metal de efeito cumulativo no organismo e seus danos colaterais dependem da intensidade e duração da exposição. Os impactos já estudados causados por esse elemento são: efeito neurológico, hematológico, endócrino, renal, carcinogênico, cardiovascular, gastrintestinal, sobre a reprodução e o desenvolvimento (MOREIRA, 2004). (NASCIMENTO, 2006).

A cinética do chumbo no organismo humano tem sido exaustivamente estudada em homens e animais, porém, muitos fatores ainda são pouco entendidos.

A maior parte do chumbo entra no organismo humano pela via respiratória e gastrointestinal e após a sua absorção, o chumbo pode ser encontrado no sangue, tecidos moles e ósseos (ATSDR, 2019).

Os ossos são o sítio primário de armazenamento de chumbo no organismo (cerca de 94% do total do Pb no organismo está nos ossos) (SANÍN et al., 1998; ATSDR, 2019). Muitos estudos evidenciam que a mobilização de Pb dos ossos para o sangue é intensificada durante os períodos de maior liberação óssea tais como crescimento rápido na infância, gravidez, lactação, menopausa, desequilíbrios hormonais, entre outros (SMITH et al., 1996; ATSDR, 2019).

Uma vez na corrente sanguínea, o chumbo incorpora-se aos eritrócitos, ossos, fígado, rins e sistema nervoso central (SNC) sendo distribuído pela corrente sanguínea e depositado nos tecidos ou excretado. Assim, os processos de absorção, trocas entre compartimentos e eliminação são facilitados. O chumbo pode afetar uma série de sistemas e a magnitude das manifestações clínicas dependerá da intensidade, do tempo de exposição e da sensibilidade do indivíduo. Em adultos, o Pb é bem conhecido por causar toxicidade na medula óssea, fígado, rins e no SNC (WANG et al, 2012; HRYHORCZUK *et al.*, 1985).

A exposição crônica ao chumbo é capaz de comprometer a síntese do heme e, conseqüentemente causar anemia, sendo esta, mais severa em crianças deficientes em ferro (SOUZA e TAVARES, 2009). Outrossim, sua toxicidade está relacionada principalmente aos sistemas hematopoiético e nervoso. Apresenta efeitos deletérios sobre o sistema nervoso central, decorrentes da exposição crônica ou mesmo aguda, caracterizados por uma encefalopatia, com alterações de humor, memória e atenção, entre outras manifestações (DE CAPITANI, 2009).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera que uma concentração sanguínea de Pb acima de 40 mg/dL é suficiente para o diagnóstico de exposição ao chumbo, enquanto o Centro de Controle e Prevenção de Doenças estabelece o limite seguro de 25 mg/dL para o diagnóstico (CDC, 1996; WHO, 1989).

De acordo com o perfil toxicológico do chumbo, elaborado pela Agência de Registro de Substâncias Tóxicas e Doenças (ATSDR, 2019), os principais efeitos do chumbo no organismo são:

- **Efeitos neurológicos:**

- **Crianças:** diminuição da função cognitiva; humor e comportamentos alterados, que podem contribuir para o déficit de aprendizado, função

neuromotora e neurossensorial alterada, neuropatia periférica e encefalopatia;

- **Adultos:** função cognitiva reduzida, incluindo atenção, memória e aprendizado; função neuromotora e neurossensorial alterada; humor e comportamento alterados; e diminuição da velocidade de condução nervosa periférica.
- **Efeitos renais:** taxa de filtração glomerular diminuída, proteinúria, enzimúria, transporte tubular prejudicado e dano histopatológico.
- **Efeitos cardiovasculares:** aumento da pressão arterial sistólica e diastólica, aumento do risco de hipertensão, aterosclerose, condução cardíaca alterada, aumento do risco de doenças cardíacas e aumento da mortalidade por doenças cardiovasculares.
- **Efeitos hematológicos:** inibição de  $\delta$ -ALAD desidratase do ácido d-aminolevulínico levando a diminuição da hemoglobina e anemia, atividade diminuída de outras enzimas eritrocitárias e alteração nos níveis plasmáticos de eritropoietina (EPO).
- **Efeitos imunológicos:** perturbação da resposta imune humoral e celular, diminuição da resistência a doenças, sensibilização, autoimunidade e inflamação.
- **Efeitos reprodutivos:**
  - **Homens:** efeitos na concentração espermática e alterações na qualidade seminal, diminuição da fertilidade, dano histopatológico nos testículos e possíveis alterações nas concentrações séricas de hormônios;
  - **Mulheres:** possíveis alterações nas concentrações séricas de hormônios reprodutivos, diminuição da fertilidade, aborto espontâneo, parto prematuro e diminuição da idade no início da menopausa.
- **Efeitos no desenvolvimento:** diminuição do peso e tamanho ao nascimento, diminuição das medidas antropométricas em crianças e atraso no início da puberdade em meninos e meninas.

O chumbo exerce muitos de seus efeitos adversos ao perturbar a homeostase de íons. Essa perturbação ocorre quando o chumbo desloca outros íons metálicos, como ferro, cálcio, zinco, magnésio, selênio e manganês,

interferindo nos processos biológicos críticos mediados pelos próprios íons ou por enzimas e proteínas que requerem esses íons. Entre os processos biológicos que o chumbo demonstrou afetar por seu impacto na homeostase de íons estão: homeostase de cálcio; transporte de íons através das membranas celulares; produção celular; e o funcionamento de inúmeras proteínas envolvidas na sinalização celular, crescimento e diferenciação, expressão gênica, metabolismo energético e vias de biossíntese. (SARYAN e ZENZ, 1994; ATSDR, 2019; MOREIRA e MOREIRA, 2004)

Nos sistemas fisiológicos, o chumbo imita cátions divalentes (cálcio, ferro, zinco). A substituição do chumbo por elementos essenciais nos sistemas de transporte de membranas é o mecanismo pelo qual o mesmo é absorvido pelo intestino e atravessa as membranas celulares por todo o corpo. Assim, inúmeras interações entre chumbo e elementos essenciais foram observadas. Portanto, a toxicidade do chumbo resulta, principalmente, de sua interferência no funcionamento das membranas celulares e enzimas, formando complexos estáveis com ligantes contendo enxofre, fósforo, nitrogênio ou oxigênio, que funcionam como doadores de elétrons (SARYAN e ZENZ, 1994; ATSDR, 2019; MOREIRA e MOREIRA, 2004).

A toxicidade aguda pelo chumbo manifesta seus efeitos geralmente entre 1 e 5 dias após a exposição. Os principais sistemas orgânicos envolvidos são: gastrointestinal, hematológico e neurológico. Sinais e sintomas aumentam em gravidade com o aumento da concentração de chumbo, variando de leve a grave. Os efeitos gastrointestinais incluem cólica e dor abdominal, náusea, vômito, diarreia e constipação. A perda maciça de fluidos gastrointestinais pode levar à desidratação (ATSDR, 2019). Os efeitos hematológicos incluem diminuição da síntese de hemoglobina, anemia e crise hemolítica aguda, caracterizada por anemia e hemoglobinúria. Numerosos sintomas neurológicos estão associados à toxicidade aguda do chumbo, incluindo dor de cabeça, hiperirritabilidade, atividade reduzida, parestesia, dor e fraqueza muscular, marcha atáxica, diminuição da consciência, edema cerebral, que leva a convulsões, encefalopatia, coma e morte. Outros sintomas relatados incluem adstringência da boca, sabor metálico e sede (ATSDR, 2019).

Com concentração de chumbo no sangue (PbS) <30 µg/dL, normalmente não são observados sinais e sintomas de toxicidade aguda. O que não significa que

nenhum efeito adverso (por exemplo, diminuição da síntese de hemoglobina) ocorra em concentrações menores, mas que os sintomas que levam os indivíduos a procurar intervenção médica (por exemplo, cólica abdominal e vômito) normalmente não são observados em PbS <30 µg/dL. À medida que as PbS aumentam para >30 µg/dL, são observados sinais e sintomas de toxicidade gastrointestinal e neurológica, com a gravidade aumentando proporcionalmente com a PbS. A encefalopatia induzida por chumbo foi relatada em PbS <100 µg/dL, mas é mais comumente associada a PbS >100 µg/dL. Em uma revisão de 96 casos de morte por intoxicação aguda por chumbo em crianças, a morte ocorreu em PbS >100 µg/dL (NAS, 1972; ATSDR, 2019).

No sangue, o chumbo se liga a vários constituintes plasmáticos e foi proposto que ele exista no plasma em quatro estados: pouco ligado à albumina sérica ou a outras proteínas, com uma afinidade relativamente baixa pelo chumbo; complexado a ligantes de baixo peso molecular, como aminoácidos e ácidos carboxílicos; fortemente ligado a uma metaloproteína em circulação e como Pb<sup>2+</sup> livre (AL-MODHEFER et al. 1991; ASTDR, 2019).

Aproximadamente 40-75% do Pb no plasma está ligado às proteínas plasmáticas e o chumbo no soro que não está ligado à proteína existe em grande parte como complexos com compostos sulfidril de baixo peso molecular (por exemplo, cisteína, homocisteína). Outros potenciais ligantes de baixo peso molecular do chumbo, no soro, podem incluir citrato, cisteamina, ergotioneína, glutatona, histidina e oxalato (ASTDR, 2019).

### **1.6 Interação Chumbo - Citrato**

Os efeitos tóxicos do chumbo surgem de seu envolvimento multipotente com enzimas e ácidos nucleicos, onde a inibição de vias bioquímicas frequentemente constitui a fonte de aberrações fisiológicas sintomáticas. Essas interações são caracterizadas por bloqueio de enzimas como a porfobilinogênio sintase, envolvida na síntese do heme; inibição das fosfatases ácidas; interação com o RNA, interferindo na síntese de proteínas; interação com o tecido ósseo, conduzindo à troca de cálcio, entre outras. As consequências das interações do chumbo com as biomoléculas têm sido frequentemente atribuídas à sua química como um íon metálico limítrofe - Pb (II) (KETY, 1942; KOURGIANTAKIS et al, 2000; CHU et al, 2011).

A mobilização de metais em fluidos biológicos requer a presença de ligantes orgânicos capazes de promover a formação de complexos de coordenação, que podem permitir a absorção ou retenção de metais, se produzirem estruturas com alto impedimento estérico. O citrato está entre as moléculas orgânicas que possuem a capacidade de solubilizar íons metálicos no plasma e aumentar sua absorção. Estudos clínicos ao longo dos anos apontaram que o citrato de sódio contribui para a absorção do chumbo (KETTY, 1942; KOURGIANTAKIS et al, 2000; CHU et al, 2011).

