

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

Alcides Ferreira Coradini

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE
METAIS NO SANGUE E SUA CORRELAÇÃO COM A LEUCEMIA
LINFOCÍTICA AGUDA**

Santa Maria, RS
2019

Alcides Ferreira Coradini

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE METAIS NO
SANGUE E SUA CORRELAÇÃO COM A LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Química**.

Orientador: Prof. Dr. Valderi Luiz Dressler


Santa Maria, RS
2019

Alcides Ferreira Coradini

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE METAIS NO SANGUE E SUA CORRELAÇÃO COM A LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Química**.

Aprovada em 26 de abril de 2019:



Valderi Luiz Dressler, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Edson Irineu Müller, Dr. (UFSM)

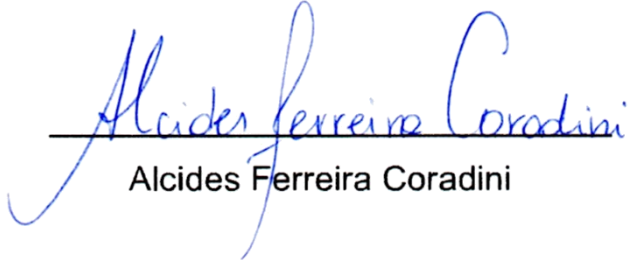


Sérgio Roberto Mortari, Dr. (UFN)

Santa Maria, RS
2019

Declaração

A pesquisa descrita nesta dissertação foi totalmente elaborada por mim e as informações retiradas da literatura estão devidamente referenciadas. Esta dissertação não foi apresentada anteriormente para obtenção de qualquer outro grau.


Alcides Ferreira Coradini

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE METAIS NO SANGUE E SUA CORRELAÇÃO COM A LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA

AUTOR: Alcides Ferreira Coradini
ORIENTADOR: Valderi Luiz Dressler

A leucemia linfocítica aguda (LLA) se caracteriza como uma doença hematológica que se origina durante o desenvolvimento de glóbulos brancos jovens, denominados linfócitos. Embora seja o tipo de câncer com o maior número de casos em crianças, adultos também podem ser diagnosticados com a doença. Em 2016, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), 10.070 novos casos (5.540 homens e 4.530 mulheres) foram diagnosticados no Brasil. O risco de desenvolvimento da doença para crianças apresenta um índice maior de incidência na idade de 2 a 5 anos. Para o combate da doença, recorre-se ao tratamento quimioterápico, onde diversos medicamentos são administrados com o intuito de destruir as células tumorais, geralmente por via venosa. Infelizmente, esses medicamentos não são seletivos e acabam causando danos a células saudáveis presentes no organismo. Desta maneira, o presente trabalho tem como objetivo determinar a concentração de alguns elementos presentes no sangue dos pacientes e correlacioná-los com possíveis danos colaterais ao longo do tratamento, uma vez que o decaimento ou aumento nas concentrações dos mesmos pode influenciar diretamente no desempenho de alguns órgãos, bem como, na homeostase do organismo como um todo. As amostras de sangue dos pacientes com LLA foram coletadas no Hospital Universitário de Santa Maria mediante consentimento do responsável, em diferentes estágios da doença. Devido a grande quantidade de amostras e volume reduzido, desenvolveu-se um método analítico para a decomposição de sangue utilizando um volume de apenas 250 μL em sistema aberto e frasco único descartável, utilizando uma mistura de HNO_3 e H_2O_2 1:1 e irradiação micro-ondas por um período total de 20 minutos. O desenvolvimento deste método se mostrou crucial para a decomposição do grande volume de amostra pela sua boa eficiência e rapidez. Para que se tenham resultados confiáveis, possíveis contaminantes metálicos nos frascos de coleta e anticoagulantes foram avaliados. Os elementos determinados foram As, Cu, Mn, Rb, Sb, Sr, V e Zn. Embora outros metais, como os elementos terras raras, tenham sido monitorados, sua quantificação não foi possível por estarem abaixo do limite de quantificação ou pela contaminação proveniente dos frascos de coleta e manuseio, como é o caso de Ca, Mg, Na e Al. As determinações da concentração dos elementos foram realizadas por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Além da determinação dos níveis de elementos presentes no sangue total de pacientes, testes de atividade enzimática para catalase também foram realizados com o intuito de correlacionar o efeito de uma possível redução nos níveis de metais com a eficiência das enzimas na redução da produção de espécies de oxigênio radicalar. Foi possível observar que pacientes com LLA possuem concentrações muito baixas de alguns elementos antes de iniciarem o tratamento da doença e que a concentração, ao chegarem à última etapa do tratamento, se aproxima muito da concentração do grupo controle. Os testes enzimáticos para catalase mostraram uma alta atividade para o início do tratamento e redução para etapas próximas ao final do tratamento, indicando uma possível redução na geração de espécies de oxigênio reativas geradas antes e durante o tratamento.

Palavras-chave: Leucemia. Sangue. Metais. ROS. ICP-MS.

ABSTRACT

METHOD DEVELOPMENT FOR DETERMINATION OF METALS IN BLOOD AND ITS CORRELATION WITH ACUTE LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

AUTHOR: Alcides Ferreira Coradini

ADVISOR: Valderi Luiz Dressler

Acute lymphocytic leukemia (ALL) is characterized as a hematological disease that originates during the development of young white blood cells, called lymphocytes. Although it is the type of cancer with the highest number of cases in children, however adults can also be diagnosed with the disease. In 2016, according to the National Cancer Institute (INCA), 10,070 new cases (5,540 men and 4,530 women) were diagnosed in Brazil. The risk of developing the disease for children has a higher incidence rate at the age of five and nine years. To treat the disease, chemotherapy is used, where several drugs are administered with the intention to destroy the tumor cells, usually by the venous route. Unfortunately, these drugs are not selective and can cause damage to healthy cells in the body. This work aims to determine the concentration levels of some elements present in whole blood of patients and to correlate it with possible collateral damages throughout the treatment, since the change in its concentrations of the same can influence directly in the performance of some organs, as well as in the homeostasis of the organism as a whole. Blood samples from patients with ALL were collected at Santa Maria University Hospital with the consent of the responsible person, reaching all different stages of the disease. In order to obtain reliable results, possible metal contaminants in the collection vials and anticoagulants were evaluated. The determinations of element concentration were performed by inductively coupled plasma mass spectrometry. In addition to determining the levels of elements present in the whole blood of patients, enzymatic activity tests for catalase were also performed in order to correlate the effect of a possible reduction in metal levels with the efficiency of the enzymes in reducing the production of reactive oxygen species (ROS). Due to the big amount of samples and reduced volume, a sample decomposition procedure was developed using only 250 mg in open system and single disposable vial. A mixture of 1: 1 HNO₃ and H₂O₂ was used and the samples were submitted to micro-wave irradiation for a period of 20 minutes. The development of this method proved to be crucial for the decomposition of a large number of samples, fast and has a good efficiency. The determined elements were Arsenic, Cu, Mn, Rb, Sb, Sr, V and Zn were quantified. Rare earth elements were monitored, but their concentration were below the limit of quantification or contamination, while high contamination of Ca, Mg, Na and Al was observed from the collection and sample handling. Elements were performed by inductively coupled plasma mass spectrometry. In addition, enzymatic activity assays for catalase were also performed in order to correlate the effect of a possible reduction in metal levels with the efficiency of the enzymes in reducing the production of radical oxygen. It was observed that patients with ALL have very low concentrations of the metals before starting the treatment of the disease. However at the end of the treatment, the concentration of the elements is mostly very close to the concentration of the control group. The catalase enzymatic assays showed a high activity for the beginning of the treatment and reduction towards the stages near the end of the treatment, indicating a possible reduction in the generation of ROS generated before and during the treatment.

Keywords: Leukemia. Blood. ROS. Metals. ICP-MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Avaliação da concentração de carbono nas soluções após tratamento das amostras com HNO ₃ e H ₂ O ₂ e utilizando micro-ondas convencional para aquecimento. A barra de erros corresponde a 1 SD dos resultados a partir de N = 3.	31
Figura 2 - Concentração de elementos em sangue total de pacientes em diferentes etapas do tratamento de LLA. Resultados obtidos utilizando ANOVA como tratamento estatístico, com intervalo de confiança de 95%.	42
Figura 3 - Concentração de Cu, Zn e Rb em sangue total de pacientes com LLA em diferentes etapas do tratamento. Resultados obtidos utilizando ANOVA como tratamento estatístico, com intervalo de confiança de 95%.	43
Figura 4 - Determinação da atividade enzimática para catalase. Resultados obtidos utilizando ANOVA como tratamento estatístico, com intervalo de confiança de 95%.	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Combinação de reagentes (ácido nítrico e peróxido de hidrogênio) e condição de irradiação com micro-ondas para a decomposição de sangue total.....	22
Tabela 2 - Condições operacionais utilizadas para as determinações por ICP OES.....	25
Tabela 3 - Condições instrumentais utilizadas para a determinação de elementos no sangue por ICP-MS.....	26
Tabela 4 - Avaliação do método de decomposição utilizando radiação micro-ondas para aquecimento das soluções.....	30
Tabela 5 - Concentração de elementos obtida dos ensaios de lixiviação para os frascos utilizados na coleta de sangue. Determinações feitas por ICP-MS. Os valores representam a média e desvio padrão para 10 replicatas.....	33
Tabela 6 - Concentração de elementos obtida dos ensaios de lixiviação para os frascos utilizados na decomposição das amostras de sangue. Determinações feitas por ICP-MS. Os valores representam a média e desvio padrão para 10 replicatas.....	34
Tabela 7 - Verificação da exatidão da curva de calibração utilizada para a determinação de elementos nas amostras de sangue total. Determinações feitas por ICP-MS. Os valores representam a média e desvio padrão para 3 replicatas.....	35
Tabela 8 - Avaliação do efeito de matriz como interferente sobre o Cr, As e Se em análises feitas por ICP-MS. Todos os resultados estão expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$	37
Tabela 9 - Avaliação da concentração de Na sobre o ^{60}Ni , ^{62}Ni , ^{59}Co e ^{63}Cu em análises por ICP-MS. Todos os resultados estão expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$	38
Tabela 10 - Limites de detecção e quantificação dos elementos na técnica de ICP-MS. Todos os resultados estão expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$	38
Tabela 11 - Ensaios de recuperação dos elementos determinados por ICP-MS para amostras diluídas 40x e 80x.....	39
Tabela 12 - Determinação de elementos em sangue total em pacientes que não iniciaram o tratamento de LLA. Valores de concentração expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$. Os valores correspondentes à média e desvio padrão (1SD).....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA, ácido desoxirribonucleico, do inglês, *deoxyribonucleic acid*
EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês, *ethylenediamine tetraacetic acid*
HUSM, Hospital Universitário de Santa Maria
ICP-MS, espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês, *inductively coupled plasma mass spectrometry*
ICP OES, espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês, *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*
LLA, leucemia linfocítica aguda
LOD, limite de detecção, do inglês, *limit of detection*
LOQ, limite de quantificação, do inglês, *limit of quantification*
N.Q., não quantificável
NIST, Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia, do inglês, *National Institute of Standards and Technology*
P.A., para análise, grau de pureza
ROS, espécies reativas de oxigênio, do inglês, *reactive oxygen species*
SD, desvio padrão, do inglês, *standard deviation*
SNV, sistema nervoso central
SOD, superóxido dismutase
TrF, transferrina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DA LITERATURA	11
3 OBJETIVOS	17
3.1 OBJETIVO GERAL	17
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4 MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	18
4.2 AMOSTRAGEM	18
4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	19
4.3.1 Coleta, transporte, estabilidade e armazenagem de amostra	19
4.3.2 Determinação de contaminantes	20
4.3.3 Preparo de amostras	21
4.3.3.1 <i>Testes preliminares para decomposição</i>	21
4.3.3.2 <i>Preparo de amostras: Otimização do método de decomposição e determinação de carbono em solução</i>	23
4.3.4 Determinação da concentração de metais em solução mediante ICP- MS	25
5 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	28
5.1 TESTES PRELIMINARES PARA OTIMIZAÇÃO DOS MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA.....	28
5.2 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRA.....	29
5.3 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CONTAMINANTES NOS FRASCOS.....	32
5.4 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	34
5.4.1 Avaliação da exatidão das medidas utilizando a técnica de ICP-MS	35
5.5 DETERMINAÇÃO DE METAIS NO SANGUE ATRAVÉS DA TÉCNICA DE ICP-MS	40
5.6 TESTES DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	48
6 CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	53
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	57
APÊNDICE B – TERMO DE CONFIDENCIALIDADE	59
APÊNDICE C – TERMO DE ASSENTIMENTO	60
APÊNDICE D – QUESTIONÁRIO DE CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	62

1 INTRODUÇÃO

A leucemia linfocítica aguda (LLA) ocorre tanto em crianças como em adultos, tendo seu pico de incidência entre as idades de 2 a 5 anos. A causa desta doença tem muitos fatores e pode ser agravada por agentes endógenos e exógenos, genética ou suscetibilidade, entre outros. Assim como o câncer de uma maneira geral, a leucemia linfocítica se manifesta através da interação entre agentes exógenos e endógenos que resultam na mutação genética das células progenitoras do sangue, essas mutações não apenas inibem o processo natural de apoptose das células que sofreram mutação, como garantem uma capacidade incontrolável de replicação. Desta maneira, o corpo é sobrecarregado por células imaturas que inicialmente ficam alocadas na medula óssea, mas com o agravamento da doença podem ser carregadas para todo o corpo mediante a corrente sanguínea.

O fator de risco que engloba a doença é estimado em aproximadamente 1 a cada 2000 crianças durante a adolescência (até os 15 anos). O maior desafio é a identificação das variáveis que estão associadas a doença, que podem estar atreladas desde a herança genética até mesmo a exposição de fatores externos. A raridade da doença e a existência de subtipos diferentes desta enfermidade, as quais não necessariamente partilham dos mesmos mecanismos biológicos, tornam o problema ainda mais complexo (GREAVES, Mel., WIEMELS, Joe., 2003).

O tratamento, de forma geral, tem duração de 2 a 5 anos e compreende três fases principais: indução da remissão, intensificação ou consolidação e a continuação ou mais comumente chamada, manutenção. A maioria das drogas utilizadas no tratamento foi desenvolvida antes da década de 70, entretanto as combinações com a quimioterapia e estudos farmacodinâmicos resultaram num aumento considerável nas taxas de sobrevivência dos pacientes (INABA, Hiroto., 2013).

Dentro deste contexto, o estudo da distribuição dos metais no sangue se torna importante, sobretudo pelo seu papel no auxílio da regulação do sistema imunológico, atividade mitocondrial, contração muscular etc. Os efeitos relacionados com a leucemia em paralelo com o desequilíbrio destes elementos estão fundamentados no princípio que muitos destes elementos catalisam o início ou inibem a formação de radicais livres (TARIQ, Saadia., 2016).

