

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

Ana Caroline Vedovato Rubin

**AVALIAÇÃO DE METALOESTRÓGENOS EM CABELO DE  
MULHERES COM CÂNCER DE MAMA POR LA-ICP-MS**

Santa Maria, RS

2021

Ana Caroline Vedovato Rubin

**AVALIAÇÃO DE METALOESTRÓGENOS EM CABELO DE MULHERES COM  
CÂNCER DE MAMA POR LA-ICP-MS**

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

2021

Rubin, Ana Caroline Vedovato  
AVALIAÇÃO DE METALOESTRÓGENOS EM CABELO DE MULHERES  
COM CÂNCER DE MAMA POR LA-ICP-MS / Ana Caroline Vedovato  
Rubin.- 2021.  
91 p. ; 30 cm

Orientador: Valderi Luiz Dressler  
Coorientador: Edson Irineu Müller  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de  
Pós-Graduação em Química, RS, 2021

1. Câncer de mama 2. metaloestrógenos 3. LA-ICP-MS 4.  
cabelo I. Dressler, Valderi Luiz II. Müller, Edson Irineu  
III. Título.

Ana Caroline Vedovato Rubin

**AVALIAÇÃO DE METALOESTRÓGENOS EM CABELO DE MULHERES COM  
CÂNCER DE MAMA POR LA-ICP-MS**

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 07 de maio de 2021:**



---

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



---

**Luciana Maria Fontanari Krause, Dr. (UFSM)**



---

**Matheus Augusto Gonçalves Nunes, Dr. (CORSAN)**

Santa Maria, RS

2021

## 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 a obtenção de qualquer outro título.

*Ana Caroline V. Rubin*

---

Ana Caroline Vedovato Rubin

## AGRADECIMENTOS

A **Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)**, ao **Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ)** e ao **Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais (LAQIA)** pela estrutura e possibilidade de execução do presente trabalho.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo incentivo a pesquisa.

Ao Prof. Dr. **Valderi Luiz Dressler**, pela orientação desde a iniciação científica até o presente momento, pela amizade, pela paciência, pela compreensão, pelos ensinamentos, pela disponibilidade, pelas oportunidades de crescimento e pelo exemplo profissional.

Ao Prof. Dr. **Edson Irineu Muller** pela participação no comitê de orientação.

A Prof. Dra. **Dirce Pozebon**, Prof. Dra. **Luciana Maria Fontanari Krause** e ao Dr. **Matheus Augusto Gonçalves Nunes**, pela participação na banca examinadora desta dissertação pelas sugestões e contribuições para o melhoramento deste trabalho.

Aos colegas e professores do **LAQIA** e **CEPETRO** pelo convívio, amizade e colaboração. Em especial a **Kéllen Francine Anschau** e ao **Henrique Faccin**.

Ao pessoal do **Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM)** e **pacientes**, em especial às Prof. Dra. **Maria do Carmo dos Santos Araújo**, Prof. Dra. **Luciana Maria Fontanari Krause** e **Beatriz Graff Schaffer**.

A minha família, em especial, aos meus pais **Carlos** e **Rosa**, que me deram todo o suporte e incentivo para meu crescimento profissional e pessoal e, ao meu irmão **Rafael** pelo incentivo.

*“Ninguém é tão grande que não possa aprender,  
nem tão pequeno que não possa ensinar.”*

(Carlos Bernardo Gonzalvez Pecotche)

## RESUMO

### AVALIAÇÃO DE METALOESTRÓGENOS EM CABELO DE MULHERES COM CÂNCER DE MAMA POR LA-ICP-MS

AUTOR: Ana Caroline Vedovato Rubin  
ORIENTADOR: Dr. Valderi Luiz Dressler

Neste trabalho foi avaliada a relação de metaloestrógenos (Al, Sb, As, Ba, Cd, Cr, Co, Cu, Pb, Hg, Ni, Se, Sn, V e Zn) com o câncer de mama em mulheres com faixa etária média de 59 anos. Para tal, a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado com ablação a laser (LA-ICP-MS) foi utilizada para avaliar as variações dos níveis de concentração destes elementos ao longo de um fio de cabelo, enquanto que as técnicas de ICP-MS e espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) foram utilizadas para determinar a concentração destes elementos no cabelo após decomposição. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a LA-ICP-MS foram empregadas para avaliar o efeito da lavagem do cabelo, cujo procedimento foi de acordo com o recomendado pela Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA). Os fios de cabelo foram fixados sobre uma lâmina de vidro com o auxílio de uma fita dupla face e, então, analisados. Através da MEV foi possível observar que a lavagem alterou a morfologia do cabelo, enquanto que por LA-ICP-MS foi possível verificar que não houve alteração significativa da concentração dos elementos no cabelo. As condições de operação do laser foram estudadas, sendo fixadas em 50  $\mu\text{m}$ , 80  $\mu\text{m s}^{-1}$  e 26,7  $\text{J cm}^{-2}$ , para o tamanho do feixe de laser, velocidade e energia de ablação, respectivamente. O instrumento de ICP-MS foi ajustado de forma a se obter a máxima sensibilidade. A calibração para a análise por LA-ICP-MS foi feita utilizando discos de papel filtro como suporte do analito, onde foi avaliada a forma de adição do padrão interno (l-cisteína). A melhor forma de adição do padrão interno, foi juntamente com a solução de calibração. Após ser observado que não havia necessidade de lavagem, comparando-se os resultados obtidos para cabelos lavados e não lavados, foi feita a determinação dos elementos nas amostras de cabelo de mulheres com e sem câncer de mama. Para a determinação da concentração dos elementos em cabelo por ICP OES e ICP-MS, as amostras foram decompostas com ácido nítrico concentrado e com aquecimento por radiação micro-ondas. A partir das análises por ICP-MS, ICP OES e LA-ICP-MS foi observado que as concentrações dos elementos nas amostras variaram, sendo o Ba o elemento presente em maior concentração nas amostras. Ao serem aplicados testes estatísticos nos dados obtidos por ICP OES e ICP-MS, foi possível observar diferenças entre o grupo de mulheres acometidas de câncer (amostra) e o grupo de mulheres sem a doença (controle) para os elementos Ni, Cu, Cd e Sb, onde estes apresentaram concentração superior para o grupo controle.

Palavras-chave: Câncer de mama, metaloestrógenos, LA-ICP-MS, cabelo.



## ABSTRACT

### EVALUATION OF METALLOSTROGENS IN HAIR OF WOMEN WITH BREAST CANCER BY LA-ICP-MS

AUTHOR: Ana Caroline Vedovato Rubin

ADVISOR: Dr. Valderi Luiz Dressler

In this work, the relationship of metalloestrogens (Al, Sb, As, Ba, Cd, Cr, Co, Cu, Pb, Hg, Ni, Se, Sn, V, and Zn) with breast cancer in women with age around 59 years. Laser ablation coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) was used to evaluate the changes of these elements along a hair strand while ICP-MS and inductively coupled plasma optical emission (ICP OES) was used to determine elements concentration in hair after sample decomposition. Scanning electron microscopy (SEM) and LA-ICP-MS were used to evaluate the effect on hair washing. Hair washing was done according to the procedure recommended by the International Atomic Energy Agency (IAEA). Hair strands were fixed on a glass slice with the aid of double-side tape and then analyzed. Hair samples without washing were analyzed in the same way. Changes in hair morphology were observed by the analyses with SEM after hair washing, while no changes in element concentration were observed when hair strands were analyzed by LA-ICP-MS after washing. For hair analysis by LA-ICP-MS, laser ablation conditions were fixed to 50  $\mu\text{m}$ , 80  $\mu\text{m s}^{-1}$  and 26.7  $\text{J cm}^{-2}$ , for the spot size, laser speed and ablation energy, respectively. Operational conditions of the ICP-MS instrument were adjusted in order to achieve the best sensitivity. Calibration in LA-ICP-MS was performed by using an internal standard (sulphur in the form of L-cysteine) and filter paper disc (17 mm diameter) as support of the analytes and internal standard. The way to add standard and internal standard solution to the filter paper was evaluate where the best results were achieved by the addition a mixture of the standard solution plus internal standard solution. For ICP-MS and ICP OES analyses, samples were decomposed with nitric acid and heating with the aid of microwave energy. From the analyzes by ICP-MS, ICP OES, and LA-ICP-MS it was observed that the concentrations of the elements in the samples varied, with Ba being the element present in the highest concentration in the samples. By analyzing the results obtained by ICP-MS and ICP OES with statistic tools, it was possible to observe higher concentrations of Ni, Cu, Cd and Sb in hair of women with cancer than women without cancer (Control individuals).

Keywords: Breast cancer, metalloestrogens, LA-ICP-MS, hair.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| Figura 1  | Estrutura do fio de cabelo e diâmetros aproximados das subunidades.....   | 22 |
| Figura 2  | Representação esquemática do sistema de LA-ICP-MS.....  | 29 |
| Figura 3  | Incidência do laser no disco de papel filtro nos testes realizados para avaliar a distribuição dos analitos e do S adicionados no papel. As condições de análise são citadas na Tabela 2..... | 40 |
| Figura 4  | Imagens de cabelo obtidas por MEV, as amostras A-1, B-1, C-1, D-1, E-1 e F-1 não passaram pelo processo de lavagem e as amostras A-2, B-2, C-2, D-2, E-2 e F-2 forma lavadas.....             | 42 |
| Figura 5  | Razão das intensidades dos sinais do Ca, Cu e Ba normalizados pela intensidade do sinal do $^{34}\text{S}$ para as amostras A e B, antes e após a lavagem do cabelo.....                      | 44 |
| Figura 6  | Efeito da fluência do laser sobre a intensidade do sinal do $^{34}\text{S}$ em cabelo.....  | 46 |
| Figura 7  | Efeito do diâmetro do feixe do laser na intensidade do sinal do $^{34}\text{S}$ em cabelo.....  | 47 |
| Figura 8  | Efeito da velocidade de varredura do laser sobre a amostra na intensidade do sinal do $^{34}\text{S}$ .....   | 48 |
| Figura 9  | Sinais do $^{13}\text{C}$ e $^{34}\text{S}$ , utilizados como padrões internos, em amostra de fio de cabelo.....  | 49 |
| Figura 10 | Razões $^{138}\text{Ba}/^{13}\text{C}$ e $^{138}\text{Ba}/^{34}\text{S}$ ao longo do papel filtro adicionado de Ba e L-cisteína.....  | 49 |
| Figura 11 | Distribuição dos elementos no papel filtro quando a solução de l-cisteína é adicionada, o papel secado, adicionada a solução com os analitos e o papel secado novamente.....                  | 50 |
| Figura 12 | Distribuição dos elementos no papel filtro quando a solução dos analitos foi adicionada primeiro, o papel filtro, secado, a solução de l-cisteína adicionada e o papel secado novamente.....  | 51 |

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Figura 13 | Distribuição dos elementos no papel filtro quando a solução com os elementos e a l-cisteína é adicionada e o papel secado.....                       | 52 |
| Figura 14 | Concentrações dos elementos, exceto o Ca, em cabelo de mulheres com câncer de mama e grupo controle. As amostras foram analisadas por LA-ICP-MS..... | 57 |
| Figura 15 | Concentrações de elementos, exceto o Ca, encontradas no cabelo referente à amostra 25.....   | 62 |
| Figura 16 | Resumo dos dados para cada elemento, como valores mínimos e máximos, os valores de 1° e 3° quartil, mediana e média.....                             | 64 |
| Figura 17 | Gráficos do tipo boxplot separados entre grupo amostra e grupo controle para cada elemento.....  | 66 |
| Figura 18 | Análise de correlação entre as variáveis.....  | 68 |
| Figura 19 | Análise dos componentes principais.....  | 69 |
| Figura 20 | Análise dos componentes principais para as variáveis que apresentaram diferença significativa de 10% (Ni, Cu, Cd, Sb, Mn, Sn, Zn).....               | 70 |
| Figura 21 | Análise por meio de Árvores de Decisão.....  | 71 |

## LISTA DE TABELAS

|          |   |    |
|----------|---|----|
| Tabela 1 | Condições operacionais nas determinações por ICP-MS e ICP OES....   | 36 |
| Tabela 2 | Condições operacionais para análise do cabelo por LA-ICP-MS.....  | 37 |
| Tabela 3 | Equações das curvas de calibração e coeficiente de determinação ( $R^2$ ); as curvas de calibração foram obtidas por LA-ICP-MS a partir de discos de papel adicionados dos analitos e l-cisteína..... | 53 |
| Tabela 4 | Faixas de concentração de elementos consideradas normais para cabelo humano. Adaptado da referência 77.....   | 55 |
| Tabela 5 | Conclusões do teste t de Student e teste de Wilcoxon-Man-Whitney quando apropriado.....   | 67 |
| Tabela 6 | Concentrações para Zn, Ca e Al em amostra de cabelo obtidas por ICP OES.....  | 85 |
| Tabela 7 | Concentrações para Cu, Ni, Co, Mn, Cr e V em amostra de cabelo obtidas por ICP-MS.....  | 86 |
| Tabela 8 | Concentrações para Pb, Ba, Sb, Sn, Cd, Se, As em amostra de cabelo obtidas por ICP-MS.....  | 88 |

## LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

|           |   |
|-----------|---|
| BSE       | Elétrons retroespalhados  |
| CMC       | Complexo de membrana celular  |
| CRM       | Material de referência certificado  |
| DNA       | Ácido desoxirribonucleico   |
| Era       | Receptor alfa estrogênio  |
| IAEA      | International Atomic Energy Agency  |
| ICP       | Plasma indutivamente acoplado   |
| ICP-MS    | Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado                     |
| ICP OES   | Espectrometria óptica com plasma indutivamente acoplado                       |
| INCA      | Instituto Nacional de Câncer  |
| LA-ICP-MS | Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado com ablação a laser |
| MEV       | Microscopia eletrônica de varredura   |
| MS        | Espectrometria de massa   |
| NcRNA     | Ácido desoxirribonucleico não codificante                                     |
| pH        | Potencial hidrogeniônico  |
| RNA       | Ácido ribonucleico  |
| SE        | Elétrons secundários  |
| SOHT      | Society of Hair Testing   |
| TCLE      | Termo de consentimento livre esclarecido                                      |
| THR       | Terapias de reposição hormonal  |

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>16</b> |
| <b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>                               | <b>18</b> |
| 2.1 METALOESTRÓGENOS .....   | 18        |
| 2.2 INTERAÇÃO DOS METALOESTRÓGENOS COM O TECIDO CANCEROSO<br>..... | 19        |
| 2.3 CABELO COMO TECIDO PARA DIAGNÓSTICO .....                      | 21        |
| 2.4 ESTRUTURA DO CABELO .....                                      | 21        |
| 2.5 CÂNCER.....  | 23        |
| 2.6 CÂNCER DE MAMA .....   | 24        |
| 2.7 ÍNDICES DE CÂNCER DE MAMA.....                                 | 25        |
| 2.8 FATORES QUE LEVAM AO CÂNCER DE MAMA .....                      | 26        |
| 2.9 METODOLOGIAS DE ANÁLISE DE CABELO.....                         | 27        |
| <b>2.9.1 PREPARO DE AMOSTRA .....</b>                              | <b>27</b> |
| <b>2.9.2 FUNDAMENTOS DA TÉCNICA DE ICP-MS .....</b>                | <b>27</b> |
| <b>2.9.3 TÉCNICA DE LA-ICP-MS .....</b>                            | <b>28</b> |
| <b>2.9.4 PADRONIZAÇÃO INTERNA.....</b>                             | <b>30</b> |
| <b>2.9.5 ANÁLISE DE CABELO POR LA-ICP-MS E ICP-MS .....</b>        | <b>31</b> |
| <b>2.9.6 TÉCNICA DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA .....</b>  | <b>32</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>2.7 ASPECTOS ÉTICOS</b> .....   | <b>32</b> |
| <b>3. OBJETIVOS</b> .....  | <b>34</b> |
| 3.1 OBJETIVO PRINCIPAL .....   | 34        |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....   | 34        |
| 3.3 MOTIVAÇÃO.....   | 34        |
| <b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....  | <b>35</b> |
| 4.1 AMOSTRAS.....  | 35        |
| 4.2 REAGENTES.....   | 35        |
| 4.3 INSTRUMENTAÇÃO .....   | 36        |
| 4.4 PREPARO DAS AMOSTRAS .....   | 38        |
| 4.5 CALIBRAÇÃO DO LA-ICP-MS.....   | 39        |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....                                       | <b>41</b> |
| 5.1 LAVAGEM.....   | 41        |
| 5.2 LA-ICP-MS.....   | 45        |
| <b>5.2.1 Avaliações dos parâmetros do LA</b> .....                           | <b>45</b> |
| <b>5.2.2 Escolha do padrão interno</b> .....                                 | <b>48</b> |
| <b>5.2.3 Calibração para análise por LA-ICP-MS</b> .....                     | <b>49</b> |
| <b>5.2.4 Análise das amostras de cabelo de mulheres com câncer de mama</b> . | <b>54</b> |
| 5.3 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE CABELO POR ICP-MS e ICP OES .....                | 63        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>6. CONCLUSÃO .....</b>  | <b>72</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>  | <b>73</b> |
| <b>ANEXO A - TERMO DE CONFIDENCIALIDADE .....</b>  | <b>82</b> |
| <b>ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO .....</b>                                    | <b>83</b> |
| <b>ANEXO C - TABELA DE RESULTADOS DA ANÁLISE POR ICP OES EM <math>\mu\text{g g}^{-1}</math> ..</b> | <b>85</b> |
| <b>ANEXO D - TABELA DE RESULTADOS DA ANÁLISE POR ICP MS EM <math>\mu\text{g g}^{-1}</math> ...</b> | <b>87</b> |



## 1 INTRODUÇÃO

Os metaloestrógenos são uma série de elementos da qual fazem parte Al, Sb, As, Ba, Cd, Cr, Co, Cu, Pb, Hg, Ni, Se, Sn, V e Zn. Estes elementos podem causar danos no DNA pela ativação dos receptores de estrogênio.<sup>1</sup> Evidências científicas indicam que a exposição a longo prazo a alguns elementos pode induzir a diferentes formas de câncer, incluindo o câncer de mama. Estes elementos estão naturalmente presentes no ambiente, mas podem ter sua presença aumentada devido a diferentes fontes de emissão antropogênica e que acabam sendo acumulados no organismo através do contato com ar, água e alimentos. Estes elementos tem atividade estrogênica e após anos sendo acumulados no organismo acabam contribuindo para o desenvolvimento do câncer.<sup>2,3</sup>

O cabelo, além de unhas, sangue e urina, é muito utilizado como amostra para a verificação da exposição a medicamentos, drogas e componentes tóxicos.<sup>4</sup> A análise de cabelo pode revelar a exposição acumulativa de elementos.<sup>5</sup> Um fato interessante é que ele fornece um histórico por um longo período de tempo, através da análise de segmentos do fio.<sup>6</sup>

De maneira geral, para a determinação da concentração de metais e não metais por diferentes técnicas analíticas, o cabelo deve ser submetido a um processo de digestão. Para se obter o digerido, muitas vezes, é necessário utilizar reagentes, elevadas temperaturas e pressões, além de ser um processo moroso e suscetível a problemas relacionados com contaminação e geração de resíduos químicos.<sup>7,8</sup>

Porém, o cabelo também pode ser analisado sem prévia decomposição, sendo a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) combinada a ablação a laser (LA) uma das técnicas bastante versáteis, sensíveis e rápidas para tal. Além disso, essa técnica permite a análise isotópica e resolução espacial, permitindo a determinação da concentração e distribuição de elementos no cabelo. Portanto, a LA-ICP-MS permite a análise direta de cabelo, não requerendo qualquer processo prévio de decomposição do cabelo.<sup>7,8</sup> Desta forma, é possível monitorar possíveis alterações dos elementos ao longo de um fio de cabelo, podendo ser aplicada para o monitoramento de metaloestrógenos relacionados com câncer de mama.

O câncer de mama é o segundo em números de casos, sendo o mais incidente em mulheres. Vários fatores podem influenciar no desenvolvimento da doença como o estilo de vida, fatores genéticos, alimentação, idade, sexo, raça, medicamentos contraceptivos hormonais, entre outros.<sup>9</sup> De maneira geral, o câncer é causado pela mutação genética, onde ao invés das células crescerem, se multiplicarem e morrerem, como acontece com as células normais, as células anormais ou cancerosas crescem de maneira rápida e desordenada.<sup>10</sup> Além disso, existem algumas capacidades biológicas que são adquiridas durante o desenvolvimento do tumor. Estão incluídos a essas capacidades biológicas a sustentação da sinalização proliferativa, que evita supressores de crescimento, assim, resistindo a morte celular, que permite a imortalidade replicativa, que induz a angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos) e ativa a invasão e metástase. De forma implícita, também a instabilidade do genoma, que gera a diversidade genética que por sua vez, acelera a aquisição, e a inflamação. Além disso, a reprogramação do metabolismo energético e a evasão da destruição do sistema imunológico também fazem parte. Assim como as células cancerosas, os tumores também exibem outra dimensão de complexidade; eles possuem um repertório de células recrutadas, aparentemente normais, que contribuem para aquisição de características marcantes, criando o “microambiente tumoral”.<sup>11</sup>

Visto que os metaestrógenos podem influenciar no desenvolvimento do câncer e de que o cabelo humano é um material de amostragem não invasiva e que acumula estes elementos ao longo do tempo, estudos nesse sentido podem ser bom indicadores para avaliar a correlação entre os metaestrógenos presentes no cabelo e a ocorrência do câncer de mama.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 METALOESTRÓGENOS

Os elementos químicos que fazem parte da classe metaloestrógenos são o alumínio, antimônio, arsênio, bário, cádmio, cromo, cobalto, cobre, chumbo, mercúrio, níquel, selênio, estanho, vanádio e zinco. Metaloestrógenos são os elementos químicos que ativam o receptor de estrogênio na ausência de estradiol. Eles podem ser enquadrados em duas subclasses: ânions de metais ou metaloides e metais catiônicos bivalentes. O selenito e vanadato são ânions de metaloide e metal, respectivamente. Já os cátions bivalentes, compreendem o cádmio, cálcio, cobalto, cobre, níquel, cromo e o mercúrio.<sup>12</sup> Evidências indicam que a exposição a longo prazo a alguns metais pode induzir a diferentes formas de câncer, incluindo o câncer de mama.<sup>13</sup> Dessa forma, danos ao sistema reprodutivo podem ser atribuídos à exposição a tais espécies no ambiente, que pode afetar a ação do estradiol.<sup>14</sup>

O metaloestrógeno mais estudado é o cádmio, o qual é um prevalente contaminante ambiental e, além disso, pode causar diversos transtornos no organismo humano.<sup>15</sup> A incidência de câncer e doenças relacionadas aos hormônios podem ser indicativos de estrogênios no ambiente. Diversos estudos relatam que quando testados em sistemas biológicos, algumas substâncias químicas encontradas no ambiente exercem atividades semelhantes às do estrogênio.<sup>13,14</sup>

Vale destacar que o estrogênio compreende um conjunto de hormônios esteroides produzidos por diversos tecidos do corpo humano, porém são principalmente produzidos nos ovários durante o período reprodutivo. A principal função do estrogênio é proporcionar o crescimento dos órgãos reprodutores e demais tecidos relacionados ao sistema reprodutivo.<sup>14</sup>

Apesar de ser conhecido que alguns elementos trazem malefícios para a saúde humana, há poucas evidências de que a exposição crônica a baixos níveis de concentração deles pode resultar diretamente no desenvolvimento e progressão do câncer.<sup>15</sup>

O mecanismo de toxicidade já é conhecido para alguns elementos, como o mercúrio. O mercúrio pode causar corrosão generalizada, inibição de enzimas e a precipitação de proteínas no organismo. Ele se liga a proteínas com diferentes grupos, como, por exemplo, a amina, amida, carboxila e fosforila. Após a ligação com o

mercúrio, essas proteínas tornam-se inativas. Além disso, a toxicidade do mercúrio depende do estado oxidativo e da forma química. O Hg elementar, por exemplo, é altamente solúvel em lipídios e atravessa facilmente as membranas plasmáticas. Em seu estado oxidado divalente, o Hg é mais tóxico do que no estado monovalente. Além disso, algumas formas orgânicas de mercúrio têm maiores taxas de absorção (90%) do que as formas inorgânicas (10%). Os compostos orgânicos de mercúrio são, portanto, relatados como tendo maiores impactos corrosivos na mucosa gastrointestinal.<sup>16</sup>

Os mecanismos de toxicidade do chumbo não são bem conhecidos, mas existem relatos que em baixas concentrações no sangue ele pode inibir a atividade de enzimas, além de estimular a formação de espécies de oxigênio e também intensificar o estresse oxidativo. A toxicidade do Pb também é associada a vários mecanismos do sistema nervoso, como o estresse oxidativo, a elevação da morte de células nervosas e a interferência de enzimas dependentes de íons Ca. Outro mecanismo de toxicidade pouco conhecido é do Ba, mas é relacionado a uma competição com K. Os íons bário competidores são bloqueados pelo canal retificador de potássio que é necessário para bombear o K para fora de célula. Além disso, a toxicidade do Ba também é ligada à sua capacidade de aumentar a permeabilidade da membrana plasmática para Na. Isso é seguido por um aumento secundário na bioeletrogênese da bomba de sódio-potássio resultando em uma mudança de K extracelular na célula.<sup>16</sup>

A toxicidade do cromo, por exemplo, está relacionada ao cromo hexavalente, que pode causar diversos tipos de mutações pontuais no DNA e também a induzir danos nos cromossomos. Além disso, a toxicidade pode ser associada a danos moleculares induzidos, associada à redução intracelular, que pode ter relação com a redução de Cr(VI) a Cr(III). Para cádmio, o mecanismo de toxicidade pode estar associado a capacidade de induzir a instabilidade no genoma por meio da interação com mecanismos de reparo do DNA, a estimulação da morte celular e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), além de outros fatores.<sup>16</sup>

## 2.2 INTERAÇÃO DOS METALOESTRÓGENOS COM O TECIDO CANCEROSO

Danos ao DNA desempenham um papel importante na mutagênese, carcinogênese e envelhecimento. Ocorrências químicas que levam a danos no DNA

incluem a hidrólise, exposição a ROS e outros metabólitos reativos. Essas reações, são desencadeadas pela exposição a produtos químicos exógenos ou podem resultar de processos metabólitos endógenos.<sup>17</sup>

As substâncias reativas de oxigênio são formadas na célula como consequência de reações metabólicas e outras reações bioquímicas. As ROS compreendem superóxido, peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila e oxigênio singlete. Estes podem reagir com o DNA e causar diversos danos ao mesmo, sendo que pode ocorrer a oxidação de bases e a quebra da fita dupla.<sup>17</sup>

O estresse oxidativo decorre quando a produção de ROS excede os mecanismos naturais de defesa antioxidante do organismo danificando macromoléculas, como o DNA, proteínas e lipídios. Além disso, inativam as enzimas antioxidantes.<sup>17</sup>

O que se sabe do efeito carcinogênico de alguns metais é que estes desencadeiam mecanismos de quebra da estrutura do DNA e a supressão da proteção antioxidante. Também existe a possibilidade de os metais influenciarem na expressão de receptores no tecido do câncer de mama. Já é sabido que o tecido mamário afetado pelo processo tumoral pode acumular metais que influenciam no nível da fragmentação do DNA e na permanência das células tumorais.<sup>18</sup>

Existem evidências que os RNAs não codificantes (ncRNAs) desempenham papel importante no desenvolvimento do câncer de mama. No entanto, complexas interações regulatórias entre diferentes variedades de ncRNA no desenvolvimento do câncer são pouco compreendidas. Em recentes descobertas foi identificado o RNA endógeno competidor, que pode provocar interações entre diferentes RNAs.<sup>19,20</sup>

O receptor alfa de estrogênio (ERα) pode ser ativado por imitadores ambientais de estrogênio incluindo metaloestrógenos que, por sua vez, podem contribuir para o surgimento do câncer de mama. Os metaloestrógenos são metais que ativam o ERα na ausência de estradiol.<sup>20</sup>

Foi relatado que o cálcio intracelular pode mediar a ativação do ERα, como descrito por Divekar et al.<sup>20</sup> Isso explica porque alguns metaloestrógenos presentes no ambiente podem ativar o receptor.

