

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

Cristiane Pappis

**DETERMINAÇÃO DE OLIGOELEMENTOS E ELEMENTOS  
POTENCIALMENTE TÓXICOS NO SANGUE DE PACIENTES COM  
LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA**

Santa Maria, RS  
2022

**Cristiane Pappis**

**DETERMINAÇÃO DE OLIGOELEMENTOS E ELEMENTOS POTENCIALMENTE  
TÓXICOS NO SANGUE DE PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA**

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

Orientador: Prof. Dr. Valderi Luiz Dressler

Santa Maria, RS  
2022

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Pappis, Cristiane  
DETERMINAÇÃO DE OLIGOELEMENTOS E ELEMENTOS  
POTENCIALMENTE TÓXICOS NO SANGUE DE PACIENTES COM  
LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA / Cristiane Pappis.- 2022.  
67 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, 2022

1. Leucemia linfocítica aguda 2. Sangue 3.  
Oligoelementos I. Dressler, Valderi Luiz II. Müller,  
Edson Irineu III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, CRISTIANE PAPPIS, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

**Cristiane Pappis**

**DETERMINAÇÃO DE OLIGOELEMENTOS E ELEMENTOS POTENCIALMENTE  
TÓXICOS NO SANGUE DE PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA**

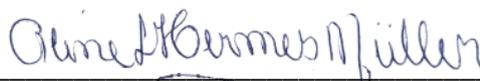
Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Química**.

**Aprovada em 17 de março de 2022.**



---

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



---

**Aline Lima Hermes Müller, Dr. (UFSM)**



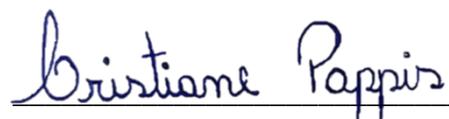
---

**Sergio Roberto Mortari, Dr. (UFN)**

Santa Maria, RS  
2022

## 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.

A handwritten signature in blue ink that reads "Cristiane Pappis". The signature is written in a cursive style and is positioned above a horizontal line.

**Cristiane Pappis**

## 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 deste trabalho.

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

Ao Prof. Dr. **Valderi Luiz Dressler**, pela orientação, pela amizade, pelo exemplo de profissional, pelos ensinamentos e acompanhamentos durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. **Edson Irineu Müller** pela co-orientação neste trabalho.

A Prof. Dra. **Aline Lima Hermes Müller**, Prof. Dr. **Adilson Ben da Costa** e ao Prof. Dr. **Sergio Roberto Mortari**, 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 **Graciela Marini Heidrich**, **Vinicius Machado Neves**, **Vanessa Ramos do Nascimento**, e ao **Henrique Faccin**.

Ao pessoal do **Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM)** e **pacientes**, em especial ao Dr. **Mauber Eduardo Schultz Moreira** e a enfermeira **Carine Meinerz**.

A minha família, em especial, aos meus pais **Lino** e **Cristina**, que sempre me incentivaram e me deram todo o suporte e apoio para meu crescimento profissional e pessoal e, ao meu irmão **Ezequiel** pelo apoio e incentivo.

“Saiba que as moléculas que compõem o seu corpo são formadas por átomos que remontam aos caldeirões que um dia foram os núcleos de estrelas massivas que explodiram sua matéria quimicamente enriquecida nas nuvens gasosas primitivas que carregavam a química da vida. Desta forma, estamos todos conectados – biologicamente uns aos outros, quimicamente à Terra e atômica e ao restante do universo.”

(Neil deGrasse Tyson)

## RESUMO

### **DETERMINAÇÃO DE OLIGOELEMENTOS E ELEMENTOS POTENCIALMENTE TÓXICOS NO SANGUE DE PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA**

AUTORA: Cristiane Pappis  
ORIENTADOR: Valderi Luiz Dressler

A leucemia linfocítica aguda (LLA) é um tipo de câncer que acomete a medula óssea, alterando o processo hematopoiético, devido a uma mutação genética que ocorre nas células tronco de origem linfóide. Desta forma, são gerados linfoblastos imaturos, que não possuem função sanguínea e se acumulam na medula óssea. Esse tipo de câncer ocorre principalmente em crianças, as quais representam a maioria dos casos desta doença. Atualmente a quimioterapia é o tratamento mais utilizado para remissão da doença, já que gera uma taxa de sobrevivência de aproximadamente 80%. Contudo, o tratamento pode acabar destruindo células normais e saudáveis, como enzimas e proteínas importantes no nosso organismo, as quais geralmente possuem ou necessitam de oligoelementos para que assim exerçam adequadamente suas funções. Desta forma, este trabalho buscou investigar a variação de oligoelementos no sangue de pacientes com LLA para verificar como a quimioterapia pode afetar a disponibilidade de alguns elementos essenciais. Além disso, também existem elementos potencialmente tóxicos que já foram relacionados a ocorrência de diversos tipos de cânceres. Sabendo disso, também buscou-se determinar elementos nocivos à saúde, como forma de investigar possíveis relações entre eles e a ocorrência da LLA. Para tanto, foram realizados estudos de preparo da amostra com solubilização em meio alcalino, com o uso de hidróxido de tetrametilamônio (TMAH), além de decomposição em meio ácido. A determinação elementar foi feita pelas técnicas de espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). Por meio de testes estatísticos foi possível verificar que no grupo de pacientes estudados não houveram diferenças significativas na média dos oligoelementos ao longo da quimioterapia, exceto para o ferro que teve um aumento considerável. Esse aumento pode estar associado as transfusões sanguíneas que são realizadas nos pacientes e que podem acabar gerando uma sobrecarga de ferro no organismo. Fatores como alimentação, condições ambientais características da região onde o paciente reside, as transfusões sanguíneas e a LLA parecem não estar relacionados aos demais oligoelementos, uma vez que não foram observadas diferenças significativas ao longo do tratamento contra a LLA. Da mesma forma, os elementos não essenciais determinados também não tiveram diferenças significativas, indicando que os pacientes não estavam expostos a presenças elevadas destes elementos durante o período de estudo. Conseqüentemente, não foram observadas evidências que correlacionem a LLA com estes elementos nocivos. Para a solubilização da amostra com TMAH, pode ser verificado que é um método mais rápido, que necessita de baixos volumes de reagente e requerer equipamentos simples. Contudo, ele não foi eficiente para a solubilização de amostras de sangue, visto que a solução final ficou com aspecto turvo e com presença de material suspenso, sendo um fator que impossibilitou a introdução da solução no ICP-MS. Portanto, a decomposição com ácido foi adotada para o preparo das amostras, onde, através de testes de adição e recuperação dos analitos, foi verificada recuperação quantitativa dos mesmos.