2 REVISÃO DA LITERATURA

A leucemia linfocítica se origina na medula óssea a partir de uma mutação genética das células sanguíneas denominadas leucócitos. Como consequência dessa mutação, as células progenitoras sofrem divisão celular originando células filhas que não chegam à maturidade, porém com as mesmas falhas genéticas. A consequência dessas falhas genéticas é a divisão celular indefinidamente das células imaturas (linfoblastos), ocupando o espaço que deveria ser de células maduras e que deveriam desempenhar suas funções completamente. Além disso, como consequência da divisão indefinida dos glóbulos brancos, o número de glóbulos vermelhos e plaquetas acabam reduzindo em função da própria limitação da medula óssea (DIAS, Patricia., 2016).

As células cancerosas competem no organismo com as células saudáveis que protegem o corpo. Na maioria dos casos, as células leucêmicas se espalham rapidamente para a corrente sanguínea onde podem se depositar em órgãos como fígado, baço, testículos e sistema nervoso, impedindo que as células destes órgãos desempenhem suas funções completamente. Um exemplo é a deposição dessas células na superfície do estômago causando dores, perdas de apetite e redução de peso. O último sinal de comprovação da doença é atribuído ao extremo cansaço e fraqueza. Neste estágio a proliferação de células cancerosas é tão alta, que além de atingir a corrente sanguínea, reduz o fluxo de sangue enviado para os órgãos, sobretudo para o cérebro. Devido à alta taxa de produção de células cancerosas é possível determinar o estágio em que a doença se encontra baseado no número de células presentes ao redor de órgãos específicos, como o baço ou o fígado (BERNARD, Samantha., 2017).

Outras doenças ou mesmo problemas internos podem denunciar o agravamento da doença. Sintomas como anemia, fraqueza, pele pálida ou redução do fôlego podem aparecer. Uma contagem baixa de leucócitos com significativa redução da imunidade pode causar infecções graves. Se um sintoma ou doença persiste por um longo período de tempo, ou mesmo se há infecções com muita frequência, pode ser indício de leucemia (BERNARD, Samantha., 2017).

A velocidade do desenvolvimento da leucemia linfocítica pode ser classificada em aguda ou crônica. A leucemia linfocítica aguda é caracterizada pela imaturidade

das células sanguíneas incapazes de exercer suas funções e pela sua alta taxa de divisão, agravando a situação do paciente de maneira muito rápida. Em comparação, a velocidade de desenvolvimento da leucemia linfocítica crônica é bem menor, já que os blastos (células sanguíneas) estão mais desenvolvidos e as células desempenham parte de suas funções, como consequência a leucemia crônica progride gradualmente e sua descoberta acaba sendo normalmente por exames de sangue de rotina (DAVIS, Amanda., 2014).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), em 2017, cerca de 12.600 novos casos de câncer entre crianças e adolescentes foram estimados. O câncer infanto-juvenil engloba vários tipos de câncer, entretanto as leucemias representam a maior parte de incidência (26%), seguidas de linfomas (14%) e tumores do sistema nervoso central (SNC) (14%). Dados divulgados pelo mesmo instituto e pelo Ministério da Saúde (MS) mostram que a sobrevivência de crianças e adolescentes de 0 a 19 anos é de 64%, valores calculados com base na incidência e mortalidade de casos confirmados.

Sabendo-se que a leucemia afeta a contagem de glóbulos brancos, vermelhos e, também, de plaquetas, o diagnóstico médico deve ser baseado em diversos exames que levam em consideração, por exemplo, o histórico do paciente, condição física, contagem total das células sanguíneas, aspiração da medula óssea e eventualmente biópsia de medula óssea. De acordo com os resultados, o médico poderá determinar o melhor tipo de tratamento a ser adotado com base na estratificação de risco.

Dentre as terapias utilizadas, a mais comum é a quimioterapia, baseado na administração de substâncias químicas com atividade biológica capaz de inibir o crescimento das células cancerosas ou destruí-las. O uso de terapias que se focam em algum tipo de câncer específico também faz uso de substâncias químicas para a destruição destas células, com a condição de não prejudicar células saudáveis. O uso de células tronco acompanhado de altas doses de quimioterápicos vem sendo considerada um tipo de terapia bem-sucedida, embora não esteja livre de complicações e lesões ao longo do tratamento (BERNARD, Samantha., 2017).

O tratamento por radiação se apresenta como uma segunda alternativa no combate ao câncer, tendo como premissa o uso de radiação de alta energia, como raios-X, para a destruição das células, podendo ainda ser utilizada como profilaxia

da doença no SNC. A emissão da radiação pode ser feita de duas maneiras, externamente com a utilização de aparelhos ou internamente com a introdução de substâncias radioativas via cateter, agulhas ou sondas nos locais onde há presença das células cancerosas.

Em relação ao tratamento que o paciente é submetido, podemos dividi-lo em três etapas: a primeira etapa do tratamento é chamada de indução da remissão. O objetivo principal nesta etapa é a destruição das células cancerosas no sangue e na medula óssea, restaurando a função medular normal e a eliminação dos sintomas da doença mediante a utilização de quatro a seis fármacos sinérgicos entre si. Após a fase de indução da remissão, inicia-se a terapia de consolidação e/ou intensificação, a qual tem a finalidade de eliminar qualquer célula blástica que ainda esteja presente no organismo e que possa resultar em uma progressão da doença. Nesta etapa as doses dos fármacos utilizados anteriormente são aumentadas e por vezes novos fármacos são adicionados ao tratamento. A última etapa do tratamento é chamada terapia de manutenção, que consiste basicamente no monitoramento da doença acompanhada de dosagens menores de fármacos do que as usadas nas etapas anteriores, onde a função principal é evitar o crescimento de células cancerosas que ainda possam estar presentes no corpo. Caso a medicação não seja administrada, é possível que a doença volte a se manifestar. (BERNARD, Samantha., 2017).

A proposta de determinar a concentração de diversos elementos químicos, em sua maioria metais, no sangue de pacientes com leucemia, está baseada em diversos trabalhos já publicados que indicam uma participação importante dos mesmos nas diversas funções corporais, tais como regulação do sistema imunológico, contrações musculares e atividade mitocondrial. Uma grande variação na concentração dos metais presentes no sangue geralmente está associada a alguma desordem biológica, como por exemplo, câncer de pulmão, câncer de mama, disfunção na glândula tireóide, esquizofrenia, Parkinson e problemas cardíacos (TARIQ, Saadia., 2016). Um exemplo é a redução da concentração dos níveis de zinco, cobre e manganês no sangue, que por atuarem como co-fatores na enzima superóxido dismutase (SOD), acabam comprometendo a sua função de regular a formação de radicais livres, causando estresse oxidativo para a célula (OSREDKAR, Josto., SUSTAR, Natasa., 2011).

Hoje, uma das técnicas analíticas mais utilizadas para a determinação destes elementos, em baixas concentrações, é a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). A técnica de ICP-MS foi proposta por volta de 1980 e hoje é utilizada nas mais diversas áreas, desde o monitoramento de contaminantes presentes no meio ambiente até pesquisas clínicas, devido a sua alta precisão e capacidade de detectar a maioria dos elementos em concentrações muito baixas (ng L^{-1}) (CESBRON, Alexandre., 2013).

Embora o uso desta técnica tenha começado com a determinação de metais em solução, hoje a técnica de ICP-MS está consolidada como muito flexível, sendo um poderoso detector cromatográfico e reconhecido pela sua capacidade de hifenação com diversos equipamentos, permitindo não apenas a quantificação, mas a especificação de diversos compostos.

Entretanto, geralmente as análises por ICP-MS são feitas com a amostra na forma de solução aquosa, sendo, na maioria dos casos, algum tipo de tratamento. O método utilizado para a decomposição das amostras acaba se tornando uma etapa fundamental; uma amostra mal decomposta pode gerar erros durante a etapa de determinação por diversos motivos, que vão desde o manuseio de frascos contaminados, até supressão ou aumento de sinal para um determinado elemento.

Existem diversos métodos utilizados especificamente para determinar metais em sangue total, alguns procedimentos fazem uso de uma diluição entre 10 – 50 vezes da amostra, seguida da adição de um surfactante (geralmente Triton X-100) em meio alcalino (hidróxido de amônio 1% v/v) com a finalidade de degradar a hemoglobina presente no sangue, permitindo assim a análise de aproximadamente 60 amostras diárias (CASE, Patrick., 2001; GONZÁLEZ-ANTUNA, Ana., 2017).

Outros autores (LUNA, Diego., 2019; HARRINGTON, James., 2014) optam por uma decomposição total da matéria orgânica com auxílio da radiação micro-ondas. Estes métodos costumam utilizar um volume de amostra que varia entre 500 até 250 μL de amostra, por vezes, separando-as em plasma e hemácias por meio de centrifugação. A composição ácida adicionada a cada fração pode variar, sendo que alguns autores utilizam volumes menores de ácido nítrico (cerca de 300 μL) para a decomposição do plasma, enquanto que para a fração rica em hemácias o volume médio é de até 1 mL. Porém, em ambas as frações, a simples adição de ácido nítrico

não se mostra eficiente, sendo necessário a adição de HCl e H₂O₂ (NUTTALL, Kern., 1995).

Além da determinação da concentração de metais no sangue, ensaios bioquímicos podem auxiliar na elucidação de uma possível correlação entre os dados. Uma das hipóteses propostas é a grande dependência das enzimas em relação aos metais que atuam como co-fatores e possibilitam desempenhar suas funções apropriadamente. Um exemplo disso é o monitoramento da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), a qual é responsável por converter oxigênio radicalar altamente reativo e prejudicial principalmente por causar dano à estrutura do DNA, em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Enzimas como a SOD utilizam metais, como zinco, cobre e manganês, para realizar suas reações biológicas, porém na ausência dos mesmos, estas enzimas podem ter o seu desempenho afetado consideravelmente (FUKAI, Tohru., FUKAI-USHIO, Masuko., 2011).

Aplicando a hipótese proposta à pesquisa em destaque, podemos inferir que com o início do tratamento para os pacientes com leucemia, os níveis de metais no sangue que se encontravam baixos devido à doença, começam a aumentar gradualmente conforme as células cancerosas são eliminadas, em consequência espera-se que a atividade enzimática também aumente e resulte na melhora do paciente. As enzimas escolhidas para os testes foram SOD e CAT.

Superóxido dismutase: Esta enzima pode conter cobre, zinco ou até mesmo manganês e ferro em sua estrutura. Ela é responsável pela conversão de superóxidos em peróxido de hidrogênio e oxigênio não radicalar. Além disso, é relatada na literatura sua influência na diminuição da produção de hidroxilas radicalares, as quais são as espécies oxidantes mais fortes dentre as espécies derivadas do oxigênio (ALDRED, 2009).

A enzima SOD pode existir em três formas diferentes no corpo humano: SOD1: presente no citoplasma (Zn-Cu-SOD); SOD2: presente nas mitocôndrias, ausente nos glóbulos vermelhos (Mn-SOD) e SOD3: presente no meio extracelular (Zn-Cu-SOD).

Catalases: São enzimas que decompõe as moléculas de peróxido de hidrogênio. Logo após a conversão dos superóxidos em peróxido de hidrogênio via enzima SOD, é necessária uma segunda reação para converter peróxido de hidrogênio em produtos menos tóxicos para o organismo, neste caso, H₂O e O₂.

Muitos estudos apontam o peróxido de hidrogênio como uma espécie citotóxica, porém, não levam em consideração que o efeito prejudicial nas células se deve por ser o precursor do radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), os quais são altamente reativos. É importante salientar que este radical só é formado quando existe a quebra de ligação química do peróxido por meio de radiação ultravioleta (UV), ou no organismo, pela presença de metais como Fe(II) (HALLIWELL et al. 2000).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal deste trabalho é estudar a variação da concentração dos elementos químicos no sangue, em sua maioria metais, ao longo do tratamento de leucemia linfocítica aguda.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Após a coleta de sangue dos pacientes e adequado tratamento da amostra para determinação química, os principais parâmetros a serem estudados são:

- Estabelecer método para a determinação de elementos em sangue humano por ICP-MS.
- Desenvolver procedimento para a decomposição de sangue para a determinação de metais por ICP-MS.
- Determinar a concentração de elementos em sangue total de pacientes com LLA ao diagnóstico.
- Comparar os resultados entre os pacientes com leucemia e pacientes fora do tratamento a mais de um ano (grupo controle), para a seleção dos elementos que sofreram influência ao longo do tratamento, usando testes estatísticos.
- Correlacionar os resultados dos testes de atividade enzimática com a variação das concentrações dos metais no sangue.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, instituição na qual os pesquisadores participantes desta pesquisa estão vinculados e somente foi executado após sua aprovação. O paciente e/ou responsável que concordou em participar voluntariamente da pesquisa, foi devidamente orientado sobre os objetivos e desenvolvimento da pesquisa antes de qualquer procedimento, conforme o Termo de Livre Consentimento e Esclarecido (Apêndice A) e Termo de Assentimento (Apêndice C), sendo garantido o sigilo e confidencialidade de suas informações, segundo o termo assinado pelos pesquisadores (Apêndice B). Foram coletados alguns dados do prontuário do paciente como idade, peso, sexo e condição clínica, bem como aplicado um questionário de caracterização de amostra (Apêndice D).

4.2 AMOSTRAGEM

A amostragem é constituída por pacientes encaminhados ao Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) que se disponibilizaram voluntariamente a participar da pesquisa, com idades entre 0 a 18 anos, ao serem diagnosticados e durante as diferentes fases do tratamento para leucemia linfocítica aguda.

No decorrer do período do tratamento, os pacientes com LLA são monitorados, na sua maioria, no mínimo semanalmente. Desta forma, não foram realizadas coletas específicas para o desenvolvimento da metodologia do presente estudo.

O sangue dos pacientes foi utilizado como o material biológico para os testes, o qual é considerado como descarte após a realização dos exames da rotina do protocolo de tratamento no HUSM.

As amostras de sangue coletadas dos pacientes foram separadas por etapa do tratamento, sendo elas: Início do Tratamento, Indução, Intensificação, Manutenção e Controle.

Início do tratamento: Para esta etapa foi considerado válido pacientes que apenas foram diagnosticados com a doença, sem qualquer tipo de tratamento. Para esta etapa, o conjunto amostral (N) foi igual a 6, sendo 4 do sexo feminino e 2 do sexo masculino.

Indução: Nesta etapa os pacientes estão submetidos à quimioterapia com o objetivo de alcançar a remissão. Caracteriza-se remissão, quando não há a detecção de células leucêmicas nas amostras de medula óssea. Além disso, observa-se o aumento do número de glóbulos vermelhos. Neste grupo, foi considerado válido um conjunto (N) igual a 9, os quais, 7 pacientes do sexo masculino e 2 do sexo feminino.

Intensificação: Nesta fase, o objetivo é eliminar as células leucêmicas remanescentes, aumentando a dosagem dos medicamentos e por vezes utilizando a estratégia da combinação de vários medicamentos que impeçam que as células remanescentes fiquem resistentes ao medicamento. Nesta etapa, o conjunto amostral foi (N) igual a 15, onde 6 pacientes são do sexo feminino e 9 pacientes do sexo masculino.