### 2.3 CABELO COMO TECIDO PARA DIAGNÓSTICO

Para a avaliação da exposição humana a elementos tóxicos, drogas, medicamentos, entre outros, são comumente realizadas análises de sangue e urina. Entretanto, a análise de cabelo pode fornecer mais informações úteis. Componentes tóxicos inalados ou ingeridos podem entrar na corrente sanguínea, disseminarem-se e serem absorvidos por vários tecidos do corpo, incluindo o cabelo. Assim, diversos trabalhos relatam a utilização do cabelo como material biológico para fins de diagnóstico.<sup>20</sup>

As concentrações das espécies pesquisadas no cabelo podem refletir a exposição acumulativa do corpo às mesmas.<sup>20</sup> Porém, alguns elementos podem ser depositados diretamente no cabelo por contaminação externa.<sup>21</sup>

A capacidade do cabelo resistir a mudanças químicas o torna um material para monitorar o acúmulo de elementos.<sup>4</sup> O cabelo, por exemplo, é resistente à hidrólise e a atividade enzimática e, além disso, possui uma composição bastante estável.<sup>6</sup> Outro fator importante a ser destacado, diferentemente de outros tecidos biológicos, é que o cabelo é amostrado de forma não invasiva e não requer condições especiais de armazenamento e manuseio.<sup>5,7</sup>

O cabelo também é muito utilizado como um material alternativo para verificação do consumo de drogas.<sup>4</sup> Mediante análise de segmentos do cabelo podem ser obtidas informações de exposição ao longo do tempo.<sup>5</sup> Porém, dependendo do caso, pode haver contaminação exógena, prejudicando a avaliação da contaminação endógena. Assim sendo, dependendo do tipo de análise e o que se pretende determinar, podem ser encontrados resultados falso-positivos.<sup>22</sup>

Conforme a Society of Hair Testing (SoHT), a preparação de amostras de cabelo deve incluir a etapa de lavagem para que a contaminação exógena seja removida.<sup>5</sup>

### 2.4 ESTRUTURA DO CABELO

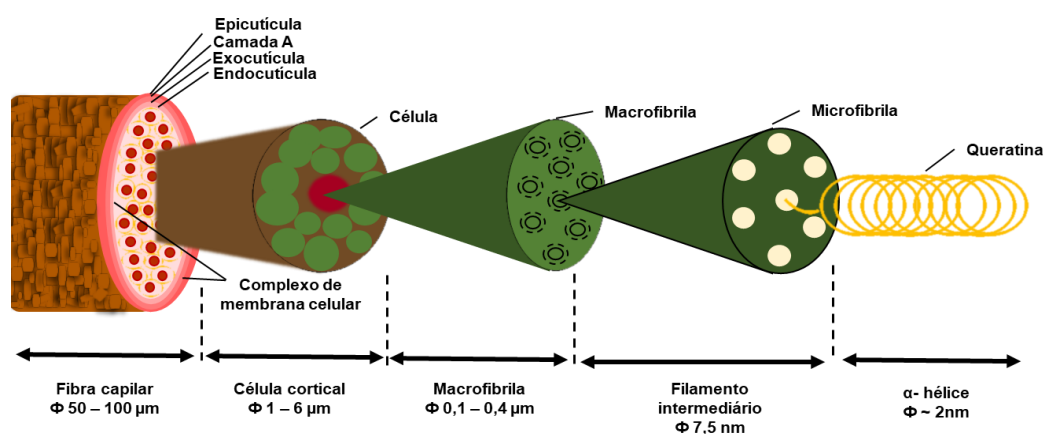
O cabelo é uma fibra proteica que possui arranjo de subunidades. A fibra capilar é composta pela medula, que é uma camada interna da seção transversal do fio de cabelo; o córtex, que é o núcleo da fibra (fio); e a cutícula, que são finas escamas sobrepostas e estão na parte mais externa do fio de cabelo. Ele é um tecido multicelular formado por vários componentes, cada um com uma composição química

específica.<sup>23</sup> O cabelo é considerado uma matéria morta e só está vivo quando está inserido no couro cabeludo por meio do folículo piloso, onde cresce e aumenta seu comprimento em cerca de 1 cm/mês.<sup>24</sup>

De maneira geral, o cabelo possui diâmetro que varia de 50 a 100  $\mu\text{m}$ .<sup>23</sup> Fatores como intemperismo, atos de pentear e escovar e uso de cosméticos podem alterar a morfologia da cutícula.<sup>24</sup>

Na Figura 1 está esquematizada a estrutura do cabelo. A seção interna é chamada de córtex, o qual é composto por células corticais com comprimentos de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  e espessura que varia de 1 a 6  $\mu\text{m}$ . Tais células corticais são compostas de macrofibrilas com diâmetros em torno de 0,1 a 0,4  $\mu\text{m}$ . Em escala nanométrica, as macrofibrilas são compostas por filamentos intermediários embutidos em uma matriz com alto teor de sulfeto. O filamento intermediário tem um diâmetro de  $\sim 7,5$  nm e é formado por oito protofilamentos. Cada protofilamento é composto de quatro cadeias de  $\alpha$ -hélice.<sup>23</sup>

Figura 1. Estrutura do fio de cabelo e diâmetros aproximados das subunidades.



FONTE: Adaptado de YU, 2017.

O cabelo contém cerca de 32% de água e, dependendo do teor de umidade, 65 a 95% de proteínas.<sup>24</sup> Além disso, contém pigmentos lipídicos e outros componentes.<sup>25</sup> Cabelos de pessoas de diferentes etnias exibem diferença na elevação da cutícula capilar, levando também a diferentes topografias quando observados no microscópio eletrônico. Estas diferenciações na elevação da cutícula podem ser a rugosidade da superfície, propriedades nanomecânicas e propriedades de tração.<sup>26</sup>

A camada A (Figura 1) é uma estrutura resistente que contém mais de 32% de cisteína. As ligações cruzadas das proteínas presentes nesta camada dão resistência física e também fazem com que o cabelo tenha uma maior resistência a ataques químicos. A exocutícula, ou camada B, corresponde a 55% da cutícula e é rica em cisteína. A endocutícula é uma parte mais interna e possui menos cisteína, cerca de 3%, sendo uma estrutura mais maleável. O complexo de membrana celular (CMC) é constituído por células que separam a cutícula e possui espessura constante de 30 nm. O ácido 18-metil eicosanóico (18-MEA) é um lipídio que se liga covalentemente à superfície externa do cabelo no CMC. Por fim, a epicutícula tem natureza proteica, sendo composta por cerca de 25% de lipídios e 75% de proteínas, sendo 12% de cistina, um aminoácido com enxofre.<sup>26</sup>

Um ponto importante referente à cutícula do cabelo é que ela é responsável pelas propriedades visuais e táteis do cabelo. Além disso, tem potencial para auxílio em diagnósticos de distúrbios de saúde e material para análise forense para fornecer informações sobre a identidade do cabelo.<sup>26</sup>

O cortex possui células com ligações cruzadas de cisteína e células duras separadas pelo CMC. Cada superfície distal da célula é áspera e irregular e são ligadas de forma cruzada umas às outras. A medula é uma fina camada cilíndrica situada no centro do fio do cabelo e que possui alta concentração de lipídios e baixa concentração de cisteína.<sup>26</sup>

A composição do cabelo, em média, compreende cerca de 51% de carbono, 17% de nitrogênio, 21% de oxigênio, 6% de hidrogênio, 5% de enxofre e vestígios de ferro, magnésio, arsênio, cromo e vários minerais.<sup>27</sup>

## 2.5 CÂNCER

De maneira geral, o câncer é causado por uma mutação sequencial de oncogêneses (genes associados ao aparecimento e crescimento de tumores) e genes supressores de tumor (gene que diminui a capacidade de uma célula de se tornar um tumor).<sup>9</sup> A multiplicação das células ditas normais ocorre de forma contínua. Essas células, crescem, se multiplicam e morrem de forma ordenada, porém nem todas as células seguem esse mecanismo.<sup>10</sup>



O crescimento das células cancerosas ocorre de maneira diferente das células normais. Ao invés de morrerem, estas continuam dando origem a outras novas células anormais, porque estas células se dividem de forma rápida e incontrolável.<sup>10</sup>

O crescimento de células de forma não controlada, resulta em uma massa anormal do tecido, cujo desenvolvimento é quase autônomo. O crescimento celular não controlado é denominado neoplasias, tumores, câncer *in situ* ou câncer invasivo.<sup>10</sup>

Alterações no DNA dos genes de uma célula normal, nada mais são que a ocorrência de mutação genética. Essas células passam então a receber informações erradas para tal atividade. As células, podem sofrer processos de mutação espontânea não alterando o desenvolvimento habitual, mesmo estando expostas à agentes cancerígenos ou carcinógenos. A malignização ou cancerização de células normais se deve as alterações nos genes especiais, os proto-oncogenes, os quais são inativos nas células normais. Os proto-oncogenes, quando ativados, são transformados em oncogenes gerando as células cancerosas.<sup>10</sup>

É relatado que a sobrevivência das células é dependente de uma manutenção de pH favorável. A intensa produção de gás carbônico (CO<sub>2</sub>) e ácido láctico leva a exposição das células cancerosas a grandes fluxos de fluídos ácido-base, que acabam causando uma perturbação do pH.<sup>28</sup>

Conforme Heng et al.,<sup>9</sup> o mecanismo de evolução do câncer é caracterizado pelo aumento da dinâmica do sistema induzido pelo estresse, heterogeneidade e epigenética (mudanças no fenótipo que são causadas por mudança na sequência do DNA) elevadas e a seleção natural a qual é medida pela alteração no genoma. A evolução do câncer tem relação com a população celular, sendo um processo progressivo que possibilita que as células se repliquem rapidamente e sobrevivam de forma assídua.<sup>29</sup>

O diagnóstico do mecanismo evolutivo do câncer, segundo Heng et al.<sup>9</sup>, requer o desenvolvimento de novas estratégias para investigação do câncer. Polyak,<sup>30</sup> também afirma que é essencial entender a heterogeneidade para o avanço de intervenções preventivas e terapêuticas relacionadas ao câncer.

## 2.6 CÂNCER DE MAMA

Nas últimas décadas, o índice de câncer de mama aumentou de forma considerável, em especial, nos países em desenvolvimento.<sup>31</sup> Segundo o Instituto

Nacional de Câncer (INCA), no Brasil, o número total de novos casos diagnosticados chega a 60.000 ao ano.<sup>32</sup> O câncer de mama é mais comum em mulheres na fase de pré-menopausa e na pós-menopausa.<sup>33</sup>

O crescimento desordenado de células com potencial invasivo resulta no câncer de mama, que ocorre a partir de alterações genéticas, podendo ser hereditárias ou adquiridas. Os principais tipos de câncer de mama são o carcinoma ductal e o carcinoma lobular, sendo o primeiro o de maior incidência.<sup>34</sup>

O carcinoma ductal se origina nos ductos mamários e há vários subtipos deste carcinoma, sendo encontrado em cerca de 80% dos casos. Já o carcinoma lobular, tem origem nos lóbulos que são responsáveis pela produção do leite materno e é diagnosticado em cerca de 5 a 10% dos casos. Os sinais da doença são o aparecimento de um nódulo mamário endurecido, fixo e geralmente indolor, mudança na pele, saída espontânea de líquido no mamilo, nódulo no pescoço ou nas axilas e/ou o endurecimento da mama.<sup>34</sup>

É relatado por Marrazzo et al.<sup>33</sup>, que, além de um padrão histológico peculiar, o câncer de mama possui uma identidade molecular específica e também uma menor instabilidade genética. De acordo com Polyak,<sup>30</sup> a evolução do câncer de mama abrange a progressão por meio de estágios patológicos e clínicos definidos, iniciando com a hiperproliferação ductal, seguido pela evolução para carcinomas invasivos e *in situ* e, por fim, para doença metastática.

A maior parte dos tumores mamários se desenvolve no tecido epitelial mamário. Existem relatos onde é afirmado que a exposição prolongada ao estrogênio pode estar associada ao aumento do risco de câncer de mama.<sup>35</sup> O câncer de mama é um câncer metastático e pode comumente transferir-se para outras regiões do corpo, como ossos, fígado, pulmão e cérebro. Assim, o diagnóstico precoce da doença pode levar a um bom prognóstico.<sup>36</sup> Além disso, quando comparados com outros cânceres fatais, pacientes com câncer de mama têm uma melhor sobrevivência, isto porque o tecido mamário não é fisicamente um órgão necessário para a sobrevivência humana.<sup>37</sup>

## 2.7 ÍNDICES DE CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é o de maior incidência em mulheres.<sup>38</sup> Estimativas mostram que em 2018 o câncer de mama foi o segundo mais incidente, com cerca de 2,1 milhões de novos casos ao ano no mundo.<sup>39</sup> O tipo histológico mais habitual é o

carcinoma de células epiteliais que ocasiona lesões invasivas ou *in situ*, sendo os carcinomas ductais e lobulares os mais comuns.<sup>40</sup>

No Brasil, em 2019 foram diagnosticados cerca de 59.700 novos casos, representando 29,5% dos casos de câncer em mulheres. Apesar das estimativas de sobreviverem aumentando em países desenvolvidos, são observadas diferenças a nível global. Em 2016, no Brasil foram registrados 16.069 óbitos por câncer de mama em mulheres. A taxa bruta, foi de 15,4 óbitos por 100 mil mulheres, sendo que as maiores taxas observadas foram nas regiões Sul e Sudeste do Brasil.<sup>38</sup>

Entre 2020 e 2022, no Brasil, são estimados 66.280 novos casos de câncer de mama. Esse número se refere a uma estimativa de 61,61 novos casos a cada 100 mil mulheres. O câncer de mama é o mais frequente em todas as regiões brasileiras, sendo que no Rio Grande do Sul, no ano de 2020, foram estimados 4.050 novos casos.<sup>38,41</sup>

Independentemente das condições socioeconômicas do país, o câncer de mama está entre as primeiras posições de neoplasias femininas. Um declínio de novas incidências foi observado em alguns países desenvolvidos, o que pode ser atribuído à diminuição do tratamento de reposição hormonal em mulheres pós-menopausa.<sup>40</sup>

## 2.8 FATORES QUE LEVAM AO CÂNCER DE MAMA

Estudos apontam que o ambiente, juntamente com outros fatores, colabora de forma significativa para o início e progressão da neoplasia mamária. Isso se deve às altas taxas de desenvolvimento industrial, que levam à poluição do solo, das águas superficiais e conseqüentemente, dos alimentos.<sup>18</sup>

Não existe apenas um fator de risco para o desenvolvimento do câncer de mama embora os principais fatores que impulsionam o início e a progressão da doença sejam os fatores genéticos e ambientais.<sup>15,42</sup> A idade também é considerada um dos fatores importantes, pois a maior incidência se dá a partir dos 50 anos.<sup>43</sup>

Além disso, a menopausa tardia, obesidade, sedentarismo e exposição frequente a radiações ionizantes também influenciam.<sup>44</sup> De acordo com Kaminska et al.<sup>45</sup>, não se deve esquecer as lesões proliferativas de caráter benigno que ocorrem nas glândulas mamárias. Elas são benignas, porém podem aumentar significativamente o risco de ocorrência de lesões malignas.<sup>45</sup>

## 2.9 METODOLOGIAS DE ANÁLISE DE CABELO

### 2.9.1 PREPARO DE AMOSTRA

De maneira geral, a concentração de elementos em níveis de traço ( $\text{ng g}^{-1}$  a  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) em cabelo é determinada mediante a digestão da amostra seguida da quantificação dos analitos por ICP-MS ou outra técnica. Todavia, esse método reflete na composição média elementar no cabelo e esta perspectiva analítica não resulta em informação sobre a distribuição espacial dos elementos de interesse presentes. Outro ponto que deve ser destacado é a necessidade de uma quantidade significativa de amostra, que muitas vezes, é difícil de ser obtida.<sup>7,8</sup>

A análise elementar em cabelo ainda é controversa, tanto em relação a sua interpretação quanto ao preparo da amostra.<sup>6</sup> A etapa mais crítica no preparo da amostra é a lavagem do cabelo, onde diversos procedimentos já foram estudados e propostos. Nesse procedimento, somente os elementos provenientes de contaminação exógena devem ser removidos. Lavagens agressivas e prolongadas em meio aquoso e com o auxílio de produtos limpantes podem remover a contaminação e sujidades externas do cabelo, além de elementos endógenos.<sup>26</sup>

Visando a remoção da contaminação da superfície do cabelo, diferentes procedimentos de lavagem foram propostos.<sup>21</sup> Segundo a Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA),<sup>46</sup> a lavagem do cabelo deve ser feita de forma sequencial; uma vez em acetona, três vezes em água e mais uma vez em acetona. Também é recomendado que a lavagem seja feita sob agitação. Outro ponto importante a ser destacado é com relação à massa mínima de amostra de cabelo a ser analisada, que deve ser de 0,5 g. Além disso, é recomendado que a amostra seja secada à temperatura ambiente, sobre papel filtro de grau cromatográfico e em ambiente limpo.<sup>46</sup>

### 2.9.2 FUNDAMENTOS DA TÉCNICA DE ICP-MS

A espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado é comumente utilizada em diversos campos de pesquisa e para análises de rotina.<sup>23</sup> A ICP-MS é amplamente utilizada para a determinação da maioria dos elementos em baixas

concentrações, sendo, atualmente, uma das mais empregadas para a determinação de elementos em matrizes biológicas.<sup>47</sup>

Devido à alta densidade de íons (em torno de  $2 \times 10^{15}$  elétrons  $\text{cm}^{-3}$ ) e a elevada temperatura (próximo a 10.000 K) de um plasma de Ar, tem-se uma fonte de íons para a análise de diversos tipos de materiais, bem como para a determinação da maioria dos elementos. Essas características propiciam uma alta sensibilidade, boa precisão, ampla faixa de resposta linear e boa tolerância a constituintes da amostra.<sup>21,47</sup> Além dessas características, o espectrômetro de massa mede a razão massa carga ( $m/z$ ) de dois íons de isótopos, o que permite determinar a composição isotópica do elemento e fazer medidas de razão isotópica. Outra característica importante é a versatilidade de uso de diferentes sistemas de introdução de amostra no ICP. Desta maneira, além da nebulização pneumática, sistema universalmente empregado, é possível acoplar sistemas de introdução de amostra baseados na geração de vapor químico (CVG), vaporização eletrotérmica (ETV), sistemas de ablação com laser (LA), entre outros. É importante destacar que mediante ICP-MS são somente obtidas informações elementares, porém é possível obter informações moleculares se as espécies químicas são previamente separadas, o que pode ser feito por técnicas cromatográficas, eletroforéticas ou outras.<sup>47</sup>

### **2.9.3 TÉCNICA DE LA-ICP-MS**

A ablação a laser acoplada a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado permite a determinação da concentração e distribuição espacial de elementos. Dependendo do laser utilizado é possível alcançar resolução lateral da ordem 1  $\mu\text{m}$ , enquanto a resolução em profundidade varia de acordo com o material a ser analisado, mas é da ordem de nm a  $\mu\text{m}$ .<sup>7,8</sup> Há instrumentos de ablação a laser com comprimentos de onda na região do infra-vermelho, visível e ultravioleta. Os lasers no ultravioleta são atualmente os mais utilizados, sendo mais comum o de 266, 213 e 193 nm. O comprimento de onda vai influenciar na interação da radiação laser com o material (amostra), no fracionamento do elemento, entre outros efeitos.<sup>48</sup>

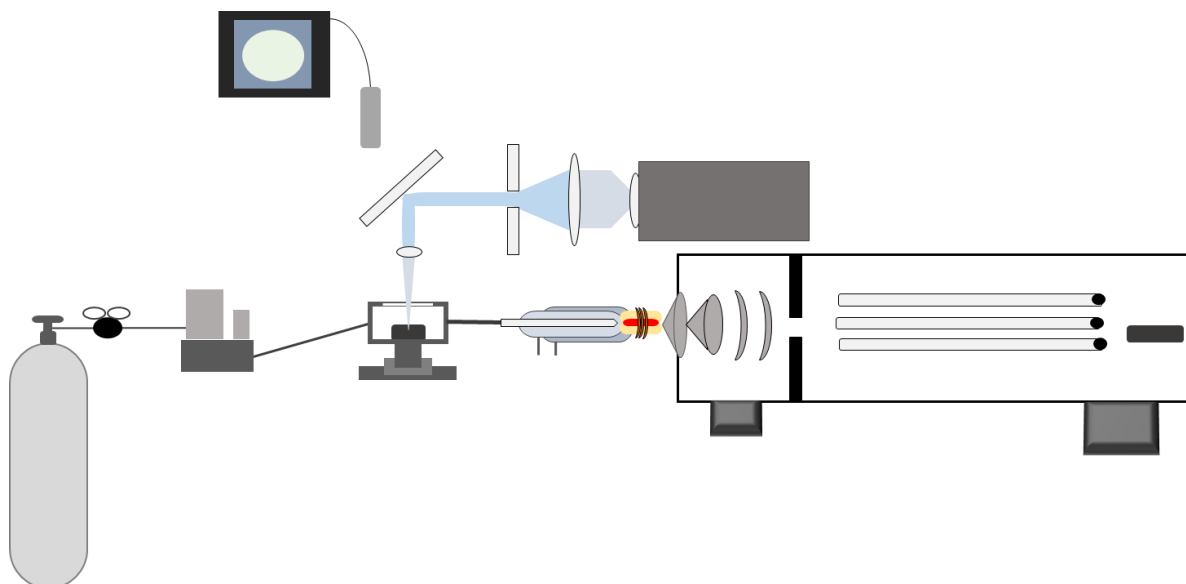
A LA-ICP-MS é uma técnica amplamente aceita para amostragem direta de materiais sólidos. Além de ser uma técnica analítica largamente utilizada para amostras geoquímicas, também é utilizada para análise de amostras ambientais e biológicas incluindo cabelo.<sup>49</sup>

Esta técnica permite além da microanálise, a análise de perfil de profundidade e o mapeamento elementar bidimensional.<sup>49</sup> A LA-ICP-MS requer mínimo preparo da amostra, ou mesmo nenhum. Além do mais, a quantidade de material amostrado é pequena, ficando na ordem de alguns ng por pulso de laser, o que se torna relevante quando há pouca quantidade de amostra.<sup>50</sup>

Entretanto, cabe ressaltar que efeitos no fracionamento elementar ocorrem durante a ablação do material pelo laser, transporte do aerossol e ionização no ICP. Esses efeitos podem levar a erros na quantificação, bem como em medidas de razão isotópica.<sup>23,50</sup> Diferentes procedimentos são adotados para contornar os erros na quantificação devido a esses efeitos, entre eles a calibração com padrão interno (IS) e ajuste de matriz.<sup>51,52</sup>

A variação da resposta nas medições por LA-ICP-MS pode ser causada pela flutuação da saída de potência do laser, heterogeneidade da amostra, variação da massa ablada e eficiência de transporte do material ablado. Neste caso, para melhorar a exatidão e precisão dos resultados, é utilizada a padronização interna.<sup>49,53</sup> Na Figura 2 está mostrado, de forma esquemática, o sistema de ablação a laser, combinado com plasma indutivamente acoplado e espectrômetro de massa.

Figura 2. Representação esquemática do sistema de LA-ICP-MS.



FONTE: Partes do sistema de LA-ICP-MS. Adaptado de 54.

Na análise por LA-ICP-MS, a amostra é vaporizada com um laser pulsado em uma câmara, onde a amostra é colocada. Ela deve isolar a amostra para evitar a

entrada de ar e a perda do aerossol formado. É nela que o feixe de laser é focado na superfície da amostra, através de uma janela de quartzo. Como a radiação é suficientemente alta, na ablação é produzido um fluxo de partículas minúsculas (aerossol) que é transportado por um gás carreador a um plasma indutivamente acoplado (ICP), que vaporiza e converte as partículas em íons. Os íons são separados com base em suas razões massa-carga pelo espectrômetro de massa e detectados.<sup>54,55,56</sup>

O gás de carreador pode afetar o fracionamento elementar. Normalmente é utilizado argônio como gás carreador. Porém, o uso de hélio reduz o efeito de fracionamento, dependendo da matriz e além disso, pode levar a um aumento do sinal, melhorando a sensibilidade.<sup>57</sup> Entretanto, o fracionamento e o tipo de gás são dependentes do comprimento de onda do laser e do tempo do pulso do laser.

#### **2.9.4 PADRONIZAÇÃO INTERNA**

A análise quantitativa por LA-ICP-MS é um grande desafio.<sup>58</sup> Para isso, diferentes estratégias de calibração são propostas. O uso de materiais de referência certificados (CRM) com matriz semelhante à da amostra, calibração por adição de padrão são exemplos.<sup>59</sup>

Dessa forma, a fim de melhorar a exatidão e a precisão dos resultados, a calibração, geralmente, é feita com o uso de padrão interno.<sup>60,61</sup> Além disso, o padrão interno é usado com a finalidade de corrigir a instabilidade instrumental, a variabilidade na ablação da amostra, efeitos de transporte do vapor e efeitos de matriz.<sup>62,63</sup>

A padronização interna normalmente compensa a maioria dos efeitos que ocorrem nos processos de ablação, transporte do aerossol e ionização. No entanto, algumas características são importantes para que um elemento seja usado como padrão interno. Semelhança da razão massa carga ( $m/z$ ), ionização e temperatura de volatilização entre o analito e o padrão interno são fundamentais. Além disso, o padrão interno deve ser livre de interferências espectrais e estar distribuído homogeneamente na amostra.<sup>60</sup>

Para análise de cabelo por LA-ICP-MS, é relatado o uso de  $^{13}\text{C}$ ,  $^{32}\text{S}$  e  $^{34}\text{S}$  como padrão interno. Neste caso, o C e S já estão presentes em toda a matriz do fio do cabelo, sem a necessidade de serem adicionados.<sup>63</sup>

### 2.9.5 ANÁLISE DE CABELO POR LA-ICP-MS E ICP-MS

Já foram relatados diversos estudos em que foi utilizada a técnica LA-ICP-MS para a análise elementar de cabelo e mapeamento da distribuição de elementos em cabelo e outros tecidos biológicos. No estudo de Duncan et al.<sup>64</sup>, foi utilizada a LA-ICP-MS para quantificar gadolínio em cabelo de pessoas que receberam agentes de contraste à base de gadolínio.<sup>64</sup> Pamphlett et al.<sup>65</sup>, mapearam mercúrio e outros elementos em tecido mamário normal e tumores em mulheres.<sup>65</sup> Puchyr et al.<sup>66</sup>, relataram que o preparo de amostra de cabelo é uma etapa crítica. Eles determinaram diversos elementos em amostra de cabelo, sendo eles Li, Be, B, Na, Mg, Al, P, S, K, Ca, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ge, As, Se, Rb, Sr, Zr, Mo, Pd, Ag, Cd, Sn, Sb, I, Cs, Ba, Pt, Au, Hg, T, Pb, Bi, Th e U, por ICP-MS.<sup>66</sup> A LA-ICP-MS foi usada por Pozebon et al.<sup>6</sup> para quantificar e monitorar a concentração de Pt ao longo de um único fio de cabelo de um paciente com câncer que havia sido tratado com cisplatina.