**Palavras chave:** Leucemia linfocítica aguda. Sangue. Oligoelementos.

## ABSTRACT

### DETERMINATION OF TRACE ELEMENTS AND POTENTIALLY TOXIC ELEMENTS IN THE BLOOD OF PATIENTS WITH ACUTE LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

AUTHOR: Cristiane Pappis

ADVISOR: Valderi Luiz Dressler

Acute lymphocytic leukemia (ALL) is a type of cancer that affects the bone marrow, changing the hematopoietic process due to a genetic mutation that affects the stem cells of lymphoid origin. So, immature lymphoblasts are generated, which have no blood function and accumulate in the bone marrow. This type of cancer occurs mainly in children, who represent the majority of cases of this disease. Currently, chemotherapy is the most used treatment for the remission of the disease since it generates a survival of approximately 80%. However, treatment can end up destroying normal and healthy cells, such as enzymes and important proteins in the body, which usually have or require trace elements to properly perform their functions. Therefore, this study aimed to investigate the variation of trace elements in the blood of patients with ALL to verify how chemotherapy can affect the availability of some essential elements. Furthermore, there are also potentially toxic elements that have already been related to the occurrence of various types of cancers. Knowing this, we also sought to determine elements harmful to health in order to investigate possible relationships between them and the occurrence of ALL. For this purpose, sample preparation tests were performed with solubilization in alkaline medium, by using tetramethylammonium hydroxide (TMAH) and decomposition in an acid medium. Element concentration was performed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and inductively coupled atomic emission spectrometry (ICP OES) techniques. By means of statistic tests, it was possible to verify that no significant differences in the mean concentration of trace elements were observed in patients submitted to chemotherapy, except for iron (Fe), which increased. The increase of Fe concentration may be associated with blood transfusions that patients were submitted and that can cause Fe overload in the body. It seems that blood transfusions, factors such as feeding and environmental characteristic of the region where the patient resides and LLA have no influences on the trace elements investigated, since no significant differences throughout treatment against ALL were observed. Similarly, the non-essential elements determined also had no significant differences, indicating that patients were not exposed to high levels of these elements during the study period. Consequently, no evidence was observed that correlates ALL with these harmful elements. In relation of sample preparation, treatment with TMAH allows a faster method and requires low volumes of reagent and simple equipment. However, it was not efficient for the solubilization of blood samples since the final solution was cloudy, with presence of solid material, making analysis by ICP-MS or ICP OES impossible. Therefore, acid decomposition was used for sample preparation, where quantitative analyte recovery was achieved through addition and recovery tests.

**Keywords:** Acute lymphocytic leukemia. Blood. Trace elements.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Testes realizados com solubilização em meio alcalino. (a) – 100 mg de sangue total + 100 e 200  $\mu$ L de TMAH (25%) + repouso / 15 min + banho maria a 80 °C / 1 hora; (b) – 100 mg de sangue total + 100 e 200  $\mu$ L de TMAH (25%) + repouso / 24 horas .....37
- Figura 2 - Gráficos do tipo boxplot, referente a variação da concentração dos elementos essenciais determinados ao longo das fases do tratamento contra a LLA.....44
- Figura 3 - Gráficos do tipo boxplot referente a variação da concentração dos elementos potencialmente tóxicos ao longo das fases do tratamento contra a LLA. ....47
- Figura 4 - Modelo de PCA referente a distribuição dos elementos no sangue em todos os pacientes. ....48
- Figura 5 - Modelo de PCA referente as amostras de sangue de pacientes do sexo masculino.49
- Figura 6 - Modelo de PCA referente as amostras de sangue de pacientes do sexo feminino. .49

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Aplicações do hidróxido de tetrametilamônio para extração elementar em amostras biológicas. ....	24
Tabela 2 - Condições experimentais para os testes de solubilização com TMAH. ....	32
Tabela 3 - Condições instrumentais utilizadas para a determinação de elementos no sangue por ICP-MS. ....	34
Tabela 4 - Condições instrumentais utilizadas para a determinação de elementos no sangue por ICP OES. ....	35
Tabela 5 - Avaliação do efeito de matriz durante as determinações elementares empregando ICP-MS, por meio do teste de diluição da solução da amostra e teste de recuperação dos analitos na amostra decomposta em meio ácido (N = 3). ....	39
Tabela 6 - Avaliação do efeito de matriz durante as determinações elementares empregando ICP OES, por meio do teste de diluição da solução da amostra e teste de recuperação do analito na amostra decomposta em meio ácido (N = 3). ....	39
Tabela 7 - Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) dos elementos pela técnica de ICP-MS. ....	40
Tabela 8 - Resumo dos resultados referentes aos valores mínimos, máximos, médios e o desvio padrão das concentrações para os elementos essenciais determinados em diferentes fases do tratamento contra a LLA. ....	42
Tabela 9 - Resumo dos resultados referentes aos valores mínimos, máximos, médios e o desvio padrão das concentrações para os elementos potencialmente tóxicos determinados em diferentes fases do tratamento contra a LLA. ....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CoRem	Consolidação da remissão
CTRD	Consolidação tardia
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FT	Fora do tratamento
HUSM	Hospital Universitário de Santa Maria
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado
ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado
IND	Indução
INT	Intensificação
LLA	Leucemia linfocítica aguda
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
MNT	Manutenção
MW	Microondas
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia
P.A.	Para análise, grau de pureza
PCA	Análise de Componentes Principais
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SD	Desvio padrão
TMAH	Hidróxido de tetrametilamônio

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	14
2.1	LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA .....	14
2.2	OLIGOELEMENTOS .....	16
2.3	DETERMINAÇÃO ELEMENTAR EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS .....	20
2.4	PREPARO DE AMOSTRA POR DECOMPOSIÇÃO EM VIA ÚMIDA EM MEIO ÁCIDO COM AQUECIMENTO POR RADIAÇÃO MICROONDAS .....	22
2.5	PREPARO DE AMOSTRA POR SOLUBILIZAÇÃO EM MEIO ALCALINO .....	22
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	29
3.1	ASPECTOS ÉTICOS .....	29
3.2	COLETA DAS AMOSTRAS .....	29
3.3	TRANSPORTE E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS .....	31
3.4	PREPARO DA AMOSTRA .....	31
<b>3.4.1</b>	<b>Solubilização em meio alcalino</b> .....	31
<b>3.4.2</b>	<b>Decomposição por via úmida em meio ácido com aquecimento por radiação microondas</b> .....	32
3.5	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ELEMENTOS NAS AMOSTRAS....	33
3.6	TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS RESULTADOS .....	36
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	37
4.1	SOLUBILIZAÇÃO EM MEIO ALCALINO .....	37
4.2	DECOMPOSIÇÃO EM MEIO ÁCIDO.....	38
4.3	DETERMINAÇÃO DOS ELEMENTOS EM SANGUE .....	40
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	51
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	52
	<b>APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b> ....	57
	<b>APÊNDICE B – TERMO DE ASSENTIMENTO</b> .....	59
	<b>APÊNDICE C – TERMO DE CONFIDENCIALIDADE</b> .....	61
	<b>APÊNDICE D – QUESTIONÁRIO DE CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA</b> ....	62
	<b>ANEXO A – HISTOGRAMAS DE DISTRIBUIÇÕES DOS ELEMENTOS DETERMINADOS</b> .....	66

## 1 INTRODUÇÃO

A Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) é uma neoplasia que acomete a medula óssea, mais especificamente o processo hematopoiético, durante o desenvolvimento de células linfoides, afetando os linfócitos B e T, gerando conseqüentemente complicações no sistema imunológico (Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia, 2020). Essa doença se desenvolve em crianças, adolescentes e adultos, contudo ela acomete principalmente crianças entre 2 a 5 anos de idade, podendo ser fatal quando diagnosticada em fase tardia (HUNGER; MULLIGHAN, 2015).