O citrato forma complexos estáveis com numerosos íons metálicos divalentes e é considerado um ligante de baixo peso molecular e preeminente no plasma do sangue humano, onde possui uma concentração de 0,1 mM. A química do citrato é complexa, com uma variedade de tipos de ligação relatados. A ligação de íons metálicos pode ocorrer em quatro locais: nomeadamente através dos três grupos carboxilato e o grupo hidroxí (BOTTARI e VICEDOMINI, 1973; CHU et al, 2011).

A síntese e o isolamento das primeiras espécies de citrato-Pb confirmam a capacidade do citrato de se ligar, coordenar e, subsequentemente, solubilizar esse íon metálico em baixos valores de pH. Além disso, a complexação fornece a porta de entrada para novas espécies, que emergem solúveis em valores fisiológicos de pH - aumentando assim, a absorção de Pb(II) pelos tecidos biológicos – o que torna muito mais provável seu papel nos efeitos tóxicos do chumbo em relação às macromoléculas biológicas (KOURGIANTAKIS et al, 2000; CHU et al, 2011).

## 2. JUSTIFICATIVA

A transfusão de sangue, hemocomponentes e hemoderivados, é uma tecnologia essencial na terapêutica atual, contribuindo com o sucesso em intervenções emergenciais, cirúrgicas ou mesmo em procedimentos complexos, aumentando a sobrevivência dos pacientes (WHO, 2010). Porém, pode levar a complicações como o risco de transmissão de agentes infecciosos ou mesmo reações transfusionais (BRASIL, 2009).

Visando a preservação dos hemocomponentes, o impedimento da coagulação, a manutenção da viabilidade das células sanguíneas durante o processamento e armazenamento, além de prevenir alterações físicas prejudiciais e evitar a proliferação bacteriana, são adicionadas às bolsas, soluções anticoagulantes (BRASIL, 2015). Os anticoagulantes mais frequentemente utilizados são a base de citrato, como o citrato de sódio e a heparina.

Por outro lado, o acondicionamento dos hemocomponentes e hemoderivados é realizado por meio de bolsas constituídas de polímeros como o cloreto de polivinila (PVC) ou etilvinil acetato (EVA), amplamente utilizados em todo o mundo (OLIVEIRA, 2012). A fim de melhorar as propriedades físicas dos polímeros, especialmente as mecânicas e térmicas, são adicionados aditivos às bolsas de PVC e EVA, que atuam como estabilizadores térmicos, prevenindo a degradação durante o processamento e ampliando a validade do produto final (JÚNIOR et al., 2002; SMITH; HASHEMI, 2012).

A presença de estabilizantes nos polímeros das bolsas como compostos a base de chumbo, nas embalagens gera preocupação devido a possibilidade de lixiviação deste metal para o produto armazenado, uma vez que este pode apresentar toxicidade dependendo das suas concentrações (RODOLFO JR. e MEI, 2007).

Além da possível lixiviação do chumbo presente no material para o conteúdo da bolsa, muitos doadores podem apresentar níveis mais elevados de chumbo no sangue, considerando ser este metal, um dos contaminantes mais comuns do ambiente, devido à sua ocorrência natural e/ou resultante de atividades industriais (MOREIRA e MOREIRA, 2004; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1995). Adicional a isso, o citrato de sódio, utilizado como anticoagulante em bolsas de hemocomponentes e/ou hemoderivados (BRASIL, 2015), é um agente complexante

que tem a habilidade de solubilizar o chumbo no plasma sanguíneo, aumentando a sua absorção. Estudos clínicos apontam que o citrato contribui não somente para a absorção do chumbo no organismo, mas também, facilita sua excreção (SANDSTRÖM et al. 1987; NOLAN et al. 1994).

Compreender a toxicidade do chumbo em sistemas biológicos implica num conhecimento profundo de seu comportamento químico em solução aquosa e das espécies formadas. Os complexos metálicos formados com um ligante fisiologicamente relevante, como o citrato, apresentaram diversidade estrutural nas espécies investigadas. Neste sentido, não há referências que abordem possíveis efeitos diretos do chumbo sobre os hemocomponentes acondicionados nas bolsas, apesar deste ser um metal reconhecidamente tóxico.

Considerando a importância da hemoterapia, a toxicidade do chumbo, a possibilidade do citrato aumentar a disponibilidade do chumbo no sangue ou tecidos e a obrigatoriedade de oferecer um hemocomponente de qualidade, é de suma relevância investigar a cinética do chumbo associada ao citrato, visando minimizar as reações transfusionais as quais o paciente está exposto.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

O objetivo geral deste estudo é avaliar a influência do citrato de sódio na biodisponibilidade e depósito de chumbo em diferentes tecidos de ratos experimentalmente expostos por via intraperitoneal.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar se o citrato de sódio altera a biodisponibilidade e deposição do chumbo nos tecidos dos animais;
- Avaliar os parâmetros bioquímicos (ALA-D, ALT, AST, ureia e creatinina);
- Avaliar os parâmetros urinários (creatinina e ALA-U) e se o citrato influencia na excreção do chumbo;
- Avaliar a presença de micronúcleos no tecido medular dos ratos expostos;
- Avaliar a concentração de chumbo no sangue dos animais expostos;

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR ISO 3826-1. Bolsas plásticas para acondicionamento de sangue humano e seus componentes - 2013.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2019. Toxicological profile for Lead. (Draft for Public Comment). Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.

Al-Modhefer AJ, Bradbury MWB, Simons TJB. 1991. Observations on the chemical nature of lead in human blood serum. Clin Sci 81:823-829.

BORDIN, J. O.; LANGHI JUNIOR, D. M.; COVAS, D. T. Hemoterapia: Fundamentos e Prática. São Paulo: Editora Atheneu, 2007. Cap. 12, p. 107-114.

BOTTARI, E.; VICEDOMINI, M.; On the complex formation between lead(II) and citrate ions in acid solution. J. Inorg. Nucl. Chem. 35 (1973) 1657.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. **Portaria nº. 950**. Diário Oficial da União nº. 229. seção 1, p. 11-14, 26 de novembro de 1998 - Aprovar Regulamento técnico sobre bolsas plásticas para coleta e acondicionamento de sangue humano e seus componentes. Secretaria de Vigilância Sanitária.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Hemovigilância: manual técnico para investigação das reações transfusionais imediatas e tardias não infecciosas. – Brasília: 124 p. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 34, de 11 de junho de 2014**. Estabelece os requisitos de boas práticas para serviços de hemoterapia que desenvolvam atividades relacionadas ao ciclo produtivo do sangue e para serviços de saúde que realizem procedimentos transfusionais, incluindo captação de doadores, coleta, processamento, testagem, controle de qualidade e proteção ao doador e ao receptor, armazenamento, distribuição, transporte e transfusão em todo o território nacional, nos termos desta Resolução. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 de junho de 2014a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 35, de 12 de junho de 2014**. Estabelece os requisitos gerais e específicos e os ensaios para bolsas plásticas para coleta, armazenamento e transferência de sangue humano e seus componentes, fixando as condições exigíveis, inclusive aquelas pertinentes ao desempenho do plástico policloreto de vinila (PVC) plastificado com o di (2-etilhexil) ftalato (DEHP), trioctiltrimelitato (TOTM) ou outros

que venham a ser aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 de junho de 2014b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual Técnico para Investigação da Transmissão de Doenças pelo Sangue**. Ed Ministério da Saúde, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 158, de 04 de fevereiro de 2016. Regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos. Diário Oficial da União [da República Federativa do Brasil], Brasília, n. 25, s. 1, 05 fev. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. **Manual de orientações para promoção da doação voluntária de sangue**. – 1. ed., 1. reimpr. – 152 p. ISBN 978-85-334-2264-3. 2015a.

BRASIL. Ministério Da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. **Guia para o uso de hemocomponentes**. Série A. Normas e Manuais Técnicos. 136p. ISBN 978-85-334-2161-5. 2015b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Gestão do Trabalho e da Educação na Saúde. Departamento de Gestão do Trabalho na Saúde. **Técnico em hemoterapia: livro texto**. 292 p. ISBN 978-85-334-1988-9. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 500, de 09 de outubro de 1997**. Regulamento técnico de soluções parenterais de grande volume. Diário Oficial da União [da República Federativa do Brasil], Brasília, v. 135, nº 197, 13 out. 1997.

BRITISH PHARMACOPOEIA. Her Majesty's Stationary Office, London, v. I, 2009.

BURTIS C.A.; ASHWOOD E.R.; BURNS D.E. Tietz Fundamentos de Química Clínica. 6 eds. Rio de Janeiro: Elsevier. p.992, 2008.

CALLISTER Jr, Willian D. Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução”. 8. ed, Rio de Janeiro: LTC, 2012.

CDC. Adult blood lead epidemiology and surveillance-United States, second quarter. MMWR 1996; 45:919e20.

CERÓN J.J.; MARTÍNEZ-SUBIELA S.; HENNEMANN C. et al The effects of different anticoagulants on routine canine plasma biochemistry. The Veterinary Journal, v.167, n.3, p.294-301, 2004.

CHU, C.; DARLING, K.; NETUSIL, R.; DOYLE, R.P.; ZUBIETA, J. Synthesis and structure of a lead(II)-citrate:  $\{Na(H_2O)_3\}[Pb_5(C_6H_5O_7)_3(C_6H_6O_7)(H_2O)_3]_9 \cdot 5H_2O$ . *Inorganica Chimica Acta* 378 (2011) 186–193.

COAKER, A.W. Poly (vinylchloride). In: CARRAHER, C; CRAVER C. (Org.). *Applied Polymer Science: 21st Century*. Oxford: Elsevier Science Ltd., 2000.

CORDEIRO, R.; LIMA FILHO, E. C. A inadequação dos valores dos limites de tolerância biológica para a prevenção da intoxicação profissional pelo chumbo no Brasil. *Cad. Saúde Pública*, vol. 2, p. 177-186, 1995

DE CAPITANI, E.M. Diagnóstico e tratamento da intoxicação por chumbo. *Medicina* (Ribeirão Preto), v.42, n.3, p. 319-29, 2009.

DEBAS HT et al. Surgery. In Jameson DT et al. *Disease control priorities in developing countries*, 2nd edition. Washington DC, World Bank/Oxford University Press, 2006.

ENDO, K. Synthesis and Structure of poly (vinyl chloride). *Progress in Polymer Science*, p. 2021-2054. 2002.