Tinkov et al.<sup>67</sup> investigaram a relação entre o oligoelemento essencial do cabelo e o conteúdo mineral e transtorno do déficit de atenção com hiperatividade (TDAH) em crianças na pré-escola de idade entre 4 e 6 anos e crianças da escola primária com idade entre 6 a 10 anos, em relação à idade e sexo. Os dados obtidos demonstram que os teores de Co, Cu, Mn, Si e Zn no cabelo em crianças com TDAH foram significativamente reduzidos em 18%, 10%, 27%, 16% e 19% em comparação com os valores de indivíduos controle, respectivamente. A diminuição mais significativa em crianças com TDAH foi observada para Mg, sendo 29% menor do que em crianças neurotípicas.<sup>67</sup>

Em outro estudo foram avaliados pelos de ursos polares machos adultos do oeste da Baía de Hudson, Canadá. O objetivo foi quantificar oligoelementos como As, Cd, Cu, Fe, Pb, Hg, Se, Sr e Zn usando LA-ICP-MS.<sup>68</sup> Outro estudo foi feito com o objetivo de examinar se os indivíduos de múmias andinas antigas de quatro cemitérios no norte do Chile foram expostos ao lítio geogênico fazendo a análise de um único fio de cabelo por indivíduo por LA-ICP-MS. A concentração de Li no cabelo das múmias andinas foi quase 20 vezes mais elevada quando comparada às concentrações de Li no cabelo de populações contemporâneas de outras regiões.<sup>69</sup>



### 2.9.6 TÉCNICA DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica utilizada para análise morfológica de microestruturas e caracterização da composição química. A formação da imagem mediante a MEV depende da aquisição de sinais que são produzidos a partir de feixes de elétrons que interagem com a amostra, sendo que tais interações podem ser tanto elásticas e inelásticas. O espalhamento elástico é resultante da deflexão do elétron incidente, pelo núcleo atômico ou por elétrons da camada externa com energia similar. Essa interação é caracterizada pela baixa perda de energia durante a colisão e por uma mudança direcional do elétron espalhado. Os elétrons são elasticamente espalhados a um ângulo de  $90^\circ$  e são chamados de elétrons retroespalhados (BSE), gerando um sinal útil para a formação de imagens. O espalhamento inelástico ocorre por meio de diversas interações entre elétrons incidentes e os elétrons nos átomos da amostra, o que resulta em um feixe primário de elétrons e substancial transferência de energia para o átomo. A excitação dos elétrons do átomo da amostra durante a ionização gera elétrons secundários (SE) com energia inferior a 50 eV, que possibilitam a medição de uma espécie para formar a imagem da amostra em análise. Outros fenômenos também ocorrem nesse processo como a emissão de raios-X característicos, elétrons Auger e catodoluminescência.<sup>70</sup>

Dependendo o volume do feixe de radiação, os elétrons também podem ser excitados longe da posição de varredura, aumentando o ruído e, assim, piorando a qualidade da imagem. A intensidade do sinal detectado é convertida em valores hierarquizados numa escala cinza, em cada varredura. Dessa forma, uma imagem em cor cinza evolui pixel a pixel. Imagens obtidas a partir de SE, com energia abaixo de 50 eV são amplamente utilizadas. O número de SE liberados depende da geometria da amostra e do ângulo de incidência do feixe de elétrons em combinação com a profundidade de foco.<sup>71</sup>

### 2.7 ASPECTOS ÉTICOS

Em meados de 1960 começou ser aceito que experimentos com seres humanos precisavam ser revistos por uma comissão multidisciplinar. No Brasil, a resolução de nº 196 de 1996<sup>72</sup> define o comitê de ética como um colegiado interdisciplinar e independente, como “múnus público”, de caráter consultivo,

deliberativo e educativo, criado para defender os interesses dos sujeitos da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro dos padrões éticos.<sup>72,73</sup>

Qualquer projeto de pesquisa que envolva estudos com seres humanos tem implicações éticas que precisam ser discutidas e adequadas para a sua execução. Para isso, é necessário observar de forma rigorosa as recomendações citadas na Resolução nº 466/2012.<sup>74</sup> Segundo esta resolução, a pesquisa envolvendo seres humanos, é aquela que, individual ou coletivamente, envolva o ser humano, de forma direta ou indireta, em totalidade ou parcialidade, incluindo o manejo de informações ou materiais. Dessa maneira, os procedimentos podem ser de natureza instrumental, ambiental, nutricional, educacional, sociológica, econômica, física, psíquica ou biológica, sejam eles clínicos ou cirúrgicos, farmacológicos e com finalidade preventiva para diagnóstico ou fins terapêuticos. A pesquisa, neste caso, deve prever procedimentos que assegurem a confidencialidade e a privacidade dos indivíduos em questão, garantindo a proteção da imagem, a não estigmatização e a não utilização das informações.<sup>74</sup>

Um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), que consiste no consentimento livre de não haver nenhuma limitação que possa influenciar à vontade e decisão do indivíduo em participar da pesquisa, deve ser assinado pelo mesmo. É considerado que o compromisso com o voluntário não só é informar, mas também esclarecer os riscos e os benefícios de sua participação. Este termo deve ser apresentado de forma a incluir a justificativa, os objetivos e os procedimentos a serem utilizados na pesquisa, bem como os riscos e os benefícios esperados.<sup>75</sup>

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO PRINCIPAL**

O objetivo principal deste estudo foi avaliar a relação dos metaloestrógenos Al, Sb, As, Ba, Cd, Cr, Co, Cu, Pb, Hg, Ni, Se, Sn, V e Zn com a incidência de câncer de mama. Para esta avaliação foram usadas as técnicas LA-ICP-MS, ICP-MS e ICP OES para a quantificação destes elementos. A LA-ICP-MS foi utilizada para avaliar a concentração destes elementos ao longo do fio de cabelo, visando verificar alteração da concentração dos mesmos, o que pode vir a estar correlacionado com o desenvolvimento e avanço da doença.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

O presente estudo também teve como objetivo avaliar alguns parâmetros do LA-ICP-MS para amostra de cabelo, como a fluência, tamanho do feixe laser e velocidade de varredura. Além disso, avaliar o padrão interno ideal, avaliar a influencia do processo de lavagem da amostra de cabelo por LA-ICPMS e MEV e comparar as concentrações dos metaloestrógenos entre o grupo amostra e grupo controle através de testes estatísticos.

#### **3.3 MOTIVAÇÃO**

A motivação do presente estudo se deve ao aumento do número de indivíduos com câncer de mama, mesmo com o melhoramento das tecnologias e disponibilidade de diagnóstico nos últimos anos. Além disso, o trabalho teve a finalidade de avaliar se estes elementos são de procedência exógena ou endógena, que pode vir a acarretar o câncer de mama.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 AMOSTRAS

Para o presente estudo foram utilizadas 53 amostras de cabelo de mulheres com câncer de mama e 28 amostras controle, sendo a idade média dessas mulheres de 59 anos. Estas amostras foram obtidas em colaboração do Hospital Universitário de Santa Maria – HUSM. As amostras foram coletadas durante o período de janeiro de 2019 a outubro de 2019, seguindo os protocolos estabelecidos pelo Comitê de Ética (número do protocolo: 3.073.678). Os cabelos foram cortados na região da nuca, usando uma tesoura de aço, que foi previamente descontaminada com água e seca. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em sacos de polietileno e mantidas à temperatura ambiente até a análise. Para a análise das amostras de cabelo por LA-ICP-MS foram utilizados 5 cm do fio de cabelo a partir da raiz, quando o comprimento era suficiente. Os fios foram cortados em dois fragmentos de 2,5 cm devido ao tamanho da cela de ablação e suporte de vidro onde a amostra é fixada.

Para a avaliação da lavagem do cabelo foram utilizadas amostras de mulheres sem histórico da doença, sendo também um grupo de amostras que não se refere ao grupo controle. Foram utilizadas seis amostras para este teste, sendo cabelos naturais e outros que tinham sido submetidos a alisamento químico, tintura e descoloração.

### 4.2 REAGENTES

A água utilizada para preparar as amostras e soluções foi previamente destilada, deionizada em coluna de troca iônica e posteriormente purificada em sistema de Milli-Q (Milipore, EUA), tendo ao final resistividade de 18,2 MΩ cm. Acetona (Vetec, Brasil) foi utilizada no processo de lavagem da amostra. O ácido nítrico P.A. (65%, correspondendo a 1,4 kg L<sup>-1</sup> e 14,4 mol L<sup>-1</sup>, Merck, Alemanha), que foi utilizado para decomposição das amostras e preparo de soluções, foi purificado em sistema de destilação abaixo do ponto de ebulição (sistema de destilação de quartzo, modelo duoPUR, Milestone, Itália). A L-cisteína (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>2</sub>SCI.H<sub>2</sub>O – Vetec, Brasil) foi utilizada como padrão interno para a análise das amostras por LA-ICP-MS. Para as curvas de calibração foi utilizada a solução multielementar SCP 33 (SCP Science, Canada).

### 4.3 INSTRUMENTAÇÃO

As amostras de cabelo foram decompostas em frascos de polipropileno com tampa rosqueável e com capacidade para 5 mL, sob aquecimento em forno de micro-ondas convencional (Eletrolux, MEF41, Brasil).

As determinações dos metaloestrógenos foram realizadas por meio de um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (Elan DRC II, PerkinElmer Sciex, Canadá), munido com nebulizador concêntrico (Meinhard Associates, EUA), câmara de nebulização do tipo ciclônica “baffled”, feita de quartzo (PerkinElmer), e com tocha e tubo injetor de quartzo com 2 mm de diâmetro interno. O separador de massa no Elan DRC II é do tipo quadrupolo. Para a geração do plasma foi utilizado Ar 99,998% (White Martins-Praxair, Brasil). As condições operacionais estão citadas na Tabela 1 e foram utilizadas conforme recomendações do fabricante com os devidos ajustes de forma a alcançar o melhor desempenho do instrumento. Também foram feitas determinações de Al, Ca e Zn utilizando-se um instrumento de ICP OES (Optima 4300 DV, PerkinElmer, EUA) equipado com nebulizador GenCone e câmara de nebulização ciclônica. As condições operacionais foram de acordo com as recomendadas pelo fabricante e estão citadas na Tabela 1.

Tabela 1: Condições operacionais nas determinações por ICP-MS e ICP OES.

| Parâmetro                                     | ICP-MS  | ICP OES |
|---|---|---------|
| Potência do gerador de RF, W                  | 1300  | 1400    |
| Vazão do gás principal, L min <sup>-1</sup>   | 15  | 15      |
| Vazão do gás auxiliar, L min <sup>-1</sup>    | 1,2   | 1,0     |
| Vazão do gás nebulizador, L min <sup>-1</sup> | 1,12  | 1,00    |
| Leituras                                      | 5   |         |
| Leituras por replicata                        | 3   |         |
| Dwell time, ms                                | 40  | -       |
| Replicatas                                    | 3   | 3       |
| Isótopo, m/z                                  | <sup>13</sup> C, <sup>27</sup> Al, <sup>32</sup> S, <sup>34</sup> S,<br><sup>43</sup> Ca, <sup>44</sup> Ca, <sup>51</sup> V,<br><sup>52</sup> Cr, <sup>53</sup> Cr, <sup>59</sup> Co,<br><sup>58</sup> Ni, <sup>60</sup> Ni, <sup>64</sup> Zn,<br><sup>65</sup> Cu, <sup>63</sup> Cu, <sup>66</sup> Zn,<br><sup>75</sup> As, <sup>82</sup> Se, <sup>111</sup> Cd,<br><sup>112</sup> Cd, <sup>118</sup> Sn, <sup>121</sup> Sb, | -       |

|                         |   |              |
|-------------------------|---|--------------|
|                         | <sup>138</sup> Ba, <sup>202</sup> Hg, <sup>207</sup> Pb,<br><sup>208</sup> Pb |              |
|                         |   | Zn (213,856) |
|                         |   | Zn (206,191) |
| Comprimento de onda, nm | -   | Ca (396,847) |
|                         |   | Ca (393,366) |
|                         |   | Ca (317,933) |
|                         |   | Al (167,078) |

Para análise direta dos fios de cabelo foi utilizada a LA-ICP-MS. O laser utilizado possui comprimento de onda de 266 nm (modelo LSX-266, Cetac Technologies, USA), contendo uma fonte de laser de estado sólido, a qual é composta por um cristal de Nd:YAG e por uma lâmpada de arco de xenônio que opera em 605 V, 72 W e pulso do laser de até 20 Hz. A superfície da amostra é possível de ser visualizada através de uma câmera CCD, com resolução de até 2  $\mu\text{m}$ . O sistema de geração do laser é refrigerado com água (com um circulador) para que a temperatura de funcionamento seja mantida a  $35 \pm 3$  °C. A largura do pulso do laser é de aproximadamente 6 ns e a energia nominal do feixe de laser é 15 mJ por pulso. A amostra fica confinada na câmara de ablação, a qual pode ser movida nas três dimensões (X, Y e Z). Os parâmetros do laser podem ser ajustados de acordo com a amostra e modo de ablação, assim como a energia do laser, tamanho da cratera e a velocidade de varredura. Os parâmetros foram avaliados para que se adquirisse uma condição de melhor sensibilidade. A ablação da amostra foi feita no modo “line”, ou seja, ablação ao longo do fio de cabelo. A comunicação do LA com o ICP-MS foi realizada por meio da porta I/O (Input/Output), mediante conexão com tipo P2 de 3,5 mm. O controle de todas as funções do laser foi feito pelo *software* DigiLaz G2. As condições operacionais do sistema LA-ICP-MS estão citadas na Tabela 2.

Tabela 2: Condições operacionais para análise do cabelo por LA-ICP-MS.

| Parâmetro                                     | LA-ICP-MS |
|---|-----------|
| Vazão do gás de arraste, L min <sup>-1</sup>  | 1,30      |
| Diâmetro do feixe, $\mu\text{m}$              | 50        |
| Velocidade de varredura, $\mu\text{m s}^{-1}$ | 80        |
| Frequência de pulso do laser, Hz              | 20        |
| Fluência, J cm <sup>-2</sup>                  | 26,7      |
| Delay, s                                      | 10        |

Para a análise das amostras de cabelo por MEV foi utilizado microscópio modelo sigma 300 VP (Carl Zeiss) com filamento de emissão por campo (FEG- Field Emission Gun) do tipo Schotky (filamento de tungstênio recoberto com óxido de zircônio), equipado com coluna Gemini (Carl Zeiss). As imagens foram obtidas com no detector secundário (SE2) no modo alto vácuo ( $1 \times 10^{-9}$  bar), energia de 1 kV, distância de trabalho de 6 mm, abertura de 20  $\mu\text{m}$  e ampliações de 500X, 1000X, 2500X e 5000X.

#### 4.4 PREPARO DAS AMOSTRAS

Para avaliar o efeito da lavagem, o cabelo foi lavado de acordo com o método proposto pela IAEA para determinação de baixas concentrações de elementos em amostras de cabelo e unhas. O método consiste na lavagem de 500 mg de amostra com acetona, seguida de três lavagens com água e, por fim, mais uma lavagem com acetona. Cada etapa de lavagem teve duração de 10 minutos, com o cabelo colocado dentro de copo béquer sob agitação mecânica em temperatura ambiente. Após a lavagem, as amostras foram colocadas sobre papel filtro e deixadas secar à temperatura ambiente.

Para a análise por MEV, as amostras passaram pelo processo de lavagem seguindo o método proposto pela IAEA. Após o processo de lavagem e secagem as amostras foram cortadas em fragmentos de 2,5 cm e inseridas na câmara de amostragem para análise.

Para a análise das amostras por ICP-MS e ICP OES foram pesadas massas exatas de amostra, na faixa de 20 a 30 mg, seguido de adição de 1 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado. A mistura foi submetida a decomposição sob radiação micro-ondas com 18 ciclos de aquecimento de 20 s cada a uma potência de 900 W, com 1 min de resfriamento entre cada ciclo. Após a decomposição das amostras, as mesmas foram avolumadas a 5 mL com água ultra pura e armazenadas à temperatura ambiente até etapa de quantificação dos metaloestrógenos. Amostras em branco foram preparadas da mesma forma, sendo utilizado somente 1 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado. As amostras decompostas foram diluídas cinco vezes para serem introduzidas no ICP-MS e ICP OES. Devido a pequena quantidade de amostra, foram decompostas apenas 25 amostras das 53 e 10 dos 28 controles. Além disso, devido a limitada quantidade de

amostra, as análises foram realizadas em monoplicata e foram feitas três leituras de cada solução amostra.

Antes de analisar as amostras de cabelo por LA-ICP-MS foram avaliados alguns parâmetros do LA para que se tivesse um melhor desempenho durante as análises. Para isso, foram avaliados o tamanho do feixe do laser, a velocidade de varredura e a fluência do laser. Também foram avaliados os sinais dos elementos para amostras que passaram pelo processo de lavagem seguindo o método da IAEA, para verificação da necessidade de submeter as amostras ao processo de lavagem, ou não. As amostras foram fixadas em lâminas de vidro com o auxílio de fita dupla face e então inseridas na câmara de ablação para análise. As análises das amostras por LA-ICP-MS foram feitas nas 53 amostras e nos 28 controles.

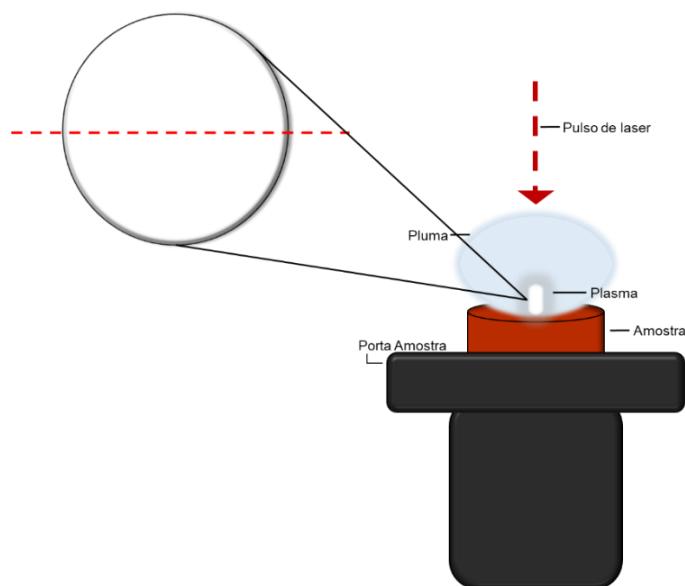
#### 4.5 CALIBRAÇÃO DO LA-ICP-MS

Curvas de calibração em concentrações na faixa de  $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$  a  $10 \mu\text{g g}^{-1}$  de cada elemento foram preparadas utilizando-se um disco de papel filtro (17 mm de diâmetro) como suporte. Solução de L-cisteína, como fonte de S para IS, foi usada para todos os pontos da curva de calibração, incluindo o branco, de forma a resultar na concentração de  $5\% \text{ m m}^{-1}$  de S no papel filtro. Esta concentração corresponde àquela de S normalmente presente no cabelo. Para saber se o padrão interno (L-cisteína) poderia ser adicionado ao papel juntamente com os analitos, bem como a distribuição dos mesmos no papel filtro, foram feitas as seguintes avaliações: primeiramente foi adicionada a solução contendo a L-cisteína ( $40 \mu\text{L}$ ), o papel foi secado e depois foi adicionada a solução com os analitos ( $40 \mu\text{L}$ ); adição da solução com os analitos ( $40 \mu\text{L}$ ) ao papel, o qual foi secado e então adicionada a solução contendo L-cisteína ( $40 \mu\text{L}$ ); adição de solução contendo L-cisteína e os analitos ao papel ( $40 \mu\text{L}$ ). Todas as soluções foram adicionadas na parte central do papel com o auxílio de uma micropipeta. Como já estabelecido previamente,<sup>84</sup> foram sempre transferidos  $40 \mu\text{L}$  de cada solução. Estes testes foram feitos com a finalidade de avaliar a distribuição dos analitos e do enxofre no papel filtro, visto que pode ocorrer precipitação de elementos na presença de L-cisteína ou efeito “cromatográfico”.<sup>86</sup> Em todos os testes o papel filtro foi secado por indução térmica, aproximando-o da lâmpada infravermelha mantida a  $80^\circ\text{C}$ .



Para verificar a distribuição dos analitos e do S, os discos de papel foram analisados em toda a sua extensão, passando o feixe do laser pelo centro, conforme esquema mostrado na Figura 3.

Figura 3. Incidência do laser no disco de papel filtro nos testes realizados para avaliar a distribuição dos analitos e do S adicionados no papel. As condições de análise são citadas na Tabela 2.



FONTE: Adaptado de 54.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

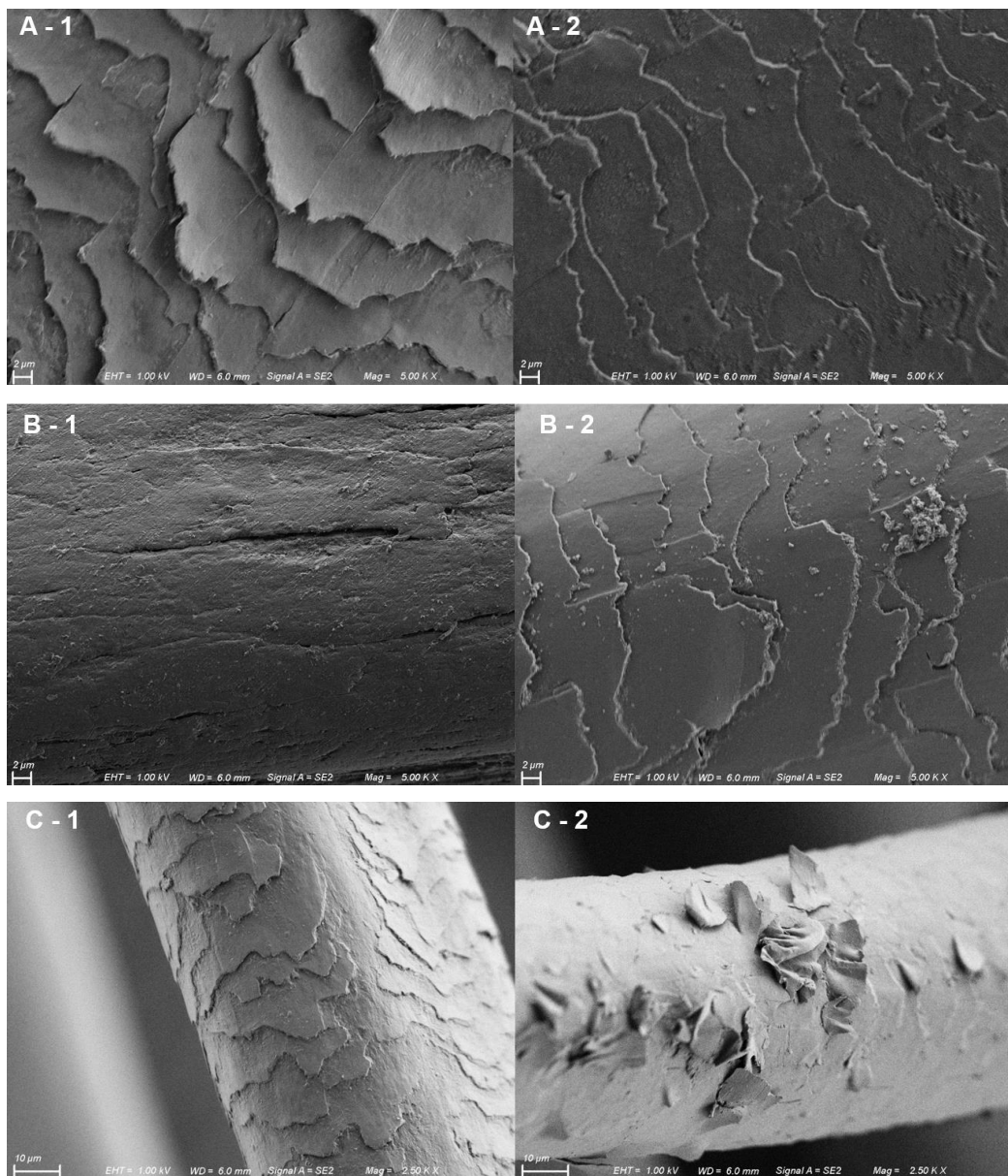
Nesta seção serão apresentados e discutidos os resultados obtidos na avaliação da influência da lavagem do cabelo, de acordo com o método IEAE, para posterior análise por LA-ICP-MS. Estudo relacionado com a alteração da morfologia do cabelo devido à lavagem será apresentado, o qual está baseado em análises realizadas por MEV. Além disso, serão discutidos os perfis dos sinais obtidos a partir da análise de segmentos do cabelo para avaliação da variação da intensidade do sinal e concentração dos metaloestrógenos, bem como a análise da concentração média dos metaloestrógenos determinados por ICP-MS e ICP OES após decomposição das amostras.