Atualmente o tratamento mais utilizado para a remissão da LLA é a quimioterapia, devido à está gerar uma taxa de sobrevivência de aproximadamente 80%. Nesse sentido, são administrados um coquetel de quimioterápicos com a finalidade de causar a destruição das células cancerígenas. Contudo, células e moléculas saudáveis e essenciais para o organismo, também podem acabar sendo danificadas devido aos efeitos dos medicamentos administrados. Além disso, os pacientes podem apresentar uma redução na concentração de oligoelementos, como zinco, cobre, manganês, magnésio, cromo, ferro e outros que possuem papéis fundamentais no metabolismo enzimático e produção de proteínas.

Desta forma, o monitoramento da variação de oligoelementos ao longo da quimioterapia no sangue de pacientes com LLA é fundamental para a verificação do aumento ou deficiência desses elementos no organismo.

Para a determinação de elementos traço (na ordem de  $\text{ng L}^{-1}$  a  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) em amostras biológicas são geralmente realizados preparos de amostra por decomposição por via úmida em meio ácido com aquecimento por radiação microondas, além de solubilização em meio alcalino. Além do mais, técnicas instrumentais como a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e espectrometria de atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) são amplamente utilizadas para a quantificação de elementos traço, na ordem de  $\text{ng L}^{-1}$ , para o ICP-MS e de  $\mu\text{g L}^{-1}$  a  $\text{mg L}^{-1}$  para o ICP OES.

Nesse sentido, este trabalho buscou investigar possíveis variações nas concentrações de oligoelementos no sangue de pacientes com LLA, ao longo do tratamento com quimioterapia. Também foram avaliadas eventuais correlações entre a presença de elementos potencialmente tóxicos com o desenvolvimento da LLA. Além do mais, foi estudado o uso do hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) para a solubilização de sangue. Para tanto, foram utilizados métodos de preparo de amostra por solubilização em meio alcalino e decomposição em meio ácido, além de determinação pelas técnicas de ICP-MS e ICP OES.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA

No organismo humano, a medula óssea é a responsável por produzir as células sanguíneas maduras, através do processo de hematopoese. Quando nascemos todos os ossos possuem medula óssea ativa, porém na idade adulta apenas os ossos das vertebras, quadris, ombros, costelas, esterno e crânio continuam com medula óssea ativa. Por meio dela são produzidas as células tronco hematopoéticas (indiferenciadas) e que por sua vez são transformadas em células sanguíneas específicas pelo processo de diferenciação (Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia, 2020).

A diferenciação celular passa inicialmente por uma etapa de progenitores hematopoéticos responsáveis pelas linhagens mieloideis e linfoides, assim as células progenitoras linfoides sofrerão diferenciação até se transformarem em linfócitos. Os linfócitos também conhecidos como glóbulos brancos, são divididos em duas classes, os linfócitos B e os linfócitos T. Essas células quando maduras, são as responsáveis pela defesa do organismo, atuando e protegendo o corpo contra patógenos, bactérias, vírus, parasitas e até células tumorais (RODRIGUES; SANTOS; AMORIN, 2019).

A patogênese da LLA, envolve a proliferação e acúmulo de leucócitos (glóbulos brancos) doentes na medula óssea, as quais acabam substituindo os leucócitos normais e saudáveis. Esse tipo de câncer tem seu início quando uma célula tronco linfóide imatura sofre mutação genética, gerando uma célula sem função (linfoblasto). As alterações genéticas fazem com que os linfoblastos cresçam e se dividam rápida e continuamente, enquanto as células normais acabam morrendo. Com isso, os linfoblastos acumulam-se na medula óssea, suprimindo a produção de células saudáveis. Desse modo há um acúmulo de linfoblastos e poucas células sanguíneas funcionais (Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia, 2020; SOUZA, 2020).

Conforme Alvarnas et al. (2015), a maioria dos quadros clínicos de LLA, apresentam um acúmulo de células linfoides malignas pouco diferenciadas, na medula óssea, sangue periférico além de locais extramedulares. Desta forma, o diagnóstico é estabelecido quando se tem a presença igual ou superior a 20% de linfoblastos na medula óssea ou no sangue periférico.

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA) os quatro principais tipos de leucemia são a leucemia aguda (LMA), leucemia mieloide crônica (LMC), leucemia linfocítica aguda

(LLA) e leucemia linfocítica crônica (CLL). Sendo que no ano de 2020 foi estimado um aumento de 5.920 casos de leucemias em homens e 4.890 casos de leucemias em mulheres.

A diferença entre a leucemia aguda e a crônica se dá pela velocidade de multiplicação das células cancerosas. Na leucemia aguda, os linfoblastos se multiplicam de forma acelerada, e o paciente possuiu um maior número de células imaturas que não desempenham suas funções corretamente. Contudo, na leucemia crônica, a multiplicação das células geneticamente alteradas ocorre de forma mais lenta, e o doente possuiu um maior número de células saudáveis que conseguem desempenhar alguma de suas funções adequadamente (Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia, 2020).

O principal grupo acometido pela LLA e que corresponde a 80% dos casos da doença, são crianças, especialmente na faixa etária de 2 a 5 anos de idade. Para alguns autores, a alta incidência de casos nesse grupo pode estar relacionado a maior susceptibilidade das crianças, devido a estas estarem no processo de desenvolvimento físico, nutricional e fisiológico. Contudo, ainda não existe uma origem específica que justifique o aparecimento da LLA, já que diversos fatores podem estar associados ao surgimento dessa doença, como as condições genéticas e, sobretudo ambientais (SPECTOR et al., 2010; SOUZA, 2020).

Embora que a LLA não seja uma doença hereditária, diversos estudos indicam que há uma maior probabilidade do surgimento desta patologia em crianças que possuem algum tipo de doença congênitas, como a síndrome de Down, anemia de Fanconi e síndrome de Bloom (BUITENKAMP et al., 2014; GERMAN., 1997; MICHELS et al., 2021; SHAH; JOHN; SONDHI, 2013). Além disso, fatores ambientais como a exposição a radiações ionizantes, pesticidas, determinados solventes, ou vírus como Epstein-Barr e o vírus da imunodeficiência humana, acabam sendo agentes predisponentes a LLA (GERINIERE et al., 1994; SEHGAL et al., 2010; SPECTOR et al., 2010). Além disso, a exposição pré-natal materna a radiações ionizantes e agrotóxicos, também culmina na pré disposição para o surgimento da LLA em crianças (WANG et al., 2019).