Fundação Hemominas. Sangue – Breve História. 2014. Disponível em: <http://www.hemominas.mg.gov.br/doacao-e-atendimento-ambulatorial/hemoterapia/sangue-breve-historia>. Acessado em: 31/12/2019.

HARR, K. E.; RASKIN, R. E.; HEARD, D. J. Temporal effects of 3 commonly used anticoagulants on hematologic and biochemical variables in blood samples from macaws and Burmese pythons. *Veterinary clinical pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology*, v. 34, n. 4, p. 383-8, dez. 2005.

Hess JR, Greenwalt TG. Storage of red cells: new approaches. *Transfus Med Rev*. 2002 Oct;16(4):283-95.

HOFFMAN, R. *Hematology: basic principles and practice*. 6.ed, London: Churchill Livingstone. 2012.

Högman CF, de Verdier CH, Ericson A, et al. Studies on the mechanism of human red cell loss of viability during storage at +4 degrees C in vitro. *Vox Sang*. 1985 May; 48(5):257-68.

JUNGBUNZLAUER SUISSE AG. Trisodium Citrate Anhydrous. Disponível em: [https://www.jungbunzlauer.com/fileadmin/content/PDF/PRINT\\_PROJECTS/Flyer/JBL\\_FL\\_Boost\\_dishwashing\\_performance\\_ecologically\\_2017-181.pdf](https://www.jungbunzlauer.com/fileadmin/content/PDF/PRINT_PROJECTS/Flyer/JBL_FL_Boost_dishwashing_performance_ecologically_2017-181.pdf). Acessado em: 20/01/2020.

JÚNIOR, R. A.; NUNES, L. R.; ORMANJI, W. Tecnologia do PVC. São Paulo: Pro Editores/Braskem. p. 95. 400 p. 2002.

JUNQUEIRA, Pedro C.; ROSENBLIT, Jacob and HAMERSCHLAK, Nelson. História da Hemoterapia no Brasil. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2005, vol. 27, n. 3, pp. 201-207. ISSN 1516-8484. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-84842005000300013>.

KETY, S. S. The lead citrate complex ion and its role in the physiology and therapy of lead poisoning. *J. Biol. Chem.* 1942 142: 181-.

KOURGIANTAKIS, M.; MATZAPETAKIS, M.; RAPTOPOULOU, C.P.; TERZIS, A.; SALIFOGLOU, A. Lead–citrate chemistry. Synthesis, spectroscopic and structural studies of a novel lead(II)–citrate aqueous complex. *Inorganica Chimica Acta* 297 (2000) 134–138.

MOREIRA FR, MOREIRA JC. A cinética do chumbo no organismo humano e sua importância para a saúde. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2004 Jun; 9(1):167-181.

MOREIRA, F. R.; MOREIRA, J. C. Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde. *Panam Salud Publica*, vol. 15, n. 2, p. 119-129, 2004.

MULDER, K.; KNOT, M. PVC plastic: A history of systems development and entrenchment. *Technology in Society*, 2001, Vol.23 (2), pp.265-286.

NAS. 1972. Lead: Airborne lead in perspective: Biological effects of atmospheric pollutants. Washington, DC: National Academy of Sciences, 71-177, 281-313.

NOLAN CR, DEGOES JJ, ALFREY AC. Aluminum and lead absorption from dietary sources in women ingesting calcium citrate. *Southern Medical Journal*. 1994 Sep; 87(9):894-8.

OLIVEIRA, C. T. Aplicação do policloreto de vinila (PVC) em substituição aos materiais convencionais da Construção Civil e Arquitetura. 32 f. Monografia. Faculdade de Tecnologia Sorocaba, Sorocaba, 2012.

PARK, J. B., BRONZINO, J. D. *Biomaterials Principles and Applications*, CRC Press LLC, 2003.

REDE DE SERVIÇO TECNOLÓGICOS PARA SANGUE E HEMODERIVADOS (REDSANGUE) – Sistema Brasileiro de Tecnologia (SIBRANTEC). - Manual para controle da qualidade do sangue total e hemocomponentes. São Paulo 2011 (apoio: Ministério da Saúde - Brasil).

- RODOLFO Jr., et. al. Tecnologia do PVC. Pró Editores Associados, São Paulo, 2006.
- RODOLFO, J.R.; A.; MEI, L. H. I. - Mecanismos de degradação e estabilização térmica do PVC. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, vol. 17, nº 3, p. 263-275, 2007.
- RODRIGUES, L.B. Aplicações de biomateriais em ortopedia. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. *Estudos Tecnológicos em Engenharia*, vol. 9, n. 2, p. 63-76, jul/dez 2013.
- SANDSTRÖM, B.; KIVISTÖ, B.; CEDERBLAD, A. Absorption of Zinc from Soy Protein Meals in Humans. *The Journal of Nutrition*, Volume 117, Issue 2, 1 February 1987, Pages 321–327
- SARAIVA, J. C. P.; OTTA, M. I. Preservação do Sangue e Componentes. In: BORDIN, J. O.; LANGHI JUNIOR, D. M.; COVAS, D. T. *Hemoterapia: Fundamentos e Prática*. São Paulo: Editora Atheneu, 2007. Cap. 12, p. 107-114.
- Saryan LA, Zenz C. Lead and its compounds. Em: Zenz OC, Dickerson B, Horvath EP, eds. *Occupational medicine*. 3ª ed. St. Louis: Mosby-Year Book; 1994. Pp. 506–541.
- SENNBRO, C.J.; KNUTSSON, M.; TIMMERMAN, P.; AMSTERDAM, P.V. Anticoagulant counter ion impact on bioanalytical LC-MS/MS assay performance: additional validation required? *Bioanalysis*, London, v. 3, n. 21, p. 2389-2391, 2011.
- SMITH, W. F.; HASHEMI, J. *Fundamentos de Engenharia e Ciências dos Materiais*. 5. ed. Porto Alegre: McGraw-Hill Brasil, 2012. Cap. 10. 355 p.
- SOUZA, A.M.; TAVARES, C.F.F. Chumbo e anemia. *Medicina (Ribeirão Preto)*, v.42, n.3, p. 337-40, 2009.
- STRYER, L. *Biochemistry*. 5ª ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2004. p. 131-135.
- Tomczak ACTQ. Estudo de métodos laboratoriais para o controle de qualidade de unidades transfusionais eritrocitárias [dissertação]. [Curitiba]: Universidade Federal do Paraná; 2008. 95p.
- VERCEZE, A. V.; PEREIRA, N. L.; BUZZO, E. J. Estudo físico e físico-químico de diferentes filmes de bolsas de sangue visando a segurança frente ao processamento hemoterapêutico. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 2006, Vol. 28, p. 139-143.
- VINHAS, G. M. et. al. Estudo de propriedades de PVC modificado com grupos alquila e benzila. Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife – PE, 2005.

WANG, J.; YANG, Z.; LIN L.; ZHAO, Z.; LIU, Z.; LIU, X. Protective effect of naringenin against lead-induced oxidative stress in rats. *Biol Trace Elem Res* 2012; 146(3):354- 359.

Weiser TG et al. An estimation of the global volume of surgery: a modelling strategy based on available data. *Lancet*, 2008; 372:139–144.

WHO - World Health Organization. (1995) Inorganic Lead. Environmental Health Criteria 165. International Programme on Chemical Safety. World Health Organization. Geneva. 300 p.

WHO - World Health Organization. (2010) Towards 100% Voluntary Blood Donation: A Global Framework for Action. World Health Organization. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44359/1/9789241599696\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44359/1/9789241599696_eng.pdf?ua=1). Acesso em: 06/01/2019.

WHO - World Health Organization. (1989) Environmental health criteria series No. 85. Lead, Geneva: Environmental Aspects. 106 p. ISBN 9241542853.

WHO - World Health Organization. (2004) World report on road traffic injury prevention. Geneva, World Health Organization.

WHO - World Health Organization. (2006) Thalassaemia and other haemoglobinopathies. Report by the Secretariat. Executive Board EB118/5, 118th Session 11 May 2006. Geneva, World Health Organization.

WHO - World Health Organization. (2009) Tapko JB, Mainuka P, Diarra-Nama AJ. Status of blood safety in the WHO African Region: report of the 2006 survey. Brazzaville, World Health Organization Regional Office for Africa.

ZARZAR JR, F.C., HOLANDA, M.G. O PVC: Características Técnicas, Vantagens e Relação com o Meio Ambiente. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, Universidade Federal de Pernambuco, 2011.

## 5. ARTIGO CIENTÍFICO

A ser submetido ao periódico Biological Trace Element Research. Qualis A3

Fator de impacto 2.43

### **Influence of sodium citrate on lead deposition in tissues of exposed rats.**

Jéssica Ferrari<sup>1,2</sup>, Emilene Mendes Becker<sup>4</sup>, Denise Bohrer do Nascimento<sup>2,5</sup>, Gabriela Göethel<sup>6</sup>, Daiane Guedes Domingues<sup>6</sup>, Solange Cristina Garcia<sup>6</sup>, Carolina Silveira Dalanhol<sup>7</sup>, Leandro Segat Perini<sup>7</sup>, Sandra Manoela Dias Macedo<sup>1,3</sup>, Eliane Dallegrave<sup>1,2,3\*</sup>.

<sup>1</sup> Toxicology Research Laboratory (LaPeTox). Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA). Porto Alegre, RS, 90050-170, Brazil.

<sup>2</sup> Health Sciences Graduation Program. Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA). Porto Alegre, RS, 90050-170, Brazil.

<sup>3</sup> Department of Pharmacosciences. Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA). Porto Alegre, RS, 90050-170, Brazil.

<sup>4</sup> Department of Inorganic Chemistry. Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS). Porto Alegre, RS, 90040-160, Brazil.

<sup>5</sup> Chemistry Department. Federal University of Santa Maria (UFSM). Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil.

<sup>6</sup> Toxicology Laboratory (LATOX), Analysis Department. Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>7</sup> Chemistry Institute. Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS). Porto Alegre, RS, 90040-160, Brazil.

\* Corresponding author: E. DALLEGRAVE, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA). Porto Alegre, RS, 90050-170, Brazil.

E-mail address: [elianedal@ufcspa.edu.br](mailto:elianedal@ufcspa.edu.br)

## **DECLARATIONS**

**Funding:** This study was financed in part by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) Finance Code 001.

**Conflicts of interest:** The authors have no conflicts of interest to disclosure.

**Ethics approval:** Project approved by the Ethics Committee on the use of animals of the Federal University of Health Sciences (UFCSPA), through the protocol 251/9.