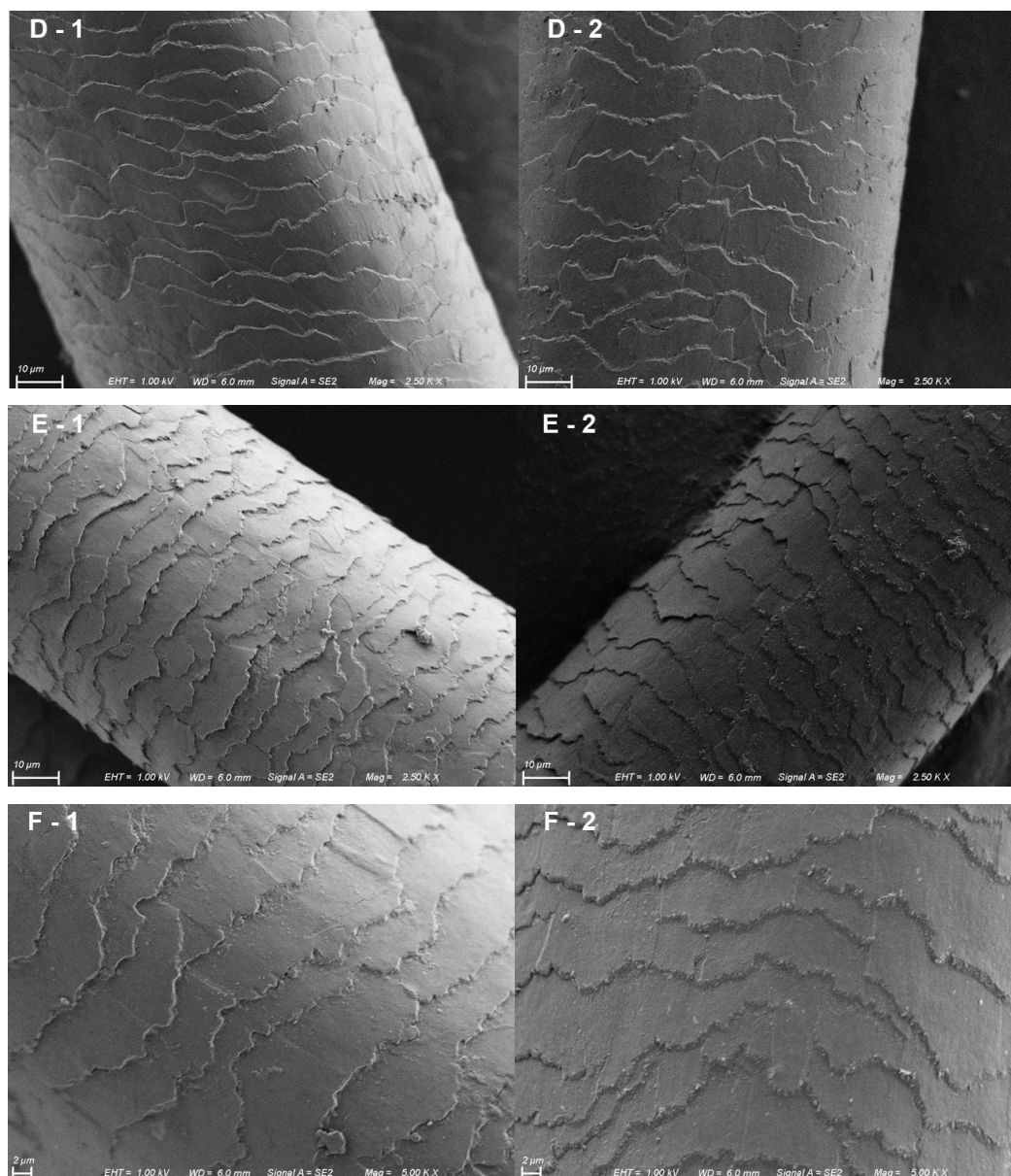
### 5.1 LAVAGEM

Foi avaliado o método de lavagem do cabelo proposto pela IEAE, o qual é indicado para remover a gordura e contaminantes exógenos. Nesta avaliação foram utilizadas seis amostras de cabelo com características diferentes, como coloração natural, coloração química, alisamento e descoloração, todas elas de pessoas sem histórico de doença. Após a lavagem das amostras de cabelo foram feitas análises por MEV, para avaliar se houve alguma alteração na morfologia do cabelo, e por LA-ICP-MS para avaliar se houve alteração dos níveis de Al, Sb, As, Ba, Cd, Cr, Co, Cu, Pb, Hg, Ni, Se, Sn, V e Zn. Esta avaliação foi feita considerando a intensidade do sinal do analito normalizado pela intensidade do padrão interno (IS). Optou-se por usar o  $^{34}\text{S}$  como IS, o qual já foi utilizado em outros estudos.<sup>64</sup>

Na Figura 4 estão mostradas as imagens das seis amostras de cabelo obtidas por MEV, antes e após a lavagem do cabelo.

Figura 4. Imagens de cabelo obtidas por MEV, as amostras A-1, B-1, C-1, D-1, E-1 e F-1 não passaram pelo processo de lavagem e as amostras A-2, B-2, C-2, D-2, E-2 e F-2 forma lavadas.





Como pode ser observado na Figura 4, ocorreram modificações na superfície do cabelo submetido à lavagem. Como se pode observar nas imagens, após o processo de lavagem dos cabelos correspondentes às amostras A, B e C, as cutículas ficaram mais alteradas. Para as amostras B e C ocorreram alterações mais significativas na superfície do cabelo. Essas alterações mais significativas podem ser decorrentes de tratamentos químicos do cabelo, como tintura, descoloração e processos de alisamento ou, estarem mesmo relacionados com a origem de cada pessoa. Entretanto, na análise por MEV, apesar das alterações superficiais observadas no cabelo que foi lavado, não é possível afirmar se houve ou não remoção dos metaloestrógenos endógenos. Desta forma, experimentos foram conduzidos

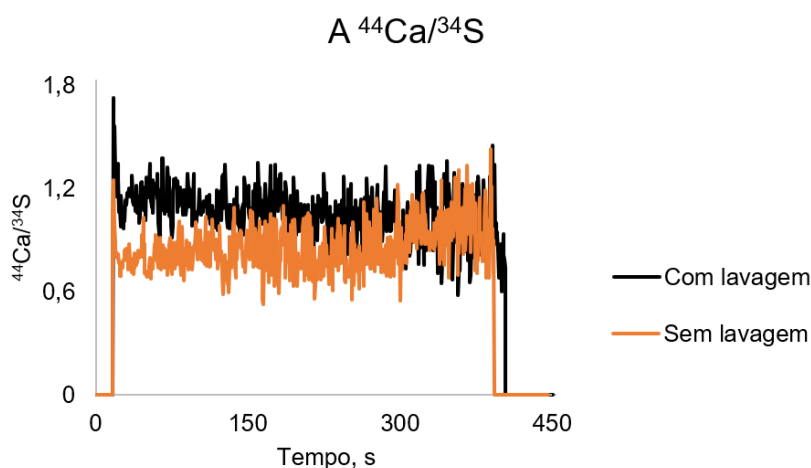
através da análise elementar por LA-ICP-MS com o intuito de verificar se houve alteração dos níveis de metaloestrógenos no cabelo.

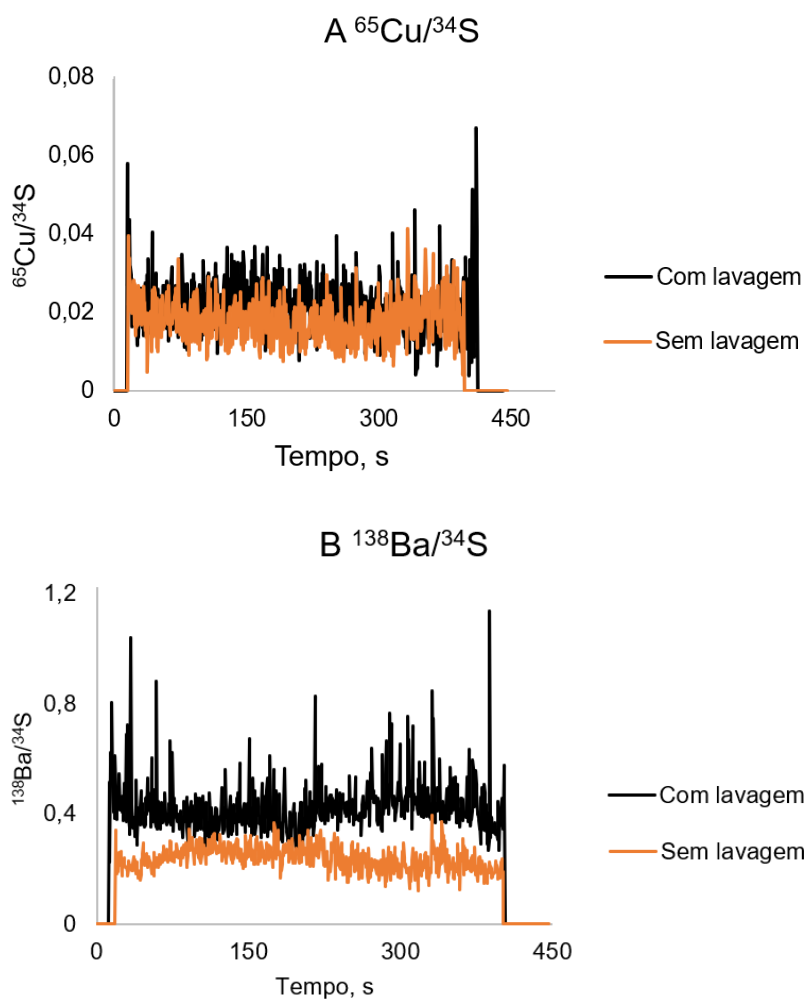
Cabe destacar que a lavagem do cabelo, para a determinação dos metaloestrógenos, deveria somente remover a contaminação exógena e não a endógena. Portanto, como descrito no método da IEAE, o uso da acetona e água, por serem reagentes pouco agressivos, deve remover somente gordura, poeira e outros componentes depositados sob a superfície do cabelo. Na Figura 5 estão mostrados os perfis dos sinais do Ca, Cu e Ba, cujas intensidades foram normalizadas pela intensidade do  $^{34}\text{S}$ , para as amostras A e B analisadas por LA-ICP-MS.

As maiores diferenças foram observadas para Ca e Cu na amostra A e para Ba na amostra B. Para os demais elementos e amostras não ocorreram diferenças significativas. Ou seja, só houve diferença para Cu, Ca e Ba. Para os demais elementos não foi observada diferença entre cabelo lavado e não lavado.

Como pode ser observado na Figura 5, houve um aumento de Cu, Ca e Ba após a lavagem do cabelo, o que pode estar relacionado a uma possível contaminação no processo de lavagem. Para Al, As, Cd, Cr, Co, Hg, Ni, Se, Sb, Sn, Pb, V e Zn não se notou diferença entre amostras lavadas e não lavadas. Isto mostra que o processo de lavagem teve pouca ou nenhuma influência na remoção destes elementos. Desta forma, as análises subsequentes das amostras de cabelo foram feitas sem estes serem submetidos à lavagem.

Figura 5. Razão das intensidades dos sinais do Ca, Cu e Ba normalizados pela intensidade do sinal do  $^{34}\text{S}$  para as amostras A e B, antes e após a lavagem do cabelo.





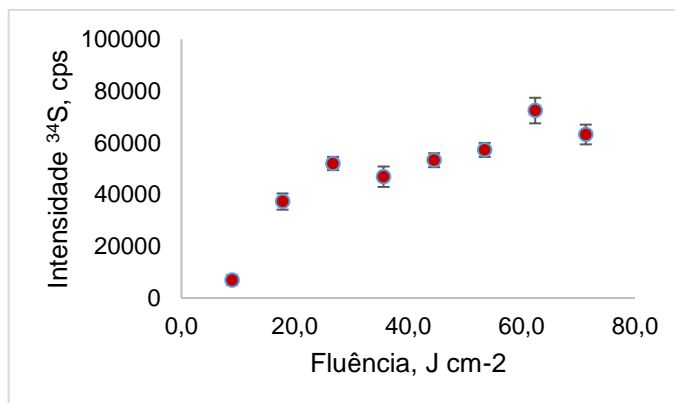
## 5.2 LA-ICP-MS

### 5.2.1 Avaliações dos parâmetros do LA

#### 5.2.2.1 Fluência do laser

Foram avaliadas fluências crescentes do laser, na faixa de 10 a 80% de energia, o que corresponde a 8,9 – 71,3 J cm<sup>-2</sup>. Na Figura 6 está mostrado o efeito da fluência do laser sobre a intensidade do sinal do <sup>34</sup>S ao longo de um segmento de fio de cabelo.

Figura 6. Efeito da fluência do laser sobre a intensidade do sinal do <sup>34</sup>S em cabelo.



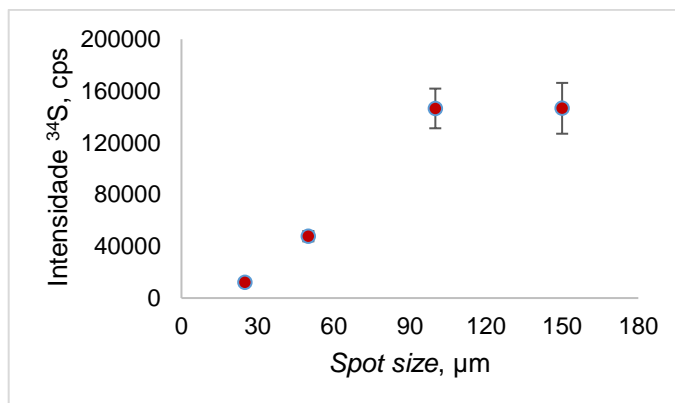
Como pode ser observado na Figura 6, há um aumento da intensidade do sinal até fluências de  $26,7 \text{ J cm}^{-2}$ , estabilizando para fluências maiores. Para fluências acima de  $26,7 \text{ J cm}^{-2}$ , as intensidades não são significativamente diferentes a um nível de confiança de 95% (teste t). Provavelmente, esse comportamento se deve ao fato de o cabelo já ter sido totalmente vaporizado (ablacionado) a partir de aproximadamente  $26,7 \text{ J cm}^{-2}$ . Para os demais elementos o efeito foi similar ao mostrado na Figura 6. Dessa forma, a fluência do laser foi fixada em  $26,7 \text{ J cm}^{-2}$  para as análises subsequentes.

Para avaliar o efeito da fluência do laser, o diâmetro do laser, a velocidade de ablação e a vazão do gás de arraste foram fixados em  $100 \mu\text{m}$ ,  $100 \mu\text{m s}^{-1}$  e  $1,3 \text{ L min}^{-1}$ .

### 5.2.1.2 Tamanho do feixe do laser

Foram avaliados quatro diferentes diâmetros em que o feixe de laser incide sobre amostra de cabelo, sendo eles  $25$ ,  $50$ ,  $100$  e  $150 \mu\text{m}$ , cujo efeito na intensidade do  $^{34}\text{S}$  é mostrado na Figura 7. O diâmetro do feixe do laser influencia no tamanho da cratera ("spot size") feita pelo laser na amostra.

Figura 7. Efeito do diâmetro do feixe do laser na intensidade do sinal do  $^{34}\text{S}$  em cabelo.



Na Figura 7 pode ser observado que a intensidade do sinal do  $^{34}\text{S}$  não difere para 100 e 150  $\mu\text{m}$ , porém os desvio-padrão são maiores do que nas condições de 25 e 50  $\mu\text{m}$ . O fato de aumentar a intensidade do sinal entre 25 e 50  $\mu\text{m}$  e não aumentar entre 100 e 150  $\mu\text{m}$  se deve ao fato do cabelo ter em torno de 80  $\mu\text{m}$  de espessura. Ou seja, houve aumento da intensidade do sinal até todo o cabelo ser vaporizado pelo feixe de laser, que é em torno de 80  $\mu\text{m}$ . Para os demais elementos o comportamento foi similar. Desta forma, o tamanho do feixe de laser utilizado foi fixado em 50  $\mu\text{m}$  para as análises subsequentes.

Para avaliar o efeito do tamanho do feixe de laser, a fluência do laser, a velocidade de ablação e a vazão do gás de arraste foram fixados em 35,7  $\text{J cm}^2$ , 100  $\mu\text{m s}^{-1}$  e 1,3  $\text{L min}^{-1}$ .

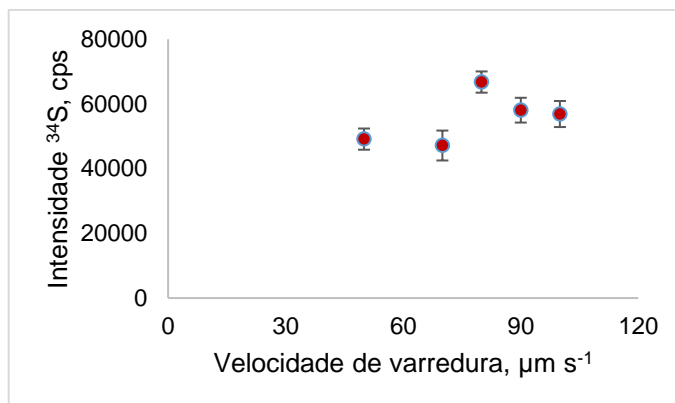
### 5.2.1.3 Velocidade de varredura

A velocidade de varredura do feixe de laser sobre a amostra foi avaliada na faixa de 50 a 100  $\mu\text{m s}^{-1}$ .

Como mostrado na Figura 8, não foi observada diferença significativa na intensidade do sinal para  $^{34}\text{S}$ . Comportamento similar foi observado para os demais elementos investigados.

Figura 8: Efeito da velocidade de varredura do laser sobre a amostra na intensidade do sinal do  $^{34}\text{S}$ .





A velocidade de  $80 \mu\text{m s}^{-1}$  foi escolhida como uma condição de compromisso para precisão e tempo de análise. A velocidade de varredura influencia na sincronização do ponto de vaporização da amostra pelo feixe de laser e aquisição do sinal pelo espectrômetro de massa, visto que o espectrômetro de massa é do tipo quadrupolo (sequencial).

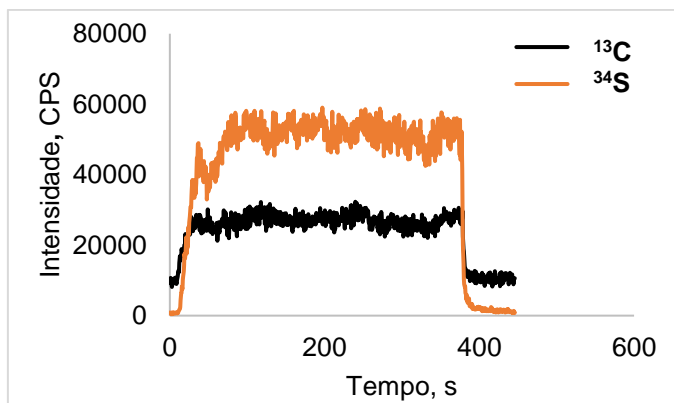
Para avaliar o efeito da velocidade que o feixe de laser incide na amostra, o diâmetro do laser, a fluência do laser e a vazão do gás de arraste foram fixados em  $100 \mu\text{m}$ ,  $35,7 \text{ J cm}^{-2}$  e  $1,3 \text{ L min}^{-1}$ .

### 5.2.2 Escolha do padrão interno

Os isótopos  $^{13}\text{C}$  e  $^{34}\text{S}$  foram avaliados para atuar como padrão interno na análise de cabelo por LA-ICP-MS. Estes isótopos foram escolhidos devido a presença destes elementos nas amostras, de forma mais homogênea, onde o S é encontrado em concentração de cerca 5% enquanto a do C é cerca 51%. O  $^{13}\text{C}$  foi escolhido devido a sua abundância isotópica natural ser menor que a do  $^{12}\text{C}$  e, conseqüentemente, menor intensidade do sinal. Por sua vez, o  $^{34}\text{S}$  foi escolhido por ser menos sujeito à interferência de íons poliatômicos quando comparado ao isótopo  $^{32}\text{S}$ .

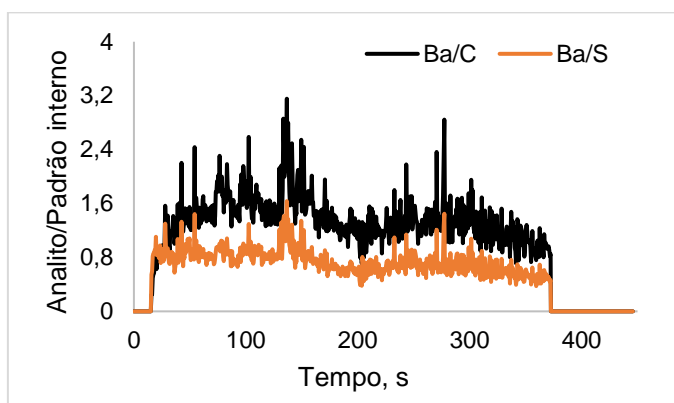
Na Figura 9 estão mostrados os perfis dos sinais do  $^{34}\text{S}$  e  $^{13}\text{C}$ , onde pode ser observado que o sinal do  $^{13}\text{C}$  é menor que o de  $^{34}\text{S}$  e a linha base para  $^{34}\text{S}$  é menor.

Figura 9. Sinais do  $^{13}\text{C}$  e  $^{34}\text{S}$ , utilizados como padrões internos, em amostra de fio de cabelo.



Na Figura 10 podem ser observadas as razões  $^{138}\text{Ba}/^{13}\text{C}$  e  $^{138}\text{Ba}/^{34}\text{S}$ , onde a razão para  $^{34}\text{S}$  foi menor quando comparado ao  $^{13}\text{C}$ . Foi escolhido a normatização do sinal dos elementos ao  $^{34}\text{S}$  nos experimentos subsequentes, visto que este elemento tem uma  $m/z$  mais alta e, portanto, mais próxima a maioria dos elementos estudados.

Figura 10. Razões  $^{138}\text{Ba}/^{13}\text{C}$  e  $^{138}\text{Ba}/^{34}\text{S}$  ao longo do papel filtro adicionado de Ba e L-cisteína.

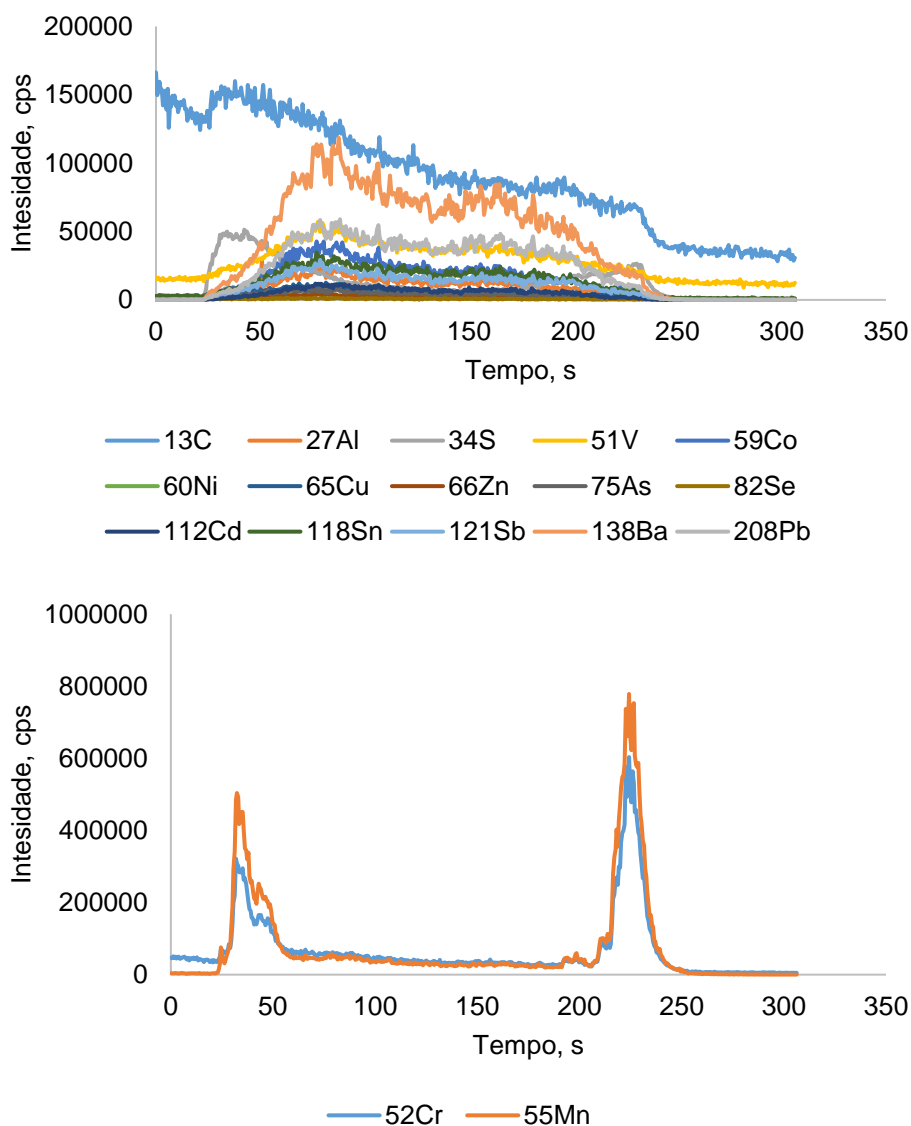


### 5.2.3 Calibração para análise por LA-ICP-MS

A curva de calibração para análise por LA-ICP-MS foi feita utilizando papel filtro como suporte para a adição das soluções de calibração. Esse material foi utilizado tendo em vista o seu uso em outros trabalhos já realizados, como os publicados por Limbeck et al.<sup>49</sup> e Nunes et al.<sup>76</sup>.

A concentração dos analitos na solução adicionada foi de  $5 \mu\text{g g}^{-1}$  e a concentração da solução de L-cisteína foi  $137 \text{ g L}^{-1}$ , a qual foi adicionada de forma que fosse 5% em relação ao papel filtro. Na Figura 11 é mostrada a distribuição dos elementos ao longo do papel filtro. Neste caso, a L-cisteína foi adicionada primeiro ao papel, que foi secado e, então foram adicionados os analitos e o papel novamente secado.

Figura 11. Distribuição dos elementos no papel filtro quando a solução de L-cisteína é adicionada, o papel secado, adicionada a solução com os analitos e o papel secado novamente.

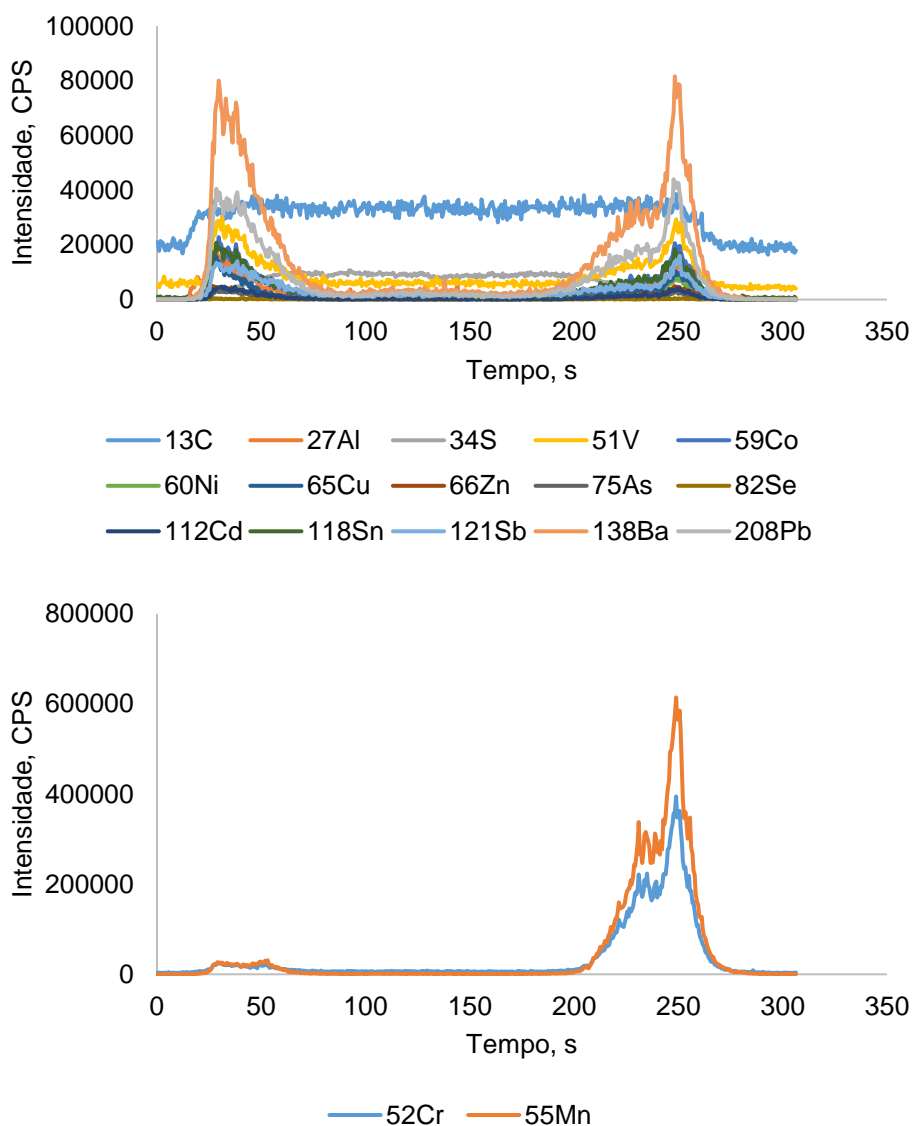


Como pode ser observado na Figura 11, a distribuição dos elementos foi relativamente homogênea ao longo do papel filtro, exceto o Mn e o Cr, os quais concentraram-se mais nas bordas do papel filtro. Para estes elementos houve “efeito cromatográfico”, em decorrência da pouca interação com o papel filtro. Esse efeito não é observado para os demais elementos, possivelmente por uma interação maior com o papel filtro, tanto do elemento na forma livre ou complexado com a L-cisteína, levando a uma distribuição mais homogênea.