A quimioterapia é o tratamento mais utilizado atualmente para combater a LLA, visto que ele leva a aproximadamente 80% de remissão em crianças com a patologia. Para tanto, o tratamento é geralmente realizado em ciclos, que variam de duração, dependendo de quais quimioterápicos são administrados. De maneira geral, existem três principais fases de tratamento que são mais comuns: indução, consolidação ou intensificação e manutenção (Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia, 2020; KATO; MANABE, 2018; SITARESMI, 2008).

A terapia de indução, consiste no uso de esteroides, vincristina e asparaginase com ou sem antraciclina, com o objetivo de destruir o máximo de células cancerosas afim de chegar à remissão. O segundo ciclo, que é a terapia de consolidação ou intensificação, é aplicado somente quando a LLA está em remissão, e tem por objetivo destruir todas as células de leucemia remanescente no corpo. Nessa etapa são administradas maiores dosagens de quimioterápicos, com duração de 4 a 6 meses, a depender de cada caso. Após a consolidação, alguns protocolos podem optar por fazer uma etapa de reindução, usando medicamentos semelhantes à etapa de indução. Por fim, a terceira etapa do tratamento é a manutenção, na qual são administradas doses mais baixas dos medicamentos, a fim de prevenir a recidiva da patologia. Os medicamentos são administrados por via oral e os pacientes tratados no ambiente laboratorial. Em geral essa etapa do tratamento dura cerca de 2 anos para os adultos e de 2 a 3 anos para as crianças (Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia, 2020).

Apesar do tratamento da LLA ser eficiente para a remissão da maioria dos casos da doença, ele pode trazer prejuízos para o organismo dos pacientes. De acordo com Akhgarjand et al. (2018), a quimioterapia pode afetar as funções biológicas e o estado nutricional dos doentes, devido a redução de oligoelementos no corpo. Metais como zinco (Zn), cobre (Cu), manganês (Mg), Magnésio magnésio (Mn), cromo (Cr) e ferro (Fe) desempenham papéis fundamentais dentro do corpo humano, na expressão génica, funções imunes celulares, proteção contra radicais livres, além de síntese e estabilização estrutural de proteínas e ácidos nucleicos.

Sabe-se que uma grande variação na concentração dos metais presentes no organismo humano pode acarretar em mortalidade por doenças cardiovasculares e câncer (DUAN et al., 2020). Alterações nos níveis séricos de Zn e Cu já foram encontrados em estudo realizado com pacientes com LLA (AKHGARJAND et al., 2018).

## 2.2 OLIGOELEMENTOS

Cerca de 99% da massa do corpo humano é composta por elementos majoritários, como o oxigênio (O), carbono (C), hidrogênio (H), nitrogênio (N), fosforo (P) e cálcio (Ca). Os demais elementos, que correspondem a cerca de 0,6%, são chamados de oligoelementos por estarem em concentrações reduzidas. Dentro dessa classe podemos destacar o boro (B), cromo (Cr), cobalto (Co), cobre (Cu), flúor (F), iodo (I), ferro (Fe), magnésio (Mg), manganês (Mn), molibdênio (Mo), níquel (Ni), enxofre (S), selênio (Se), estanho (Sn), vanádio (V) e zinco (Zn), (CARVALHO et al., 2015). Os oligoelementos, mesmo que em quantidades muito baixas, desempenham papéis fundamentais no organismo, como na manutenção da integridade de

vários processos fisiológicos e metabólicos, devido a estes atuarem como centros ativos em enzimas ou como substâncias traços bioativas (ZAZZO, 1993). Desta forma, quando o organismo humano possui concentrações a baixo do normal para esses elementos, diversos problemas podem ocorrer, como anormalidades estruturais e fisiológicas (CARVALHO et al., 2015).

O Cr é um oligoelemento importante devido ao seu papel no metabolismo da glicose, servindo como cofator para a liberação da insulina. Esse elemento pode existir em diferentes estados de oxidação, como o  $\text{Cr}^0$ ,  $\text{Cr}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$  e  $\text{Cr}^{6+}$ . Entre eles o  $\text{Cr}^{3+}$  é o mais importante, pois é um dos principais minerais no controle dos níveis de glicose no sangue e lipídios. O  $\text{Cr}^{3+}$  aumenta a eficácia da insulina e estimula a captação de glicose dos músculos e outros tecidos, sendo o principal elemento do fator de tolerância à glicose. Desta forma, quando o organismo possui níveis de cromo sérico menor, o nível circulante do fator de tolerância a glicose também é menor. Conseqüentemente a insulina acaba sendo menos eficaz na redução de açúcar no sangue, e devido ao nível elevado de açúcar no sangue acaba sendo liberada insulina ineficaz. Contudo, é difícil determinar o estado deficiente de cromo, o que se acredita é que níveis de cromo inferiores a 0,14-0,15 ng mL<sup>-1</sup> no soro indica a deficiência de cromo no organismo (BHATTACHARYA; MISRA; HUSSAIN, 2016). Por outro lado, a espécie de  $\text{Cr}^{6+}$  não possui valor nutricional e é tóxico para o organismo humano, onde causa peroxidação lipídica, aumento do estresse oxidativo, além de causar danos no DNA (CARVALHO et al., 2015).

O Cu é um elemento essencial que está presente em quase todos os tecidos do corpo, sendo que é o terceiro elemento mais abundante no organismo, variando de 75 a 100 mg. No sangue o cobre é distribuído principalmente entre os eritrócitos e no plasma. Ele é o responsável pela mobilização do ferro para a síntese da hemoglobina, estimula o sistema imunológico, aumentando o número de células de defesa e prevenindo o aparecimento de doenças. Além disso, o cobre se liga especificamente a algumas enzimas metabólicas fazendo com que elas funcionem adequadamente, como a superóxido dismutase, aminoácido oxidase e dopamina β-hidroxiase ceruloplasmina. O cobre também é um componente da lisil oxidase, que participa da síntese de colágeno e elastina, sendo essencial também para manter a força da pele, do cabelo, dos vasos sanguíneos, do tecido epitelial e conjuntivo em todo o organismo (BHATTACHARYA; MISRA; HUSSAIN, 2016; CARVALHO et al., 2015).

O Zn é o segundo oligoelemento mais abundante do organismo humano, visto que há de 2 a 4 gramas de Zn distribuídos por todo o corpo. O zinco possui inúmeras funções biológicas importantes e desempenha um papel fundamental em mais de 300 enzimas. Ele auxilia na função imunológica, na cicatrização de feridas, síntese de proteínas, síntese do DNA

e divisão celular. Está relacionado ao bom senso de paladar e olfato, além de ser importante para o crescimento e desenvolvimento normal durante a gravidez, infância e adolescência. No plasma, o Zn se encontra ligado, principalmente, a albumina e transferrina. Como a transferrina também transporta o Fe, o excesso de Fe pode acabar reduzindo a absorção de Zn e vice-versa. Da mesma forma, quando há um excesso de Zn ele pode acabar diminuindo a absorção de Ca e Mg e, inversamente, altos níveis de Ca e Mg na dieta podem acabar interferindo na absorção de Zn. No entanto a concentração de Zn no plasma permanece relativamente constante, independente da sua ingestão (BHATTACHARYA; MISRA; HUSSAIN, 2016; CARVALHO et al., 2015).