## **ABSTRACT**

Hemotherapy is a technology of extreme relevance in current therapy, however, this process involves health risk. To ensure transfusion efficacy and safety, it is important to consider the quality of the supplies used in the process, including bags with possible chemical contaminants such as plasticizers and metals, which can be leached into the content over the expiration date. The bags used in Brazil for the collection, storage and transfer of blood components or bone marrow progenitors are made with polyvinyl chloride or ethylene vinyl acetic. In addition, lead-based stabilizers are used in the manufacture of blood bags to provide greater stability to polymers. Metals can cause adverse health effects, including changes on the reproductive, immune, nervous and hematopoietic systems, among others. The aim of this study was to evaluate the influence of sodium citrate on bioavailability and lead deposition in tissues of rats experimentally exposed, since this anticoagulant complex with lead. Wistar rats (N=20) were allocated into 4 groups that were administrated with one acute intraperitoneal dose of: 1) 1 mL/kg of saline (control), 2) 2.2 mg/kg sodium citrate, 3) 3.0 mg/kg lead acetate or 4) lead acetate plus citrate sodium. After forty-eight hours, lead concentration was determined in the blood, urine and organs (brain, liver and kidneys) by atomic absorption spectrometry with a graphite furnace. In addition, biochemical parameters and micro-nucleus analysis were also performed. The results indicate that citrate induces an increase in urinary excretion and, although it does not reach statistical significance, citrate was able to increase brain lead concentration even at concentrations that did not cause biochemical changes in kidney and liver function or lead exposure markers. These findings reinforce the need to monitor the lead concentrations in the blood bags and also in hemocomponents to improve the hemotherapy.

**Keywords:** Hemotherapy, lead, citrate, blood bags.

## INTRODUCTION

Blood transfusion, blood components and blood products, is a very relevant technology in modern therapy, contributing to routine medical and surgical interventions, in emergencies, as well as complex procedures that drastically improved patients' expectations and quality of life <sup>[1]</sup>. However, it can induce acute or late complications, such as the risk of transmission of infectious agents or even, clinical complications resulting from transfusion reactions <sup>[2]</sup>.

Current processing techniques allow the storage of different blood components and derivatives in suitable conditions, allowing the recipients to receive, in a smaller volume, only blood components or derivatives that they need, minimizing the risks inherent to transfusion therapy. <sup>[2, 3]</sup>

In order to better preserve blood components, preservative anticoagulant solutions and additive solutions are added to the bags in order to conserve blood products, prevent clotting, maintain the viability of blood cells during processing and storage, prevent harmful physical changes and prevent proliferation bacterial. <sup>[4]</sup> The anticoagulants most frequently used are adenine citrate phosphate dextrose (CPDA-1), acid dextrose citrate (ACD), phosphate dextrose citrate (CPD and CP2D), sodium citrate and heparin. The first three contain nutritional factors for red blood cells, so they are used when you want to store blood. <sup>[4]</sup>

Plastic bags, where blood components are stored, contain contaminants in their composition. Despite the evolution of techniques for preserving blood components, contamination of these products is still a reality, common also to some pharmaceutical products. The source of these contaminants can be components of polymer materials of packaging used in health products, since, they can migrate to the formulation or the content.

Polyvinyl chloride (PVC) and ethyl vinyl acetate (EVA) are polymers widely used worldwide. Due to their particular properties and characteristics, both are chosen for blood component bags, infusion solutions and parenteral nutrition <sup>[5]</sup>. In order to improve the physical properties of polymers additives are added acting as stabilizers, plasticizers, pigments, lubricants, among others. In addition, to prevent degradation caused by heat and light during processing, thermal stabilizers are added to PVC and EVA <sup>[6, 7]</sup>.

Lead-based compounds (Pb), cadmium (Cd), barium (Ba), calcium (Ca) and zinc (Zn) are used as thermal stabilizers in the synthesis of PVC. Lead-based stabilizers are the oldest and most widely used, providing polymers with long-term stability at satisfactory levels, good value for money and good dielectric properties <sup>[8]</sup>.

The toxic effects of lead arise from its multipotent involvement with enzymes and nucleic acids, where inhibition of biochemical pathways is often the source of symptomatic physiological aberrations. These interactions between sodium citrate and heavy metals are characterized by the inhibition of enzymes such as porphobilinogen synthase that is involved in the synthesis of heme, the inhibition of acid phosphatases, the interference in protein synthesis through interaction with RNA, the interaction with human bones leads to the exchange of calcium and others. The consequences of the interactions of lead with biomolecules have often been attributed to its chemistry as a boundary metal ion (Pb<sup>2+</sup>) [9, 10, 11].

In addition to the possible leaching of lead present in the material to the contents of the bag, many blood cell donors may have higher levels of lead in their blood, since it is one of the most common contaminants in the environment, due to its natural occurrence and also to the countless industrial activities [12, 13].

On the other hand, sodium citrate - used in all anticoagulants as a calcium chelator reacting with free calcium in the blood and preventing the clotting [4] - is a complexing agent that has the ability to solubilize various metal ions in the blood plasma, increasing its absorption. Some clinical studies point out that citrate contributes to the absorption of lead in the body, thus facilitating its excretion [14, 15]. Citrate forms stable complexes with numerous divalent metal ions and is considered a ligand of small and preeminent molecular weight in human blood plasma, where it has a concentration of 0.1 mM. [9, 10, 11, 16].

Understanding the toxicity of lead in biological systems implies a deep knowledge of its chemical behavior in aqueous solution and the formed species. The metal complexes formed with a physiologically relevant ligand, such as citrate, showed structural diversity in the investigated species.

There are no references that address possible direct effects of lead on the blood components contained in the bags and knowledge of its kinetics associated with sodium citrate in different tissues would contribute to understand the possible risks induced by this anticoagulant and to minimize related problems.

Considering the importance of hemotherapy, the toxicity of lead, the possibility of citrate increasing the availability of lead and the obligation to offer a quality blood component, it is extremely important to investigate the influence of sodium citrate on lead kinetics. Thus, this study aimed to evaluate the influence of sodium citrate on lead bioavailability in blood, urinary excretion and deposition in tissues of exposed rats.

## **MATERIALS AND METHODS**

This is an experimental study based on the Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure, N° 420, from the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), for the Guidelines for the Testing of Chemicals<sup>[17]</sup>.

All procedures were performed in accordance with the legislation in force in Brazil (Law 11.794/08, regulated in 10/8/2008) and with approval by the Ethics Committee in Animal Use of the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA) under protocol 251/9.

### **Animals**

A total of 20 male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were used at 10 weeks of age and approximately  $300 \pm 50$  g. The animals were kept in controlled conditions and were exposed to light/dark cycle of 12 hours, receiving water and food *ad libitum*. The rats were randomly assigned into four groups: control (n = 5), sodium citrate (n = 5), lead (n = 5) and a mixture of sodium citrate with lead (n = 5).

### **Exposure**

The sodium citrate group received 2.2 mg/kg of sodium citrate (proportional to that existing in blood bags), the lead group received 3 mg/kg of lead acetate (according to dosages used in studies available in the literature)<sup>[39]</sup>, the lead plus sodium citrate group received 3 mg/kg of lead acetate and 2.2 mg/kg of sodium citrate, respecting an administration volume equivalent to 1 mL/kg, and all were compared to a single control group that received saline in a similar volume. The route of administration of the respective solutions was intraperitoneal.

Behaviors indicating CNS depressing and stimulating activity and autonomic manifestations were observed. The indicative signs of toxicity observed were altered locomotion, reaction to stimuli, piloerection, diarrhea, sialorrhea, tremor, ptosis, altered muscle tone, hypnosis, convulsions and abdominal contortions. Lethality was observed within the first 24 hours after administration.

The rats remained for 24 hours in a metabolic cage prior to exposure for ambience. Urine was collected at the end of 24 hours for comparison after exposure.

After acclimatization, the rats spent 48 hours in the metabolic cage and urine was collected at the end of 24 hours and at the end of 48 hours. The rats were euthanized by anesthetic overdose with sodium thiopental (120 mg/kg) intraperitoneally. After checking the absence of reflexes, the rat was incised in the abdomen, blood was collected from the vena cava and the organs were removed (liver, kidneys, brain and bone marrow) and their masses measured. All organs were inspected for possible macroscopic changes and were frozen and kept at -80 °C or -20 °C for further analysis of lead deposition (liver, kidneys and brain) and micronucleus test (bone marrow).

### **Biochemical parameters.**

Part of the collected blood was stored in tubes for biochemical analysis, without the presence of anticoagulant. This sample was centrifuged, the serum was obtained and tested using Bioclin® commercial kits for the serum concentration of urea, creatinine and transaminases (AST and ALT).

### **Determination of delta-aminolevulinic acid (ALA-U) in urine.**

In the urines basal, 24 and 48 hours, the determination of delta-aminolevulinic acid (ALA-U) was performed according to Tomokuni and Ogata (1972) <sup>[18]</sup>.

### **Determination of systemic levels of delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D)**

Part of the blood was collected in a specific tube for analysis of metal traces. In this blood, the determination of delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) was performed using the European Standardized Method (Berlin & Schaller, 1974) <sup>[19]</sup>.

### **Micronucleus test (MN) in bone marrow cells**

In all animals, the preparations for the study of the frequency of micronucleus (MN) in bone marrow cells were performed according to the sequence suggested by Schmid (1975)<sup>[20]</sup> with modifications.

The slides were analyzed by immersion optical microscopy. Immature polychromatic erythrocytes (PCE) were stained in light blue and mature normochromatic erythrocytes (NCE) were stained with tile red. The presence or absence of a micronucleus (MN) was observed, through the formation of small points close to the cell nucleus (Choy 2001) <sup>[21]</sup>.

One thousand cells were counted for each sample, in duplicate. The results were expressed as the frequency of MN in 1000 cells.

## **Lead Determination**

### **Preparation of the whole blood sample**

The whole blood was diluted with a diluent chosen according to the literature. 100  $\mu\text{L}$  of whole blood was mixed with 300  $\mu\text{L}$  of 0.1% (v/v) Triton X-100 solution acidified with 0.2% (v/v) nitric acid in vials of the equipment's automatic sampler immediately before analysis. All readings were performed in triplicate <sup>[22]</sup>.

### **Preparation of the urine sample**

Urine samples of basal, 24 and 48 hours underwent decomposition with nitric acid to minimize the matrix effect. For this, 300  $\mu\text{L}$  of concentrated nitric acid was added to 0.5 mL of urine. After that, the sample was heated in a water bath for 4 hours and the volume made up to 4 mL with deionized water. All readings were performed in triplicate.