Na Figura 12 pode ser observado a distribuição dos mesmos elementos mostrados na Figura 11 ao longo do papel filtro. Neste teste, a solução contendo os

analitos foram adicionadas ao papel filtro, este foi seco com o auxílio da lâmpada em temperatura de aproximadamente 80°C, adicionada a solução de l-cisteína e novamente o papel foi secado.

Figura 12. Distribuição dos elementos no papel filtro quando a solução dos analitos foi adicionada primeiro, o papel filtro, secado, a solução de l-cisteína adicionada e o papel secado novamente.

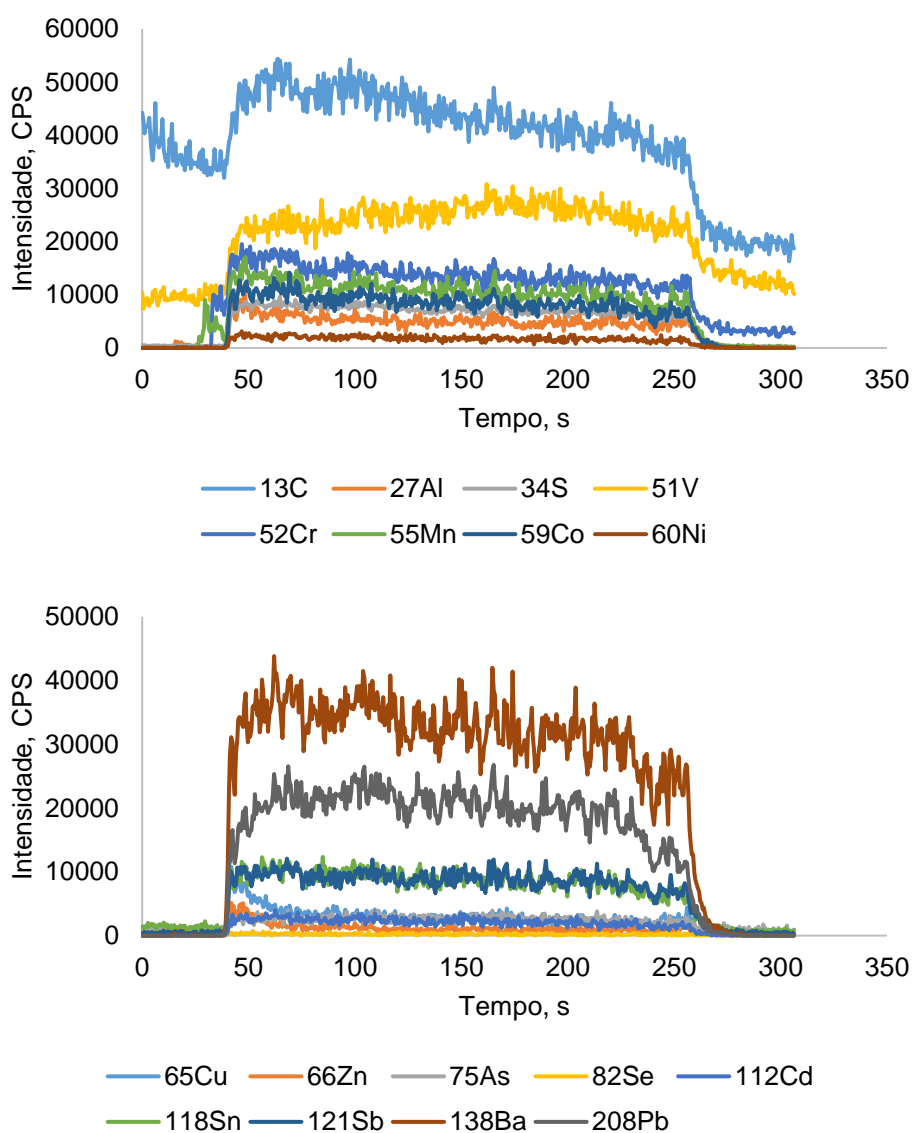


Como pode ser observado na Figura 12, de forma diferente ao observado na Figura 11, ocorreu um aumento da intensidade do sinal para todos os elementos nas bordas do papel, com aumento mais significativo para Mn e Cr novamente. Isto pode ser devido à ordem de adição da solução de l-cisteína, a qual pode ter promovido o “arraste” dos elementos para as bordas do papel filtro, assim resultando em uma distribuição heterogênea dos mesmos no papel filtro, com aumento de concentração

do centro para as bordas. A maior intensidade do sinal dos elementos num ponto da borda pode ser o resultado da solução ter se deslocado mais para este lado do papel no momento da sua adição. É interessante observar que o S ficou distribuído de forma bastante homogênea.

Na Figura 13 pode ser observada a distribuição dos elementos no papel filtro quando é adicionada a solução contendo os elementos junto com a l-cisteína.

Figura 13. Distribuição dos elementos no papel filtro quando a solução com os elementos e a l-cisteína é adicionada e o papel secado.



Como pode ser observado na Figura 13, ao adicionar somente os 40  $\mu\text{L}$  de solução contendo os elementos mais a l-cisteína, a distribuição dos elementos no

papel filtro ocorreu de forma homogênea. Possivelmente, a distribuição ficou mais homogênea em relação aos experimentos anteriores por causa do volume adicionado (somente uma alíquota de 40  $\mu\text{L}$ ). Além disso, a l-cisteína também pode influenciar, uma vez que a mesma forma complexo com diversos elementos, alterando assim a interação do elemento com o papel e, conseqüentemente, o “efeito cromatográfico”. Dessa forma, esta condição foi escolhida para os estudos posteriores.

Na Tabela 6 são listadas as equações das curvas de calibração e seus respectivos coeficientes de determinação para cada elemento avaliado. Para a obtenção da curva de calibração foram seguidas as condições escolhidas no item 5.2.1, onde a fluência foi de 26,7  $\text{cm J}^{-2}$ , o tamanho de feixe foi de 50  $\mu\text{m}$  e a velocidade de varredura foi 80  $\mu\text{m s}^{-1}$ .

Tabela 3. Equações das curvas de calibração e coeficiente de determinação ( $R^2$ ); as curvas de calibração foram obtidas por LA-ICP-MS a partir de discos de papel adicionados dos analitos e l-cisteína.

| Elemento          | Equação da Curva              | $R^2$  | LD ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) |
|-------------------|-------------------------------|--------|-----------------------------|
| $^{27}\text{Al}$  | $y = 0,0021x + 0,0032$        | 0,9343 | 0,018                       |
| $^{51}\text{V}$   | $y = 0,005x + 0,0004$         | 0,9991 | 0,002                       |
| $^{55}\text{Mn}$  | $y = 0,0069x + 0,0005$        | 0,9998 | 0,001                       |
| $^{59}\text{Co}$  | $y = 0,0057x + 0,0002$        | 0,9998 | 0,001                       |
| $^{60}\text{Ni}$  | $y = 0,0012x + 0,0003$        | 0,9914 | 0,0003                      |
| $^{66}\text{Zn}$  | $y = 0,0003x + 0,0007$        | 0,8077 | 0,0015                      |
| $^{75}\text{As}$  | $y = 0,0007x + 0,0005$        | 0,9897 | 0,0007                      |
| $^{82}\text{Se}$  | $y = 0,0001x + 0,0001$        | 0,9678 | 0,0003                      |
| $^{112}\text{Cd}$ | $y = 0,0011x - 7\text{E}-0,6$ | 0,9991 | 0,0001                      |
| $^{118}\text{Sn}$ | $y = 0,0061x + 0,0005$        | 0,9969 | 0,0015                      |
| $^{121}\text{Sb}$ | $y = 0,0057x + 0,0018$        | 0,9964 | 0,0025                      |
| $^{138}\text{Ba}$ | $y = 0,0249x + 0,0003$        | 0,9994 | 0,0040                      |
| $^{208}\text{Pb}$ | $y = 0,0166x + 0,0004$        | 0,9996 | 0,0009                      |

Os limites de detecção foram calculados a partir da média de 10 leituras do branco, onde o desvio da medida foi multiplicado por três e a média das leituras do branco foi somada a esse produto ( $\text{LD} = 3\text{SD} + \bar{X}_{\text{branco}}$ ). Papel filtro adicionado de 40  $\mu\text{L}$  de  $\text{HNO}_3$  5% foi usado como branco. De maneira geral, os limites de detecção foram baixos para os elementos monitorados por LA-ICP-MS. Para Cr e Cu não foi possível obter curvas de calibração, pois não foram obtidas correlações lineares para esses

elementos, sendo o coeficiente de correlação ( $R^2$ ) de 0,0663 e 0,3346, respectivamente.

Os elementos Hg e Ca foram somente monitorados qualitativamente. Não é comum a determinação de Hg por LA-ICP-MS, mas o elemento foi monitorado para verificar a sua presença em alguma amostra analisada. Quanto ao Ca, o seu monitoramento foi feito apenas para verificar se em alguma amostra o sinal do mesmo alterava significativamente, uma vez que há relatos da sua diminuição e consequente aumento de outro metal devido à troca com o Ca no organismo e, assim, resultando na mutação celular.

#### **5.2.4 Análise das amostras de cabelo de mulheres com câncer de mama**

Após o desenvolvimento do método, este foi aplicado para a análise de cabelo de indivíduos diagnosticados com câncer de mama. Amostras de cabelo de indivíduos sem histórico da doença também foram analisadas. A técnica LA-ICP-MS foi utilizada para monitorar os elementos ao longo dos fios de cabelo. Para tal, a ablação foi iniciada sempre na extremidade próxima à raiz, em segmentos de até 5 cm, quando o comprimento do fio de cabelo era suficiente. A concentração dos elementos foi calculada ponto-a-ponto, de acordo com as medições feitas. Para os elementos determinados qualitativamente, somente a razão da intensidade do sinal normalizada pela intensidade do padrão interno foi considerada. Por fim, a concentração dos analitos em algumas amostras, aquelas com massa suficiente, foi determinada por ICP OES ou ICP-MS, após decomposição das amostras com ácido.

De maneira geral, na análise por LA-ICP-MS os resultados obtidos para cada indivíduo foram distintos, não seguindo uma faixa de concentração “padrão” ou mesmo um perfil similar para os elementos investigados (Figura 13). Isto pode ser devido a diferenças entre os indivíduos com etnia, fatores genéticos, gênero, hábitos alimentares, ingestão de medicamentos, consumo de bebida alcoólica, tabagismo, entre outras características.

Na análise de um fio cabelo por LA-ICP-MS pode ser observado que o sinal de determinado elemento ao longo do fio é variável. Isto se deve a fatores ambientais e genéticos, hábitos alimentares e de vida de cada indivíduo. Como não se tem as informações sobre cada paciente como, por exemplo, estágio do câncer de mama, histórico de outras doenças, hábitos alimentares, região em que o indivíduo vive etc.,

não foi possível detectar alguma similaridade entre a presença de cada elemento e os indivíduos, não sendo, portanto, possível compará-los ou agrupá-los para uma possível conclusão. Assim sendo, os resultados obtidos foram comparados com as concentrações consideradas normais para cabelo humano, as quais são citadas na Tabela 4.

Tabela 4. Faixas de concentração de elementos consideradas normais para cabelo humano. Adaptado da referência 77.

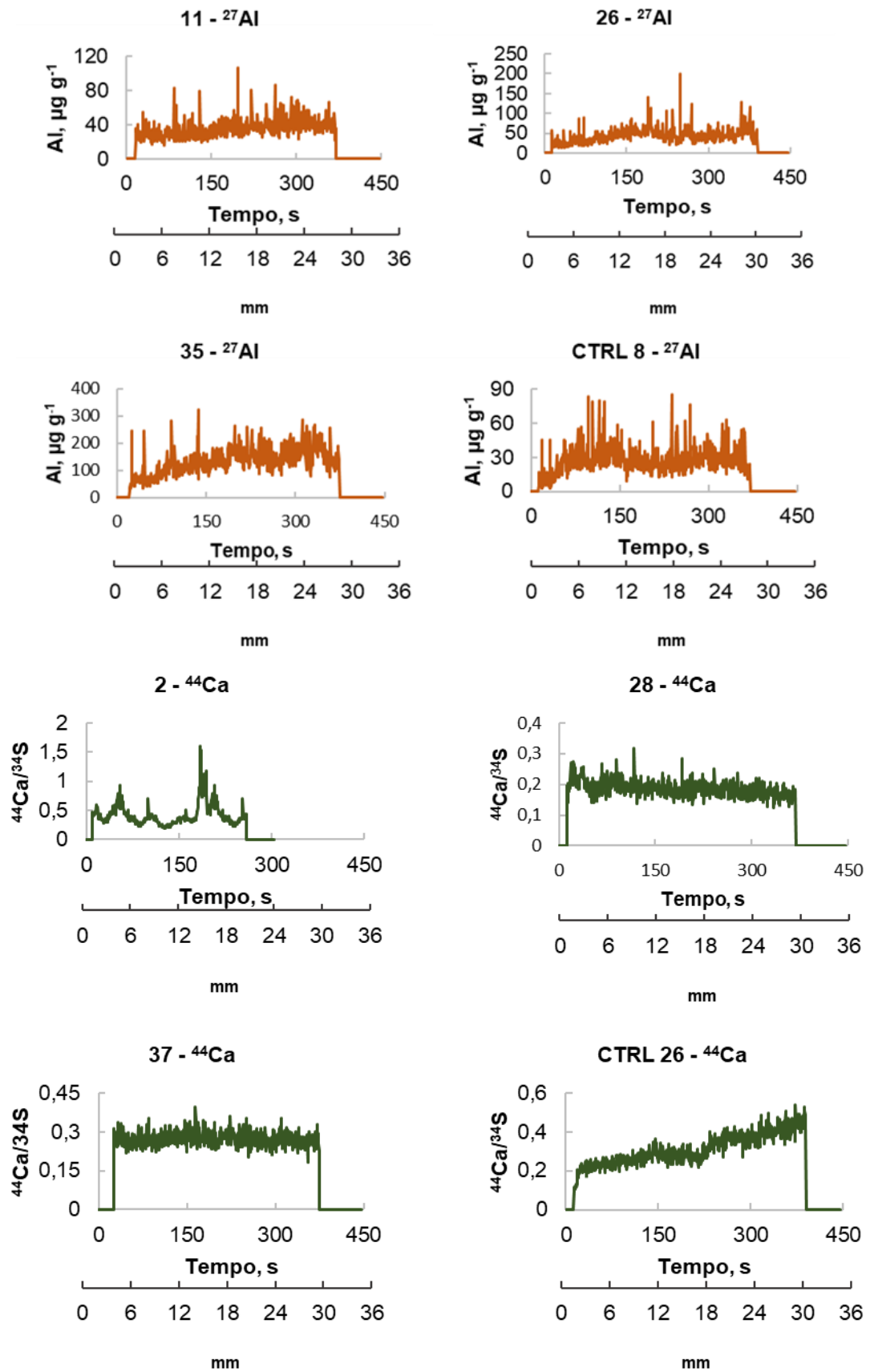
| Elemento | Concentração, $\mu\text{g g}^{-1}$ | Elemento | Concentração, $\mu\text{g g}^{-1}$ |
|----------|------------------------------------|----------|------------------------------------|
| Al       | 0,10 – 36                          | Mn       | 0,04 - 24                          |
| As       | 0,03 - 25                          | Ni       | 0,002 – 4,05                       |
| Ba       | 0,76 – 1,41                        | Pb       | 0,004 - 95                         |
| Ca       | 170 - 4690                         | Sb       | 0,05 – 0,06                        |
| Cd       | 0,04 – 5,3                         | Se       | 0,002 – 6,6                        |
| Co       | 0,07 – 1,7                         | Sn       | 0,036 – 8,3                        |
| Cr       | 0,08 – 2,5                         | V        | 0,04 - 160                         |
| Cu       | 6 - 293                            | Zn       | 53,7 - 327                         |
| Hg       | 0,3 – 12,2                         |          |                                    |

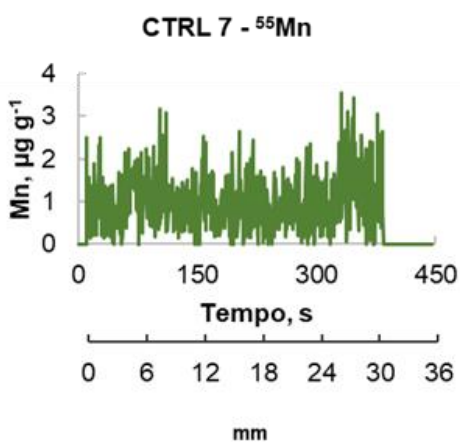
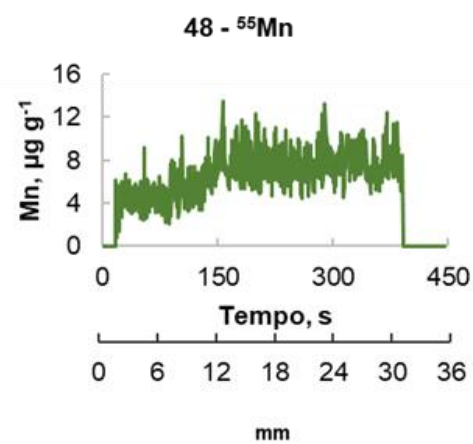
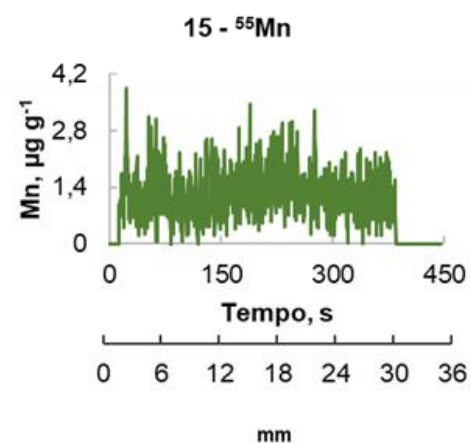
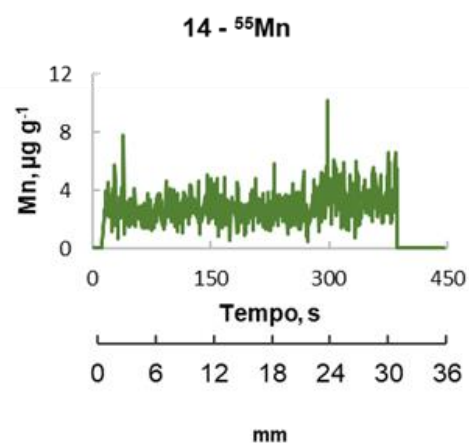
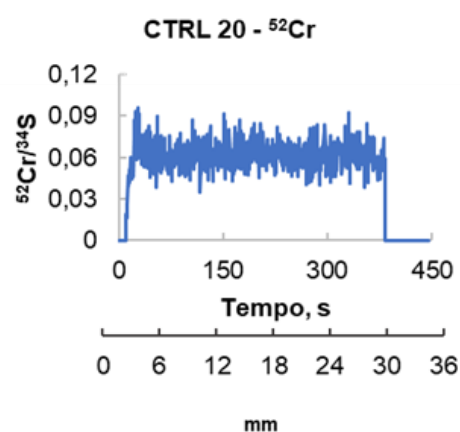
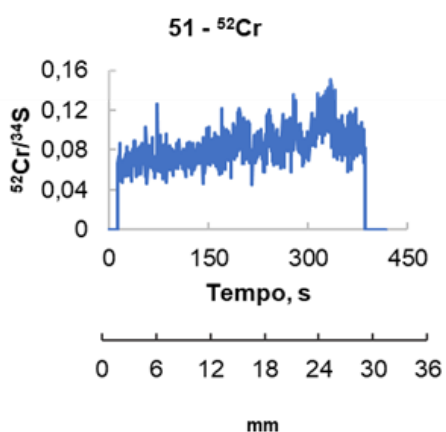
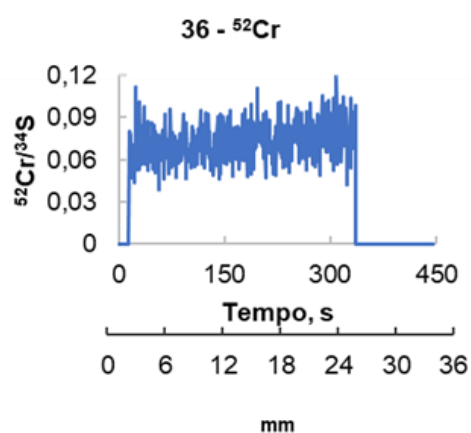
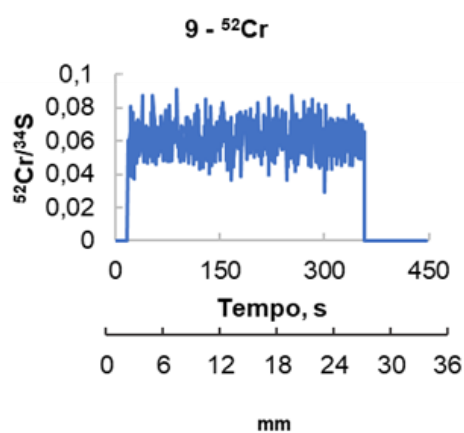
A concentração de As, Cd, Co, Ni, Sb e Sn nas amostras foi inferior ao limite de detecção (LD). Na Figura 14 são mostrados os resultados obtidos na análise de cabelo por LA-ICP-MS e, comparando-se com os dados constantes na Tabela 4, pode ser observado que as concentrações de Mn e V estão dentro da faixa de concentração normal no fio de cabelo. Para estes elementos, observam-se pontos de maior concentração, mostrando que há variação da concentração ao longo do fio de cabelo. O Ca, cujo sinal foi apenas normalizado em relação ao  $^{34}\text{S}$ , não variou ao longo do fio do cabelo para a grande maioria das amostras analisadas. A concentração do Zn na maioria das amostras está abaixo da faixa de concentração esperada, o que pode estar relacionado com a deficiência deste elemento que é essencial para o metabolismo humano. O Ba e o Cu estão presentes em concentrações acima daquelas consideradas normais em cabelo humano (Tabela 4). Entre os elementos determinados, o Ba está presente em maior concentração na maioria das amostras, inclusive naquelas do grupo controle. A concentração do Al variou bastante ao longo do fio do cabelo, mas isto pode ser, em parte, devido à contribuição do Al presente na fita que foi utilizada para fixar a amostra na lâmina de vidro.

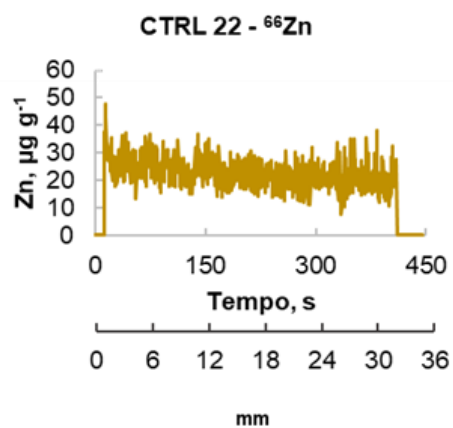
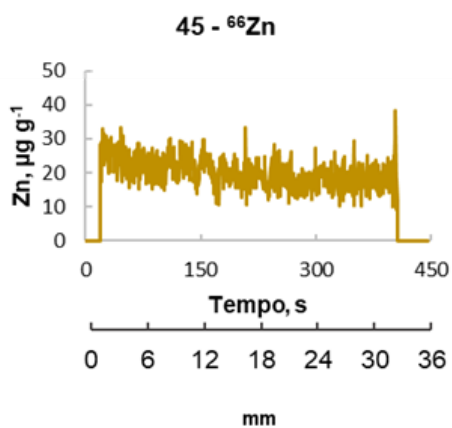
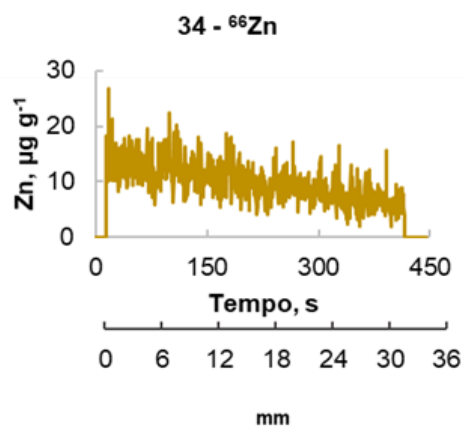
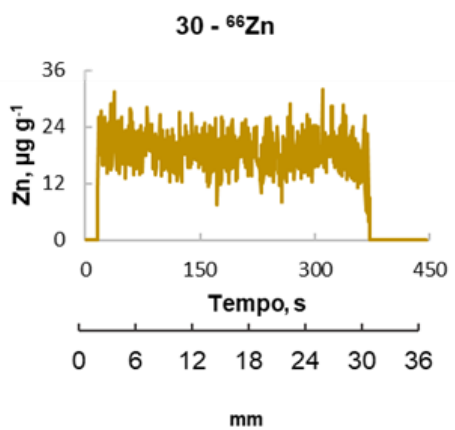
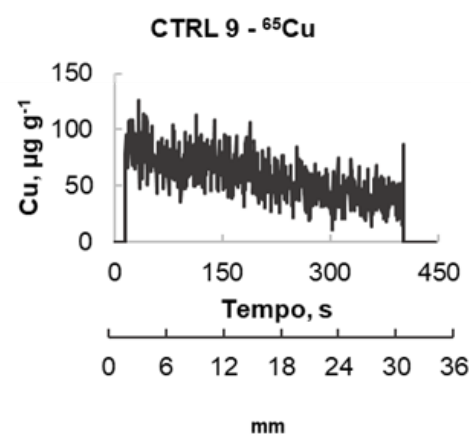
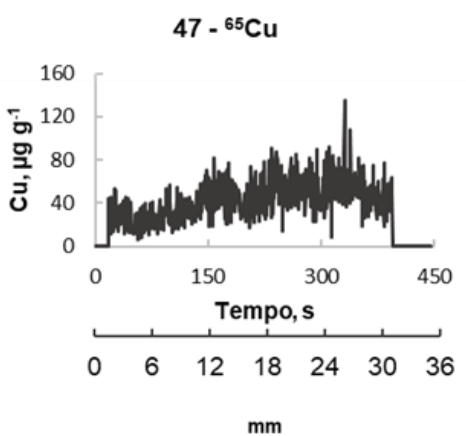
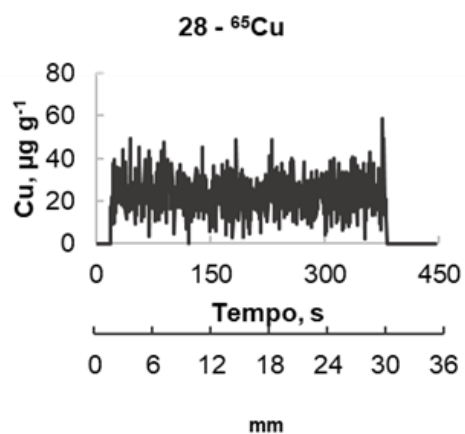
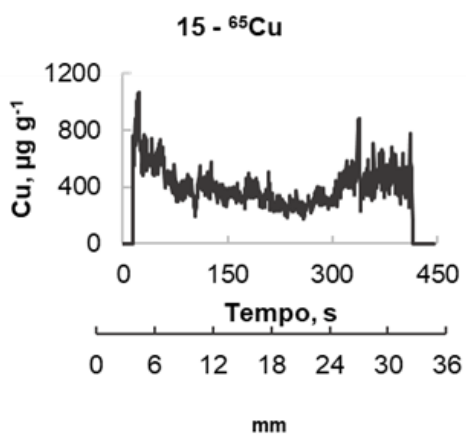