O Fe é o oligoelemento essencial mais abundante no corpo, visto que a sua concentração está na faixa de 3 a 5 gramas distribuídos em todo o organismo. Esse elemento desempenha um importante papel no transporte de oxigênio no sangue, através da hemoglobina presente nos glóbulos vermelhos. Além disso, o Fe desempenha também uma função essencial na produção de energia como constituinte de várias enzimas incluído a catalase, peroxidase e citocromo, as quais são responsáveis por vários ciclos metabólicos. Desta forma, a atividade de muitas enzimas que necessitam do Fe para as suas atividades bioquímicas podem ser diminuídas se houver deficiência de Fe nos tecidos. Nesse contexto temos a anemia por deficiência de Fe, a qual é a manifestação mais comum de baixos níveis séricos desse oligoelemento. Muitas vezes a baixa absorção de Fe no organismo pode estar associado quando há uma maior ingestão de Ca, devido ao Ca acabar inibindo a absorção de Fe, pois ambos possuem propriedades semelhantes, como o mecanismo de transporte celular (BHATTACHARYA; MISRA; HUSSAIN; 2016; CARVALHO et al., 2015).

O Co pode estar presente no corpo na forma orgânica, fazendo parte integrante da vitamina B12, tendo um papel importante na formação de aminoácidos e várias proteínas para a geração da bainha de mielina. O Co é essencial para o funcionamento normal de todas as células, principalmente as da medula óssea. Além disso, ele também auxilia na geração de neurotransmissores, necessários para o correto funcionamento do organismo. Desta forma, em situações de deficiência de Co, não há formação de vitamina B12, o que acaba gerando uma disfunção no organismo (BHATTACHARYA; MISRA; HUSSAIN, 2016; CARVALHO et al., 2015).

As formas inorgânicas de Co são tóxicas para o organismo por causarem danos às células, visto que o excesso de íons de Co no corpo pode acabar aumentando a ação de tireóide e da medula óssea, resultando em uma alta produção de eritrócitos, fibrose nos pulmões e asma (BHATTACHARYA; MISRA; HUSSAIN, 2016; CARVALHO et al., 2015).

O Mg é considerado um possível oligoelemento, já que possuiu inúmeras funções fisiológicas, ele auxilia no metabolismo de P, sódio (Na) e potássio (K), além de ser importante para a absorção de Ca e vitamina C. O Mg também atua convertendo a glicose do sangue em energia, além de junto com o Ca, manter o bom funcionamento dos músculos. Além disso, ele é fundamental no metabolismo e ação da vitamina D. Quando há uma deficiência de Mg no organismo, pode haver fadiga, insônia, depressão, espasmos musculares, insuficiência cardíaca, náuseas e vômitos. Por outro lado, o excesso de magnésio pode causar problemas como fraqueza muscular, distúrbios cardíacos, inibição da calcificação óssea e hipotensão (CARVALHO et al., 2015).

O Mn está presente em uma série de enzimas além de ser indispensável para a ativação de uma série de outras enzimas, como a glicosiltransferases, que é essencial para a síntese de poliglicanos necessários para a formação de cartilagem e ossos. Contudo alguns elementos como Fe, Ca, P e Mg podem acabar interferindo na absorção de Mn (CARVALHO et al., 2015).

O Mo é um oligoelemento presente em baixas quantidades no corpo, sendo encontrado principalmente como componente da molibdoproteína. Participa da formação de sítios ativos para várias enzimas. Todas as enzimas contendo Mo são oxidorreduções, nas quais o Mo pode estar em diferentes estados de oxidação (BHATTACHARYA; MISRA; HUSSAIN, 2016; CARVALHO et al., 2015).

O Se é um oligoelemento vital que está presente em enzimas antioxidantes e na selenocisteína, que é incorporada em mais de 30 selenoproteínas. Entre as selenoproteínas temos as glutatinoxidases, que auxiliam contra o estresse oxidativo, as iodotironina desidases, as selenoproteínas de Pb, que são envolvidas na ação antioxidante e função de transporte, e as tioredoxinas redutases, que estão envolvidas na manutenção do estado redox intracelular (BHATTACHARYA; MISRA; HUSSAIN, 2016; CARVALHO et al., 2015).

O Ni possuiu uma importante função no corpo humano, atuando como um centro catalítico em enzimas redox e não-redox. Além disso, evidências indicam que o Ni influencia na absorção e metabolismo do Fe, sendo um componente essencial do processo hematopoético (CARVALHO et al., 2015).

O V é um oligoelemento que auxilia no controle e regulação da enzima adenosina trifosfatase sódio-potássio (bomba de sódio-potássio). Ele também serve como biocatalisador para a oxidação de substratos envolvidos no metabolismo do colesterol. Contudo, devido ao V estar na corrente sanguínea ligado a transferrina, ele pode acabar interferindo no armazenamento e metabolismo do Fe (FRIEDEN, 1985; CARVALHO et al., 2015).

O Rb é considerado um possível oligoelemento, devido a ter propriedades bioquímicas semelhantes às do K. Este elemento possuiu baixa toxicidade no organismo humano, contudo estudos referentes as suas atividades específicas em processos biológicos são bastante escassos na literatura (LOMBECK et al., 1980).

A essencialidade do Sn está ligada principalmente a evidencias de que ele auxilia no crescimento e interage com a riboflavina (vitamina B2), a qual é uma importante vitamina que favorece o metabolismo das gorduras e açúcares (ARAS; ATMAN, 2007).

O Sr é um possível elemento essencial que possuiu propriedade semelhantes a do Ca, dessa forma, ele pode atuar imitando o comportamento do Ca. Por esse motivo, o Sr está presente principalmente nos ossos, e possuiu um impacto significativo no metabolismo ósseo, devido a capacidade de aumentar a mineralização de dentes e ossos (STANIĆ, 2019)

O Ca é o principal constituinte dos ossos e dentes, também está envolvido em funções musculares, como a contração e relaxação, além de auxiliar na coagulação sanguínea e pressão arterial (ARAS; ATAMAN, 2007)

O K é um oligoelemento que atua facilitando muitas reações, como no caso da síntese de proteínas, também na transmissão nervosa e contração dos músculos (ARAS; ATAMAN, 2007).

### 2.3 DETERMINAÇÃO ELEMENTAR EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Atualmente a técnica de ICP-MS é comumente utilizada em diversos ramos da pesquisa para a determinação elementar em baixas concentrações, principalmente em matrizes biológicas (AMMANN, 2007).