### **Preparation of the tissue sample**

The tissues were lyophilized, using the LIOTOP L101 lyophilizer and then weighed again and macerated in an agate grail. Approximately 0.12 g of tissue was weighed and transferred to conical plastic tubes and 500  $\mu\text{L}$  of concentrated nitric acid was added for sample decomposition. The mixture was left to act overnight and then heated for 4 hours. Afterwards, 300  $\mu\text{L}$  of hydrogen peroxide was added and left to stand overnight. The final volume was made up to 4 mL with deionized water and the lead was measured directly in the solution by GF AAS. All readings were performed in triplicate.

## **Reference materials**

Certified blood samples from the European Commission – Institute for Research Materials and Measurements, Certified Reference Material – BCR 634 were analyzed.

## **Instrumentation**

Lead was determined by Atomic Absorption Spectrometry in a Graphite Furnace (GF AAS). All measurements were performed with the Perkin Elmer equipment (Norwalk, CT,

USA) PinAAcle 900T equipped with HGA 800 graphite furnace and an AS-72 autosampler and the background correction system was based on the Zeeman Effect. A hollow lead cathode lamp (Perkin Elmer) was used with a wavelength of 283.3 nm.

The volume of the diluted sample and the calibration solutions pipetted into the atomizer was 10  $\mu\text{L}$ . 5  $\mu\text{g}$  of Pd and 3  $\mu\text{g}$  of  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  were used as chemical modifiers, with a total volume of 8  $\mu\text{L}$ . Argon, 99.996% (White Martins, Porto Alegre, Brazil) was used as a purge gas.

The analysis conditions for AAS were experimentally optimized at different temperatures of pyrolysis (600 to 1300°C) and atomization (1800 to 2200°C) using a blood sample fortified with 10  $\mu\text{g}/\text{L}$  of lead. The optimized conditions are described in Table 1.

**Table 1: Scheme of graphite furnace time/temperature program.**

Step	Name	Temp (°C)	Ramp (°C)	Hold (s)	Gas flow rate mL min <sup>-1</sup>
1	Drying	150	15	30	250
1	Drying	250	40	40	250
2	Pyrolysis	1000	20	30	250
3*	Atomization	2000	0	3	0
4	Cleaning	2450	1	3	250

\*Read in this step; Pb.

### Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS software (SPSS version 21.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). First, the normality was evaluated using the Kolmogorov-Smirnov test. Then, the variables that presented normal distribution were tested by one-way ANOVA followed by Bonferroni and those without normal distribution were analyzed by Kruskal Wallis followed by Dunn's test, both considering a 95% confidence.

For the statistical analysis of lead determination by GF AAS, values lower than the detection limit (LOD) were replaced by half the value of the LOD, according to Jung KH et al, 2014 [23].

## RESULTS

Regarding the animals' behavior after treatment with lead, citrate or both, compared to a control group, no clinical signs of manifestation of excitement, depression or autonomic changes were observed neither lethality.

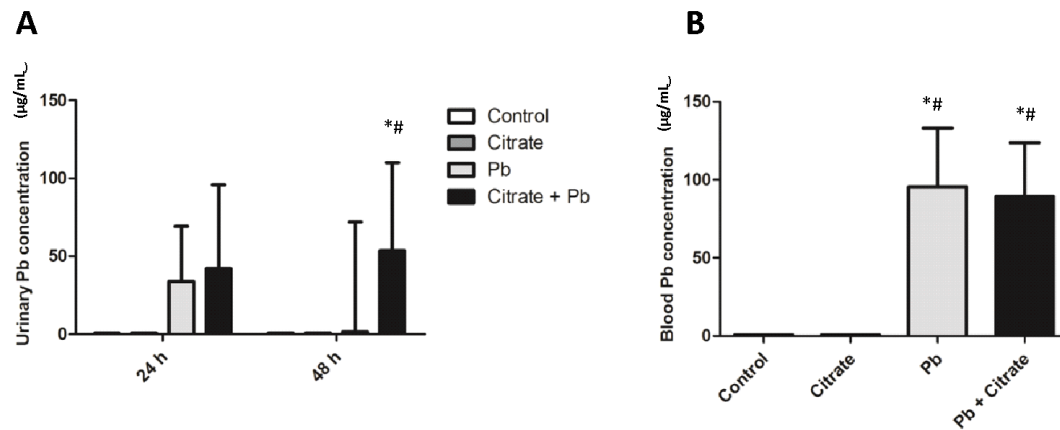
Lead deposition in tissues and their presence in urine and blood were assessed using atomic absorption spectrometry with a graphite furnace (GF AAS) in each sample. For this, the method used to determine lead concentration was previously optimized for pyrolysis and atomization temperature conditions, reagents and calibration curves. Ideal conditions to be used for sample analysis, with the lowest matrix residue in the graphite furnace and the best reading sensitivity, are shown in Table 2, including the merit parameters for determining lead.

**Table 2: Merit parameters in the determination of Pb by GF AAS**

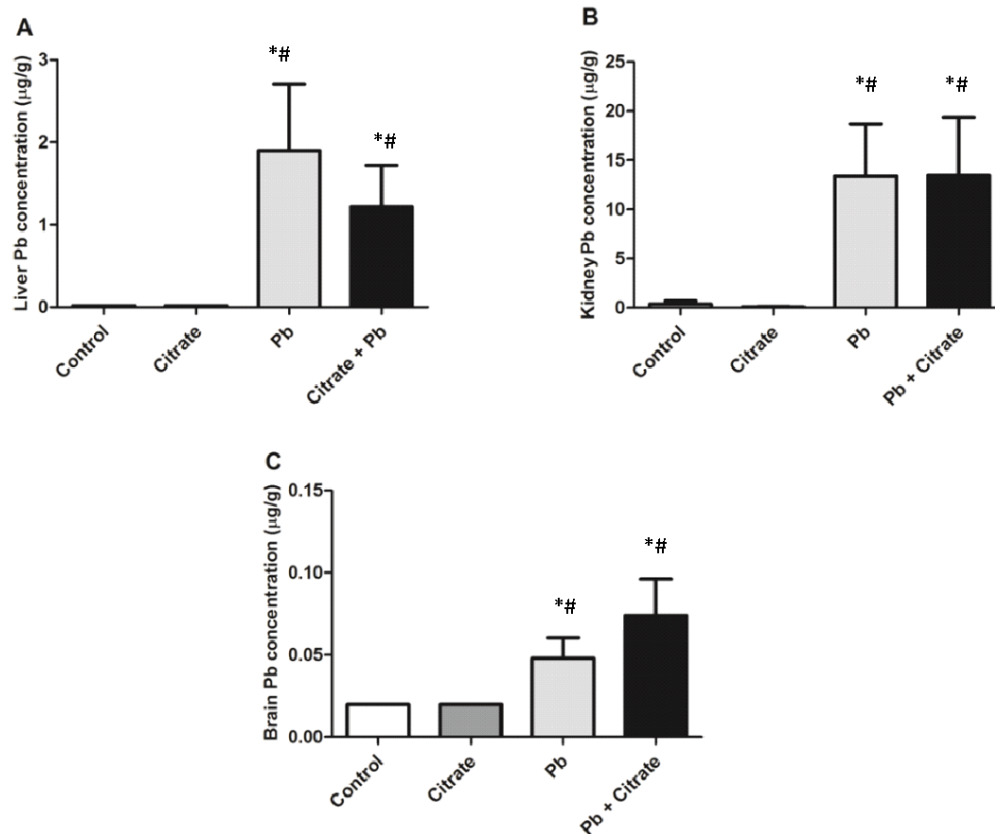
<b>Merit parameters in the determination of Pb by GF AAS</b>	
<b>Calibration curve</b>	Abs Int (s) = 0.0012 CPb + 0.001
<b>R<sup>2</sup></b>	0.9983
<b>LOD</b>	1.34 µg/L
<b>LOQ</b>	4.479 µg/L
<b>Characteristic Mass</b>	30 pg

Figures 1 and 2 shows the results of the GF AAS in each group. The control and sodium citrate groups did not show significant lead concentrations in any matrix, while the lead and lead plus sodium citrate groups showed high lead values in all evaluated matrices.

The results indicate that sodium citrate induces a significant increase in urinary excretion and, although it does not reach statistical significance, this increase seems to be related to lower blood concentrations and hepatic deposition; however, sodium citrate was able to increase the brain's lead concentration (Figures 1 and 2).



**Figure 1.** Lead (Pb) concentration in body fluids after treatment with citrate, Pb and citrate + Pb. **(A)** Urinary Pb concentration ( $\mu\text{g/mL}$ ) in 24h ( $p=0.111$  - One-Way ANOVA) and 48h ( $p=0.048$  - Kruskal-Wallis); **(B)** Blood Pb concentration ( $\mu\text{g/mL}$ ) in 48h ( $p=0.020$  - One-Way ANOVA). Each column represents the mean  $\pm$  SEM (urine 24h and blood 48h) or median  $\pm$  quartis (urine 48h). Statistical comparisons were made using one-way ANOVA (blood and urine 24h) or Kruskal Wallis (urine 48h) followed by Bonferroni or Dunn's post hoc tests, respectively (\* $p < 0.05$  vs control; # $p < 0.05$  vs citrate).



**Figure 2.** Lead (Pb) concentration in tissues after treatment with citrate, Pb and citrate + Pb. **(A)** Liver Pb concentration ( $\mu\text{g/g}$ ),  $p=0.030$  - one-way ANOVA/Bonferroni; **(B)** Kidney Pb concentration ( $\mu\text{g/g}$ ),  $p=0.025$  - Kruskal Wallis/Dunn's test; **(C)** Brain Pb concentration ( $\mu\text{g/g}$ ),  $p=0.024$  - one-way ANOVA/Bonferroni. Each column represents the mean  $\pm$  SEM (liver and brain) or median  $\pm$  quartis (kidney). Statistical comparisons were made using one-way ANOVA/Bonferroni post-hoc test (liver and brain) or Kruskal Wallis/Dunn's test (kidney), (\* $p < 0.05$  vs control; # $p < 0.05$  vs citrate).

Biochemical parameters of the liver and kidney function and also, lead exposure markers are demonstrated in Table 3. There were no statistically significant differences in any of the evaluated parameters ( $P > 0.05$ , one-way ANOVA or Kruskal-Wallis).