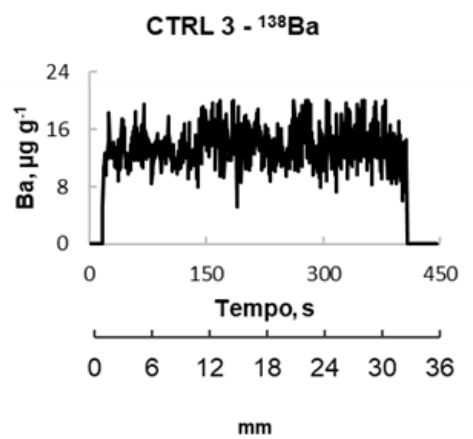
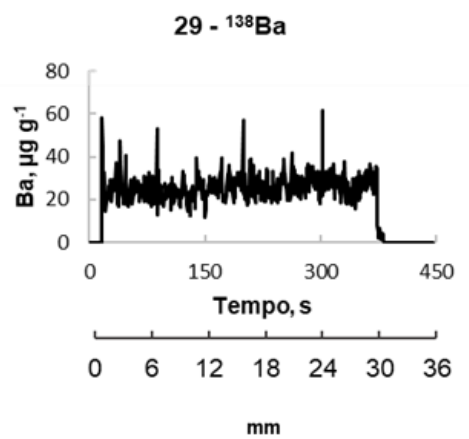
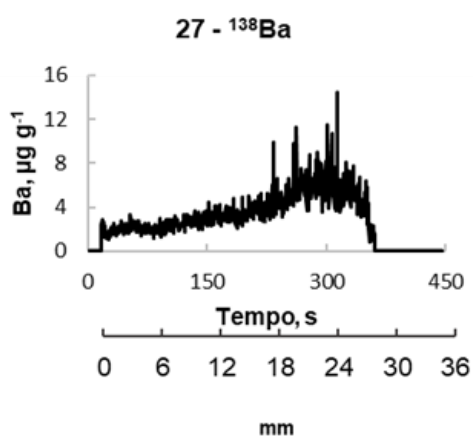
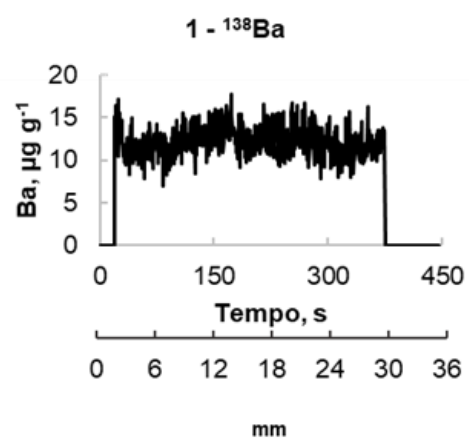
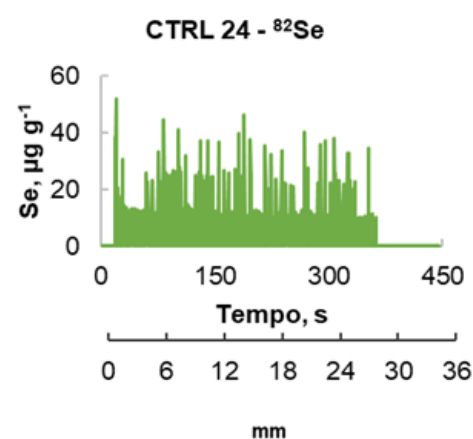
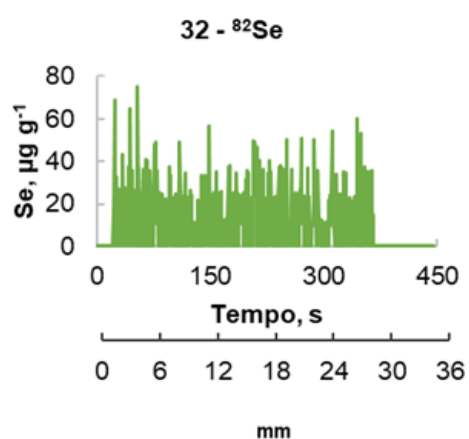
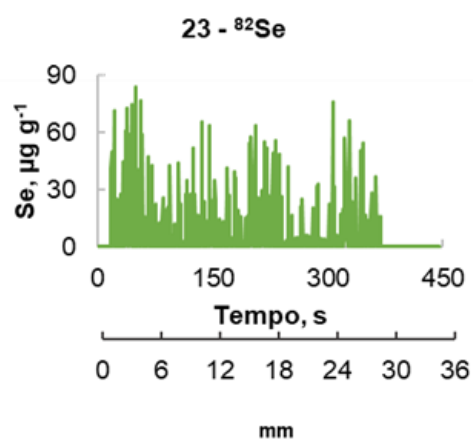
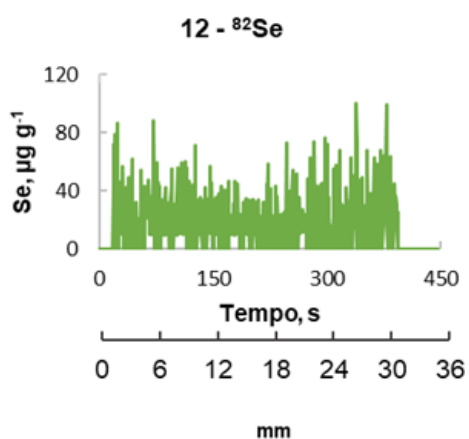
A concentração de Pb, ao comparar entre as amostras, teve uma variação considerável, porém está dentro da faixa de concentração mostrada na Tabela 7. Para Cr também foram observadas variações significativas na concentração. Pode ser devido a própria presença de Cr no cabelo ou devido a interferência espectral, visto a elevada quantidade de carbono presente no cabelo, bem como na própria fita dupla face. Neste caso, pode haver formação do íon poliatômico  $^{40}\text{Ar}^{13}\text{C}$ . A concentração de Se variou bastante ao longo do fio de cabelo, sendo que em alguns pontos, a concentração estava acima da faixa de concentração daquelas consideradas normais para cabelo humano.

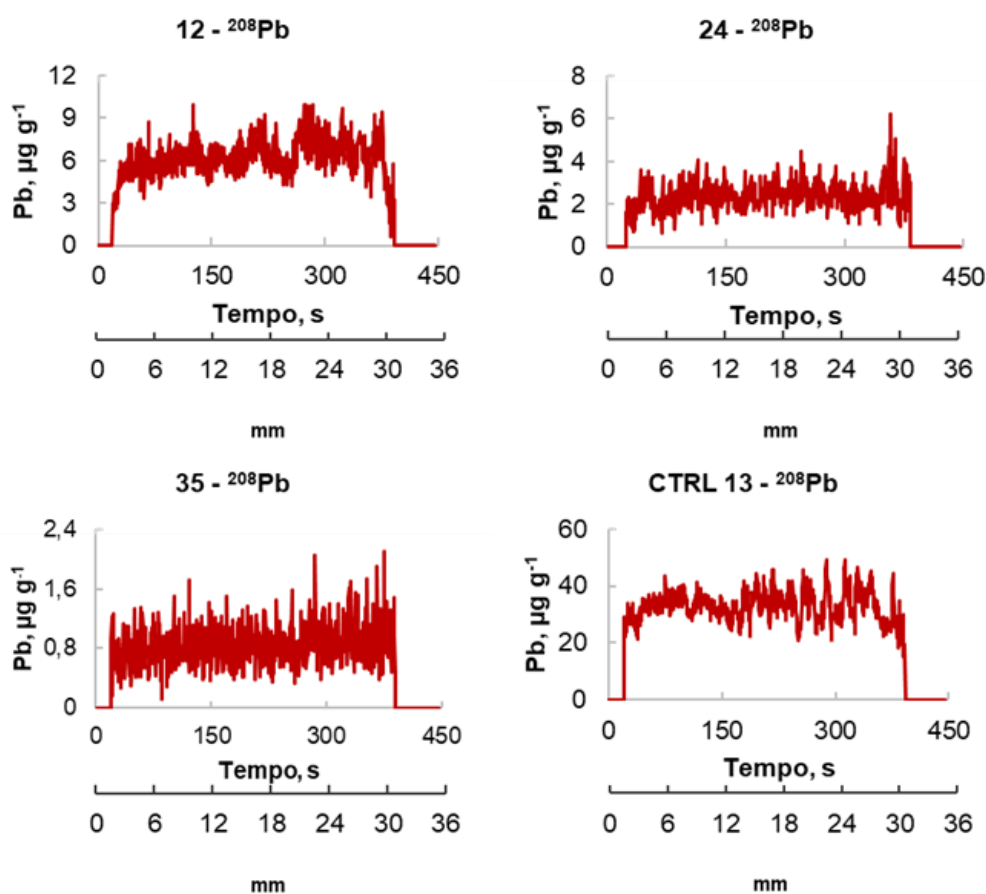
Figura 14. Concentrações dos elementos, exceto o Ca, em cabelo de mulheres com câncer de mama e grupo controle. As amostras foram analisadas por LA-ICP-MS.





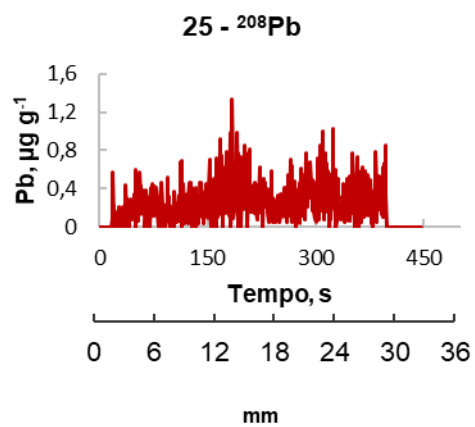
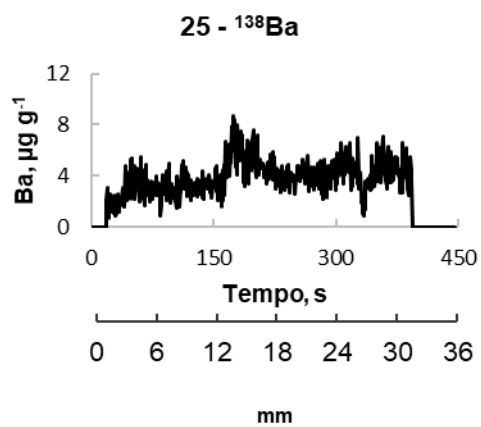
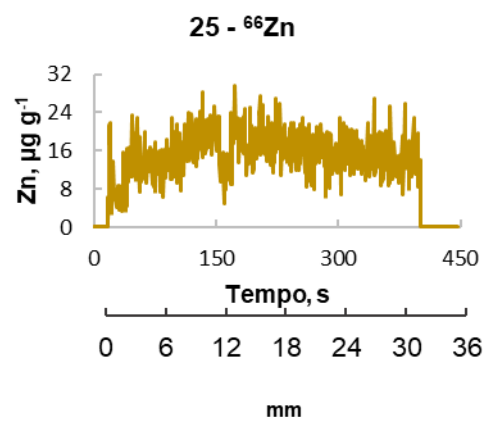
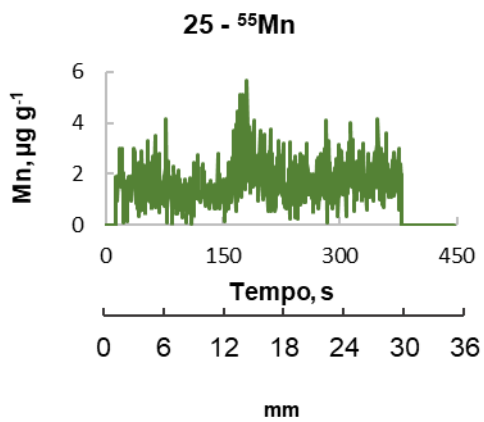
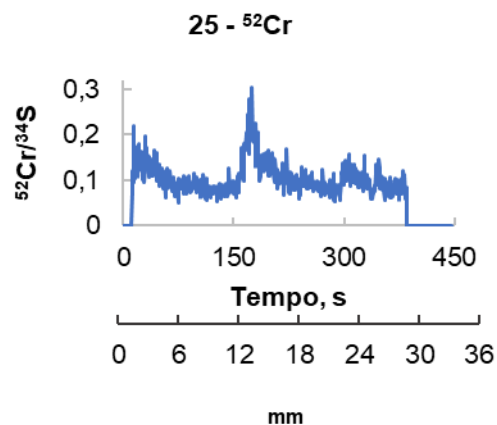
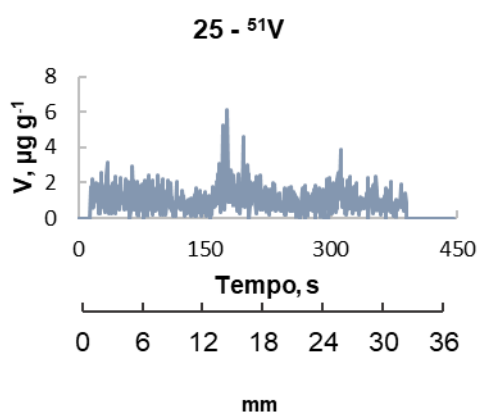
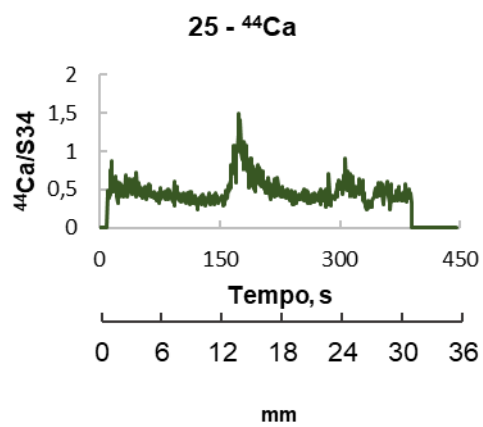
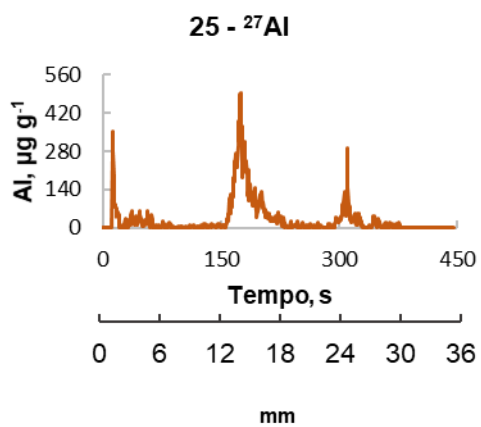






Na Figura 15 são mostrados os resultados obtidos na análise do cabelo de um único indivíduo. O cabelo armazena informações sobre exposições do indivíduo ao longo de determinado período de tempo e, uma vez que o cabelo cresce cerca de um centímetro por mês, ele pode trazer informações que ocorreram ao longo de um período. Dessa forma, as variações observadas no cabelo, cujos resultados são mostrados na Figura 15, podem estar relacionadas com exposições do indivíduo. Mudança de hábitos alimentares do indivíduo, exposição a elementos químicos e doenças podem levar a alterações nos níveis de concentração dos elementos em tecidos do corpo, sangue, urina e, conseqüentemente, no cabelo. Entretanto, diferentemente do cabelo, a concentração dos elementos nos tecidos, no sangue e na urina muda conforme as condições de exposição vão mudando. Por outro lado, devido às características do cabelo, os elementos se incorporam no mesmo a partir da corrente sanguínea, ao longo do tempo. No caso da Figura 15, como não se tem conhecimento do histórico do indivíduo, as variações observadas não podem ser explicadas.

Figura 15. Concentrações de elementos, exceto o Ca, encontradas no cabelo referente à amostra 25.



### 5.3 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE CABELO POR ICP-MS e ICP OES

Poucos trabalhos relatam a avaliação de uma gama maior de elementos relacionados com o câncer de mama. Um dos poucos trabalhos encontrados que relatam um número maior de elementos é o de Cihan et al.<sup>78</sup>, onde são avaliados 36 elementos em 52 amostras de pacientes com câncer de mama em estágio III. Neste estudo, foram observados níveis mais altos de Fe nas amostras, enquanto que no grupo controle foram encontrados níveis mais altos para Ca. Os dois grupos apresentaram altos níveis de Sn, Mg, Zn e Na. Também observaram que os valores para os elementos avaliados nos pacientes com câncer apresentaram uma maior dispersão do que no grupo controle. Além disso, houve diferenças estatísticas entre os dois grupos para Ag, As, Au, B, Ba, Be, Ca, Cd, Ce, Co, Cr, Ga, Mn, Ni, Pb, Sb, Sc, Se e Zn.<sup>78</sup>

Nas amostras de cabelo decompostas foi possível quantificar todos os elementos monitorados. Na análise por ICP OES, foi possível observar que o Zn nas amostras 7 e 10 estava abaixo da faixa de concentração normal, o que também foi observado na análise por LA-ICP-MS. Por outro lado, na amostra 20 a concentração de Zn é maior que a normal. Quanto ao Ca, a faixa de concentração encontrada foi ampla e somente nas amostras 10 e 23 a concentração do elemento estava acima da faixa de considerada normal. Enquanto isto, em quatro amostras (10, 11, 12 e CTRL 7), a concentração do Al estava acima da faixa de concentração normal. As concentrações de Zn, Ca e Al, determinadas por ICP OES, em todas as amostras de cabelo analisadas, constam na Tabela 1 do ANEXO C.

Nas Tabelas 2 e 3, que estão no ANEXO D, constam os resultados obtidos na análise por ICP-MS, onde se pode observar que as concentrações de Pb e Se estão dentro da faixa de concentração consideradas normais para cabelo humano. Para Ba, de maneira geral, a concentração do elemento nas amostras está acima da faixa normal, com exceção da amostra 7, onde a concentração de Ba encontra-se dentro desta faixa normal de concentração. Para As, Cd, Sb e Sn na maior parte das amostras as concentrações estão abaixo da faixa de concentração normal.

As concentrações de Cr, Cu e Ni nas amostras encontram-se dentro da faixa de concentração considerada normal para cabelo humano, com exceção do Cu e Ni, cujas concentrações estão abaixo da faixa somente na amostra 7. A concentração de Co nas amostras 12, 17, 23 e CTRL 7 está dentro da faixa normal e a de Mn nas



amostras 21 e CTRL 1 é inferior. Nas demais amostras as concentrações de Co e Mn estão dentro da faixa considerada normal. Em todas as amostras, a concentração de V está abaixo do LD do método.

Os dados obtidos a partir das análises por ICP OES e ICP-MS foram adaptados para que análises estatísticas fossem realizadas. Para tal, foi utilizado o *software* R (versão 4.0.5).<sup>79</sup> Para a obtenção do gráfico de matriz de correlações foi utilizado os pacotes *corrplot*<sup>80</sup>, para os gráficos de PCA o *ggbiplot*<sup>81</sup>, e para a técnica de árvore de decisão o *rpart* e *rpart.plot*.<sup>82,83</sup> Como o V está abaixo do LD e o As apenas duas amostras estavam acima do LD, estes elementos foram desconsideradas para estas análises. Dessa forma, foram consideradas 25 amostras e 10 controles.

Na Figura 16 estão resumidos os dados para cada variável, onde estão apresentados os valores mínimos e máximos, os valores de 1° e 3° quartil, mediana e média. Dessa forma, é possível observar a amplitude das concentrações determinadas para cada elemento, bem como uma ideia da distribuição destes valores nas amostras.

Figura 16. Resumo dos dados para cada elemento, como valores mínimos e máximos, os valores de 1° e 3° quartil, mediana e média.

|         | V      | Cr    | Mn     | Co       |
|---------|--------|-------|--------|----------|
| Min.    | :0.109 | :0.11 | :0.380 | :0.01000 |
| 1st Qu. | :0.109 | :0.77 | :0.670 | :0.01000 |
| Median  | :0.109 | :1.28 | :0.740 | :0.02000 |
| Mean    | :0.109 | :1.18 | :1.447 | :0.05286 |
| 3rd Qu. | :0.109 | :1.64 | :1.595 | :0.05000 |
| Max.    | :0.109 | :2.12 | :5.940 | :0.55000 |

|         | Ni      | Cu      | As      | Se      |
|---------|---------|---------|---------|---------|
| Min.    | :0.0600 | : 2.02  | :0.1000 | :0.3700 |
| 1st Qu. | :0.2550 | : 9.24  | :0.1000 | :0.3700 |
| Median  | :0.3900 | : 11.85 | :0.1000 | :0.3700 |
| Mean    | :0.8137 | : 26.81 | :0.1074 | :0.4303 |
| 3rd Qu. | :0.9150 | : 19.59 | :0.1000 | :0.4450 |
| Max.    | :5.2800 | :265.01 | :0.2500 | :0.7100 |

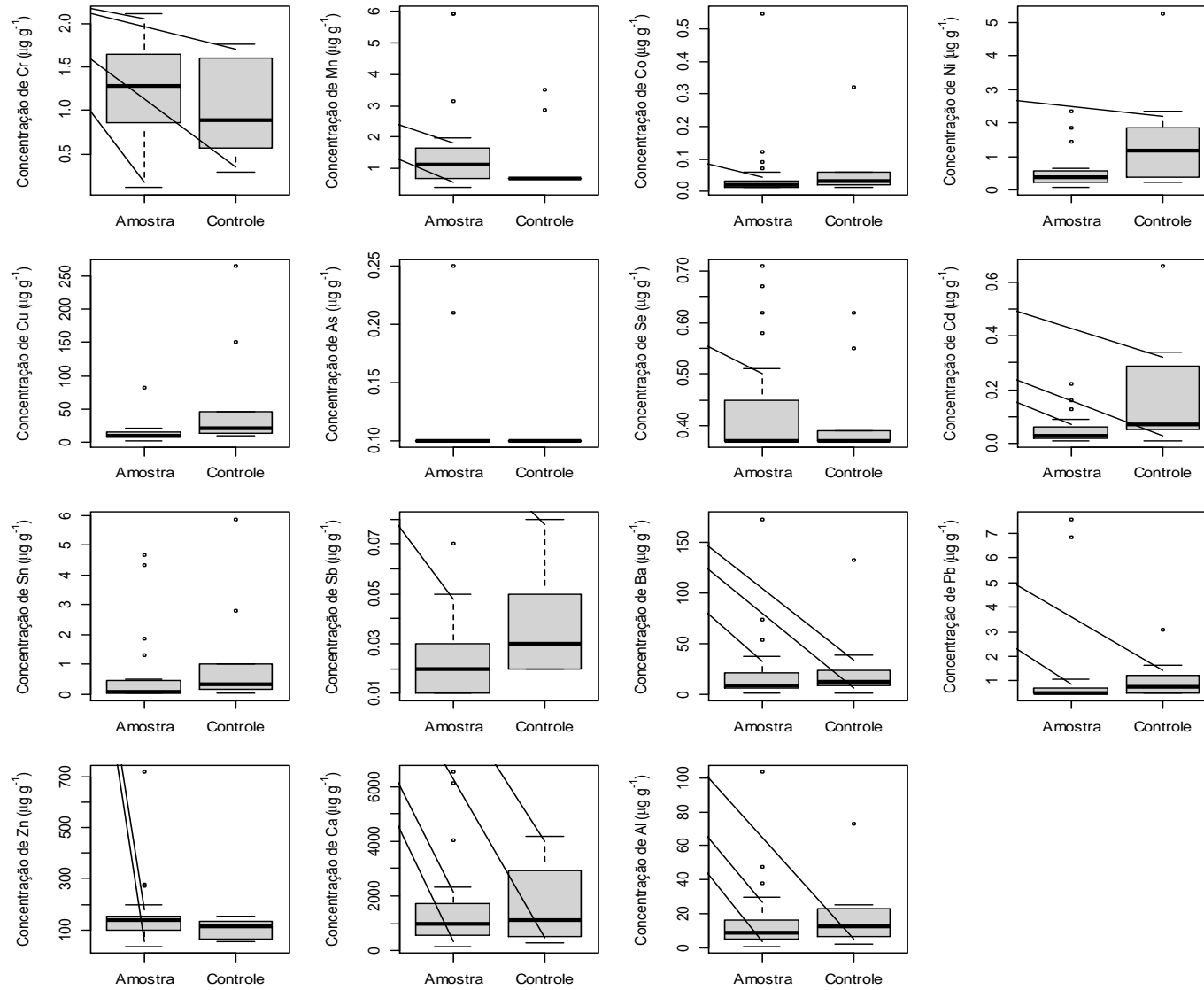
  

|         | Cd      | Sn      | Sb     | Ba       |
|---------|---------|---------|--------|----------|
| Min.    | :0.0100 | :0.0100 | :0.010 | : 0.230  |
| 1st Qu. | :0.0200 | :0.0100 | :0.010 | : 5.405  |
| Median  | :0.0400 | :0.1600 | :0.020 | : 10.480 |

|  |         |         |         |         |         |         |         |          |  |
|--|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|--|
|  | Mean    | :0.0871 | Mean    | :0.7486 | Mean    | :0.025  | Mean    | : 23.079 |  |
|  | 3rd Qu. | :0.0750 | 3rd Qu. | :0.4550 | 3rd Qu. | :0.030  | 3rd Qu. | : 22.615 |  |
|  | Max.    | :0.6600 | Max.    | :5.8700 | Max.    | :0.080  | Max.    | :173.380 |  |
|  |         | Pb      |         | Zn      |         | Ca      |         | Al       |  |
|  | :--     | :-----  | :-----  | :-----  | :-----  | :-----  | :-----  | :-----   |  |
|  | Min.    | :0.480  | Min.    | : 34.22 | Min.    | : 160.0 | Min.    | : 0.47   |  |
|  | 1st Qu. | :0.480  | 1st Qu. | : 76.23 | 1st Qu. | : 546.1 | 1st Qu. | : 5.31   |  |
|  | Median  | :0.480  | Median  | :123.34 | Median  | :1065.0 | Median  | : 9.33   |  |
|  | Mean    | :1.088  | Mean    | :140.55 | Mean    | :1608.8 | Mean    | : 16.98  |  |
|  | 3rd Qu. | :0.830  | 3rd Qu. | :146.83 | 3rd Qu. | :1889.2 | 3rd Qu. | : 22.50  |  |
|  | Max.    | :7.590  | Max.    | :718.78 | Max.    | :6525.0 | Max.    | :103.49  |  |

Também foram plotados gráficos do tipo boxplot, os quais estão separados entre amostras controle para que seja possível observar diferenças entre os grupos. No boxplot (Figura 17), as barras pretas de maior espessura representam a média e os limites dos retângulos cinzas representam os 1° e 3° quartis, o que significa que 50% dos dados se encontram dentro dos limites estabelecidos pelos retângulos cinzas. As linhas tracejadas representam limites calculados matematicamente, sendo que acima ou abaixo destes limites os dados podem ou não ser considerados outliers, que são então representados por círculos.