Devido a técnica de ICP-MS possuir uma fonte de íons de alta temperatura (próximo a 10.000 K) e gerar uma alta densidade de elétrons (aproximadamente  $2 \times 10^{15}$  elétrons  $\text{cm}^{-3}$ ), o plasma formado consegue fornecer energia suficiente para atomizar e ionizar total o parcialmente a maioria dos elementos. Além disso, a ICP-MS permite uma análise multielementar e, também, dos diferentes isótopos que um mesmo elemento possuiu, onde são gerados espectros simples dos elementos que possuem razão massa/carga ( $m/z$ ) entre 5 a 250 (AMMANN, 2007).

Devido a ICP-MS ter uma alta sensibilidade é possível obter limites de quantificação na ordem de  $\text{ng L}^{-1}$ , possibilitando a sua utilização para a quantificação de oligoelementos de forma eficiente (AMMANN, 2007).

Outra característica importante da técnica é a possibilidade de diferentes formas de introdução de amostra. Entre elas, a mais utilizada é a nebulização pneumática com solução líquida. Desta forma, isto implica que a maioria das amostras necessitam serem digeridas ou solubilizada para então ser introduzida no plasma. Além disso, pode ser empregado a geração de vapor químico (CVG), nebulização ultrassônica, técnicas de introdução de amostras sólidas, como a ablação a laser (LA) e a vaporização eletrotérmica (ETV). Ademais, também podem ser acoplados sistemas que permitem a separação de espécies moleculares, como técnicas de cromatografia e eletroforese (BEAUCHEMIN, 2020).

Um fator importante durante as determinações elementares, principalmente quando se utiliza a técnica de ICP-MS, é ter conhecimento sobre a composição da matriz da amostra, e quais são as possíveis interferências que ela pode vir a causar na etapa de quantificação dos analitos. De acordo com a literatura sabe-se que amostra biológicas podem ter um considerável teor de C, caso não sejam bem decompostas. Desta forma, o C acaba sendo um grande interferente nas determinações elementares, devido a formação de moléculas poliatômicas de mesma  $m/z$  nominal de elementos de interesse. Como por exemplo  $^{24}\text{Mg}$  ( $^{12}\text{C}_2^+$ ),  $^{52}\text{Cr}$  ( $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$ ),  $^{53}\text{Cr}$  ( $^{36}\text{Ar}^{17}\text{O}$ ) (MAY; WIEDMEYES, 1998). Além disso, o C pode afetar a intensidade do sinal de elementos como o Hg, Se e As devido ao C gerar um efeito de transferência de carga, dessa forma há um aumento da população de átomos e íons no estado excitado. Como o C possui um potencial de ionização de aproximadamente 11,26 eV, ele acaba aumentando a energia do plasma e favorecendo a ionização de elementos com alto potencial de ionização. Contudo, elementos que possuem baixo potencial de ionização como o Ba, Li, e Mo podem ter seu sinal suprimido na presença de altas concentrações de C (GRINDLAY, 2013).

Além do C, o sangue possui uma considerável concentração de Na, estando na faixa de 123 a 140  $\text{mmol L}^{-1}$ , o qual também pode se combinar com outros elementos e acabar gerando espécies interferentes poliatômicas, como no  $^{60}\text{Ni}$  ( $^{25}\text{Na}^{35}\text{Cl}^+$ ),  $^{62}\text{Ni}$  ( $^{25}\text{Na}^{39}\text{K}^+$ ),  $^{59}\text{Co}$  ( $^{36}\text{Ar}^{23}\text{Na}^+$ ),  $^{63}\text{Cu}$  ( $^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}$ ) (BUZANOVSKII, 2017; MAY; WIEDMEYES, 1998). Além disso, devido ao Na ter um baixo potencial de ionização (5,14 eV), quando ele está presente em maior concentração na amostra ele acaba diminuindo a energia do plasma, dificultando assim, a ionização de elementos com alto potencial de ionização.

Outra técnica utilizada para a análise elementar em amostras biológicas é a ICP OES. Por ser uma técnica multielementar e que possuiu uma ampla faixa linear de trabalho, de  $\mu\text{g L}^{-1}$  a  $\text{mg L}^{-1}$ , ela é amplamente utilizada para a determinação de mais de 70 elementos.

Nesse caso, também temos o plasma indutivamente acoplado que servirá como fonte para a atomização e excitação dos elementos. O princípio dessa técnica está baseado na medida

da radiação eletromagnética emitida por átomos ou íons excitados por uma fonte de energia. Após essas espécies absorverem um quantum de energia, elas retornam ao seu estado fundamental emitindo um fóton, que é característico daquele elemento. Desta forma, é possível fazer a quantificação de elementos que emitem radiação na faixa no UV-Vis entre aproximadamente 120 e 800 nm (MANNING; GROW, 1997).

Na técnica de ICP OES também é possível utilizar diferentes formas de introdução de amostra. Assim como na ICP-MS é possível utilizar nebulizadores pneumáticos, ultrassônicos, geração de vapor químico e introdução de amostras sólidas, por ablação a laser ou vaporização eletrotérmica (GINÉ, 1998).

#### 2.4 PREPARO DE AMOSTRA POR DECOMPOSIÇÃO EM VIA ÚMIDA EM MEIO ÁCIDO COM AQUECIMENTO POR RADIAÇÃO MICROONDAS

Para determinação de oligoelementos em matrizes biológicas, a etapa de preparo de amostra é extremamente importante e deve garantir a eliminação da fração orgânica e solubilização dos elementos de interesse (ARAS; ATAMAN, 2007). Nesse sentido, o método de preparo de amostra por decomposição em meio ácido com aquecimento por radiação microondas (MW) é amplamente utilizado para a digestão de matrizes orgânicas, por ser um método eficiente, rápido e reprodutível (MÜLLER et al., 2014).

Para a decomposição de matrizes orgânicas, são utilizados ácidos oxidantes, principalmente o ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ), para que assim a fração orgânica seja totalmente convertida em  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  (MÜLLER et al., 2014).

O aquecimento por radiação MW pode ser feito tanto em sistemas abertos como em sistemas fechados. Em geral, a utilização de sistemas abertos permite o uso de maior massa de amostra, porém a eficiência de decomposição se limita a temperatura de ebulição dos solventes. Contudo, alguns trabalhos demonstram que a utilização de sistemas abertos, como os fornos de microondas convencionais, são eficientes para a decomposição de diferentes tipos de matriz, como leite em pó, farinha de arroz e plantas (GHOLAMI, et al., 2016; HUANG et al., 2004).

#### 2.5 PREPARO DE AMOSTRA POR SOLUBILIZAÇÃO EM MEIO ALCALINO

A utilização de bases fortes, como o hidróxido de tetrametilamônio (TMAH), vem sendo amplamente discutido na literatura como uma forma de preparo de amostra que promove a solubilização e extração elementar de amostras biológicas (BATISTA et al., 2009).

O TMAH é uma base orgânica forte, que possuiu pH entre 13,4 a 14,7, é derivada de um sal de amônio quaternário, que é estável à temperatura ambiente e solúvel em água ou álcoois. Diversos autores relatam que o TMAH causa cisão hidrolítica e metilação de ésteres, amidas e éteres, além de promover a quebra de moléculas de dissulfeto em proteínas (NÓBREGA et al., 2006). Desta forma, ele já foi utilizado para solubilização de diferentes matrizes orgânicas para a determinação elementar, como pode ser observado na Tabela 1, a qual fornece uma breve revisão de diferentes trabalhos que utilizaram a solubilização alcalina com TMAH para a determinação elementar em matrizes biológicas.