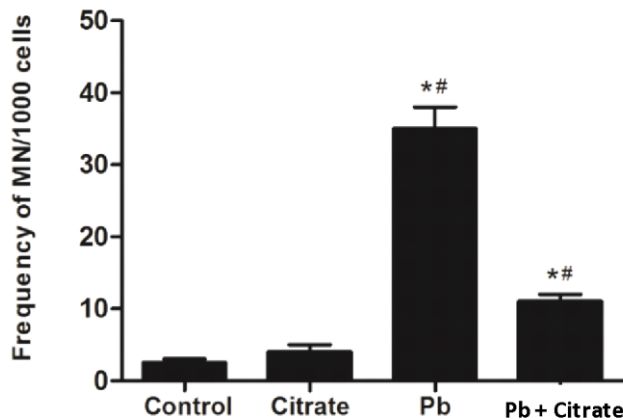
**Table 3: Biochemical parameters measured in serum after acute intraperitoneal treatment with lead and or citrate in Wistar rats.**

	Matri x	Control	Citrate	Lead	Lead + Citrate	P (Test)
<b>ALA-U Basal<sup>1</sup></b>	Urine	0.94 $\pm$ 0.29	0.97 $\pm$ 0.405	1.29 $\pm$ 0.28	1.00 $\pm$ 0.32	0.837 (One Way ANOVA)
<b>ALA-U 24h<sup>1</sup></b>	Urine	2.41 $\pm$ 0.44	2.13 $\pm$ 1.17	1.26 $\pm$ 0.64	2.02 $\pm$ 0.62	0.649 (One Way ANOVA)
<b>ALA-U 48h<sup>1</sup></b>	Urine	2.14 $\pm$ 1.58	3.02 $\pm$ 0.19	3.94 $\pm$ 0.45	8.58 $\pm$ 6.30	0.409 (One Way ANOVA)
<b>ALA-D<sup>1</sup></b>	Blood	0.82 $\pm$ 0.29	1.39 $\pm$ 0.18	1.41 $\pm$ 0.09	1.67 $\pm$ 0.195	0.056 (One Way ANOVA)
<b>Urea<sup>2</sup></b>	Serum	56 (48:59)	49 (47.5:53.5)	50 (45.5:51.5)	53 (46.5:60)	0.327 (Kruskal-Wallis)
<b>Creatinine 1</b>	Serum	0.47 $\pm$ 0.06	0.41 $\pm$ 0.026	0.42 $\pm$ 0.028	0.44 $\pm$ 0.033	0.720 (One Way ANOVA)
<b>AST<sup>2</sup></b>	Serum	108 (90.75:139.5 )	78.5 (68.5:120.8)	77 (72:105)	87 (85.5:114)	0.224 (Kruskal-Wallis)
<b>ALT<sup>2</sup></b>	Serum	50 (38:66.5)	37 (35.5:56.5)	45 (42:50.5)	52 (42:71.5)	0.357 (Kruskal-Wallis)

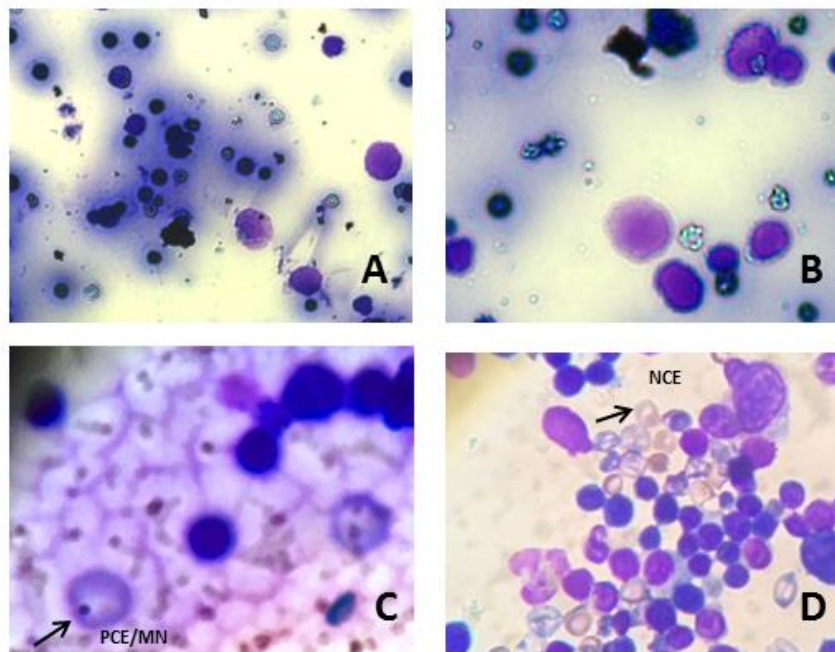
<sup>1</sup> Normal Distribution ( $P > 0.05$ , Kolmogorov-Smirnov)

<sup>2</sup> Doesn't show normal distribution ( $P < 0.05$ , Kolmogorov-Smirnov)

The micronucleus test, indicative of chromosomal damage, was performed on the bone marrow of the animals. As shown in Figures 3 and 4, there was an increased presence of micronuclei in the lead group and a decrease when associated with citrate.



**Figure 3.** Polychromatic erythrocytes (PCE)/erythrocyte normochromic (NCE) ratio per thousand cells per animal a 14 day of study. The mean frequency of the PCE/NCE ratio was analyzed by the one-way ANOVA, followed by Tukey's test.  $*p < 0.05$  compared to control group;  $\#p < 0.05$  compared to citrate group.



**Figure 4:** Microscope image of bone marrow cells showing normochromatic erythrocyte (NCE) as well as polychromatic erythrocyte (PCE) cells. **(A)** Control group; **(B)** Citrate group **(C)** Pb group – one PCE contains a micronucleus (MN) indicated by arrow and **(D)** Citrate + Pb group – contains NCE cells. These images were captured at 100x under oil immersion objective.

## DISCUSSION

In order to investigate the influence of sodium citrate on lead kinetics in animal model, lead acetate, sodium citrate and both substances were intraperitoneal administrated to rats. The lead concentrations were measured in blood, urine, and tissues, and also, the urine and blood biochemical markers were evaluated, as well as the genotoxic effects in bone marrow cells.

This study demonstrated that the lead citrate complex was able to alter the bioavailability of this metal in blood, improve their urinary excretion, and also change the lead deposition in the tissues of rats. The lead citrate complex reduced the hepatic deposition and increase the brain lead concentrations; however these effects do not show statistical significance, probably because the little number of animals in each experimental group.

The presence of citrate can improve the bioavailability of lead in the blood, by forming a complex with the metal, preventing the binding of lead to erythrocytes <sup>[9, 11]</sup>. The metals mobilization in biological fluids requires the presence of organic ligands, capable to promoting the coordination complexes formation, which can allow metals absorption or retention, if they produce high steric impediment structures. As mentioned earlier, sodium citrate is among organic molecules that have the ability to solubilize metal ions in plasma and increase their absorption. Clinical studies over the years have shown that citrate contributes to lead absorption <sup>[9, 10, 11]</sup>.

Citrate forms stable complexes with numerous divalent metal ions and is considered a ligand of small and prominent molecular weight in human plasma <sup>[11, 16]</sup>. The synthesis and isolation of the first Pb citrate species confirm the citrate's ability to bind, coordinate and subsequently solubilize this metal ion with low pH values. In addition, complexation provides the gateway to new species, which emerge soluble in physiological pH values - thus possibly increasing the absorption of Pb(II) by biological tissues, and also, the toxic effects occurrence <sup>[10, 11]</sup>.

The biological activity of citrate is recognized as a metal complexing agent, although the literature references regarding the passage of the complexed form with lead through the

blood-brain barrier are limited <sup>[24]</sup>. The blood-brain barrier plays a fundamental role in maintaining central nervous system (CNS) homeostasis and is able to block the transport of harmful substances from blood and cerebrospinal fluid <sup>[24, 25]</sup>. Excessive exposure to lead can cause multiple harmful effects to the various systems of the human body. It can also affect several CNS structures, and the blood-brain barrier is the primary target of lead <sup>[26, 27]</sup>. Previous studies have already shown that *in vivo* exposure to lead can affect and compromise the permeability of the blood-brain barrier and the blood-cerebrospinal fluid barrier <sup>[28, 29]</sup>. This effect was mediated, in part, by the divalent metal transporter 1 (DMT1) and the iron response element (IRE), as well as by the intracellular iron levels <sup>[29]</sup>. DMT1 is a protein that has 12 transmembrane domains and is capable of transporting several divalent metals, such as iron and lead <sup>[30, 31]</sup>.

Other studies also show that lead can affect the expression of junction proteins (Tight junctions) <sup>[31, 32]</sup>.

The blood-brain barrier has properties that limit the diffusion of non-lipophilic molecules into or out of the brain. The mechanisms of substance distribution across cell membranes include diffusion and transport mediated by transporters, and diffusion across endothelial cell membranes is usually limited to small (<700 dalton) and lipophilic molecules. The distribution of metals across the blood-brain barrier is likely to occur via membrane transporters <sup>[33, 34]</sup>.

Low molecular weight and lipophilic substances pass through the blood-brain barrier by diffusion. However, there are still efflux pumps such as glycoprotein to return them to circulation. The lead must pass attached to carriers in calcium channels, being in the form of a free ion or complexed to low molecular weight molecules. Citrate, in turn, has a low molecular weight and is also capable of blocking calcium, which also facilitates the passage of metals through transporters in the membrane <sup>[34, 35]</sup>.

In relation to the biochemical markers, although ALA-U showed a significant increase due to the increase in urinary lead excretion, this did not show a significant difference between the lead group and lead plus citrate, and ALA-D did not show the expected reduction in its activity, as demonstrated in other studies <sup>[12, 36]</sup>, in the groups exposed to the lead, or that associated with citrate.

On the other hand, the genotoxic effects on the bone marrow was significantly reduced by the association with sodium citrate. Micronucleus evaluation provides an idea of the clastogenic potential of any agent, as it emerges from centric chromosomal fragments or entire chromosomes, which are left behind during cell division <sup>[37]</sup>. Alghazal et al. (2008) and

Jagetia and Aruna (1998) <sup>[37, 38]</sup> have previously demonstrated that lead causes an increase in the number of micronuclei present in the bone marrow of rats. The increase in the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes and the decrease in the proportion of polychromatic to normochromatic erythrocytes demonstrates the cytotoxic and genotoxic effects of lead <sup>[37, 38]</sup>. Our results also show the presence of micronuclei in rats treated with lead acetate, however in the group with the association of lead with citrate the presence of micronuclei decreased, suggesting that Pb-citrate complex prevents the binding of Pb to the erythrocytes, avoiding genotoxic damage <sup>[9, 11]</sup>.