Manutenção: Se as células leucêmicas continuam diminuindo após a fase de intensificação, é possível começar a fase de manutenção. Esta fase é iniciada com um medicamento diário específico e sua concentração aumenta ao longo do tratamento. Além deste medicamento, um conjunto de outros medicamentos, em geral esteróides, são administrados semanalmente ou períodos que variam de 4 a 8 semanas. Nesta etapa, um conjunto amostral de (N) igual a 20 foi considerado, sendo 8 pacientes do sexo feminino, 12 do sexo masculino.

Controle: Admitiu-se como controle, pacientes que estavam fora do tratamento por um período superior a 1 ano. Para este grupo amostral, obteve-se um N igual a 16, sendo 6 pacientes do sexo masculino e 10 pacientes do sexo feminino.

4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.3.1 Coleta, transporte, estabilidade e armazenagem de amostra

O período de coleta das amostras compreende os meses de agosto de 2018 até fevereiro de 2019. Todas as coletas foram efetuadas por um profissional

capacitado do próprio HUSM para o procedimento. O protocolo de tratamento dos indivíduos portadores de LLA prevê uma coleta de hemograma semanal, quinzenal ou mensal conforme a fase do tratamento. Essas coletas são realizadas no laboratório de Hemato-Oncologia do HUSM, sendo executadas por técnicos especializados. Após a realização do hemograma ao final da manhã, as amostras são separadas e alocadas em um refrigerador.

As amostras de sangue são provenientes de pacientes já cadastrados no HUSM, que começaram o tratamento ou que já se encontravam em tratamento mediante consentimento dos responsáveis e após responder os questionários pertinentes para o desenvolvimento da pesquisa, os quais se encontram no Apêndice C e D.

Logo após a equipe do HUSM disponibilizar as amostras, o transporte das mesmas foi realizado pelos responsáveis pela pesquisa e consistiu na transferência das amostras de sangue entre o HUSM e o Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais, localizado no prédio 21 da mesma instituição. As diretrizes utilizadas para o transporte e armazenagem das amostras biológicas estão descritas no Manual de Vigilância Sanitária para transporte de sangue e componentes no âmbito da hemoterapia, publicado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e também pelo *Manual of the management, maintenance and use of blood cold chain equipments*, publicado pela Organização Mundial da Saúde (WHO).

4.3.2 Determinação de contaminantes

Para que se obtenham resultados com uma boa precisão e exatidão, é necessário antes de qualquer coisa, determinar o grau de contaminação dos elementos que se tenha interesse em determinar, que estão presentes nos frascos e materiais utilizados durante a pesquisa. Desta forma, dez tubos coletores de sangue foram escolhidos de forma aleatória juntamente com o anticoagulante utilizado nas amostras, neste caso, ácido etilenodiaminotetra-acético (K₃-EDTA). Foi adicionada aos frascos, uma solução de ácido nítrico 10% (v/v), simulando desta forma, algum eventual lixiviamento de metais contido nas paredes dos frascos para o sangue previamente coletado. O mesmo teste foi aplicado para os frascos onde as amostras de sangue foram pesadas e decompostas (preparo das amostras), para simular o

lixiviamento dos elementos nos frascos em uma condição similar a decomposição de sangue. Logo após, os frascos foram deixados em repouso por um período de 24 horas para posterior determinação dos elementos, pela técnica de ICP OES e ICP-MS.

4.3.3 Preparo de amostras

Inicialmente, as amostras recebidas no Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais foram acondicionadas em temperaturas de 1 a 10 °C, seguindo as diretrizes já mencionadas.

O procedimento de decomposição ácida é uma técnica amplamente conhecida para análises químicas, sobretudo, determinação de metais. O método consiste basicamente na adição de alguma substância ácida, ou mistura de substâncias ácidas para a oxidação da matéria orgânica mediante aquecimento; neste caso utilizou-se o ácido nítrico de alta pureza e aquecimento brando mediante irradiação micro-ondas.

4.3.3.1 Testes preliminares para decomposição

Para que se tenha uma decomposição eficiente da amostra, isso é, uma condição em que toda a matéria orgânica seja decomposta ou pelo menos a concentração de carbono residual na solução não cause interferência durante a determinação dos elementos por ICP-MS, é necessário a otimização de um método, que envolve determinados parâmetros importantes durante o processo de decomposição. O método adotado para os testes preliminares foi uma adaptação do trabalho de Harrington (2014), que se baseia na decomposição do material por via úmida assistida por radiação micro-ondas. Os testes foram realizados em sistema aberto, utilizando frascos de polipropileno, fundo cônico, da marca CRAL com 5 mL de volume, resistentes a temperaturas de até 121 °C. Para aquecimento, foi utilizado um micro-ondas convencional da marca Electrolux, espaço interno de 34 L e potência máxima 1300 W.

Inicialmente, a principal questão foi determinar um valor fixo de uma solução capaz de decompor a amostra com a maior eficiência, a qual foi baseada no teor de

carbono em solução. Com base na literatura, foram escolhidos ácido nítrico grau P.A. (65%, 1,4 kg L⁻¹, ALPHATEC, Brasil) purificado em sistema de destilação abaixo do ponto de ebulição (duoPUR, Subboiling Distillation System, Milestone, Itália) e peróxido de hidrogênio 30% grau P.A. (Merck), estabilizado para altas temperaturas, como os reagentes principais. Caso os ensaios não se mostrassem eficientes, uma nova pesquisa deveria ser feita.

Desta maneira, um volume fixo de 250 mg de sangue total foi adicionado aos frascos juntamente a 0,5, 1,0 e 1,5 mL de HNO₃. Em alguns frascos adicionou-se 0,25 mL e 0,5 mL de H₂O₂, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Combinação de reagentes (ácido nítrico e peróxido de hidrogênio) e condição de irradiação com micro-ondas para a decomposição de sangue total.

Frasco	Massa de amostra (mg)	Reagentes	Potência (W)	Tempo de Irradiação
1	250	0,5 mL de HNO ₃	1300	6 min
2	250	1,0 mL de HNO ₃	1300	6 min
3	250	1,5 mL de HNO ₃	1300	6 min
4	250	0,5 mL de HNO ₃ + 0,25 mL de H ₂ O ₂	1300	6 min
5	250	1,0 mL de HNO ₃ + 0,25 mL de H ₂ O ₂	1300	6 min
6	250	1,5 mL de HNO ₃ + 0,25 mL de H ₂ O ₂	1300	6 min
7	250	0,5 mL de HNO ₃ + 0,50 mL de H ₂ O ₂	1300	6 min
8	250	1,0 mL de HNO ₃ + 0,50 mL de H ₂ O ₂	1300	6 min
9	250	1,5 mL de HNO ₃ + 0,50 mL de H ₂ O ₂	1300	6 min

Antes da etapa de irradiação com micro-ondas, todos os frascos contendo as amostras e reagentes, foram deixados em repouso por um período de aproximadamente 2 horas.

O tempo total de irradiação em todos os testes foi fixado em 6 minutos, porém, este tempo foi dividido em 15 intervalos com duração de 20 segundos, tomando sempre o cuidado para que a solução não fosse projetada para fora dos frascos em decorrência da ebulição das amostras.

4.3.3.2 *Preparo de amostras: Otimização do método de decomposição e determinação de carbono em solução*

Para a verificação da eficiência da decomposição foi utilizado uma bolsa de concentrado de hemácias (gentilmente cedida pelo HUSM), a qual se diferencia de sangue total pela ausência de plasma sanguíneo. O tempo de decomposição, composição da mistura ácida, potência da radiação do micro-ondas e por fim, teores de carbono em solução foram avaliados.

O tempo de irradiação contínua sob a amostra foi fixado em 5, 10, 20 e 30 minutos, sendo este tempo dividido em intervalos de 20 segundos sob irradiação e 20 segundos de arrefecimento, para evitar problemas como projeção da solução interna, deformações e explosões dos frascos. A temperatura dos frascos foi monitorada através de irradiação infravermelha, variando entre 40 °C durante o período de resfriamento, até uma temperatura máxima de 90 °C com incidência de radiação micro-ondas.

Para a determinação de carbono em solução nas amostras decompostas, uma alíquota de 1 mL de cada amostra foi diluída até um volume final de 10 mL, no intuito de evitar danos ao equipamento como entupimento de capilares, depósito de carbono na tocha do equipamento e reduzir a concentração de ácido na solução final. Logo após, foram transferidos para os frascos, 10 µL de uma solução de referência de ítrio ($1002 \pm 5 \text{ mg L}^{-1}$, Honeywell Fluka), utilizada como padrão interno. Todos os frascos foram submetidos a uma purga contínua com gás argônio (99,998%, White Martins, Brasil), por um período de 2 minutos cuja finalidade é garantir a total eliminação de todo o CO_2 contido no seio da solução e que eventualmente pudesse causar diferenças significativas entre os resultados obtidos para o carbono em solução. A técnica de ICP OES foi escolhida para a determinação do teor de carbono, utilizando um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (Spectro Ciros CCD, Spectro Analytical Instruments, Alemanha), equipado com nebulizador pneumático do tipo “*cross-flow*”, câmara de nebulização duplo passo (Scott, Spectro Analytical Instrument) e tocha com injetor de quartzo com diâmetro interno de 2,5 mm. Os comprimentos de onda escolhidos para a determinação foram de 193,091 nm para carbono, de 371,030 nm para ítrio e

430,010 nm para argônio, usado como referência para monitorar possíveis variações nas condições do plasma.

A avaliação dos resultados, discussão e seleção de parâmetros foi baseada em testes estatísticos. Para a comparação de médias (teste t-student, com nível de confiança de 95%) ou, quando necessário, análise de variância (ANOVA, com nível de confiança de 95%) foram empregados. Para isso, foi utilizado o software GraphPad InStat, versão 3.0, 1997 (GraphPad InStat Software, San Diego, Califórnia, EUA).

4.3.3.2 Determinação de contaminantes nos frascos

Antes de determinar qualquer elemento nas amostras, é necessário verificar o grau de contaminação nos frascos utilizados durante todas as etapas da determinação. Desta maneira, os frascos de coleta de sangue (Vacutainer) foram avaliados em relação a sua contaminação. Estes frascos já possuem uma quantidade de anticoagulante (K_3 -EDTA, neste caso) suficiente para evitar a coagulação do sangue. Para a determinação do grau de contaminação nestes frascos, foram escolhidos de forma aleatória 10 frascos contendo apenas o anticoagulante. Foi adicionada aos frascos uma solução de HNO_3 destilado com concentração de 10% (v/v). Os frascos foram agitados manualmente e, por fim, deixados em repouso por um período de 24 horas. O mesmo procedimento foi aplicado para os frascos utilizados na decomposição das amostras. A determinação dos elementos majoritários (Ca, K, Mg, Fe, Cu e Zn) foi feita por ICP OES, estando as condições operacionais mostradas na Tabela 2.

Tabela 2 - Condições operacionais utilizadas para as determinações por ICP OES.

Parâmetro	ICP OES
Potência do gerador de RF, W	1400
Vazão de argônio principal, L min ⁻¹	15
Vazão de argônio auxiliar, L min ⁻¹	1,00
Vazão de argônio do nebulizador, L min ⁻¹	0,70
Leituras por replicata	3
Comprimentos de onda espectral, nm	CaII (393,366)
	FeII (238,204)
	KI (766,490)
	CuI (327,396)
	MgI (285,213)
	ZnII (206,200)

4.3.4 Determinação da concentração de metais em solução mediante ICP-MS

Para a quantificação dos metais presentes nas amostras de sangue, foi utilizado um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (modelo Elan DRC II, Perkin Elmer Sciex, Canadá) equipado com nebulizador concêntrico (Meinhard Associates, USA), câmara de nebulização ciclônica do tipo “Baffled” (Glass Expansion Inc., Austrália), tocha de quartzo com tubo injeto de 2,0 mm de diâmetro interno. Na Tabela 3, estão mostradas as condições operacionais utilizadas na determinação dos metais nas amostras de sangue, entretanto, foi escolhido isótopos específicos para alguns elementos.

Tabela 3 - Condições instrumentais utilizadas para a determinação de elementos no sangue por ICP-MS.

Parâmetros	ICP-MS
Potência do gerador de rádio frequência, W	1300
Vazão de argônio principal, L min ⁻¹	12,00
Vazão de argônio auxiliar, L min ⁻¹	1,30
Vazão de argônio do gás nebulizador, L min ⁻¹	1,00
Câmara de nebulização	Ciclônica “baffled”
Nebulizador	Concêntrico
Cone de amostragem e <i>skimmer</i>	Pt
Dwell time, ms	20
Sweeps per reading	5
Readings per replicate	5
Replicatas	3

Segundo a literatura, amostras biológicas, como o caso do sangue, apresentam um elevado teor de carbono. O carbono pode ser um interferente na determinação de alguns elementos pela técnica de ICP-MS, devido ao fato de formar espécies poliatômicas de mesma razão massa/carga nominal (não separadas num espectrômetro de massa do tipo quadrupolo simples). Como por exemplo, pode ser citado o ²⁴Mg (¹²C₂⁺), ⁴²Ca (⁴⁰Ar¹H₂), ⁵²Cr (⁴⁰Ar¹²C⁺) e ⁵³Cr (³⁶Ar¹⁷O). Além disso, a presença de carbono no plasma pode suprimir ou aumentar a intensidade do sinal de alguns elementos. Por exemplo, é bem documentado o aumento do sinal do As e Se, quando determinadas concentrações de C estão presentes na solução. Portanto, após o processo de decomposição ser otimizado com base nos resultados obtidos nas determinações do teor de carbono, foi necessário verificar se a matriz da amostra ainda exercia algum tipo de efeito durante as determinações pela técnica de ICP-MS. Para isso, as amostras com os menores valores para carbono residual foram escolhidas para este ensaio.

Inicialmente, as curvas de calibração foram feitas utilizando uma solução multielementar (SCP33MS, PlasmaCAL, Quebec, Canadá) em concentrações entre 0,1 µg L⁻¹ e 10 µg L⁻¹. A exatidão da calibração foi verificada através de uma solução padrão de referência (NIST 1640a – Trace elements in natural water) diluída em ácido nítrico 5% v v⁻¹ por um fator de 10 vezes. Para determinar se a matriz apresentava algum tipo de efeito sobre as medidas, as amostras foram diluídas em um

fator de 40, 80, 160 e 1600 vezes, sendo os isótopos ^{52}Cr , ^{75}As e ^{82}Se monitorados em relação a linearidade de suas respectivas diluições.

Em um segundo momento, ensaios de recuperação dos elementos foram realizados nas amostras decompostas, adicionando uma concentração conhecida e equivalente a $5 \mu\text{g L}^{-1}$ do elemento à amostra previamente diluída em um fator de 40 e 80 vezes. Os resultados foram comparados com o somatório teórico da medida da amostra na sua diluição correspondente com a medida obtida da solução de referência de $5 \mu\text{g L}^{-1}$.