Tabela 1 - Aplicações do hidróxido de tetrametilamônio para extração elementar em amostras biológicas.

(continua)

Amostra	analitos	procedimentos	técnicas	observações	referência
CRMs – músculo bovino e ovo em pó	Al, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Pb, Sb, Se, Sr, V, e Zn	Utilizou-se 75 mg de amostra, a qual foi solubilizada com 1 mL de TMAH 50% (v/v). As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 12 horas em um homogeneizador rotacional. A solução foi aferida para 10 mL, utilizando uma solução contendo HNO <sub>3</sub> 0,5% (v/v), Triton®-X – 100 0,01% (v/v) e 10 µg L <sup>-1</sup> Rh.	ICP-MS	Os elementos Al, As, Ba, Cd, Co, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Pb, Sb, Se, Sr, V, e Zn apresentaram taxas de recuperação > 85% nas determinações por ICP-MS. Apenas o Cr teve recuperações insatisfatórias, dessa forma foi necessário utilizar a cela de reação dinâmica, empregando H <sub>2</sub> /Ar – 5/95% como gás de colisão. Além disso, para os elementos Zn e Se foram adotadas equações de correção.	Batista et al. (2009)
Peixes e camarões	Cd, Pb	Utilizou-se 4,0 g de amostra, a qual foi liofilizada e feita a adição de 4 mL de água deionizada e 4 mL de TMAH 25 % (m/v) em metanol. As amostras foram deixadas em repouso por 2 horas e posteriormente foram aferidas a 25 mL com água deionizada.	GF AAS	O método mostrou-se adequado para a determinação de Cd e Pb em peixes e camarões. As taxas de recuperação situaram-se na faixa de 84% a 99% para Cd e entre 94% a 107% para Pb.	Torres et al. (2016)

Tabela 1 - Aplicações do hidróxido de tetrametilamônio para extração elementar em amostras biológicas.

(continuação)

Amostra	analitos	procedimentos	técnicas	observações	referência
carne	Fe, Mg, Mn, P e Zn	Foi utilizado 1,0 g de amostra e adicionado 1,250 µL de TMAH 25% (m/v). Posteriormente foi realizado um repouso durante 2 a 3 horas. Após a solubilização a solução foi aferida a 25 mL.	ICP OES	A solução da amostra apresentou coloração turva e presença de material suspenso. Contudo foi possível fazer a quantificação de Fe, Mg, Mn, P e Zn, visto que os percentuais de recuperação variaram de 85% a 118%.	NUNES et al. (2013)
carne bovina	Cu, Mo, Zn	Foi utilizado 0,25 g de amostra juntamente com 5,0 mL de água ultrapura e 1,5 mL de TMAH 25% (v/v). Após, foi realizado aquecimento em banho maria a 85 °C por 1 hora. Decorrido o tempo de solubilização a solução da amostra foi centrifugada e a solução obtida foi usada para a quantificação elementar.	FAAS, ETAAS	Os elementos Cu e Zn foram determinados por FAAS, e para a determinação de Cu foi utilizada a técnica de ETAAS, já que era esperado que teor de Mo nos tecidos biológicos fosse extremamente baixo.	IAQUINTA et al. (2020)
camarão e caranguejo	Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn e Zn	Foi utilizado 0,25 g de amostra, seguido da adição de 1 mL de TMAH 25% (m/v). Na sequência as amostras	MIP OES	O método proposto foi eficiente e as recuperações obtidas foram adequadas, variando entre 91 a 106%.	LEMOS; CRUZ; DANTAS, (2021)

Tabela 1 - Aplicações do hidróxido de tetrametilamônio para extração elementar em amostras biológicas.

(continuação)

Amostra	analitos	procedimentos	técnicas	observações	referência
		foram sonicadas em banho de ultrassom por 30 min, e após 1 mL de HNO <sub>3</sub> 14 mol L <sup>-1</sup> foi adicionado e levado a um banho termostático a 70 °C por 10 min a 250 rpm. Após o resfriamento as soluções das amostras foram diluídas para 25 mL. Após essa etapa, as amostras foram centrifugadas e filtradas, antes das determinações.			
Óleos comestíveis de mostarda, girassol, gergelim, amendoim, coco, arroz e milho.	Pb, Cu, Fe, Mn, Cd, Cr, Zn	Foi utilizado 1,0 g de amostra, seguido da adição de 2,5 mL de TMAH 25% (v/v) e 1,5 mL de EDTA 0,06 M. Em seguida o pH foi ajustado para 12 com 0,2 mL de HNO <sub>3</sub> concentrado. As soluções foram aquecidas em banho maria a 80°C por 20 min. As amostras foram	GFAAS	O uso do EDTA possibilitou a pré-concentração das impurezas traço e ultra traço nos óleos comestíveis. Desta forma, a combinação do TMAH com EDTA resultou em melhores limites de detecção quando comparado aos obtidos pelo método de digestão por micro-ondas.	MANJUSHA; SHEKHAR; KUMAR (2019)

Tabela 1 - Aplicações do hidróxido de tetrametilamônio para extração elementar em amostras biológicas.

(conclusão)

Amostra	analitos	procedimentos	técnicas	observações	referência
		submetidas a ondas de ultra-som durante 30 min. Após essa etapa as amostras foram aferidas a 5 mL e centrifugadas por 10 min, para então realizar as determinações.			

Fonte: Autor.

Esse tipo de preparo de amostra tem-se tornado uma alternativa particularmente atrativa, devido ao fato de requer apenas um aquecimento simples, geralmente realizado em banho maria. Nesse sentido, é dispensado a utilização de sistemas de decomposição de alto custo de aquisição e manutenção, como fornos de microondas de alta eficiência, os quais são geralmente utilizados (NUNES et al., 2013).

Desta forma, a utilização do TMAH pode representar uma alternativa para os métodos de preparo de amostra tradicionais, como a decomposição em meio ácido, devido à algumas vantagens do método, como a geração de resíduos menos perigosos, menor volume de reagente necessário, utilização de equipamentos laboratoriais de baixo custo, como o banho maria, além de baixa susceptibilidade à contaminação, devido a menor manipulação da amostra (IAQUINTA et al., 2020; NUNES et al., 2013).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Inicialmente este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, e somente foi iniciado após sua aprovação. Desta forma, os pacientes ou seus responsáveis foram primeiramente informados sobre a pesquisa e devidamente orientados sobre os objetivos, desenvolvimento e procedimentos a serem adotados durante a realização do trabalho, conforme o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (apêndice A) e o Termo de Assentimento (apêndice B). Desse modo, o paciente ou seu responsável estando de acordo com a participação voluntária, leram e assinaram os termos de Livre Consentimento Livre e Esclarecido e o termo de Assentimento. Além disso, foi garantido o sigilo e confidencialidade das informações dos pacientes, conforme o termo assinado pelos pesquisadores (apêndice C). Também foi aplicado um questionário, no qual foram coletadas algumas informações dos pacientes como idade, sexo, peso, condição clínica e características da alimentação, conforme apêndice D.