## **CONCLUSION**

In conclusion, the clinically relevant aspect in this study was that sodium citrate appears to increase the ability of lead to cross the blood-brain barrier, although it protects against lead-induced genotoxicity in bone marrow. Therefore, further studies are needed to evaluate the transfer of Pb through the blood-brain barrier mediated by citrate, as well as its effects on the nervous system. It is also necessary to evaluate the possible beneficial effects of sodium citrate in hemotherapy bags, in relation to the possible presence of lead in the components of the bags or even from the occupationally exposed donor.

## REFERENCES

- 1 – WHO (2010) Towards 100% Voluntary Blood Donation: A Global Framework for Action. World Health Organization. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44359/1/9789241599696\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44359/1/9789241599696_eng.pdf?ua=1). Acesso em: 06/01/2019.
- 2 – Brasil (2007) Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Hemovigilância: manual técnico para investigação das reações transfusionais imediatas e tardias não infecciosas. – Brasília: 124 p.
- 3 – Brasil (2011) REDE DE SERVIÇO TECNOLÓGICOS PARA SANGUE E HEMODERIVADOS (REDSANGUE) – Sistema Brasileiro de Tecnologia (SIBRANTEC). - Manual para controle da qualidade do sangue total e hemocomponentes. São Paulo.
- 4 – Brasil (2015) Ministério Da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. **Guia para o uso de hemocomponentes**. Série A. Normas e Manuais Técnicos. 136p. ISBN 978-85-334-2161-5.
- 5 - OLIVEIRA, C. T. (2012) Aplicação do policloreto de vinila (PVC) em substituição aos materiais convencionais da Construção Civil e Arquitetura. Monografia. Faculdade de Tecnologia Sorocaba, Sorocaba.
- 6 - JÚNIOR, R. A.; NUNES, L. R.; ORMANJI, W. (2002) Tecnologia do PVC. São Paulo: Pro Editores/Braskem. p. 95. 400 p.
- 7 - SMITH, W. F.; HASHEMI, J. (2012) Fundamentos de Engenharia e Ciências dos Materiais. 5. ed. Porto Alegre: McGraw-Hill Brasil.
- 8 - RODOLFO, J.R.; A.; MEI, L. H. I. (2007) Mecanismos de degradação e estabilização térmica do PVC. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 17:263-275.
- 9 - KETY, S. S. (1942) The lead citrate complex ion and its role in the physiology and therapy of lead poisoning. *J. Biol. Chem.* 142:181-.
- 10 - KOURGIANTAKIS, M.; MATZAPETAKIS, M.; RAPTOPOULOU, C.P.; TERZIS, A.; SALIFOGLU, A. (2000) Lead–citrate chemistry. Synthesis, spectroscopic and structural studies of a novel lead(II)–citrate aqueous complex. *Inorganica Chimica Acta*. 297:134–138.
- 11 - CHU, C.; DARLING, K.; NETUSIL, R.; DOYLE, R.P.; ZUBIETA, J. (2011) Synthesis and structure of a lead(II)–citrate:  $\{Na(H_2O)_3\}[Pb_5(C_6H_5O_7)_3(C_6H_6O_7)(H_2O)_3] \cdot 9.5H_2O$ . *Inorganica Chimica Acta*. 378:186–193.
- 12 - MOREIRA, F. R.; MOREIRA, J. C. (2004) Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde. *Panam Salud Publica*, 15:119-129.
- 13 - WHO - World Health Organization. (1995) Inorganic Lead. *Environmental Health Criteria* 165. International Programme on Chemical Safety. Geneva. 300 p.
- 14 - SANDSTRÖM, B.; KIVISTÖ, B.; CEDERBLAD, A. (1987) Absorption of Zinc from Soy Protein Meals in Humans. *The Journal of Nutrition*, 117:321–327.
- 15 - NOLAN CR, DEGOES JJ, ALFREY AC. (1994) Aluminum and lead absorption from dietary sources in women ingesting calcium citrate. *Southern Medical Journal*. 87:894-898.
- 16 - BOTTARI, E.; VICEDOMINI, M. (1973) On the complex formation between lead (II) and citrate ions in acid solution. *J. Inorg. Nucl. Chem.* 35:1657.
- 17 - OECD, Test No. 420: Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure, OECD Publishing, 2002. <https://doi.org/10.1787/20745788>

- 18 - TOMOKUNI K, OGATA M. (1972) Simple method for determination of urinary -aminolevulinic acid as an index of lead exposure. *Clin Chem.* 18(12):1534-1538.
- 19 - BERLIN, A.; SCHALLER, K.H. (1974) European standardized method for the determination of d-aminolevulinic acid dehydratase activity in blood. *Zeitschrift fuer Klinische Chemie und Klinische Biochemie*, Berlin, 12:389-390.
- 20 - SCHMID, W. (1975) The micronucleus test. *Mutation Research*, Amsterdam, 31:9-15.
- 21 - CHOY, W.N. (2001) Regulatory Genetic toxicology tests. In: *Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment* (Choy, W.N. ed.), Marcel Dekker, Inc, New York, 93-113.
- 22 - WÓJCIAK-KOSIOR M, SZWERC W, STRZEMSKI M, WICHŁACZ Z, et al. (2017) Optimization of high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for direct analysis of selected trace elements in whole blood samples, *Talanta*, 165:351-356. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2016.12.077>
- 23 - JUNG KH, LUI B, LOVINSKY-DESIR S, et al (2014) Time Trends of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Exposure in New York City from 2001 to 2012: Assessed by Repeat Air and Urine Samples. *Environ Res.* 131:95–103. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.02.017>.
24. SCHNEEBERGER EE, LYNCH RD (2004) The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol*; 286:C1213-C1228
25. TSUKITA S, FURUSE M, ITOH M. (2001) Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 2:285-293
26. LIU KS, HAO JH, ZENG Y, DAI FC, GU PQ (2013) Neurotoxicity and biomarkers of lead exposure: a review. *Chin Med Sci J*; 28:178-188
27. BARANOWSKA-BOSIACKA I, GUTOWSKA I, RYBICKA M, NOWACKI P, CHLUBEK D (2012) Neurotoxicity of lead. Hypothetical molecular mechanisms of synaptic function disorders. *Neurol Neurochir Pol*; 46:569-578
28. WANG Q, LUO W, ZHANG W, et al. (2011) Involvement of DMT1 +IRE in the transport of lead in an in vitro BBB model. *Toxicol in Vitro*; 25:991-998
29. SU P, ZHAO F, CAO Z, et al. (2015) Mir-203-mediated tricellulin mediates lead-induced in vitro loss of blood-cerebrospinal fluid barrier (BCB) function. *Toxicol in Vitro*; 29:1185-1194.
30. GUNSHIN, H., MACKENZIE, B., BERGER, U.V., GUNSHIN, Y., ROMERO, M.F., BORON, W.F., Nussberger, S., Gollan, J.L., Hediger, M.A., (1997). Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388, 482–488.
31. LIU X, SU P, MENG S, ASCHNER M, CAO Y, LUO W, ZHENG G, LIU M. (2017) Role of matrix metalloproteinase-2/9 (MMP2/9) in lead-induced changes in an in vitro blood-brain barrier model. *Int J Biol Sci.* 13(11):1351-1360. doi: 10.7150/ijbs.20670.
32. WANG Q, LUO W, ZHANG W, et al. (2007) Iron supplementation protects against lead-induced apoptosis through MAPK pathway in weanling rat cortex. *Neurotoxicology*; 28:850-859
33. W. PARDRIDGE (2003) Blood-brain barrier drug targeting: The future of brain drug development, *Mol. Interventions* 3:90–105.
34. R.A. YOKEL (2006) Blood-brain barrier flux of aluminum, manganese, iron and other metals. *Journal of Alzheimer's disease.* 10: 223–253

35. R. DEANE, S.H. PARK AND M.W. BRADBURY (1986) Effect of intravenous ferric or aluminum chloride on the uptake of  $^{203}\text{Pb}$  into brain and other soft tissues of rats, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 239:548–553.
36. FERNÍCOLA NAGG e AZEVEDO FA. (1981) Níveis de chumbo e atividade da desidratase do ácido-aminolevulínico (ALA-D) no sangue da população da grande São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde Púb, São Paulo.* 15:272-282
37. ALGHAZAL MA, ŠUTIÁKOVÁ I, KOVALKOVIČOVÁ N, LEGÁTH J, FALIS M, PISTL J, SABO R, BEŇOVÁ K, SABOVÁ L AND VÁCZI P (2008) Induction of micronuclei in rat bone marrow after chronic exposure to lead acetate trihydrate. *Toxicology and Industrial Health*; 24:587–593.
38. JAGETIA GC, ARUNA R. (1998) Effect of various concentrations of lead nitrate on the induction of micronuclei in mouse bone marrow. *Mutation Research* 415:131–137.
39. OJO, O. A. induced toxicity in Experimental Rats ceptet. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 0, n. 0, p. 000, 2018. Taylor & Francis. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/15376516.2018.1558321>>.

## 6. CONCLUSÃO

A exposição aguda intraperitoneal de ratos Wistar ao chumbo revelou a presença de altas concentrações deste metal na urina, sangue e tecidos dos animais expostos e, quando associado ao citrato, foi possível verificar que a excreção urinária de chumbo foi significativamente aumentada, embora aparente redução hepática e proteção contra a genotoxicidade induzida pelo metal na medula óssea, a concentração cerebral tende a aumentar, mesmo em concentrações em que não houve alterações bioquímicas de função renal e hepática nem nos marcadores de exposição ao chumbo. Sendo assim, os achados deste estudo corroboram com a hipótese de que apesar do citrato se complexar ao chumbo no sangue e aumentar sua excreção urinária, este, também altera sua deposição nos tecidos, facilitando seu acesso ao tecido cerebral viabilizando a ocorrência de efeitos neurotóxicos.

## **7. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Considerando a alta toxicidade do chumbo, sendo capaz de induzir alterações em quase todos os órgãos e sistemas orgânicos, e que, o citrato forma complexos com este metal alterando sua cinética, é imprescindível a monitorização das quantidades de chumbo presentes nos hemocomponentes, advindas da migração dos plastificantes ou mesmo da exposição ocupacional dos doadores de sangue, para evitar possíveis reações transfusionais em pacientes que recebem transfusões sucessivas. Outrossim, é necessário, mais estudos que avaliem a capacidade do complexo citrato mais chumbo de atravessar barreiras como a hematoencefálica, uma vez que, o chumbo é reconhecido por sua neurotoxicidade. Os resultados deste estudo indicam a necessidade de investigar a concentração de chumbo presente nas bolsas utilizadas em hemoterapia, bem como no sangue de doadores potencialmente expostos a este metal, como forma de melhorar o controle de qualidade das bolsas e dos hemocomponentes e, conseqüentemente reduzir o risco ao qual pacientes transfundidos poderão estar expostos.