4.3.5 Atividade enzimática - Catalase

A determinação da atividade enzimática para a catalase foi realizada de acordo com o método adaptado de Nelson e Kiesow. Estes ensaios envolvem a variação na absorvância em um comprimento de onda de 240 nm, sendo, desta maneira, determinada a atividade enzimática da catalase com base na velocidade da decomposição do peróxido de hidrogênio em seus produtos, água e oxigênio. Para tal, uma alíquota (20 μL) de sangue foi homogeneizada em uma solução tampão de fosfato de potássio, 0,05%, pH 7,0.

A determinação espectrofotométrica da atividade da catalase foi feita após a adição de 70 μL de uma solução aquosa a $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio. O decréscimo da absorvância foi monitorada por um período de 2 minutos. A atividade da enzima foi calculada utilizando como coeficiente de extinção molar de $0,0436 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$. Além disso, os resultados estão expressos como nmol mg^{-1} de proteína.

5 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1 TESTES PRELIMINARES PARA OTIMIZAÇÃO DOS MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA

Embora os métodos de decomposição de sangue (plasma ou sangue total) já serem bem conhecidos na literatura, a maioria dos trabalhos relatam a utilização de fornos micro-ondas comerciais comumente utilizados em laboratórios por conseguirem atingir altas temperaturas e pressões em seus frascos. Diferentemente desta visão, o presente trabalho tenta de uma maneira simplificada, utilizar frascos baratos e forno de micro-ondas de uso doméstico para conseguir as mesmas finalidades. É importante ressaltar a grande quantidade de amostras coletadas para a análise, além de um volume de amostra muito pequeno o qual deve ser utilizado para todos os testes. Logo, existindo a necessidade da criação de um novo método que tivesse uma frequência de análise maior, bem como, a avaliação das variáveis que influenciam no processo de decomposição.

Para avaliar a viabilidade da decomposição, massas exatas em torno de aproximadamente 250 mg das amostras foram pesadas em balança com precisão de quatro casas decimais. As decomposições foram feitas em triplicata. Após a pesagem das amostras diretamente nos frascos em que seriam decompostas, volumes de 0,5, 1,0 e 1,5 mL de HNO_3 foram adicionados a diferentes frascos, agitados e deixados em repouso por um período de 2 horas. Esta etapa de repouso após a adição de ácido é de extrema importância, pois antes de ser adicionado H_2O_2 à solução, é necessário degradar as enzimas peroxidases que atuam convertendo as moléculas de H_2O_2 em H_2O e O_2 . Sem esse procedimento, observa-se a geração de muita espuma na solução.

Não houve nenhuma alteração visual nas amostras que continham apenas ácido nítrico. Porém, nos frascos contendo a mistura de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio, a mudança da coloração foi imediata.

Aparentemente a velocidade da reação para os frascos contendo a mistura HNO_3 e H_2O_2 se mostrou superior comparada aos frascos que continham apenas HNO_3 , com uma mudança de coloração logo nos primeiros 3 min, após a adição dos

reagentes, enquanto que para os frascos com HNO_3 foi necessário pelo menos 6 min para ocorrer a reação, observado pela mudança perceptível de cor.

Além disso, também foram conduzidos testes em frascos contendo apenas peróxido de hidrogênio, sem adição de ácido nítrico. Porém, a reação observada resultou em uma produção de espuma muito intensa, sem qualquer tipo de mudança na coloração. Este efeito provavelmente ocorre devido à presença de enzimas peroxidases presentes no sangue total, que quando em contato com peróxido, catalisam o reagente produzindo água e oxigênio gasoso, dando origem a grande quantidade de espuma.

Verificou-se ao final dos ensaios, que visualmente, os frascos com a mistura de $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$, além de apresentar uma coloração bem menos intensa do que as amostras que apenas foram tratadas com ácido nítrico (um indicativo de uma melhor decomposição), também foram os primeiros frascos a reagirem sob irradiação micro-ondas. Para uma avaliação mais precisa e com resultados contundentes que provassem de fato a eficiência da decomposição, estipulou-se a determinação de carbono em solução nas decomposições, bem como a avaliação de novas proporções entre a mistura de HNO_3 e H_2O_2 , conforme mostrado na Tabela 1.

5.2 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRA

Como determinado nos testes preliminares, optou-se pelo uso da mistura HNO_3 e H_2O_2 , não apenas pelo fato de se ter vários trabalhos na literatura citando esta mistura, mas como os próprios ensaios demonstraram bons resultados. A opção de utilizar HNO_3 , ao invés de HCl ou H_2SO_4 está relacionado com a sua característica como forte agente oxidante, da possibilidade de sua purificação por meio da destilação, além de que os sais de nitrato serem mais solúveis em água, do que sais de cloreto e sulfato.

Para avaliar a influência de cada reagente na mistura, inicialmente utilizou-se valores crescentes de ácido nítrico enquanto um valor fixo de H_2O_2 foi mantido, da mesma forma o estudo inverso foi realizado. As proporções da mistura estão descritas na Tabela 4.

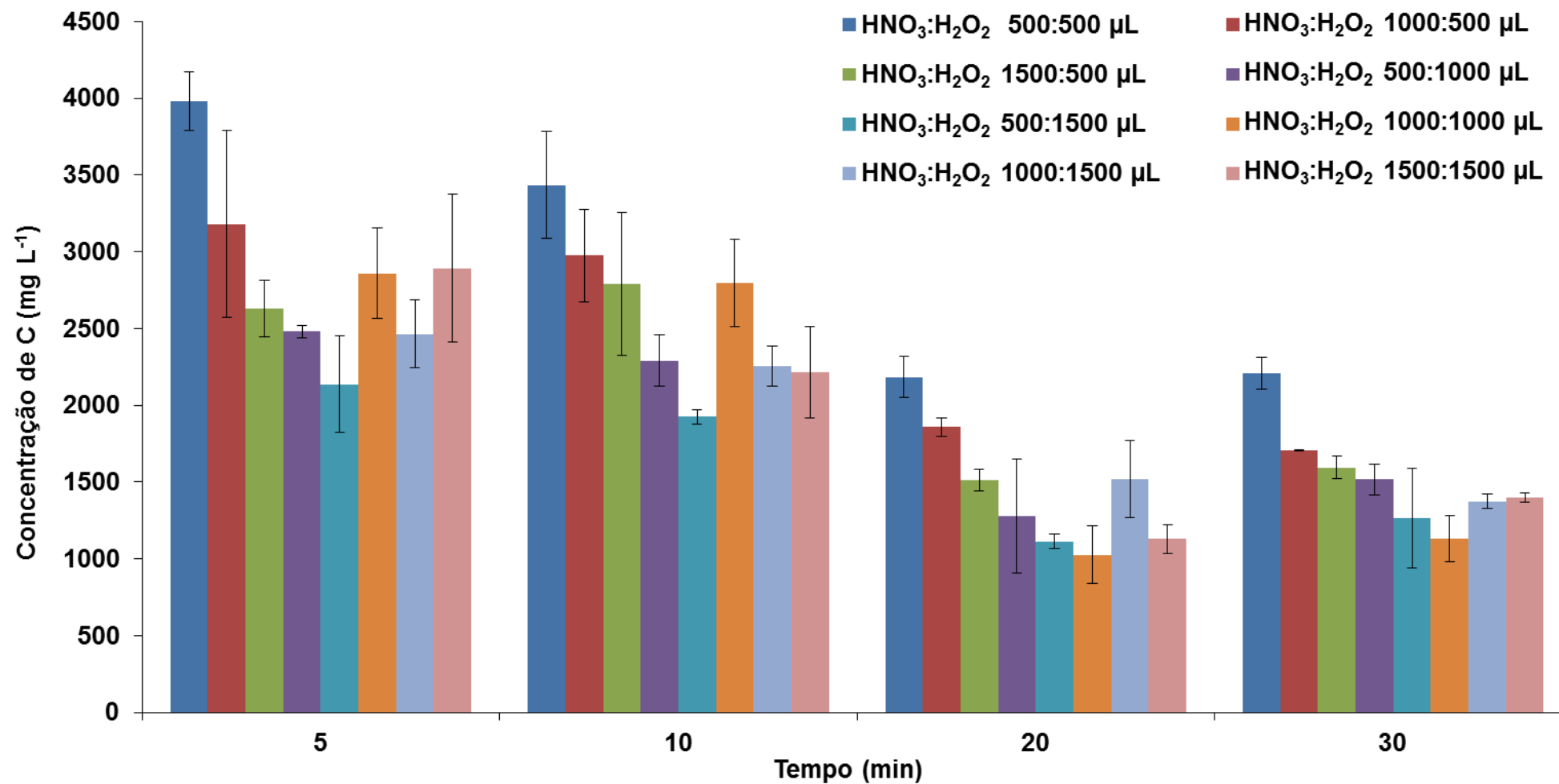
Tabela 4 - Avaliação do método de decomposição utilizando radiação micro-ondas para aquecimento das soluções.

Volume de HNO₃ (µL)	Volume de H₂O₂ (µL)	Tempo (min)
500	500	
1000	500	
1500	500	
500	1000	5, 10, 20, 30
500	1500	
1000	1000	
1000	1500	
1500	1500	

Os ensaios utilizando a potência máxima de 1300 W, não se mostraram adequados durante a decomposição, por superaquecerem a solução e projetando-a para fora dos frascos, uma vez que os frascos permaneciam abertos durante toda a decomposição para que a pressão interna nos frascos não aumentasse, evitando o seu rompimento. Assim, optou-se pela utilização de 60% da potência, mantendo ainda, intervalos de 20 segundos de aquecimento e 20 segundos de arrefecimento. A potência ajustada para 780 W se mostrou adequada quanto ao processo de decomposição, como com a segurança do operador.

Na Figura 1 está mostrada uma comparação entre os resultados dos ensaios realizados levando em consideração a proporção da mistura de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio e o tempo de decomposição. Nota-se que além do tempo ser uma variável importante na decomposição, a proporção da mistura utilizada também parece ser um fator relevante. Pode-se verificar que ao variar a concentração entre os componentes da mistura reacional, ambos exercem influência para a redução no teor de carbono na solução, porém a contribuição do peróxido de hidrogênio é nitidamente mais relevante. A possível explicação para essa diminuição no teor de carbono deve-se ao fato do peróxido de hidrogênio ser um agente oxidante forte. Além disso, é provável que parte do peróxido de hidrogênio produza radicais hidroxila, devido à grande quantidade de ferro presente no sangue. Desta maneira, os radicais hidroxila gerados possivelmente atacam compostos celulares mais complexas e insaturadas, tornando-os passíveis de serem oxidados.

Figura 1 - Avaliação da concentração de carbono nas soluções após tratamento das amostras com HNO_3 e H_2O_2 e utilizando micro-ondas convencional para aquecimento. A barra de erros corresponde a 1SD dos resultados a partir de $N = 3$.



Para a escolha da proporção a ser utilizada no processo de decomposição, foram realizados testes comparativos entre os resultados (*teste t-student*, com nível de confiança de 95%) com os valores de menor teor de carbono em solução, ou seja, para os tempos de 20 e 30 min de decomposição. A proporção escolhida entre HNO₃ e H₂O₂ foi de 1:1, não havendo diferença significativa entre os resultados.

Tempos maiores que 30 minutos não foram avaliados uma vez que os valores da concentração de carbono resultantes das decomposições ficaram abaixo dos valores citados na literatura que levam à interferências nas medidas por ICP-MS. Segundo um estudo de Grindlay (2013) em relação aos diferentes efeitos da concentração de carbono em solução na determinação de metais utilizando a técnica de ICP-MS, apenas foi notado interferência de alguma natureza (matriz, transporte e ionização) para concentrações superiores a 5000 mg L⁻¹ de C para a maioria dos elementos, com exceção de As e Se.

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para a determinação de C por ICP OES foram estimados a partir da média entre dez leituras de diferentes soluções contendo 1,0 mL de HNO₃ e 1,0 mL de H₂O₂ aferidas em um volume final de 5,0 mL. Os valores do LOD e LOQ para carbono foram de 2,24 mg L⁻¹ e 4,91 mg L⁻¹, respectivamente.

5.3 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CONTAMINANTES NOS FRASCOS

Houve a necessidade de monitorar a concentração dos elementos majoritários nos frascos de coleta de sangue, uma vez que os mesmos contêm uma quantidade de anticoagulante previamente adicionado quando comercializado. Desta maneira, foram realizados ensaios de lixiviação para determinar a pureza do reagente utilizado, bem como a contaminação nos frascos de coleta. Utilizando a técnica de ICP OES, verificou-se uma concentração média de 3,10 mg L⁻¹ de Ca, 2,19 mg L⁻¹ de Mg e para K a concentração média excedeu 100 mg L⁻¹ pelo fato do anticoagulante utilizado ter em sua composição K₃-EDTA.

O mesmo ensaio foi realizado para os frascos utilizados para a decomposição, sendo que as concentrações obtidas para os mesmos elementos foram de 0,25 mg L⁻¹ para Ca, enquanto que para Mg e K, os valores obtidos foram de 7,86 e 23,5

$\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente. Os demais elementos foram determinados através da técnica de ICP-MS e estão descritos nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5 - Concentração de elementos obtida dos ensaios de lixiviação para os frascos utilizados na coleta de sangue. Determinações feitas por ICP-MS. Os valores representam a média e desvio padrão para 10 replicatas.

Elemento	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)
^{51}V	$0,25 \pm 0,17$
^{52}Cr	$1,33 \pm 0,07$
^{55}Mn	$0,58 \pm 0,12$
^{59}Co	$0,03 \pm 0,01$
^{60}Ni	$0,26 \pm 0,07$
^{65}Cu	$0,21 \pm 0,06$
^{68}Zn	$9,20 \pm 2,64$
^{75}As	$0,05 \pm 0,02$
^{82}Se	$0,34 \pm 0,07$
^{85}Rb	$11,04 \pm 0,83$
^{88}Sr	$3,89 \pm 1,19$
^{98}Mo	$0,03 \pm 0,01$
^{111}Cd	$0,02 \pm 0,01$
^{121}Sb	$2,33 \pm 0,19$
^{138}Ba	$2,32 \pm 0,49$
^{208}Pb	$0,13 \pm 0,02$

Tabela 6 - Concentração de elementos obtida dos ensaios de lixiviação para os frascos utilizados na decomposição das amostras de sangue. Determinações feitas por ICP-MS. Os valores representam a média e desvio padrão para 10 replicatas.