Figura 17. Gráficos do tipo boxplot separados entre grupo amostra e grupo controle para cada elemento.



Para fazer a comparação estatística entre as médias da concentração dos elementos entre o grupo amostra e o grupo controle, foram utilizados os testes t de Student, para os dados que possuíam normalidade, e de Wilcoxon-Man-Whitney, para aqueles que não possuíam normalidade. Dessa forma, na Tabela 5, estão as conclusões dos testes, onde é indicado se as médias entre os grupos são iguais ou diferentes, sendo que, neste caso, é indicado o grau de significância em que estes são diferentes a um nível de  $\alpha=5\%$  ou  $\alpha=10\%$ .

Tabela 5. Conclusões do teste t de Student e teste de Wilcoxon-Man-Whitney quando apropriado.

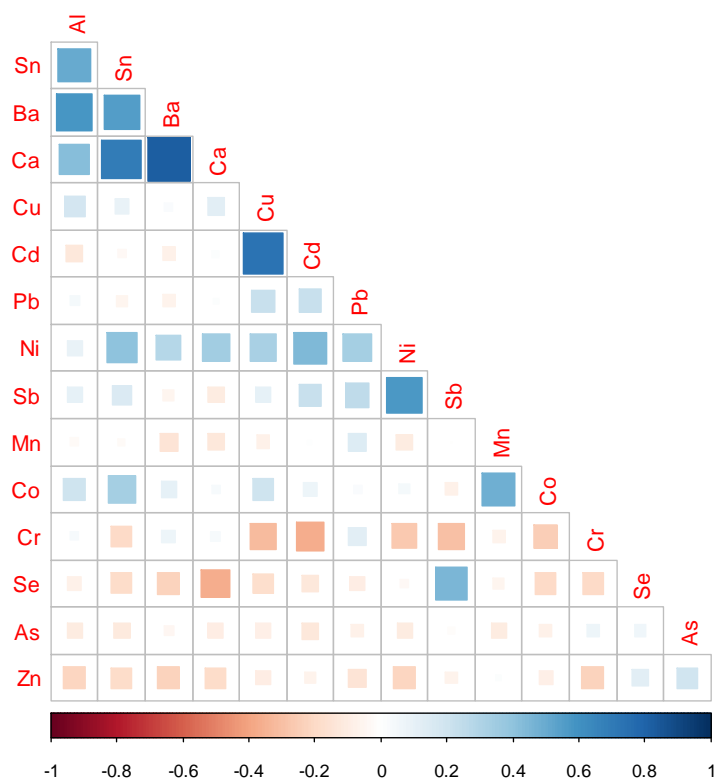
| Elemento  | teste | p-valor | conclusão     |
|-----------|-------|---------|---------------|
| Cr        | t     | 0,289   | =             |
| Mn        | WMW   | 0,098   | $\alpha=0,1$  |
| Co        | WMW   | 0,308   | =             |
| <b>Ni</b> | WMW   | 0,015   | $\alpha=0,05$ |
| <b>Cu</b> | WMW   | 0,003   | $\alpha=0,05$ |
| As        | WMW   | 0,389   | =             |
| Se        | WMW   | 0,671   | =             |
| <b>Cd</b> | WMW   | 0,008   | $\alpha=0,05$ |
| Sn        | WMW   | 0,1     | $\alpha=0,1$  |
| <b>Sb</b> | WMW   | 0,011   | $\alpha=0,05$ |
| Ba        | WMW   | 0,553   | =             |
| Pb        | WMW   | 0,094   | $\alpha=0,1$  |
| Zn        | WMW   | 0,1     | $\alpha=0,1$  |
| Ca        | WMW   | 0,788   | =             |
| Al        | WMW   | 0,432   | =             |

Em uma significância de 5%, foram observadas diferenças entre as médias nos grupos amostra e controle apenas para os elementos Ni, Cd, Cu e Sb. Já para uma significância de 10% são evidenciadas diferenças entre as médias dos grupos para Mn, Sn, Pb e Zn. Assim, partindo de um ponto de vista univariado e considerando as informações, apenas para os elementos Ni, Cu, Cd e Sb são observadas distinções entre os grupos amostra e controle em uma significância de 5%.

Pela análise de correlações entre as variáveis, é possível observar que Cu e Cd estão fortemente correlacionados nos grupos estudados, assim como Ni e Sb entre si. Outras correlações importantes ocorreram entre Ca e Ba, Ca e Sn, Sn e Ba, e Ba e Al. Porém, para estes últimos elementos não foram percebidas diferenças entre as médias dos grupos amostra e controle. Estas correlações podem ser observadas na Figura 18, onde o valor do coeficiente de correlação é dado pela escala colorida abaixo

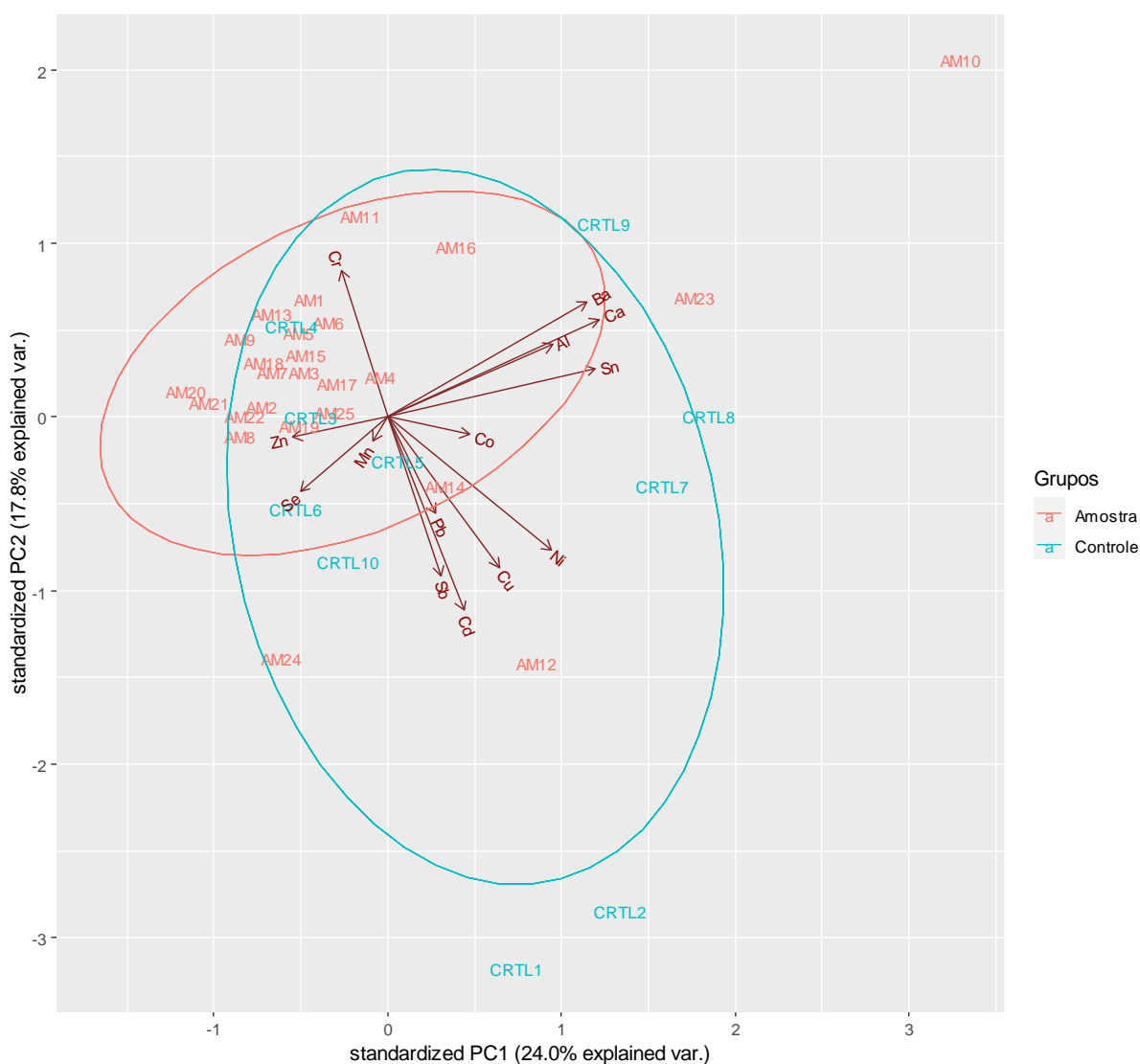
da matriz diagonal apresentada. A dimensão dos quadros coloridos é proporcional ao coeficiente de correlação entre as variáveis consideradas, para facilitar a visualização.

Figura 18. Análise de correlação entre as variáveis.



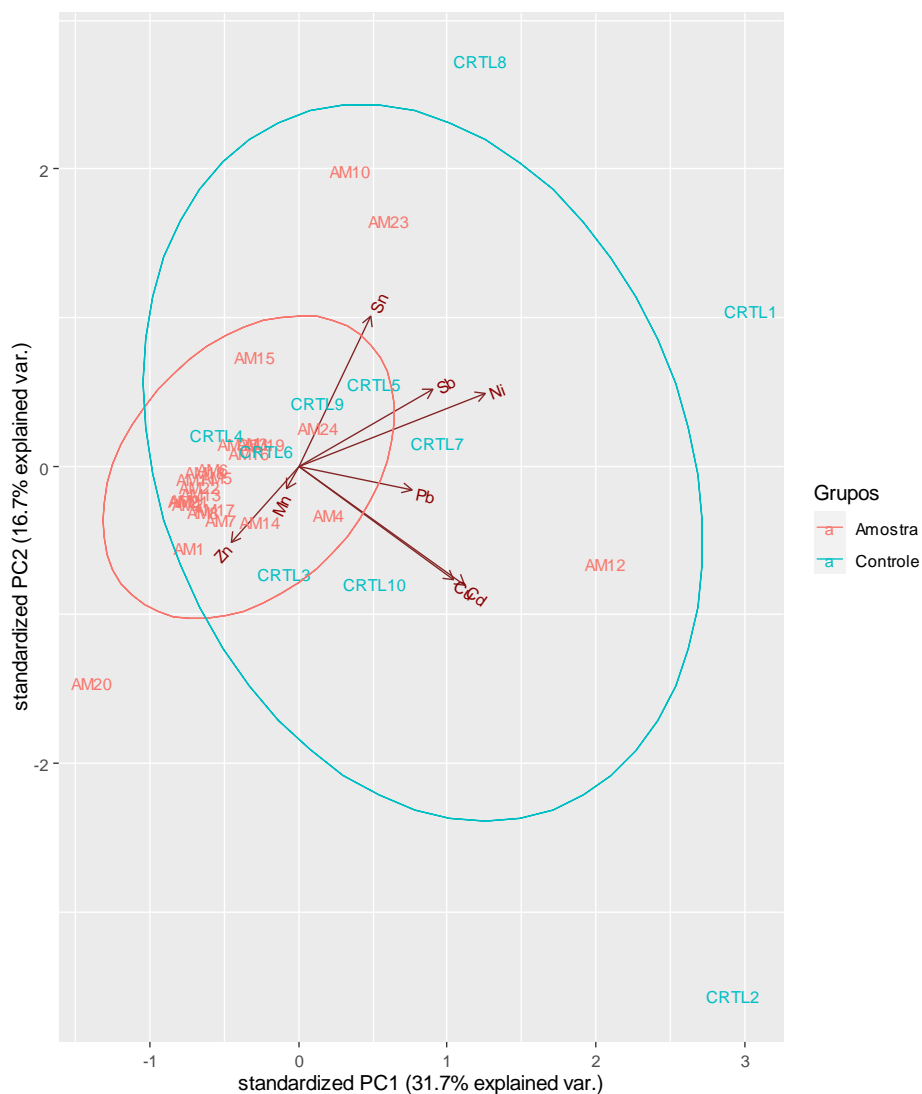
Utilizando a técnica multivariada de Análise de Componentes Principais, com os dados padronizados para evitar um resultado tendencioso às variáveis com maior variância, foi observado que são necessários pelo menos 8 componentes principais para explicar cerca de 90% da variabilidade dos dados. Os dois primeiros componentes principais explicam, juntos, apenas 41,8% da variabilidade dos dados. No entanto, é possível observar na Figura 19, a proximidade dos vetores que representam as variáveis Ni, Cu, Cd e Sb, as mesmas indicadas pelo teste de WMW, e de como a maior parte das amostras se localizam agrupadas numa região distante do extremo destes vetores. Isto pode indicar que o grupo controle possui maior concentração desses elementos ao ser comparado com o grupo amostra, o que fica evidente na análise dos gráficos do tipo boxplot mostrados na Figura 17.

Figura 19. Análise dos componentes principais.



Em um segundo momento, foram consideradas apenas as variáveis que apresentaram diferença significativa,  $\alpha = 10\%$ , entre as médias dos grupos amostra e controle, de forma univariada, sendo eles o Ni, Cu, Cd, Sb, Mn, Sn, Pb e Zn, como mostrado na Figura 20. Foi observado que são necessários pelos menos cinco componentes principais para explicar cerca de 90% da variabilidade dos dados. Novamente, foi observado que as amostras formam um grupo concordante, mas os controles estão dispersos, indicando que estes apresentam muita variabilidade entre si. Além disso, as mesmas interpretações quanto à proximidade das observações com os extremos dos vetores de variáveis podem ser observadas.

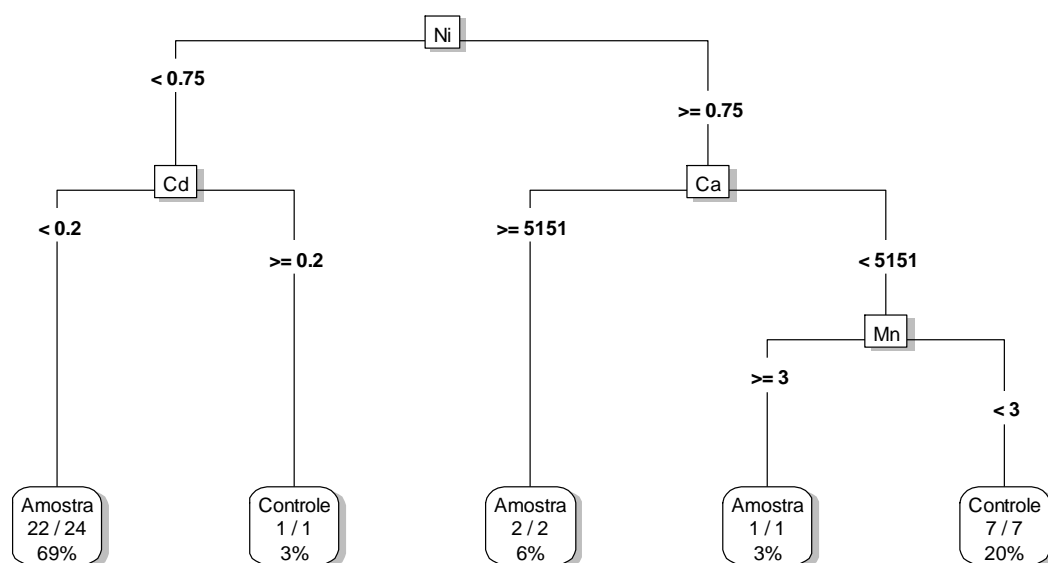
Figura 20. Análise dos componentes principais para as variáveis que apresentaram diferença significativa de 10% (Ni, Cu, Cd, Sb, Mn, Sn, Zn).



Por fim, foi feita a análise multivariada por meio de Árvores de Decisão a fim de compreender se existe algum padrão entre as variáveis disponíveis, que poderia classificar um indivíduo como pertencente ao grupo amostra ou ao grupo controle. O ideal desta técnica é que seja utilizada com um número de observações, bastante superior ao disponível, para que os padrões possam ser identificados com maior precisão. No entanto, como mostrado na Figura 21, é interessante notar que, mesmo em uma condição não ideal, são evidenciados dois dos elementos já citados anteriormente; o Ni e o Cd. A concentração de Ni está classificada como variável mais impactante na decisão de se uma observação deve ser classificada como amostra, a maioria dos ramos do lado esquerdo da árvore, ou como controle, a maioria dos ramos do lado direito da árvore.

Outra possível conclusão da análise, é que, a partir dos dados, as variáveis que mais impactaram na diferenciação entre grupo amostra e grupo controle, em um contexto multivariado, são os elementos Ni, Cd, Ca e Mn.

Figura 21. Análise por meio de Árvores de Decisão.





## 6. CONCLUSÃO

Foi avaliada a relação dos metaloestrógenos com a incidência de câncer de mama em mulheres a partir da análise do cabelo por LA-ICP-MS. Observou-se que o Ba está numa concentração mais elevada no cabelo destas mulheres, quando considerada a faixa de concentração normal deste elemento em cabelo humano. Alumínio também está em concentração mais elevada em relação a faixa de concentração normal deste elemento em cabelo humano. No entanto, a concentração mais alta de Al pode ser, em parte, devida a contribuição do Al presente na fita usada para fixar o cabelo sobre a lâmina de vidro. De maneira geral, as concentrações de diversos elementos variaram ao longo do cabelo, o que era esperado, visto que cada indivíduo tem diferentes hábitos alimentares, está exposto a ambientes diferentes, entre outros aspectos, o que leva alteração dos elementos no organismo e, conseqüentemente, isso se reflete ao longo do fio de cabelo. Mesmo assim, não se pode desconsiderar os efeitos decorrentes relacionados ao câncer. Entretanto, os resultados não foram conclusivos em relação a variação da concentração dos elementos ao longo do fio de cabelo.

Quando as amostras foram analisadas por ICP-MS e ICP OES não foram observadas diferenças significativas para a maioria das amostras, comparando-se as concentrações encontradas com as faixas de concentração dos elementos consideradas normais em cabelo humano. Porém, ao serem aplicados testes estatísticos, foi possível observar diferenças entre o grupo amostra e o grupo controle para os elementos Ni, Cu, Cd e Sb, onde estes apresentaram concentração superior para o grupo controle.

Também foi possível concluir que a lavagem do cabelo não influencia nos resultados, uma vez que ao comparar os sinais obtidos por LA-ICP-MS, antes e após a lavagem, não foram observadas diferenças. Isso também pode estar relacionada a própria sensibilidade da técnica, que não foi suficiente para detectar pequenas alterações na concentração do elemento antes e após a lavagem. Porém, apesar de não terem sido percebidas diferenças na concentração dos elementos, foram observadas alterações na morfologia do cabelo, quando avaliadas por MEV.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FLOREA, A. M.; BUSSELBERG, D. Metals and Breast Cancer: Risk Factors or Healing Agents? **Journal of Toxicology**. 2011, 2011, 159619.
2. KAMIŃSKA, M.; et al. Breast cancer risk factors. **Przegląd Menopauzalny**. 14(3), 2015, 196–202.
3. JOSEPH, P.; et al. Cadmium-induced cell transformation and tumorigenesis are associated with transcriptional activation of c-fos, c-jun, and c-myc proto-oncogenes: role of cellular calcium and reactive oxygen species. **Toxicological Sciences**. 61(2), 2001, 295–303.
4. SILVA, A. T. M.; et al. Bioanalytical methods for determining ecstasy components in biological matrices: a review. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 108, 2018, 323-346.
5. ALDLGAN, A. A.; TORRANCE, H. J. Bioanalytical methods for the determination of synthetic cannabinoids and metabolites in biological specimens. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 80, 2016, 444-457.
6. POZEBON, D.; et al. Monitoring of platinum in a single hair by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) after cisplatin treatment for cancer. **International Journal of Mass Spectrometry**, 272, 2008, 57–62.
7. NOËL, M.; et al. Using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) to characterize copper, zinc and mercury along grizzly bear hair providing estimate of diet. **Science of the Total Environment** 529, 2015, 1–9.

8. DRESSLER, V. L.; et al. Biomonitoring of essential and toxic metals in single hair using on-line solution-based calibration in laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. **Talanta**, 82, 2010, 1770–1777.
9. HENG, H. H. Q.; et al. The Evolutionary Mechanism of Cancer. **Journal of Cellular Biochemistry** 109, 2010, 1072–1084.
10. ABC DO CÂNCER 6ª edição revista e atualizada Rio de Janeiro, RJ 2020, 14–17.
11. HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, 144(5), 2011, 646-74.
12. DARBRE, P. D. Metalloestrogens: an emerging class of inorganic xenoestrogens with potential to add to the oestrogenic burden of the human breast. **Journal of Applied Toxicology**, 26, 2006, 191–197.
13. BYRNE, C.. et al. Metals and Breast Cancer J Mammary Gland. **Biol Neoplasia**. 18, 2013, 63–73.
14. MARTIN, M. B.; et al. Estrogen-Like Activity Of Metals In MCF-7 Breast Cancer Cells Endocrinology. **Endocrine Society**. 144(6), 2003, 2425–2436.
15. AQUINO, N. B.; et al. Role of Cadmium and Nickel in Estrogen Receptor Signaling and Breast Cancer: Metalloestrogens or Not? **Journal of Environmental Science and Health Part C Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology**. Rev. 30(3), 2012, 189–224.
16. YU, M; ZHANG, J. Serum and Hair Nickel Levels and Breast Cancer: Systematic Review and Meta-Analysis. **Biological Trace Element Research**. 179(1), 2017, 32-37.
17. DE BONT, R.; VAN LAREBEKE, N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. **Mutagenesis**. 19(3), 2004, 169–185.

18. ABDOLLAHZADEH, R.; et al. Competing endogenousRNA(ceRNA) cross talk and language in ceRNA regulatory networks: A new look at hallmarks of breast cancer. **Journal of Cellular Physiology**. 234, 2019, 10080–10100.
19. DIVEKAR, S. D.; et al. The Role of Calcium in the Activation of Estrogen Receptor-Alpha. **Cancer Research**. 71(5), 2011, 1658-68.
20. GRASSIN-DELYLEA, S.; et al. A high-resolution ICP-MS method for the determination of 38 inorganic elements in human whole blood, urine, hair and tissues after microwave digestion. **Talanta**. 199, 2019, 228–237.
21. GELLEIN, K.; et al. Trace Element Profiles in Single Strands of Human Hair Determined by HR-ICP-MS. **Biological Trace Element Research**. 123, 2008, 250–260.
22. Recommendations for hair testing in forensic cases. **Forensic Science International**. 145(2-3), 2004, 83-84.
23. YU, Y.; et al. Structure and mechanical behavior of human hair. **Materials Science and Engineering: C**, 73(1), 2017, 152-163.
24. VELASCO, M.V.R.; et al. Hair fiber characteristics and methods to evaluate hair physical and mechanical properties, **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. 45, 2009, 153–162.
25. HARLAND, D.P.; et al. Three-dimensional architecture of macrofibrils in the human scalp hair cortex. **Journal of Structural Biology**. 185, 2014, 397–404.
26. HILL, V.; et al. Identification and analysis of damaged or porous hair. **Drug Testing Analysis**. 6, 2014, 42–54.
27. QIAN, W.; et al. Human hair-derived carbon flakes for electrochemical supercapacitors. **Energy & Environmental Science**. 7, 2014, 379–386.
28. SWIETACH, P.; et al. The chemistry, physiology and pathology of pH in câncer. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**. 369, 2014. 1-9.

29. ADLER, F.R.; GORDON, D.M. Cancer ecology and evolution: positive interactions and system vulnerability. **Current Opinion in Systems Biology**. 17, 2019, 1-7.
30. POLYAK, K. Breast cancer: origins and evolution. **The Journal of Clinical Investigation**. 117, 2007, 3155–3163.
31. TIEZZI, D.G.; et al. Current Breast Cancer Screening Scenario in Brazil. **Brazilian Journal of Gynecology and Obstetrics**. 41, 2019, 633–635.
32. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Câncer. Estimativas 2018: Incidência de Câncer no Brasil: Síntese de Resultados e Comentários. Rio de Janeiro, RJ: INCA; 2017 <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/sintese-de-resultados-comentarios.asp>. Accessed June 06, 2019.
33. MARRAZZO, E.; et al. Mucinous breast cancer: A narrative review of the literature and retrospective tertiary single-centre analysis. **The Breast**. 49, 2020, 87-92.
34. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Câncer. A mulher e o câncer de mama no Brasil. 3ª edição revista e atualizada, Rio de Janeiro, RJ. INCA, 2018.
35. YUE, W.; et al. Estrogen receptor-dependent and independent mechanisms of breast cancer carcinogenesis. **Steroids** 78, 2013, 161–170.
36. SUN, Y.-S.; et al. Factors and Preventions of Breast Cancer. **International Journal of Biological Sciences**. 13, 2017, 1387–1397.
37. FENG, Y.; et al. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. **Genes & Diseases**. 5(2), 2018, 77-106.
38. MINISTÉRIO DA SAÚDE Instituto nacional de câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: INCA, 2019.

39. AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer facts & figures 2019. **Atlanta: American Cancer Society**, 2019a.
40. BRAY, F.; et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**. Hoboken, 68(6), 2018, 394-424.
41. MINISTÉRIO DA SAÚDE Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) A situação do câncer de mama no Brasil: Síntese de dados dos sistemas de informação. Rio de Janeiro, RJ INCA 2019 18-20.
42. MINISTÉRIO DA SAÚDE Instituto Nacional de Câncer JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Tipos de câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer>. Acesso em: 5 set. 2019.
43. SIEGEL, R.L.; MILLER, K.D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2017. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**. 67, 2017, 7-30.
44. FERLAY, J.; et al. Cancer today. Lyon, France: **International Agency for Research on Cancer**, 2018. (IARC CAnceRBase, n. 15). Available at: <https://publications.iarc.fr/Databases/Iarc-Cancerbases/Cancer-Today>
45. KAMIŃSKA, M.; et al. Breast cancer risk factors **Przegląd Menopauzalny**. 14(3), 2015, 196-202.
46. Health-related monitoring of trace element pollutants using nuclear techniques a technical document issued by the international atomic energy agency, Vienna, 1985.
47. AMMANN, A. A. Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS): a versatile tool. **Journal of Mass Spectrometry**. 42, 2007, 419–427.
48. GUILLONG, M.; GU"NTHER, D. Effect of particle size distribution on ICP-induced elemental fractionation in laser ablation-inductively coupled plasma-

- mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. 17, 2002, 831–837.
49. LIMBECK, A.; et al. Recent advances in quantitative LA-ICP-MS analysis: challenges and solutions in the life sciences and environmental chemistry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. 407, 2015, 6593–6617.
50. GALLARDO, E.; QUEIROZ, J. The role of alternative specimens in toxicological analysis. **Biomedical Chromatography**. 22(8), 2008, 795-821.
51. MUSSHOF, F.; MADEA, B. Analytical pitfalls in hair testing. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. 388(7), 2007, 1475-1494.
52. GUNTHER, D.; HATTENDORF, B. Solid sample analysis using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. **Trends in Analytical Chemistry**. 24(3), 2005, 255-265.
53. RUSSO, R. E; MAO, X.; PEER, S. S. M. Reviewed: The Physics of Laser Ablation in Microchemical Analysis. **Analytical Chemistry**. 74(3), 2002, 70–77.
54. RUSSO, R. E. Laser ablation in analytical chemistry—a review. **Talanta**. 57, 2002, 425–451.
55. HARE, D.; AUSTIN, C.; DOBLE P. Quantification strategies for elemental imaging of biological samples using laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry. **Analyst**, 137, 2012, 1527–1537.
56. POZEBON, D.; SCHEFFLER, G.L.; DRESSLER, V.L.; NUNES, M. A. G. Review of the applications of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) to the analysis of biological samples. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. 29, 2014, 2204-2228.
57. SYLVESTER, P. J.; JACKSON, S. E. A Brief History of Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (LA-ICP-MS). **Elements**. 12 (5), 2016, 307–310.