## 8. ANEXOS

### 8.1 Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais.



#### CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

##### PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA E ENSINO

1) PROTOCOLO Nº: 251/9

2) DATA DO PARECER: 13/03/2019

Parecer 623/19

3) TÍTULO DO PROJETO:

Influência do citrato de sódio na deposição de chumbo nos tecidos em modelo animal

4) PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Eliane Dalegrave

5) RESUMO DO PROJETO:

Trata-se de um projeto que avaliará o efeito do citrato de sódio e deposição do chumbo em ratos wistar. Este material é encontrado em bolsas para hemoterapia e seus efeitos para os seres humanos é pouco explorado. Por ser um produto liberado pela ANVISA é de extrema importância verificar se existe impacto na saúde humana auxiliando este órgão regulador na informação e tomada de decisão.

6) OBJETIVOS DO PROJETO:

Avaliar a influência do citrato de sódio na biodisponibilidade e depósito de chumbo nos tecidos de ratos após a administração intraperitoneal

7) FINALIDADE DO PROJETO:

Ensino  Pesquisa

8) ITENS METODOLÓGICOS E ÉTICOS DO PROJETO:

Título  Adequado  Comentários

Introdução  Adequada  Comentários

Objetivos  Adequados  Comentários

Relevância e Justificativa  Adequados  Comentários



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

**UFCSPA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

**Materiais e Métodos**  Adequados  Comentários

**Cronograma para execução da pesquisa**  Adequado  Comentários

**Orçamento e fonte financiadora**  Adequados  Comentários

**Referências Bibliográficas**  Adequadas  Comentários

9) O PROJETO ESTÁ ADEQUADO À LEGISLAÇÃO VIGENTE:

Sim  Não

10) INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS:

Grau de dor/estresse: B | C  D  E

*Justifique:*

Experimento que causa estresse, desconforto ou dor de leve intensidade

Espécie: Ratos wistar

Número Amostral: 20

Redução Amostral:  Sim  Não

*Justifique:*

Substituição de Metodologia:  Sim  Não

*Se achar necessário, justifique e sugira uma nova metodologia:*

Aprimoramento da Metodologia:  Sim  Não

*Se achar necessário, justifique e sugira aprimoramentos da metodologia:*

Acomodação e manutenção dos animais:  Adequada  Inadequada

*Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:*



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

**UFCSPA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

**Manipulação dos animais:**  Adequada  Inadequada

*Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:*

**Analgesia dos animais (se aplicável):**  Adequada  Inadequada

*Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com analgésico substituto:*

**Anestesia dos animais (se aplicável):**  Adequada  Inadequada

*Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com anestésico substituto:*

**Eutanásia dos animais (se aplicável):**  Adequada  Inadequada

*Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com metodologia substituta:*

**Local de Realização (Biotério/Labotatório):** Biotério, prédio 3

Outra instituição. Qual?

**11) CRONOGRAMA DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS**

Data 02/2019      Espécie Rato      Sexo não especificado      Quantidade 20

**12) RECOMENDAÇÃO:** As pendências deverão ser respondidas em uma carta, indicando as páginas do projeto que foram alteradas (nova versão), assinadas pelo pesquisador responsável.

Aprovado

Com Pendência

Não aprovado

Data de início 03/2019      Data de Término 07/2020



COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA  
UFCSA

A Comissão de Ética no uso de Animais, analisou o Projeto:

**Projeto:** 19-251

**Versão do Projeto:**

**Versão do TCLE:**

**Pesquisadores:**

ELIANE DALLEGRAVE

PEDRO ROOSEVELT TORRES ROMÃO

JÉSSICA FERRARI

EMILENE MENDES BECKER

DENISE BOHRER DO NASCIMENTO

**Título:** INFLUÊNCIA DO CITRATO DE SÓDIO NA DEPOSIÇÃO DE CHUMBO NOS TECIDOS  
EM  
MODELO ANIMAL

Este projeto foi aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos. Todo e qualquer alteração do projeto, assim com eventos adversos graves, deverão ser comunicados a esta CEUA.

Porto Alegre, 26 de março de 2019.

Profa. Fernanda Bastos de Mello  
Dept. de Farmacociências  
UFCSA

## **8.2 Anexo 2: Normas da Revista**

### **Biological Trace Element Research**

**QUALIS CAPES – Medicina I – B1**

**Impact Factor: 2.431**

#### **Submission guidelines**

##### **Manuscript Submission**

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

##### **Permissions**

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

##### **Online Submission**

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Please ensure you provide all relevant editable source files. Failing to submit these source files might cause unnecessary delays in the review and production process.

##### **Title Page**

Please use this template title page for providing the following information.

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) of the author(s), i.e. institution, (department), city, (state), country

- A clear indication and an active e-mail address of the corresponding author
- If available, the 16-digit ORCID of the author(s)
- If address information is provided with the affiliation(s) it will also be published.
- For authors that are (temporarily) unaffiliated we will only capture their city and country of residence, not their e-mail address unless specifically requested.

### **Abstract**

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

For life science journals only (when applicable)

Trial registration number and date of registration

Trial registration number, date of registration followed by “retrospectively registered”

### **Keywords**

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

### **Declarations**

All manuscripts must contain the following sections under the heading 'Declarations'.

If any of the sections are not relevant to your manuscript, please include the heading and write 'Not applicable' for that section.

- To be used for non-life science journals

**Funding** (information that explains whether and by whom the research was supported)

**Conflicts of interest/Competing interests** (include appropriate disclosures)

**Availability of data and material (data transparency)**

**Code availability** (software application or custom code)

**Authors' contributions** (optional: please review the submission guidelines from the journal whether statements are mandatory)

- To be used for life science journals + articles with biological applications

**Funding** (information that explains whether and by whom the research was supported)

**Conflicts of interest/Competing interests** (include appropriate disclosures)

**Ethics approval** (include appropriate approvals or waivers)

**Consent to participate** (include appropriate statements)

**Consent for publication** (include appropriate statements)

**Availability of data and material** (data transparency)

**Code availability** (software application or custom code)

**Authors' contributions** (optional: please review the submission guidelines from the journal whether statements are mandatory)

Please see the relevant sections in the submission guidelines for further information as well as various examples of wording. Please revise/customize the sample statements according to your own needs.

### **Text Formatting**

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

[LaTeX macro package \(Download zip, 188 kB\)](#)

### **Headings**

Please use no more than three levels of displayed headings.

### **Abbreviations**

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

### **Footnotes**

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

### **Acknowledgments**

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

### **Scientific style**

Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).

Nomenclature: Insofar as possible, authors should use systematic names similar to those used by Chemical Abstract Service or IUPAC.

Genus and species names should be in italics.

Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.

Please use the standard mathematical notation for formulae, symbols, etc.:  
Italic for single letters that denote mathematical constants, variables, and unknown quantities  
Roman/upright for numerals, operators, and punctuation, and commonly defined functions or abbreviations, e.g., cos, det, e or exp, lim, log, max, min, sin, tan, d (for derivative)  
Bold for vectors, tensors, and matrices.

### **References**

#### **Citation**

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

#### **Reference list**

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and

unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

### **Journal article**

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

### **Article by DOI**

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. <https://doi.org/10.1007/s001090000086>

### **Book**

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

### **Book chapter**

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

### **Online document**

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

### **Dissertation**

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

[ISSN.org LTWA](http://www.issn.org/LTWA)

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

[EndNote style \(Download zip, 4 kB\)](#)

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file spbasic.bst which is included in Springer's LaTeX macro package.

## Tables

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

## Artwork and Illustrations Guidelines

### Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

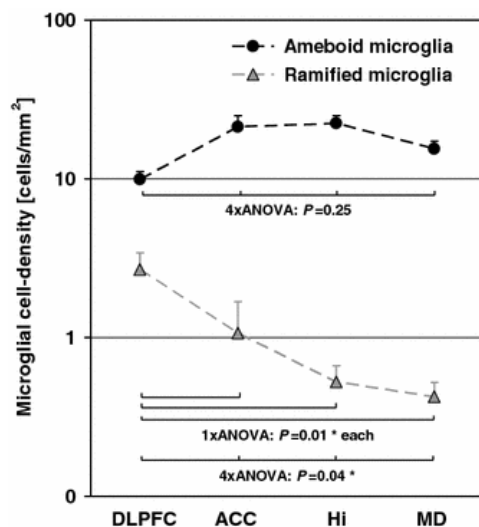
Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

### LineArt



Definition: Black and white graphic with no shading.

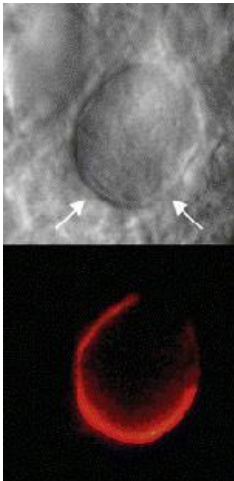
Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

### HalftoneArt

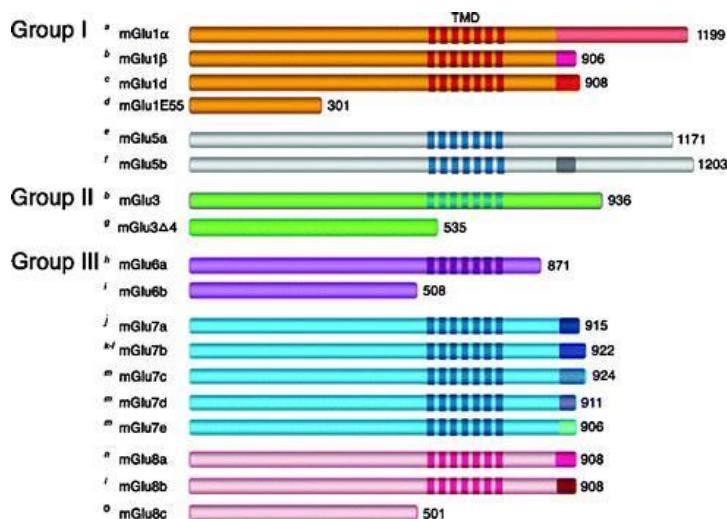


Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

### CombinationArt



Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

## Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

## Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions within your illustrations.

## Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

## Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

### **Figure Placement and Size**

Figures should be submitted separately from the text, if possible.

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For large-sized journals the figures should be 84 mm (for double-column text areas), or 174 mm (for single-column text areas) wide and not higher than 234 mm.

For small-sized journals, the figures should be 119 mm wide and not higher than 195 mm.

### **Permissions**

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.