Elemento	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)
⁵¹ V	0,03 ± 0,01
⁵² Cr	0,16 ± 0,03
⁵⁵ Mn	0,08 ± 0,01
⁵⁹ Co	0,004 ± 0,001
⁶⁰ Ni	0,15 ± 0,02
⁶⁵ Cu	0,09 ± 0,02
⁶⁸ Zn	8,51 ± 0,45
⁷⁵ As	0,02 ± 0,001
⁸² Se	0,10 ± 0,03
⁸⁵ Rb	0,01 ± 0,003
⁸⁸ Sr	1,06 ± 0,13
⁹⁸ Mo	0,01 ± 0,001
¹¹¹ Cd	0,001 ± 0,001
¹²¹ Sb	0,01 ± 0,002
¹³⁸ Ba	0,91 ± 0,13
²⁰⁸ Pb	0,10 ± 0,02

Com base nos resultados obtidos, não foi possível determinar Ca, K e Mg em função da alta contaminação presente nos frascos de coleta de sangue e nos frascos onde as amostras foram decompostas. Para os demais elementos, quando comparados com os resultados nas amostras de sangue, a concentração é pelo menos dez vezes inferior do que os valores obtidos para nas amostras de sangue.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Para que se tenha uma compreensão melhor dos fenômenos que podem ocorrer durante as determinações dos elementos na amostra, foram realizados experimentos de recuperação dos elementos de interesse para avaliar o comportamento da matriz decomposta frente a diferentes diluições, para então optar pela diluição ideal sem qualquer interferência física como efeito de transporte, efeitos espaço/carga e ionização no plasma.

5.4.1 Avaliação da exatidão dos resultados utilizando a técnica de ICP-MS

Anteriormente a etapa de determinação dos elementos de interesse nas amostras de sangue, foi necessária uma etapa de verificação da exatidão dos resultados, uma vez que era desconhecido o comportamento da matriz.

A calibração, como já mencionado, foi realizada utilizando solução de referência com concentrações entre $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ a $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Posteriormente, para verificar a exatidão dos resultados, foi analisada uma solução padrão de referência de água natural (NIST 1640a) em um fator de diluição de 10 vezes. A concordância dos resultados está descrita na *Tabela 7*. Os valores obtidos por ICP-MS foram todos concordantes com o valor informado na solução de referência certificada, sendo que nenhum dos elementos determinados ultrapassou 10% da margem de erro.

Tabela 7 - Verificação da exatidão da curva de calibração utilizada para a determinação de elementos nas amostras de sangue total. Determinações feitas por ICP-MS. Os valores representam a média e desvio padrão para 3 replicatas.

Elemento	Concentração NIST 1640a ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Diluição teórica (ng L^{-1})	Concentração obtida (ng L^{-1})	Concordância dos valores (%)
^{51}V	$15,05 \pm 0,25$	1505	1356	90
^{53}Cr	$40,54 \pm 0,3$	4054	3749	92
^{55}Mn	$40,39 \pm 0,36$	4039	3651	90
^{59}Co	$20,24 \pm 0,24$	2024	1828	90
^{60}Ni	$25,32 \pm 0,14$	2532	2394	94
^{63}Cu	$85,75 \pm 0,51$	8575	7965	92
^{68}Zn	$55,64 \pm 0,35$	5564	5224	93
^{75}As	$8,075 \pm 0,07$	807,5	812	100
^{82}Se	$20,13 \pm 0,17$	2013	2156	107
^{88}Sr	$126,03 \pm 0,91$	12603	11604	92
^{98}Mo	$45,6 \pm 0,61$	45600	4370	95
^{111}Cd	$3,992 \pm 0,074$	3992	387	97
^{121}Sb	$5,105 \pm 0,046$	5105	495	96
^{137}Ba	$151,8 \pm 0,83$	15180	14108	92
^{208}Pb	$12,101 \pm 0,05$	1210,1	1111	91

5.4.2 Estudo do efeito de matriz nas amostras de sangue

Antes de determinar a concentração dos elementos desejados, é necessário conhecer o tipo de matriz com a qual se está trabalhando, neste caso, o sangue. O sangue compreende basicamente o plasma, células vermelhas, brancas e plaquetas. O plasma corresponde a uma fração de aproximadamente 55% do sangue total. Para completar, os outros 45% são compostos por células vermelhas, células brancas e plaquetas. Esta última fração possui um alto teor de carbono, enquanto no plasma temos uma alta concentração de íons solvatados, sobretudo, sódio e cloreto.

Ao utilizar uma técnica como a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, a alta concentração de carbono ou sódio, pode afetar de diversas maneiras a exatidão, levando a resultados errôneos e por vezes muito diferentes do resultado real. Um exemplo comumente relatado na literatura quando a matriz apresenta um elevado teor de carbono é o aumento de sinal para As, Se, Te, Au e Hg (GRINDLAY, Guillermo, 2013). Esse aumento de sinal é explicado principalmente pelo fato do carbono facilitar a ionização de elementos com alto potencial de ionização, através de um mecanismo de transferência de carga entre C⁺ e estes elementos na região central do plasma.

Outro problema recorrente é a supressão de sinal dos elementos, usualmente ocasionado pela quantidade de alguns sais presentes na matriz, como é o caso do sangue. Normalmente esse problema é contornado através da calibração com simulação da matriz ou, quando possível, diluindo a matriz por um fator que não haja mais supressão dos sinais e a linearidade se mantenha, uma vez que vários elementos serão determinados de forma sequencial, porém com concentrações variadas.

Para verificar se o teor de carbono ainda interfere nas determinações, foram realizadas diluições na amostra de sangue total utilizada para as otimizações do método, nos fatores de 40, 80, 160 e 1600 vezes para verificar qualquer tipo de interferência física ou espectral. Os elementos monitorados para formação de íons poliatômicos foram o ⁵²Cr (⁴⁰Ar¹²C⁺); ⁷⁵As (⁴⁰Ar³⁵Cl⁺) e o ⁸²Se (¹²C³⁵Cl₂⁺) (ALLAIN, Pierre, 1991). Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 8.

Tabela 8 - Avaliação do efeito de matriz como interferente sobre o Cr, As e Se em análises feitas por ICP-MS. Todos os resultados estão expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$.

Fator de Diluição	^{52}Cr	^{75}As	^{82}Se
40	24,9	0,24	2,92
80	12,4	0,13	1,39
160	6,46	< 0,08	0,64
1600	0,52	< 0,08	< 0,5

As interferências possíveis sobre ^{52}Cr e ^{82}Se estão diretamente relacionadas a concentração de carbono na solução, sendo que os ensaios de diluição tem o objetivo de verificar a linearidade dos resultados em uma condição em que a interferência poliatômica fosse contornada. A linearidade para ^{52}Cr e ^{82}Se foi observada a diluições de até 80 vezes, desta forma não havendo interferências de poliatômicos de maneira significativa que comprometa a medida. É relatado na literatura que concentrações de carbono de até 250 mg L^{-1} não apresentam interferências poliatômicas significativas para as medidas, como foi observado nas amostras após etapa de diluição (MÜLLER, A. et al., 2014).

Para ^{75}As , o principal interferente é o íon poliatômico $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$, desta forma a concentração de cloreto seria um fator importante. A concentração de cloreto no sangue varia em uma faixa de $2,75 - 2,95 \text{ g L}^{-1}$ (OLIVEIRA, Laura et al., 2005), desta forma diluições de 40 e 80 vezes se mostram adequadas para eliminar a interferência causada pelo íon cloreto, mantendo a linearidade nas respostas para As. Testes de recuperação também foram realizados para observar o perfil do sinal.

O mesmo procedimento foi utilizado para verificar algum problema de supressão de sinal e/ou interferência poliatômica, ambos ocasionados pela alta concentração de Na no sangue. Os elementos monitorados foram o ^{60}Ni ($^{23}\text{Na}^{37}\text{Cl}^+$), ^{62}Ni ($^{23}\text{Na}^{39}\text{K}^+$), ^{59}Co ($^{36}\text{Ar}^{23}\text{Na}^+$) e ^{63}Cu ($^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}^+$). Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 9.

Tabela 9 - Avaliação da concentração de Na sobre o ^{60}Ni , ^{62}Ni , ^{59}Co e ^{63}Cu em análises por ICP-MS. Todos os resultados estão expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$.

Fator de Diluição	^{60}Ni	^{62}Ni	^{59}Co	^{63}Cu
40	17,3	17,6	0,12	21,4
80	8,5	8,9	0,07	10,9
160	4,5	4,6	N.Q.	5,8
1600	0,4	0,4	N.Q.	0,5

Os limites de detecção e quantificação dos elementos foram obtidos através do cálculo de 3 e 10 vezes o desvio padrão das medidas de 3 replicatas do branco e estão descritos na Tabela 10.

Como pode ser verificada uma redução proporcional da concentração dos elementos com o fator de diluição da amostra, pode-se inferir que não está ocorrendo uma interferência devido ao Na nas medições destes elementos.

Tabela 10 - Limites de detecção e quantificação dos elementos na técnica de ICP-MS. Todos os resultados estão expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$.

Elemento	^{52}Cr	^{75}As	^{82}Se	^{60}Ni	^{62}Ni	^{59}Co	^{63}Cu
LOD	0,01	0,02	0,17	0,13	0,12	0,02	0,04
LOQ	0,05	0,08	0,50	0,36	0,35	0,07	0,12

Além de ensaios de diluição, foram realizados ensaios de recuperação dos elementos de interesse para comprovar que a matriz não tem interferência de natureza física. Desta maneira, duas alíquotas da amostra digeridas foram separadas e diluídas por um fator de 40 e 80 vezes, seguido da adição de uma solução de referência multielementar (SCP33MS) para obter uma concentração equivalente a $5 \mu\text{g L}^{-1}$ em ambas as soluções. As recuperações variaram entre 82% a 113% para a solução diluída com um fator de 80 vezes, enquanto que as recuperações para a solução diluída 40 vezes foram de 69% a 112%, como mostrado na Tabela 11.

Tabela 11 - Ensaios de recuperação dos elementos determinados por ICP-MS para amostras diluídas 40x e 80x.

Elemento	Recuperação (%) Amostra 80X	Recuperação (%) Amostra 40X
⁵¹ V	98	94
⁵² Cr	101	69
⁵⁵ Mn	83	83
⁵⁹ Co	97	97
⁶² Ni	98	63
⁶³ Cu	101	71
⁶⁸ Zn	98	71
⁷⁵ As	112	112
⁸² Se	113	83
⁸⁵ Rb	99	87
⁸⁸ Sr	98	70
⁹⁸ Mo	101	84
¹¹¹ Cd	94	91
¹¹⁸ Sn	99	71
¹²¹ Sb	103	97
¹³⁷ Ba	101	76
²⁰⁸ Pb	110	76

Com base nos resultados obtidos, pode-se observar um efeito de supressão de sinal devido a presença da matriz da amostra de sangue, o qual é completamente contornado com a diluição da amostra. Em geral, a literatura relata problemas com a formação de íons poliatômicos especialmente sobre ⁵²Cr, devido a presença de C, o que não foi observado, o mesmo é válido para ⁸²Se. Para as diluições de 40 e 80 vezes, a concordância com os valores teóricos não ultrapassou 13% de erro. Diluições acima de 80 vezes não se mostraram adequadas uma vez que os elementos de interesse se encontram em uma concentração abaixo do LOQ.

Para os ensaios que visavam o efeito do sódio como interferente, houve linearidade para todas as diluições, sem supressão de sinal. Apesar dos testes de recuperação mostrarem que um fator de diluição de 80 vezes seria o mais adequado pelo fato de contornar o efeito de matriz, optou-se por utilizar diluições de 40 vezes para a determinação nas amostras decompostas, uma vez que a faixa de

concentração em relação ao LOQ das medidas é 3 vezes superior. Além disso, o teste de recuperação se mostrou adequado para a maioria dos analitos.

5.5 DETERMINAÇÃO DE METAIS NO SANGUE ATRAVÉS DA TÉCNICA DE ICP-MS

Após as etapas de otimização da decomposição, investigação dos efeitos de matriz e da escolha adequada da diluição das amostras, foi realizada a determinação dos analitos presentes nas amostras.

Como já mencionado anteriormente na sessão 4.2, as amostras foram separadas de acordo com as diferentes etapas do tratamento aplicado aos pacientes. Inicialmente foram analisadas as amostras relativas aos pacientes que apresentavam resultados positivos para a LLA em seus diagnósticos, porém não haviam iniciado o tratamento quimioterápico (Tabela 12) e para pacientes que estavam iniciando ou já se encontravam na primeira fase do tratamento.

Após a determinação dos metais durante o início do tratamento e a fase de indução, as amostras de pacientes que não tiveram recidiva durante o tratamento, isto é, pacientes que tiveram boa resposta a primeira fase do tratamento, foram separadas para compor o terceiro grupo, ou a segunda etapa denominada fase de intensificação ou consolidação da remissão. A terceira fase é chamada de manutenção, cuja esta etapa visa manter a quantidade de glóbulos brancos sob controle, geralmente em torno de 3×10^9 contagens por litro. É a fase com a maior duração em todo o tratamento (em média 2 anos) sendo o seu tempo variável de acordo com o prognóstico de cada paciente.

Para um referencial comparativo, amostras de sangue de um grupo de pacientes que se apresentaram fora do tratamento por um período superior a um ano foram coletadas e determinadas utilizando os mesmos procedimentos aplicados para as demais etapas. Os resultados obtidos também estão mostrados na Tabela 12. Para uma melhor comparação dos resultados obtidos, os gráficos de barras das Figuras 2 e 3 mostram os valores obtidos de cada elemento ao longo do tratamento com seus respectivos desvios padrão.

Tabela 12 - Determinação de elementos em sangue total em pacientes que não iniciaram o tratamento de LLA. Valores de concentração expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$. Os valores correspondentes à média e desvio padrão (1SD).

Elemento	Pacientes que não iniciaram o tratamento (N = 6)	Pacientes em fase de indução (N = 9)	Pacientes na fase de intensificação (N = 15)	Pacientes na fase de manutenção (N = 20)	Controle (N = 16)
⁵¹ V	0,02 ± 0,002	0,0198 ± 0,0021	0,0105 ± 0,002	0,0232	0,0144
⁵² Cr	< 0,044	< 0,044	< 0,044	< 0,044	< 0,044
⁵⁵ Mn	0,0286 ± 0,0046	0,0360 ± 0,0038	0,0373 ± 0,006	0,0370	0,0673
⁵⁹ Co	< 0,007	< 0,007	< 0,007	< 0,007	< 0,007
⁶² Ni	< 0,014	< 0,014	< 0,014	< 0,014	< 0,014
⁶³ Cu	1,5717 ± 0,2249	0,7847 ± 0,2476	0,6676 ± 0,205	0,7409	0,8164
⁶⁸ Zn	2,6159 ± 0,5895	3,0753 ± 0,4180	3,0417 ± 0,536	2,8676	4,0388
⁷⁵ As	0,0127 ± 0,0014	0,0117 ± 0,0018	0,0095 ± 0,001	0,0086	0,0089
⁸² Se	0,0795 ± 0,0175	0,1241 ± 0,0353	0,1421 ± 0,033	0,1011	0,0977
⁸⁵ Rb	1,6334 ± 0,2839	2,3910 ± 0,5193	2,8090 ± 0,673	2,7490	3,8638
⁸⁸ Sr	0,0179 ± 0,0051	0,0161 ± 0,0039	0,0149 ± 0,004	0,0171	0,0154
⁹⁸ Mo	< 0,01	< 0,01	0,0024 ± 0,001	0,0017	< 0,010
¹¹¹ Cd	< 0,002	< 0,002	< 0,002	< 0,002	< 0,002
¹¹⁸ Sn	< 0,011	< 0,011	< 0,011	< 0,011	0,0012
¹²¹ Sb	0,0053 ± 0,0006	0,0068 ± 0,0015	0,0075 ± 0,001	0,0064	0,0092
¹³⁷ Ba	< 0,056	< 0,056	< 0,056	< 0,056	< 0,056
²⁰⁸ Pb	< 0,008	< 0,008	0,0046 ± 0,002	< 0,008	< 0,008

Figura 2 - Concentração de elementos em sangue total de pacientes em diferentes etapas do tratamento de LLA. Resultados obtidos utilizando ANOVA como tratamento estatístico, com intervalo de confiança de 95%.