58. SHENG, L. Y.; ZHAOCHU, H.; MING, L.; GAO SHAN, G. Applications of LA-ICP-MS in the elemental analyses of geological samples. **Chemical Geology**. 559, 2021, 119917.
59. MILISZKIEWICZ, N.; WALAS, S.; TOBIASZA, A. Current approaches to calibration of LA-ICP-MS analysis. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. 30, 2015, 327-338.
60. MARTINEZ, M.; BAUDELET, M. Calibration strategies for elemental analysis of biological samples by LA-ICP-MS and LIBS – A review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 412, 2020, 27-36.
61. KONZ, I.; et. al. Gold internal standard correction for elemental imaging of soft tissue sections by LA-ICP-MS: element distribution in eye microstructures. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 405, 2013, 3091-3096.
62. MADRIDAB, K. C.; ARRUDA, M. A. Z. Internal standard evaluation for bioimaging soybean leaves through laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: a plant nanotechnology approach. **Journal Analytical Atomic Spectrometry**. 33, 2018, 1720.
63. ARNAUDGUILHEM, C.; et al. Toward a comprehensive study for multielemental quantitative LA-ICP MS bioimaging in soft tissues. **Talanta**. 222, 2021, 121537.
64. DUNCAN, B. R.; et al. Variability in hair gadolinium concentrations among decedents who received gadolinium-based contrast agents. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. 413(6), 2021, 1571–1582.
65. PAMPHLETT, R.; et al.; Elemental bioimaging shows mercury and other toxic metals in normal breast tissue and in breast cancers. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. 17, 2020, 8990.
66. PUCHYR, R. F.; et al. Preparation of Hair for Measurement of Elements by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS). **Biological Trace Element Research**, 62, 1998, 167–182.



67. TINKOV, A. A.; et al. ICP-MS Assessment of Hair Essential Trace Elements and Minerals in Russian Preschool and Primary School Children with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD). **Biological Trace Element Research**. 196(2), 2020, 400-409.
68. BECHSHOFT, T.; et al. Monitoring spatially resolved trace elements in polar bear hair using single spot laser ablation ICP-MS. **Ecological Indicators**. 119, 2020, 106822.
69. BLUMENSTIEL, D.; MCDONALD, M.; Bernardo ARRIAZA, Dulasiri AMARASIRIWARDENA. Exposure to geogenic lithium in ancient Andeans: Unraveling lithium in mummy hair using LA-ICP-MS. **Journal of Archaeological Science**. 113, 2020, 105062.
70. ZHOU W. et al. Fundamentals of Scanning Electron Microscopy (SEM). 2006.
71. KLEIN, T.; BUHR, E.; FRASE, C.G. Chapter 6 - TSEM: A Review of Scanning Electron Microscopy in Transmission Mode and Its Applications Advances in Imaging and Electron Physics. 171, 2012, 297-356.
72. Resolução CNS 196/96 disponível em <https://www.inca.gov.br/publicacoes/legislacao/resolucao-cns-196-96>.
73. HOSSNE, W.S.; VIEIRA, S. Experimentação com seres humanos: aspectos éticos. In: Segre M, Cohen C (org.) **Bioética**. São Paulo, EDUSP. 1995, 127-146.
74. VIEIRA, V. A. Hipertensão arterial e aspectos éticos em pesquisa envolvendo seres humanos: implicações para a área da saúde. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, 3(4), 2003, 481-488.
75. CASTILHO, E. A.; KALIL J. Ética e pesquisa médica: princípios, diretrizes e regulamentações. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 38(4), 2005, 344-47.

76. NUNES M. A. G., et al. External calibration strategy for trace element quantification in botanical samples by LA-ICP-MS using filter paper. **Analytica Chimica Acta**, 905, 2016, 51-57.
77. POZEBON D. et al. Análise de cabelo: uma revisão dos procedimentos para a determinação de elementos traço e aplicações. **Química Nova**, 22(6), 1999, 838-846.
78. CIHAN, Y. B.; SÖZEN, S.; YILDIRIM, S. O. Trace Elements and Heavy Metals in Hair of Stage III Breast Cancer Patients. **Biological Trace Element Research**. 144, 2011, 360–379.
79. R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
80. Taiyun Wei and Viliam Simko (2017). R package "corrplot": Visualization of a Correlation Matrix (Version 0.84). Available from <https://github.com/taiyun/corrplot>
81. Vincent Q. Vu (2011). ggbiplot: A ggplot2 based biplot. R package version 0.55. <http://github.com/vqv/ggbiplot>
82. Terry Therneau and Beth Atkinson (2019). rpart: Recursive Partitioning and Regression Trees. R package version 4.1-15. <https://CRAN.R-project.org/package=rpart>
83. Stephen Milborrow (2020). rpart.plot: Plot 'rpart' Models: An Enhanced Version of 'plot.rpart'. R package version 3.0.9. <https://CRAN.R-project.org/package=rpart.plot>

**ANEXO A - TERMO DE CONFIDENCIALIDADE**

## TERMO DE CONFIDENCIALIDADE

Título: A RELAÇÃO DOS METALOESTRÓGENOS COM O CÂNCER DE MAMA.

Pesquisadores responsáveis: Beatriz Graff Schaffer, Luiz Carlos Moreira Antunes

Instituição de origem do pesquisador: UNIVERSIDADE FRANCISCANA

Local da Coleta de dados: Consultório de Mastologia e Oncologia

Telefone para contato: (55) 98100-3428

Os pesquisadores do presente estudo comprometem-se a preservar a privacidade dos pacientes cujos dados serão coletados dos prontuários e em entrevistas individuais, comprometendo-se ainda a garantir e preservar as informações dos prontuários e base de dados dos Serviços e do Arquivo Médico e a confidencialidade dos pacientes.

Concorda, igualmente, que estas informações serão para execução do presente projeto e seus desdobramentos de pesquisa. As informações somente poderão ser divulgadas de forma anônima e serão mantidas por um período de cinco anos, sob a responsabilidade do pesquisador do referido estudo. Após este período, os dados serão destruídos.

Santa Maria, RS, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## **ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO**

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Você está sendo convidada para participar, de forma voluntária, da pesquisa: “A RELAÇÃO DOS METALOESTRÓGENOS COM O CÂNCER DE MAMA”.

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.

Sua participação nos permitirá ampliar o conhecimento sobre os fatores que podem estar associados a ocorrência do câncer de mama, entre estes alguns metais presentes no nosso cotidiano.

Se você como participante integra o grupo controle responderá a uma entrevista sobre seus dados pessoais e será coletado uma amostra da sua urina onde serão dosados alguns metais. Na possibilidade de resultados alterados nesta amostra você será devidamente orientada pelo médico participante do estudo.

Se você como participante integra o grupo amostra responderá a uma entrevista sobre seus dados pessoais, algumas informações sobre a sua doença serão analisadas a partir do seu prontuário clínico e será coletado uma amostra da sua urina onde serão dosados alguns metais. O resultado deste teste será encaminhado ao seu clínico. Estes não terão influência no seu diagnóstico e tratamento, mas poderá contribuir para que cada vez mais sejam conhecidos os fatores de risco para o câncer de mama.

Você poderá se sentir desconfortável e/ou nervosa 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 necessário uma assistência mais específica, você a receberá imediatamente. Esta assistência não lhe trará nenhuma forma de ônus, pois será da responsabilidade dos pesquisadores.

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 identificação dos voluntários. As fichas das avaliações bem como a

entrevista respondida por você, ficarão guardadas com os pesquisadores e serão 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 sofrerá nenhum prejuízo a assistência que esteja recebendo.

Não será pago a você nenhum valor por sua participação. Entretanto, se ocorrer algum dano comprovadamente em função dessa 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 aceita participar desse estudo, pedimos que assine este termo de consentimento livre e esclarecido.

Eu, \_\_\_\_\_,  
concordo em participar do estudo que a mim foi apresentado. Declaro que fui suficientemente informada a respeito da pesquisa por meio das informações que li ou que foram lidas para mim e que me foi dado uma cópia desse termo. Ficaram claros para mim quais são os objetivos do estudo, como se dará a minha participação, seus desconfortos, riscos, garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Dessa forma, concordo voluntariamente em participar da pesquisa.

Santa Maria, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura da participante

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador Responsável

Telefone para contato:

Pesquisador Responsável: Beatriz Graff Schaffer – (55) 98100-3428

CEP – Universidade Francisacana: (55) 3220-1289

## ANEXO C - TABELA DE RESULTADOS DA ANÁLISE POR ICP OES EM $\mu\text{g g}^{-1}$

Tabela 6. Concentrações para Zn, Ca e Al em amostra de cabelo obtidas por ICP OES.

| Amostras | Elementos / Linhas ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) |                 |               |
|----------|---|-----------------|---------------|
|          | Zn 206,191                                  | Ca 396,847      | Al 167,078    |
| 1        | 135,39 ± 1,32                               | 1752 ± 18,16    | 26,85 ± 2,61  |
| 2        | 112,48 ± 1,21                               | 160,01 ± 2,10   | 2,85 ± 0,29   |
| 3        | 81,38 ± 0,65                                | 833,23 ± 9,11   | 7,46 ± 0,37   |
| 4        | 68,25 ± 0,86                                | 2329,34 ± 14,52 | 10,23 ± 0,99  |
| 5        | 194,91 ± 0,88                               | 1155,42 ± 7,10  | 8,26 ± 0,88   |
| 6        | 142,89 ± 1,35                               | 2026,37 ± 10,85 | 4,63 ± 0,95   |
| 7        | 37,93 ± 0,70                                | 249,51 ± 1,86   | 10,08 ± 1,06  |
| 8        | 277,42 ± 1,95                               | 729,73 ± 6,86   | 7,10 ± 0,57   |
| 9        | 123,34 ± 1,81                               | 755,14 ± 3,71   | 8,46 ± 0,88   |
| 10       | 34,22 ± 0,82                                | 6525 ± 49,14    | 103,49 ± 4,92 |
| 11       | 137,88 ± 0,09                               | 1414 ± 22,62    | 47,66 ± 2,32  |
| 12       | 100,01 ± 1,47                               | 1191 ± 15,78    | 37,68 ± 2,10  |
| 13       | 136,28 ± 0,73                               | 510,05 ± 6,09   | 2,70 ± 0,29   |
| 14       | 152,67 ± 1,70                               | 686,12 ± 13,30  | 5,29 ± 0,66   |
| 15       | 71,09 ± 1,29                                | 556,23 ± 5,81   | 29,79 ± 0,74  |
| 16       | 65,85 ± 0,91                                | 4044,79 ± 43,35 | 15,33 ± 0,51  |
| 17       | 141,99 ± 1,39                               | 2150,83 ± 47,05 | 6,16 ± 1,03   |
| 18       | 122,41 ± 0,40                               | 1246,11 ± 10,95 | <0,47         |
| 19       | 199,83 ± 1,37                               | 940,26 ± 18,71  | 15,87 ± 0,99  |
| 20       | 718,78 ± 5,98                               | 995,31 ± 5,33   | 8,94 ± 0,75   |
| 21       | 150,77 ± 1,59                               | 463,02 ± 3,72   | 0,71 ± 0,21   |
| 22       | 168,20 ± 0,77                               | 488,77 ± 9,50   | 0,68 ± 0,86   |
| 23       | 137,38 ± 1,81                               | 6135 ± 32,59    | 2,70 ± 0,56   |
| 24       | 270,97 ± 2,37                               | 432,93 ± 6,14   | 24,47 ± 1,01  |
| 25       | 116,16 ± 2,19                               | 1512,40 ± 21,04 | 15,97 ± 1,09  |
| CTRL 1   | 60,61 ± 0,62                                | 297,36 ± 3,49   | 1,66 ± 0,13   |
| CTRL 2   | 155,68 ± 0,51                               | 2949 ± 10,87    | 6,34 ± 0,85   |
| CTRL 3   | 137,88 ± 1,12                               | 1064,99 ± 7,75  | 5,33 ± 0,33   |
| CTRL 4   | 51,77 ± 0,85                                | 535,92 ± 2,22   | 10,21 ± 1,29  |
| CTRL 5   | 122,20 ± 1,04                               | 1214,12 ± 34,50 | 9,33 ± 0,99   |
| CTRL 6   | 117,44 ± 0,45                               | 786,81 ± 9,03   | 22,45 ± 1,10  |
| CTRL 7   | 69,81 ± 1,48                                | 1544,95 ± 54,99 | 72,63 ± 2,54  |

|         |                   |                     |                  |
|---------|-------------------|---------------------|------------------|
| CTRL 8  | $109,96 \pm 0,57$ | $4166,04 \pm 42,66$ | $25,46 \pm 1,38$ |
| CTRL 9  | $63,46 \pm 1,87$  | $4042 \pm 41,24$    | $22,54 \pm 1,57$ |
| CTRL 10 | $131,93 \pm 0,28$ | $423,10 \pm 7,84$   | $14,57 \pm 1,59$ |

---

## ANEXO D - TABELA DE RESULTADOS DA ANÁLISE POR ICP MS EM $\mu\text{g g}^{-1}$

Tabela 7. Concentrações para Cu, Ni, Co, Mn, Cr e V em amostra de cabelo obtidas por ICP-MS.

| Amostras | Elementos / Isótopos ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) |                  |                  |                  |                  |                  |
|----------|---|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|          | $^{51}\text{V}$                               | $^{52}\text{Cr}$ | $^{55}\text{Mn}$ | $^{59}\text{Co}$ | $^{60}\text{Ni}$ | $^{65}\text{Cu}$ |
| 1        | <0,109  | 1,82 ± 0,08      | 5,94 ± 0,25      | 0,02 ± 0,01      | 0,29 ± 0,02      | 9,17 ± 0,42      |
| 2        | <0,109  | 0,49 ± 0,01      | 1,92 ± 0,12      | <0,01            | 0,19 ± 0,01      | 9,31 ± 0,27      |
| 3        | <0,109  | 1,48 ± 0,07      | <0,67            | <0,01            | 0,37 ± 0,03      | 19,44 ± 0,37     |
| 4        | <0,109  | 1,69 ± 0,03      | 1,44 ± 0,09      | 0,02 ± 0,01      | 0,56 ± 0,04      | 14,31 ± 0,23     |
| 5        | <0,109  | 1,63 ± 0,07      | <0,67            | 0,03 ± 0,01      | 0,56 ± 0,01      | 7,97 ± 0,27      |
| 6        | <0,109  | 1,40 ± 0,01      | 1,12 ± 0,01      | 0,06 ± 0,01      | 0,63 ± 0,03      | 9,97 ± 0,21      |
| 7        | <0,109  | 1,28 ± 0,01      | 1,74 ± 0,02      | <0,01            | <0,06            | 2,02 ± 0,06      |
| 8        | <0,109  | 0,95 ± 0,02      | 1,12 ± 0,07      | <0,01            | 0,16 ± 0,01      | 10,23 ± 0,15     |
| 9        | <0,109  | 1,54 ± 0,08      | 0,73 ± 0,05      | <0,01            | 0,13 ± 0,01      | 12,67 ± 0,33     |
| 10       | <0,109  | 0,96 ± 0,02      | <0,67            | 0,06 ± 0,01      | 1,46 ± 0,02      | 20,58 ± 0,42     |
| 11       | <0,109  | 2,12 ± 0,11      | <0,67            | 0,02 ± 0,01      | 0,57 ± 0,02      | 8,32 ± 0,13      |
| 12       | <0,109  | 1,75 ± 0,06      | 3,16 ± 0,07      | 0,12 ± 0,01      | 1,84 ± 0,04      | 82,21 ± 2,08     |
| 13       | <0,109  | 1,67 ± 0,07      | <0,67            | 0,02 ± 0,01      | 0,23 ± 0,01      | 19,45 ± 0,60     |
| 14       | <0,109  | 0,44 ± 0,04      | 5,94 ± 0,04      | 0,55 ± 0,01      | 0,38 ± 0,02      | 19,72 ± 1,05     |
| 15       | <0,109  | 1,92 ± 0,10      | 0,38 ± 0,03      | 0,03 ± 0,01      | 0,34 ± 0,03      | 11,55 ± 0,48     |
| 16       | <0,109  | 1,65 ± 0,06      | 0,74 ± 0,01      | 0,02 ± 0,01      | 0,39 ± 0,03      | 17,92 ± 0,30     |
| 17       | <0,109  | 0,78 ± 0,10      | 1,29 ± 0,11      | 0,07 ± 0,01      | 0,50 ± 0,01      | 14,49 ± 0,47     |



|         |        |             |             |             |             |                |
|---------|--------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------------|
| 18      | <0,109 | 1,28 ± 0,08 | <0,67       | <0,01       | 0,09 ± 0,01 | 7,57 ± 0,07    |
| 19      | <0,109 | 1,58 ± 0,15 | 1,56 ± 0,04 | 0,02 ± 0,01 | 0,26 ± 0,02 | 8,29 ± 0,29    |
| 20      | <0,109 | 0,76 ± 0,02 | 0,96 ± 0,03 | <0,01       | 0,24 ± 0,01 | 4,96 ± 1,03    |
| 21      | <0,109 | 1,18 ± 0,15 | <0,67       | <0,01       | 0,31 ± 0,02 | 11,85 ± 0,24   |
| 22      | <0,109 | 0,86 ± 0,11 | 1,16 ± 0,02 | <0,01       | 0,28 ± 0,03 | 8,68 ± 0,17    |
| 23      | <0,109 | 1,15 ± 0,15 | 1,63 ± 0,13 | 0,09 ± 0,01 | 2,35 ± 0,08 | 10,67 ± 0,18   |
| 24      | <0,109 | 0,11 ± 0,06 | 1,96 ± 0,08 | 0,02 ± 0,01 | 0,45 ± 0,03 | 4,66 ± 1,05    |
| 25      | <0,109 | 0,66 ± 0,11 | 1,42 ± 0,02 | <0,01       | 0,37 ± 0,01 | 9,35 ± 0,02    |
| CTRL 1  | <0,109 | <0,29       | <0,67       | 0,02 ± 0,01 | 5,28 ± 0,07 | 45,85 ± 0,44   |
| CTRL 2  | <0,109 | <0,29       | <0,67       | <0,01       | 1,87 ± 0,11 | 265,01 ± 13,88 |
| CTRL 3  | <0,109 | 1,60 ± 0,04 | <0,67       | 0,04 ± 0,01 | 0,25 ± 0,02 | 9,53 ± 0,11    |
| CTRL 4  | <0,109 | 1,51 ± 0,20 | <0,67       | 0,02 ± 0,01 | 0,24 ± 0,06 | 9,38 ± 1,32    |
| CTRL 5  | <0,109 | 1,77 ± 0,08 | 2,87 ± 0,09 | 0,06 ± 0,01 | 1,41 ± 0,02 | 33,05 ± 0,41   |
| CTRL 6  | <0,109 | 0,70 ± 0,10 | 3,51 ± 0,07 | 0,02 ± 0,01 | 0,39 ± 0,01 | 15,06 ± 0,26   |
| CTRL 7  | <0,109 | 0,57 ± 0,21 | <0,67       | 0,32 ± 0,01 | 0,96 ± 0,02 | 149,92 ± 6,42  |
| CTRL 8  | <0,109 | 0,78 ± 0,12 | <0,67       | 0,04 ± 0,01 | 2,34 ± 0,03 | 13,69 ± 0,38   |
| CTRL 9  | <0,109 | 1,66 ± 0,04 | <0,67       | 0,06 ± 0,01 | 1,86 ± 0,11 | 20,37 ± 0,07   |
| CTRL 10 | <0,109 | 0,99 ± 0,23 | <0,67       | <0,01       | 0,87 ± 0,02 | 21,14 ± 0,11   |

---

Tabela 8. Concentrações para Pb, Ba, Sb, Sn, Cd, Se, As em amostra de cabelo obtidas por ICP-MS.

| Amostras | Elementos / Isótopos ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) |                  |                   |                   |                   |                   |                   |
|----------|---|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|          | $^{75}\text{As}$                              | $^{82}\text{Se}$ | $^{112}\text{Cd}$ | $^{118}\text{Sn}$ | $^{121}\text{Sb}$ | $^{138}\text{Ba}$ | $^{208}\text{Pb}$ |
| 1        | <0,1  | <0,37            | 0,04 ± 0,01       | <0,01             | <0,01             | 3,24 ± 0,06       | 0,83 ± 0,04       |
| 2        | <0,1  | <0,37            | 0,03 ± 0,01       | <0,01             | <0,01             | 6,64 ± 0,10       | <0,48             |
| 3        | <0,1  | <0,37            | 0,03 ± 0,01       | 0,07 ± 0,01       | 0,03 ± 0,01       | 8,32 ± 0,35       | <0,48             |
| 4        | <0,1  | <0,37            | <0,01             | 0,04 ± 0,01       | <0,01             | 16,26 ± 0,19      | 6,87 ± 0,02       |
| 5        | 0,25 ± 0,01                                   | 0,43 ± 0,16      | 0,02 ± 0,01       | 0,11 ± 0,01       | 0,02 ± 0,01       | 24,59 ± 0,49      | 0,72 ± 0,02       |
| 6        | <0,1  | <0,37            | 0,03 ± 0,01       | 0,47 ± 0,02       | <0,01             | 5,42 ± 0,19       | <0,48             |
| 7        | <0,1  | <0,37            | 0,13 ± 0,01       | <0,01             | <0,01             | 0,23 ± 0,03       | <0,48             |
| 8        | 0,21 ± 0,01                                   | 0,49 ± 0,07      | 0,03 ± 0,01       | <0,01             | 0,03 ± 0,01       | 5,67 ± 0,09       | <0,4801           |
| 9        | <0,1  | 0,51 ± 0,09      | 0,02 ± 0,01       | <0,01             | <0,01             | 3,80 ± 0,02       | <0,48             |
| 10       | <0,1  | <0,37            | 0,02 ± 0,01       | 4,66 ± 0,13       | 0,02 ± 0,01       | 173,38 ± 5,02     | <0,48             |
| 11       | <0,1  | <0,37            | <0,01             | <0,01             | <0,01             | 21,15 ± 0,48      | <0,48             |
| 12       | <0,1  | <0,37            | 0,22 ± 0,01       | 0,49 ± 0,02       | 0,05 ± 0,01       | 19,56 ± 0,29      | 7,59 ± 0,12       |
| 13       | <0,1  | <0,37            | 0,03 ± 0,01       | 0,36 ± 0,01       | <0,01             | 11,59 ± 0,25      | <0,48             |
| 14       | <0,1  | <0,37            | 0,16 ± 0,02       | 1,85 ± 0,01       | <0,01             | 21,95 ± 0,52      | 0,61 ± 0,01       |
| 15       | <0,1  | 0,67 ± 0,11      | <0,01             | 1,29 ± 0,03       | 0,03 ± 0,01       | 10,80 ± 0,04      | <0,48             |
| 16       | <0,1  | <0,37            | 0,06 ± 0,01       | 0,44 ± 0,01       | 0,02 ± 0,01       | 53,11 ± 2,86      | <0,48             |
| 17       | <0,1  | 0,44 ± 0,32      | 0,06 ± 0,01       | 0,16 ± 0,02       | <0,01             | 15,45 ± 0,51      | <0,48             |
| 18       | <0,1  | 0,43 ± 0,17      | <0,01             | <0,01             | 0,02 ± 0,01       | 3,53 ± 0,08       | 1,07 ± 0,26       |
| 19       | <0,1  | 0,58 ± 0,06      | 0,04 ± 0,01       | 0,09 ± 0,01       | 0,05 ± 0,01       | 37,74 ± 9,30      | 0,74 ± 0,01       |
| 20       | <0,1  | 0,39 ± 0,22      | 0,02 ± 0,01       | 0,02 ± 0,01       | <0,01             | 5,94 ± 0,05       | <0,48             |
| 21       | <0,1  | 0,62 ± 0,07      | 0,02 ± 0,01       | <0,01             | <0,01             | 5,39 ± 0,18       | <0,48             |
| 22       | <0,1  | 0,45 ± 0,12      | 0,02 ± 0,01       | <0,01             | 0,02 ± 0,01       | 4,89 ± 0,17       | <0,48             |
| 23       | <0,1  | <0,37            | 0,09 ± 0,02       | 4,34 ± 0,19       | 0,02 ± 0,01       | 73,54 ± 1,84      | 0,68 ± 0,03       |
| 24       | <0,1  | 0,71 ± 0,14      | 0,08 ± 0,01       | 0,28 ± 0,01       | 0,07 ± 0,01       | 5,88 ± 0,46       | 0,98 ± 0,01       |
| 25       | <0,1  | <0,37            | 0,03 ± 0,01       | 0,18 ± 0,01       | 0,03 ± 0,01       | 5,15 ± 0,07       | <0,48             |
| CTRL 1   | <0,1  | 0,55 ± 0,14      | 0,29 ± 0,01       | 0,37 ± 0,01       | 0,08 ± 0,01       | 0,92 ± 0,04       | 3,08 ± 0,04       |

|         |      |             |             |             |             |               |             |
|---------|------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------|-------------|
| CTRL 2  | <0,1 | <0,37       | 0,66 ± 0,02 | 0,36 ± 0,01 | 0,02 ± 0,01 | 23,80 ± 0,51  | 1,63 ± 0,02 |
| CTRL 3  | <0,1 | 0,38 ± 0,03 | 0,23 ± 0,01 | <0,01       | 0,02 ± 0,01 | 10,48 ± 0,06  | 0,93 ± 0,02 |
| CTRL 4  | <0,1 | <0,37       | <0,01       | 0,14 ± 0,05 | 0,02 ± 0,01 | 8,57 ± 0,89   | <0,48       |
| CTRL 5  | <0,1 | <0,37       | 0,07 ± 0,01 | 1,02 ± 0,05 | 0,05 ± 0,01 | 14,45 ± 0,20  | 0,83 ± 0,01 |
| CTRL 6  | <0,1 | 0,62 ± 0,08 | 0,05 ± 0,01 | 0,27 ± 0,01 | 0,04 ± 0,01 | 8,16 ± 0,13   | 0,48 ± 0,01 |
| CTRL 7  | <0,1 | <0,37       | 0,06 ± 0,01 | 2,78 ± 0,09 | 0,03 ± 0,01 | 23,28 ± 0,72  | 0,65 ± 0,01 |
| CTRL 8  | <0,1 | <0,37       | 0,07 ± 0,01 | 5,87 ± 0,07 | 0,05 ± 0,01 | 38,93 ± 0,61  | 1,24 ± 0,03 |
| CTRL 9  | <0,1 | <0,37       | 0,05 ± 0,01 | 0,32 ± 0,01 | 0,02 ± 0,01 | 132,56 ± 0,79 | <0,48       |
| CTRL 10 | <0,1 | 0,39 ± 0,21 | 0,34 ± 0,02 | 0,12 ± 0,01 | 0,03 ± 0,01 | 3,40 ± 0,04   | 0,51 ± 0,02 |