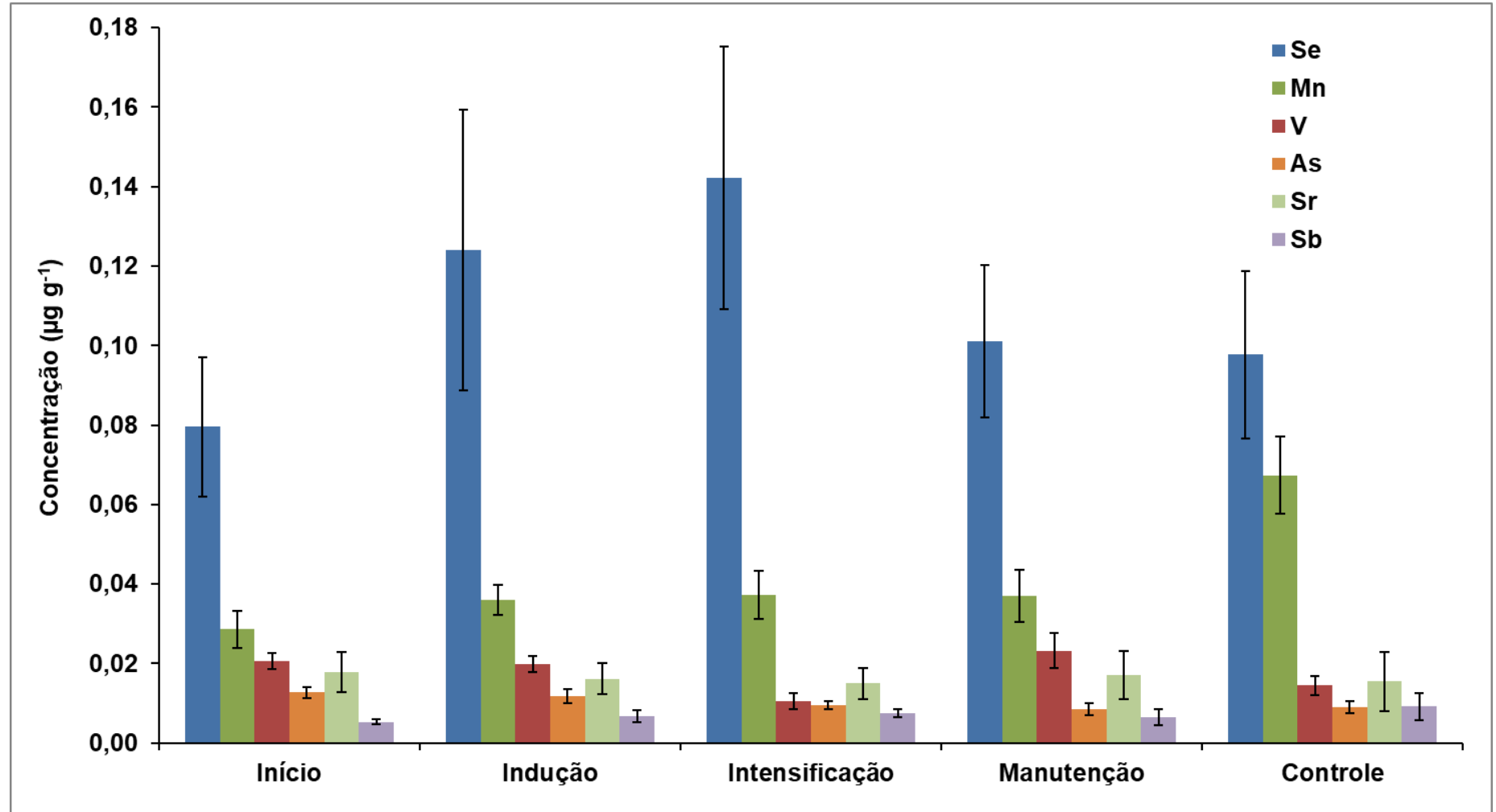
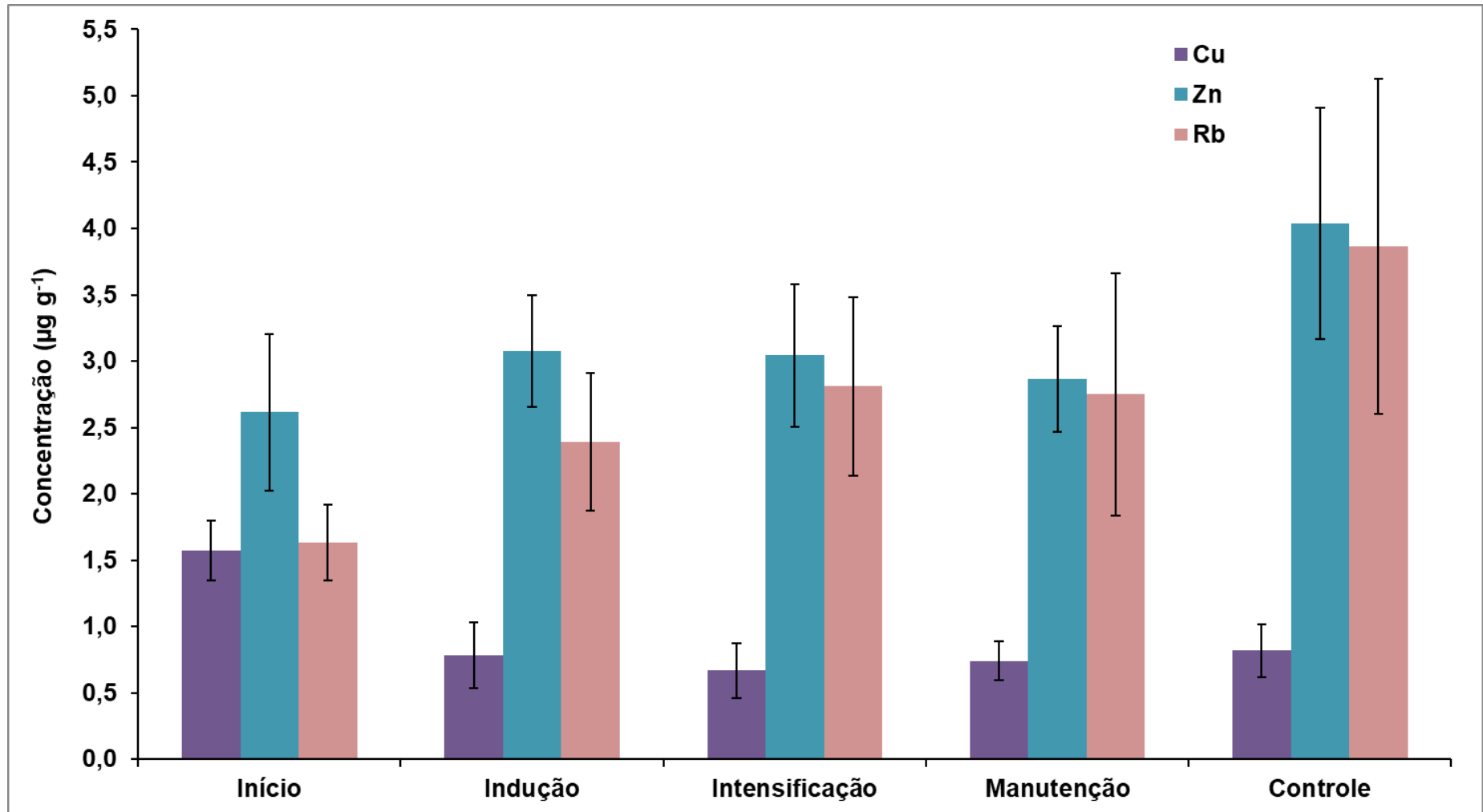


Figura 3 - Concentração de Cu, Zn e Rb em sangue total de pacientes com LLA em diferentes etapas do tratamento. Resultados obtidos utilizando ANOVA como tratamento estatístico, com intervalo de confiança de 95%.



Para entendermos as variações dos elementos apresentados, é importante que saibamos o seu papel no organismo humano. Muitos elementos fazem parte de diversas rotas metabólicas atuando como cofatores para muitas enzimas, bem como centros estabilizantes de estruturas proteicas.

Ao observarmos a Figura 2, temos a variação dos elementos traços determinados neste trabalho. Para um melhor detalhamento sobre os resultados obtidos, cada elemento será abordado separadamente.

Vanádio: Predominantemente, as espécies de vanádio na corrente sanguínea estão na forma de vanadatos ou vanádio ligado a transferrina. A partir da corrente sanguínea, o vanádio pode ser distribuído para os tecidos do corpo e principalmente para os ossos, os quais atuam como depósitos para o vanádio em função da sua semelhança química com fosfato. Recentemente, compostos orgânicos de vanádio estão sendo sintetizados e utilizados para o combate de diversos tipos de neoplasias, principalmente casos de células resistentes à cisplatina (REHDER, Dieter, 2013). Conforme a Figura 2, existe uma diferença significativa ($P < 0,05$), entre as concentrações em pacientes antes de iniciarem o tratamento e após um ano de finalizarem o tratamento. Entretanto, não há diferença significativa entre as etapas do tratamento, exceto na etapa de intensificação onde há uma redução considerável nos níveis de vanádio, porém é a concentração mais próxima dos pacientes controles. Possivelmente, por tratar-se da etapa onde as concentrações dos fármacos são administradas em concentrações maiores, a maior parte dos blastos que retém o elemento tenha sido destruído e conseqüentemente eliminado do organismo.

Estrôncio: Particularmente, devido a sua semelhança com o cálcio, o estrôncio pode ter um comportamento similar ao cálcio. Logo, a razão entre Ca e Sr presente no organismo reflete de maneira geral a mesma proporção na dieta alimentar. Em relação a suas funções endócrinas, pode manter a liberação de insulina como resposta da presença de glucose. O excesso de estrôncio no organismo pode causar uma doença chamada hipocalcemia, resultado da alta excreção de cálcio e absorção de estrôncio (NIELSEN, Pors, 2004). Os resultados obtidos para todas as etapas do tratamento referente a estrôncio não possuem diferenças significantes ($P > 0,05$).

Antimônio e arsênio: Estes dois elementos possuem propriedades química parecidas. Ambos os elementos estão relacionados muito mais em função da sua toxicidade do que seus efeitos benéficos ao corpo humano. Tanto o arsênio como o antimônio não são considerados elementos essenciais para o organismo e podem, dependendo de sua espécie, serem letais.

Na sua forma pentavalente, o antimônio tem sido utilizado como fármaco no combate à leishmaniose e, em alguns casos, o trióxido de antimônio pode ser utilizado para induzir o aumento da produção das espécies reativas de oxigênio com o intuito de destruir células de câncer. Da mesma forma como o trióxido de antimônio é utilizado propositalmente para induzir a produção de espécies reativas de oxigênio, o ácido dimetilarsínico pode atuar da mesma forma, causando danos diretos ao DNA, originando aberrações cromossômicas.

Ambos os elementos não apresentaram variações consideráveis ao longo do tratamento. É possível verificar uma diminuição contínua para arsênio, apresentando uma diferença significativa apenas entre os pacientes no início do tratamento em comparação ao grupo controle. Curiosamente, o perfil encontrado para antimônio demonstra um aumento da concentração ao final do tratamento, com um aumento significativo da concentração. Uma vez que antimônio não se caracteriza como um elemento comum ou essencial ao organismo, é razoável assumir que os valores crescentes podem estar relacionados a alguma eventual contaminação durante a administração dos fármacos.

Manganês: A forma mais comum de exposição ao manganês é oralmente com a ingestão de vegetais, vitaminas, cereais e até mesmo água. Ainda que o mecanismo de absorção no intestino não esteja elucidado, sabe-se que a distribuição do manganês após atingir a corrente sanguínea, se dá através dos eritrócitos, que conseguem transportar o elemento em sua forma iônica através de alguns transportadores, como a transferrina (TfR), localizados na superfície da célula.

O manganês presente na corrente sanguínea pode estar em sua forma divalente ou trivalente, mas não se sabe exatamente a proporção entre as espécies, apenas que a espécie divalente é predominante e está complexada a diversas moléculas dentre elas, a albumina, que corresponde a praticamente 84% do Mn^{2+} presente no sangue. A Figura 2 mostra valores crescentes da concentração de manganês entre as fases do tratamento da LLA. Entretanto, estatisticamente, não há

diferenças significantes entre pacientes recém-diagnosticados e pacientes nas fases de indução, intensificação ou manutenção ($P > 0,05$). A grande diferença é verificada quando comparamos o grupo controle com qualquer fase do tratamento. Esta diferença provavelmente é explicada pelos baixos níveis de albumina presentes no sangue antes e durante o tratamento, juntamente a este fator temos os baixos níveis de eritrócitos, os quais acabam aumentando ao longo do tratamento.

Selênio: O selênio é tido como um micronutriente muito importante em relação a sua função antioxidante, assim como o zinco, cobre, manganês e ferro, a importância deste elemento foi descoberta por atuar juntamente com a enzima glutathione peroxidase, responsável pela conversão de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (ARTHUR, John, 2000).

Alguns estudos têm demonstrado que a baixa atuação da glutathione peroxidase está relacionada a diversos tipos de câncer (ARTHUR, John, 2000). Em geral, quando o paciente é diagnosticado com LLA, sua atividade enzimática e a concentração de selênio se mantém baixa. Isso pode ocorrer em razão de dois motivos principais. Uma estaria relacionada ao desequilíbrio entre a quantidade de espécies reativas de oxigênio produzida e a capacidade de conversão da enzima. Em um segundo momento existe a hipótese de os sítios ativos da enzima estarem disponíveis para a conversão destas espécies, porém não existir a suplementação suficiente de Se atuando como cofator da enzima. Em ambos os casos, a enzima não irá desempenhar o seu papel de converter estas espécies reativas, levando, como consequência, danos ao DNA celular (SQUADRONE, Stefania, 2015).

Segundo as variações da concentração de Se observadas na Figura 2, é possível ver o aumento gradual dos valores de Se em cada etapa do tratamento até a fase de intensificação. Estatisticamente não há diferenças significativas entre as etapas do início do tratamento, indução e manutenção, porém, existe uma diferença expressiva na etapa de intensificação com as demais fases do tratamento. Esta diferença em relação as demais fases do tratamento, inclusive do grupo controle, possivelmente pode ser explicada por eventuais transfusões sanguíneas, muito comum, quando as contagens de eritrócitos (glóbulos vermelhos) estão muito baixas no paciente.

Zinco e cobre: O perfil obtido e mostrado na Figura 3 para estes elementos destaca-se sobre os demais, uma vez que para a maioria dos elementos houve um

perfil crescente e gradual ao longo do tratamento, o contrário ocorre especificamente com o elemento cobre. A comparação entre o início do tratamento com o grupo controle tanto para cobre como para zinco é muito significativa e pode estar associada justamente as enzimas regulatórias do stress oxidativo do organismo. Esta inversão na razão entre cobre e zinco, anterior ao tratamento, também foi relatada por Sgabieri e colaboradores (1999), propondo ser um indicativo de distúrbio no metabolismo causado por alguma patologia.

Segundo Osredkar (2011) o zinco encontrado no plasma sanguíneo está em sua maioria (60%) ligado a albumina e transferrina (10%). Normalmente a concentração de zinco na corrente sanguínea se mantém inalterada, independentemente da alimentação do paciente. Os baixos níveis de zinco podem ser explicados pelo baixo teor de albumina presente na corrente sanguínea, o que concordaria com os resultados obtidos para manganês. Uma segunda hipótese que complementaria esta explicação seria o desequilíbrio entre zinco e cobre, observado por Sgabieri e colaboradores (1999), já que ambos os elementos possuem papel importante no controle das espécies reativas de oxigênio.

Assim como o zinco, o cobre tem um papel extremamente importante para o funcionamento apropriado de muitas enzimas que controlam nosso metabolismo. O cobre é responsável por manter a estrutura da pele, vasos sanguíneos, tecido epitelial e conjuntivo. O cobre também tem atuação na produção de hemoglobina, melanina e miosina, além de manter o funcionamento da glândula tireoide normal (SKALNAYA, Margarita, 2018).

Juntos, o cobre e o zinco são cofatores para a enzima superóxido dismutase, a qual está localizada no citoplasma das células e também no núcleo. Esta enzima exerce uma função muito importante no organismo, convertendo as espécies de oxigênio radicalar em peróxido de hidrogênio, espécie menos reativa, porém ainda prejudicial.

Possivelmente, além da redução dos níveis de albumina no sangue, explicando a drástica diminuição de zinco no organismo dos pacientes, a mudança na razão entre zinco e cobre tenha refletido na atividade enzimática que a superóxido dismutase desempenha, substituindo um átomo de zinco por dois átomos de cobre como cofatores. Obviamente, uma vez que a enzima não consegue

desempenhar totalmente sua função, a conversão das espécies reativas acaba sendo comprometida.

Rubídio: É o mais abundante elemento no corpo humano que não tem um papel biológico conhecido, sendo sua concentração em média 0,68 gramas para uma pessoa com 70 kg. Sabe-se que sua absorção é rápida e apresenta baixa toxicidade aos seres humanos. Alguns estudos indicam a possibilidade da sua atuação em sistemas neurofisiológicos (Durfor e Becker, 1964). Estudos com relação a sua participação em processos biológicos são escassos na literatura, entretanto Nielsen (1986) relata a substituição de potássio por rubídio em algumas atividades biológicas.

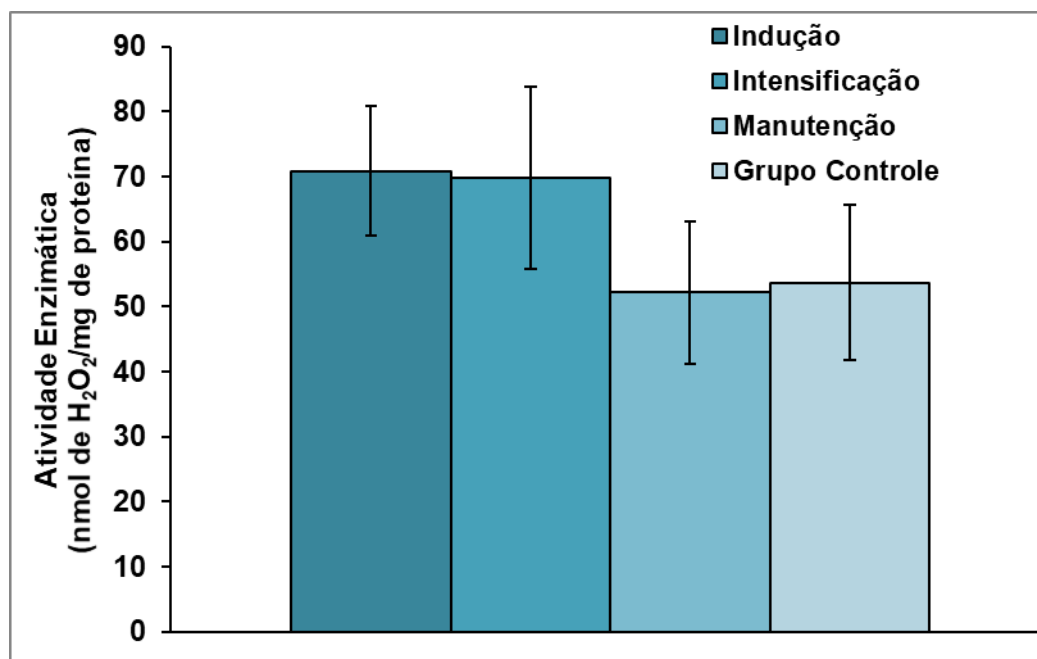
Assim, como esperado, a concentração de rubídio aumenta, sendo a comparação entre o início do tratamento e o grupo controle muito significativa ($P < 0,05$). Muito provavelmente o resultado mais razoável para a explicação deste perfil seria a melhora do paciente conforme a progressão do tratamento. Também se deve levar em consideração que a falta de apetite nos primeiros meses de tratamento é algo muito comum, o que contribuiria para valores menores de Rb muito diferentes ao grupo controle.

5.6 TESTES DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Os testes relacionados à atividade da enzima superóxido dismutase não foram concluídos em razão de diversas amostras não apresentarem resposta aos testes aplicados. Uma possível explicação para este acontecimento seria a desnaturação das enzimas, uma vez que as mesmas foram estocadas por um longo período, sendo manuseadas por diversas vezes para controle e registro das mesmas.

Os resultados obtidos para os ensaios de atividade enzimática de catalase estão mostrados na Figura 4 e compreende um grupo amostral com $N = 11$ para pacientes na fase de indução, $N = 18$ para pacientes na fase de intensificação, $N = 17$ para pacientes na fase de manutenção e $N = 21$ para pacientes que compreendem o grupo controle. Todas as medições foram realizadas em duplicatas.

Figura 4 - Determinação da atividade enzimática para catalase. Resultados obtidos utilizando ANOVA como tratamento estatístico, com intervalo de confiança de 95%.



Como mostrado na Figura 4, é possível identificar que para as fases iniciais do tratamento da LLA, a atividade da catalase se mantém em um nível elevado. Estatisticamente não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre a etapa de indução e intensificação.

Durante a etapa de manutenção, onde já está constatada a remissão das células cancerígenas, a atividade enzimática é reduzida. O mesmo pode ser notado com o grupo controle, cujos pacientes se encontram a mais de um ano fora do tratamento. Não há diferença significativa ao comparar as médias entre a etapa de manutenção e a média obtida para o grupo controle ($P > 0,05$).

Entretanto, existe diferença significativa quando comparamos as médias de indução e intensificação com as médias da etapa de intensificação e do grupo controle ($P < 0,05$).

Esta redução da atividade da enzima, possivelmente reflete uma diminuição na geração de espécies reativas de oxigênio. Obviamente, mais testes seriam necessários para comprovar tal eficiência, além da análise das demais enzimas que contribuem para a conversão destas espécies.

Como a relação dos elementos cobre e zinco estão associados diretamente a enzima superóxido dismutase, não é possível concluir com certeza se o aumento de suas concentrações contribuíram na redução da geração de ROS. Porém, como a enzima catalase representa o fim de uma sequência de mecanismos de conversão destas espécies, é razoável supor que a sua atividade enzimática esteja indiretamente relacionada aos níveis de metais que participam desta cadeia de reações.

6 CONCLUSÃO

Com este trabalho, esperava-se esclarecer algumas questões que ainda não estão completamente elucidadas na literatura sobre o tratamento da leucemia linfocítica aguda, principalmente em relação à variabilidade da concentração dos metais no sangue e a influência na produção de espécies reativas de oxigênio ao longo do tratamento e seu impacto direto na qualidade de vida dos pacientes. Além disto, houve a necessidade de fazer um estudo da decomposição de amostras de sangue total humano para determinação de múltiplos elementos, sem a necessidade da adição de agentes quelantes e surfactantes como comumente é feito nos métodos de determinação de elementos por ICP-MS.

As decomposições das amostras coletadas se mostraram satisfatórias em relação a todos os testes realizados para viabilizar a determinação dos elementos escolhidos pela técnica de ICP-MS. Diferentemente da maioria dos trabalhos já publicados, a adição de surfactantes ou mistura de ácidos não foi necessária para se atingir o objetivo de uma decomposição com baixa concentração de carbono em solução. Mesmo com um grande número de amostras, as decomposições foram realizadas em forno micro-ondas convencional e em um tempo de decomposição não superior a 1 hora.

As determinações dos elementos selecionados mostraram que pacientes com leucemia linfocítica aguda possuem concentrações muito baixas antes de iniciarem o tratamento da doença e que ao chegarem à terceira etapa do tratamento (manutenção), para a maioria dos elementos, as concentrações se aproximam muito da concentração em pacientes fora do tratamento.

Para os elementos Cu e Zn, que tem relação direta com a produção de espécies reativas de oxigênio, as quais podem causar danos diretos ao DNA celular e provocar mutações, identificou-se desequilíbrio entre a razão considerada adequada. Ao longo do tratamento as concentrações de ambos os elementos foram reestabelecidas, o que seria um indício de que o organismo estaria retornando a sua homeostase.

Os testes de atividade enzimática mostraram que durante as primeiras fases do tratamento há uma atividade bastante elevada. Entretanto, ao final do tratamento as atividades se equiparam ao grupo controle, possivelmente explicando a

diminuição das espécies reativas de oxigênio geradas antes e durante o início do tratamento.

REFERÊNCIAS

- ALDRED, Elaine. **Pharmacology, A Handbook for Complementary Healthcare Professionals**. Elsevier, 2009, 352 p.
- AL-FARTUSIE, Falah. **Essencial Trace Elements and Their Vital Roles in Human Body**. *Indian Journal of Advances in Chemical Science*, 2017, 127 - 136 p.
- ALKUFI, Hussein. **Determination the levels of Zinc and Copper in Patients with Leukemia**. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2015, 812 - 816 p.
- ALLAIN, Pierre., JAUNAUULT, Laurent., MAURAS, Yves., **Signal Enhancement of Elements Due to the Presence of Carbon-Containing Compounds in Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry**. *Analytical Chemistry*, 63, 1991, 1497-1498 p.
- ARTHUR, John., **The glutathione Peroxidases**. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57, 2000, 1835 – 1825 p.
- ARTHUR, Johnson R. **The glutathione peroxidases**. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2000, 1825 – 1835 p.
- BERNARD, Samantha. **Pediatric Leukemia – A Review**. *Journal of Cancer Clinical Trials*, 2017, 2,130 p.
- BRASIL. VIGILÂNCIA SANITÁRIA: **Manual de Vigilância Sanitária para o transporte de Sangue e Componentes no âmbito da hemoterapia**. 2a Ed, 2016.
- CASE, Patrick. **Development of a Routine Method for the determination of Trace Metals in Whole Blood by Magnetic Sector Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry with Particular Relevance to Patients with Total Hip and Knee Arthroplasty**, *Clinical Chemistry*, 2001, 275 - 280 p.
- CESBRON, Alexandre. **Metallic Profile of Whole Blood and Plasma in a Series of 106 Healthy Volunteers**. *Journal of Analytical Toxicology*, 2013, 401 - 405 p.
- DAVIS, Amanda. **Leukemia: An Overview for Primary Care**. *American Family Physician*, 2014, 89, 731. Disponível em: www.aafp.org/afp. Acesso em: 17/04/2019.
- DIAS, Patricia. **Mortalidade Infantil por Leucemia Linfóide nas Regiões do Brasil**. *Revista Brasileira de Inovação Tecnológica em Saúde*, 2016, 6(1), 11 p.
- DOBLE, Philip. **Distributions of manganese in diverse human cancers provide insights into tumour radioresistance**. *Metallomics*, 2018, 10, 1191 - 1210 p.
- FUKAI, Tohru., USHIO-FUKAI, Masuko. **Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases**. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(6), 2011, 1583–1606 p.

GONZALEZ-ANTUÑA, Ana. **Simultaneous quantification of 49 elements associated to e-waste in human blood by ICP-MS for routine analysis**, *MethodsX*, 2017, 328 – 334 p.

GREAVES, Mel., WIEMELS, Joe. **Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia**. *Nature Reviews Cancer*, 2003, 639 – 649 p.

GRINDLAY, Guillermo. **A systematic study on the influence of carbon on the behavior of hard-to-ionize elements in inductively coupled plasma–mass spectrometry**. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 86, 42 – 49 p.

HALLIWELL, Barry. **Hydrogen Peroxide in the Human Body** – *FEBS Letters*, 2000, 486, 10 p.

HARRINGTON, James. **Analysis of Human Serum and Whole Blood for Mineral Content by ICP-MS and ICP-OES: Development of a Mineralomics**

INABA, Hiroto. **Acute lymphoblastic leukaemia**. *The Lancet*, 2013, 1943 – 1955 p.

INABA, Hiroto., GREAVES, Mel., & MULLIGHAN, Charles. (2013). **Acute lymphoblastic leukaemia**. *The Lancet*, 2013, 381, 1943–1955 p.

INCA – Instituto Nacional do Câncer; Disponível em: www.inca.gov.br. Acesso em: 16/01/2018.

KIRA, Carmen. **Fast and simple multi-element determination of essential and toxic metals in whole blood with quadrupole ICP-MS**. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2014, Vol. 4 (05), 039 – 045 p.

KOT, Fyodor. **On the rubidium and lithium content and availability in the sub-arid south-eastern Mediterranean: potential health implications**. *Environmental Geochemistry and Health*, 2018, 1841 - 1851 p.

LUNA, Diego., MIRANDA, Marta., MINERVINO, Antonio., PIÑERO, Veronica., HERRERO-LATORRE, Carlos., LÓPEZ-ALONSO, Marta. **Validation of a simple sample preparation method for multielement analysis of bovine serum**. *PLOS ONE*, 2019, e0211859, 1 – 10 p.

MILLS, Gordon. **The purification and properties of glutathione peroxidase of erythrocytes**. *Journal of Biological Chemistry*, 1959, 234 - 502 p.

MÜLLER, Aline., OLIVEIRA, Jussiane., MELLO, Paola., MÜLLER, Edson., FLORES, Erico., **Study and determination of elemental impurities by ICP-MS in active pharmaceutical ingredients using single reaction chamber digestion in compliance with USP requirements**. *Talanta*, 136, 2015, 161 - 169 p.

NELSON, David L.; COX, Michael M. Cap. 8. Enzimas. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. Editora Sarvier, São Paulo – SP, 1995, 2a Ed., 147 – 176 p.

- NELSON, Dennis., KIESOW, Lutz. **Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C**. Analytical Biochemistry, 1972, 49(2), 474 – 478 p.
- NIELSEN, Forrest., Cap. 10: Other elements: Sb, Ba, B, Br, Cs, Ge, Rb, Ag, Sr, Sn, Ti, Zr, Be, Bi, Ga, Au, In, Nb, Sc, Te, Tl, W. **Trace elements in human and animal nutrition**. Editora Walter Mertz, 1986, Vol. 2, 5a Ed., 415–463 p.
- NIELSEN, Pors. **The biological role of strontium**. Bone, 35, 2004. 583 – 588 p.
- NUTTALL, Kern., GORDON, William., ASH, Owen., **Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry for Trace Element Analysis in the Clinical Laboratory**. Annals of Clinical and Laboratory Science, 25, 1995, 264 p.
- OLIVEIRA, Laura., ZAMBONI, Cibele., LINS, Patricia da Silva., AZEVEDO, Maria Regina de Andrade., **The Chlorine reference value in whole blood using ANAA**. Brazilian Journal of Physics, 35(3b), 2005, 793 – 796 p.
- OSREDKAR, Josko. **Copper and Zinc, Biological Role and Significance of Copper/Zinc Imbalance**. Journal of Clinical Toxicology, 2011, 3 - 1 p.
- PAGLIA, Donald. **Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase**. Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 1967, 70, 158 - 169 p.
- PRABHAKAR, Rajeev. **Elucidation of the mechanism of selenoprotein glutathione peroxidase (GPx)-catalyzed hydrogen peroxide reduction by two glutathione molecules: a density functional study**. Biochemistry, 2005, 44, 11864 – 11871 p.
- REHDER, Dieter. Cap. 5. – Vanadium. It`s Role for Human. **Metal Ions in Life Science**, Editora Springer. 2013, 13a Ed., 139–169 p.
- RICHARDSON, Claire. **Optimisation of whole blood and plasma manganese assay by ICP-MS without use of a collision cell**. Clinical Chemistry and Laboratorial Medicine, 2012, 317 – 323 p.
- SGABIERI, Ursula. **Nutritional assessment and serum zinc and copper concentration in leukemic children**. São Paulo Medical Journal, 1999, 8 – 13 p.
- SKALNAYA, Margarita. **Essential trace elements in human health: a physician's view**. – Tomsk, Publishing House of Tomsk State University, 2018. – 224 p.
- SQUADRONE, Stefania., **Blood metal levels and related antioxidant enzyme activities in patients with ataxia telangiectasia**. Neurobiology of Disease, 81, 2015, 162 - 167 p.
- TARIQ, Saadia. **Distributive Variability of Selected Trace Elements in the Blood Samples of Leukemia Patients**. Journal of Heavy Metal and Toxicity and Diseases, 2016, 1:1.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Manual on the management, maintenance and use of blood.** Geneva, Switzerland, 2005.

WOZNIAK, Anna. **Metal concentration in hair of patients with various head and neck cancers as a diagnostic aid.** Biometals, 2016, 81 – 93 p.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE

Título do Projeto: **“METAIS NO SANGUE E SUA CORRELAÇÃO COM A LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA”**

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Valderi Luiz Dressler

Instituição de origem do pesquisador: UFSM

Local da Coleta de amostra: Hospital Universitário de Santa Maria, RS

Telefone e endereço para contato: (55) 3220-9445. Av. Roraima, 1000, Prédio 21, Sala 5015, 97105-970 – Santa Maria - RS

Eu, Valderi Luiz Dressler, responsável pela pesquisa: **“METAIS NO SANGUE E SUA CORRELAÇÃO COM A LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA”** o convido a participar como voluntário para o nosso estudo.

Dessa forma, pedimos a gentileza de ler com atenção o que está escrito abaixo antes de decidir se aceitará esse convite ou não. Qualquer dúvida que você tiver, pergunte ao responsável pelo estudo, que ele esclarecerá qualquer pergunta.

Esta pesquisa pretende demonstrar que ao longo do tratamento os níveis de metais presentes no sangue, essenciais para o funcionamento do organismo, sofrem variações ao longo do tratamento. Essas variações podem estar melhorando ou piorando o desempenho do seu organismo e esperamos demonstrar isso de forma a entender melhor o funcionamento do corpo humano frente à leucemia linfocítica aguda.

Esse estudo será realizado aqui no HUSM e para participar, você responderá a uma entrevista sobre seus dados pessoais como peso, altura e alimentação. Alguns dados do seu prontuário também serão utilizados.

Você poderá se sentir desconfortável quanto aos procedimentos descritos acima. No caso de algum desconforto ou dificuldade, ou se você julgar procedente, a avaliação poderá ser interrompida, em qualquer etapa, sem prejuízo algum para o tratamento que você está recebendo. Se você concordar em participar do estudo, seu nome será mantido em sigilo. As informações do estudo serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas sem

Comitê de Ética em Pesquisa da UFSM: Av. Roraima, 1000 - 97105-900 - Santa Maria - RS -

2º andar do prédio da Reitoria. Telefone: (55) 3220-9362 - E-mail: cep.ufsm@gmail.com.

identificação dos voluntários. As fichas das avaliações bem como a entrevista respondida por você ficarão guardadas com os pesquisadores e serão destruídas por incineração após a conclusão do estudo.

Você pode se recusar a participar do estudo, ou retirar seu consentimento a qualquer momento, mesmo durante o exame, sem precisar justificar. Além disso, você não receberá qualquer prejuízo à assistência que esteja recebendo.

Não será pago a você nenhum valor por sua participação. Entretanto, se ocorrer algum dano comprovado em função desta participação você terá direito a indenização. Da mesma forma, se houver alguma despesa relacionada a participação na pesquisa, essa será ressarcida pelos pesquisadores.

Então, se você aceitar participar desse estudo, pedimos que assine esse termo de consentimento livre e esclarecido.

Eu, _____, após a leitura ou a escuta da leitura deste documento e ter tido a oportunidade de conversar com o pesquisador responsável para esclarecer minhas dúvidas concordo em participar do estudo que a mim foi apresentado. Declaro que fui suficientemente informada(o) a respeito da pesquisa por meio das informações que li ou que foram lidas para mim e que me foi dada uma cópia desse termo. Ficaram claros para mim quais são os objetivos do estudo, como se dará a minha participação, seus desconfortos, riscos e garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Dessa forma, concordo voluntariamente em participar da pesquisa.

Santa Maria, _____ de _____ de 20____.

Assinatura do Pesquisador Responsável

Assinatura do participante

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Valderi Luiz Dressler – (55) 9-9972.3252

Comitê de Ética em Pesquisa da UFSM: Av. Roraima, 1000 - 97105-900 - Santa Maria - RS -
2º andar do prédio da Reitoria. Telefone: (55) 3220-9362 - E-mail: cep.ufsm@gmail.com.

APÊNDICE B – TERMO DE CONFIDENCIALIDADE



Termo de Confidencialidade

Título do Projeto: **“METAIS NO SANGUE E SUA CORRELAÇÃO COM A LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA”**

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Valderi Luiz Dressler

Instituição de origem do pesquisador: UFSM

Local da Coleta de amostra: Hospital Universitário de Santa Maria, RS

Telefone para contato: (55) 3220-9445

Os pesquisadores do presente projeto se comprometem a preservar a privacidade dos pacientes, cujos dados serão coletados dos prontuários e em entrevistas individuais, utilizando questionários sobre aspectos psicossociais e alimentação dos pacientes selecionados no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM); comprometendo-se, ainda, a garantir e preservar as informações dos prontuários e base de dados dos Serviços e do Arquivo Médico do referido hospital e confidencialidade dos pacientes.

Concordam, igualmente, que estas informações serão para execução do presente projeto e seus desdobramentos de pesquisa. As informações somente poderão ser divulgadas de forma anônima, serão mantidas na UFSM – Avenida Roraima, 1000, Prédio 21, Sala 5015 – 97105-900, por um período de cinco anos, sob a responsabilidade do coordenador do projeto, Prof. Dr. Valderi Luiz Dressler. Após este período, os dados serão destruídos.

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UFSM em ___/___/___, e recebeu o número Caae _____.

Santa Maria, _____ de _____ de 20____.

Prof. Dr. Valderi Luiz Dressler

APÊNDICE C – TERMO DE ASSENTIMENTO



Termo de Assentimento

Título do Projeto: **“METAIS NO SANGUE E SUA CORRELAÇÃO COM A LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA”**

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Valderi Luiz Dressler

Instituição de origem do pesquisador: UFSM

Local da Coleta de amostra: Hospital Universitário de Santa Maria, RS

Telefone para contato: (55) 3220-9445

Você está sendo convidado para participar, de forma voluntária, da pesquisa: **“METAIS NO SANGUE E SUA CORRELAÇÃO COM A LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA”**.

Este estudo irá avaliar a presença de metais no seu sangue. Estes metais são importantes para sua saúde.

Esse estudo será realizado aqui no HUSM e para participar, você, ou seus pais ou responsáveis, responderão a uma entrevista sobre dados pessoais, peso, altura e alimentação. Alguns dados do prontuário serão utilizados.

Você não precisará realizar nenhuma coleta para participar, pois para análise dos metais será utilizado o material biológico (sangue) que já é coletado para seus exames de rotina para o protocolo do tratamento.

Você poderá se sentir desconfortável quanto aos procedimentos descritos acima. No caso de algum desconforto ou dificuldade, ou se você julgar procedente, a avaliação poderá ser interrompida, em qualquer etapa, sem prejuízo algum para o tratamento que está sendo disponibilizado. Se você concordar em participar do estudo, seu nome será mantido em sigilo.

Você pode se recusar a participar do estudo, ou retirar seu consentimento a qualquer momento, mesmo durante o exame, sem precisar justificar e sem qualquer prejuízo a assistência que esteja recebendo.

Não será pago a você nenhum valor por sua participação. Entretanto, se ocorrer algum dano comprovado em função desta participação você terá direito a indenização. Da mesma

forma, se houver alguma despesa relacionada à participação na pesquisa, essa será ressarcida pelos pesquisadores.

Então, se você aceitar participar desse estudo, pedimos que assine esse Termo de Assentimento. Este Termo de Assentimento será assinado em duas (02) vias.

Se você não souber assinar seu nome, identifique seu aceite ou negativa nas figuras abaixo.

Santa Maria, _____ de _____ de 20____.

Assinatura ou nome do participante



Assinatura do Pesquisador Responsável

Telefone para contato:

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Valderi Luiz Dressler – (55) 9-99723252

APÊNDICE D – QUESTIONÁRIO DE CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA



Questionário de caracterização da amostra

Título do Projeto: **“METAIS NO SANGUE E SUA CORRELAÇÃO COM A LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA”**

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Valderi Luiz Dressler

Instituição de origem do pesquisador: UFSM

Local da Coleta de amostra: Hospital Universitário de Santa Maria, RS

Telefone para contato: (55) 3220-9445

Nome: _____

Idade: _____ anos Data de Nascimento: ____/____/____

Sexo: Masculino Feminino

Peso: _____ kg Altura: _____

Condição Clínica: _____

Você pratica esportes com que frequência?

- Nunca 2 a 3 vezes por semana
 1 vez por semana Mais de 3 vezes por semana

Quanto tempo, em média, dura esta atividade física?

- Até 30 minutos
 Entre 30 minutos até 1 hora
 Superior a 1 hora

Em média, quanto tempo você assiste televisão ou usa o computador ou outro aparelho eletrônico?

- 1 hora ao dia ou menos
 1 – 5 horas ao dia
 6 horas ou mais ao dia

Quantos dias da semana você costuma comer feijão?

- Não tenho hábito de comer feijão
 1 vez por semana 3 vezes por semana
 2 vezes por semana 4 vezes ou mais por semana

Qual tipo de carne você mais consome na sua semana?

- Gado Aves
 Porco Peixe

Quando você come carne, você costuma comer toda a gordura?

- Sim, na maioria das vezes.
 Não, geralmente tiro o excesso de gordura.
 Não, sempre retiro toda a gordura.

Com que frequência você costuma comer fígado bovino ou suíno?

- Não consumo Mais de duas vezes ao mês
 Menos que duas vezes ao mês Ao menos uma vez por mês

Com que frequência você costuma comer frutas e verduras?

- Não tenho o hábito 2 vezes por semana
 1 vez por semana 3 vezes por semana ou mais

Assinale as frutas/sucos naturais que você costuma ingerir durante o ano:

Banana Limão Abacaxi Melão Mamão

Maçã Laranja Morango Melancia Manga

Outras: _____

Você costuma comer verduras e legumes cozidos ou apenas lavados e cortados?

Geralmente cozidos ou servidos em sopa.

Geralmente apenas lavados e cortados, como salada.

Assinale os legumes e verduras que você mais consome na semana:

Alface Cenoura Alimentos Integrais Lentilha

Rúcula Beterraba Espinafre Amendoim

Tomate Cebola Castanha Abóbora

Outras: _____

Com que frequência você costuma ingerir laticínios (leite, iogurte...)

Não costumo / Sou intolerante 3 vezes por semana

1 vez por semana 4 vezes por semana

2 vezes por semana 5 vezes por semana ou mais

Assinale os alimentos que você costuma consumir regularmente durante a semana:

Pão Francês Queijo Vagem

Farinha de Trigo Ovos Repolho

Castanha do Pará Arroz Milho

Você costuma comer frutos do mar?

- Sim, ao menos uma vez por mês. Não costumo comer.
- Sim, mas apenas em datas especiais.

Você costuma usar sal para temperar sua comida?

- Não, não costumo usar sal. Sim, em algumas refeições.
- Sim, em todas as refeições.

Você costuma usar açúcar (chá, café, suco, sobremesa) ou adoçante na alimentação?

- Não, não costumo usar açúcar. Sim, consumo adoçante.
- Sim, consumo açúcar.

Com que frequência você costuma beber refrigerante?

- Não bebo refrigerante Ao menos 2 vezes por semana
- Ao menos 1 vez por semana Mais de 3 vezes por semana

Qual das suas refeições você definiria como principal ao longo do seu dia?

- Café da manhã Café da Tarde
- Almoço Janta

Você substitui suas refeições diárias por lanches como pastéis, pizzas ou sanduíches?

- Não Sim, ao menos uma vez por semana.
- Raramente Sim, diariamente.