#### 3.2 COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras foram coletadas junto ao Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), no período de maio a novembro de 2021. Ao total 24 pacientes participaram voluntariamente da pesquisa, sendo 12 pessoas do sexo feminino e 12 do sexo masculino, entre idades de 2 a 26 anos e que estavam em diferentes fases do tratamento contra a LLA.

O sangue foi coletado no laboratório de Hemato-Oncologia do HUSM, por profissionais da área, que já estavam previamente capacitados para o procedimento. O sangue foi coletado e armazenado em tubos para coleta a vácuo (Vacutainer), de polietilentereftalato e tampa de borracha butílica, que contém reagente  $K_3$ -EDTA, o qual inibe a coagulação do sangue e promove preservação da amostra por um maior período.

Desta forma, após a realização dos exames de rotina seguidos pelo protocolo do hospital, as amostras de sangue foram repassadas aos responsáveis por essa pesquisa.

Conforme o protocolo de tratamento seguido pelo hospital, os pacientes com LLA, fazem coleta para o hemograma de forma semanal, quinzenal ou mensal, de acordo com a respectiva etapa do tratamento. Assim sendo, não foi necessário realizar coletas extras para o desenvolvimento do trabalho e o material utilizado material seria descartado.

Foram adquiridas um total de 80 amostras de sangue, referentes a 5 diferentes etapas da quimioterapia, além de amostras de pacientes antes de iniciarem o tratamento e pacientes já fora do tratamento. De acordo com o protocolo seguido pelo hospital, as 5 fases do tratamento contra a LLA incluem:

- Terapia de Indução (IND): indica o início do tratamento, no qual são administrados quimioterápicos a fim de causar a destruição das células cancerígenas. Para essa fase, o conjunto amostral N foi igual a 10, sendo 7 do sexo masculino e 3 do sexo feminino.
- Terapia de Consolidação da Remissão (CoRem): essa etapa ocorre junto com a indução, na sequência direto, e tem por objetivo atingir a remissão. Para a comprovação da remissão é necessário que nenhuma célula cancerígena seja detectada na medula óssea, ou porcentagem de blastos na medula óssea deve ser menor do que 5%, e a contagem de células sanguíneas volta ao normal. Nessa fase o N amostral foi igual a 8, sendo 6 amostras de pacientes do sexo masculino e 2 do sexo feminino.
- Intensificação (INT): nessa etapa são administradas maiores dosagens dos quimioterápicos, a fim de destruir qualquer célula cancerígena remanescente no corpo do paciente. Para essa fase o N amostral foi igual a 9, sendo 7 pacientes do sexo masculino e 2 do sexo feminino.
- Consolidação Tardia (CTRD): essa etapa corresponde a uma repetição da terapia de indução mais a consolidação da remissão, de forma mais compacta, já preparando para a manutenção. Nessa fase o N amostral foi igual a 13, sendo 6 pacientes do sexo masculino e 7 pacientes do sexo feminino.
- Manutenção (MNT): nessa fase são administradas menores dosagens do quimioterápicos, apenas para evitar a recidiva da doença. Para essa fase o N amostral foi igual a 30, sendo provenientes de 6 pacientes do sexo masculino e 6 do sexo feminino.

Além disso, o N amostral correspondente a paciente antes do início do tratamento (AnTr) foi igual a 7, sendo todos do sexo masculino. Já o N amostral para paciente fora do tratamento (FT) foi igual a 3, sendo todos provenientes de pacientes do sexo feminino.

### 3.3 TRANSPORTE E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras de sangue coletadas pela equipe do HUSM, já possuíam uma quantidade de anticoagulante ( $K_3$ -EDTA), necessário para evitar a coagulação do sangue. Desta forma, após serem coletas, as amostras foram guardadas sob refrigeração até serem disponibilizadas para os responsáveis por essa pesquisa. Em seguida à disponibilização, as amostras foram transferidas do HUSM até o Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais, localizado no prédio 21 da UFSM, onde foram mantidas refrigeradas abaixo de 10 °C até o momento do preparo da amostra.

As diretrizes seguidas para realização do transporte e armazenamento de amostras biológicas estão descritas no Manual de Vigilância Sanitária para transporte de sangue e componentes no âmbito da hemoterapia, publicado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2016) e também pelo *Manual of the management, maintenance and use of blood cold chain equipments*, descrito pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2005).

### 3.4 PREPARO DA AMOSTRA

#### 3.4.1 Solubilização em meio alcalino

Para os testes de solubilização em meio alcalino o Hospital Universitário de Santa Maria, cedeu gentilmente, uma bolsa de concentrado de hemácias, a qual se difere de uma bolsa de sangue total por não conter plasma sanguíneo. Desta forma, foram realizados testes preliminares para verificar a eficiência de solubilização. Para tanto, foi feita uma adaptação do método descrito por Nunes et al. (2013), que se baseia na solubilização de amostra biológica, nesse caso carne, utilizando hidróxido de tetrametilamônio.

Para os testes de solubilização de sangue, foram utilizados frascos de polipropileno de fundo cônico, com capacidade para 5 mL de volume (CRAL<sup>®</sup>), resistentes a variação de temperatura até 121 °C, conforme descrito pelo fabricante. Para a solubilização foi utilizado o hidróxido de tetrametilamônio 25% (v/v) em água (Merck, Hohenbrunn, Alemanha) e para o aquecimento das amostras por meio de banho maria foi utilizado uma chapa de aquecimento (modelo 752A, Fisatom, Brasil).

Desta maneira, foram realizados testes com a adição de um volume fixo de sangue total de 100 µL e adições de 100 e 200 µL de TMAH. Também foi avaliada a necessidade de

aquecimento das soluções, assim como o tempo de repouso da amostra com o TMAH, conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2 - Condições experimentais para os testes de solubilização com TMAH.

Frasco	Massa de amostra (mg)	Reagente	Tempo de repouso	aquecimento
1	100	100 $\mu$ L de TMAH, 25% (v/v)	15 minutos	80 °C / 1 hora
2	100	200 $\mu$ L de TMAH, 25% (v/v)	15 minutos	80 °C / 1 hora
3	100	100 $\mu$ L de TMAH, 25% (v/v)	24 horas	-
4	100	200 $\mu$ L de TMAH, 25% (v/v)	24 horas	-

Fonte: autor.

Após o tempo de repouso ou aquecimento, conforme descrito acima, as amostras foram aferidas a 5 mL com ácido nítrico grau P.A. (65%, 14,4 mol L<sup>-1</sup>, Dinâmica, Indaiatuba, São Paulo) purificado em sistema de destilação abaixo do ponto de ebulição (duoPUR, Subboiling Distillation System, Milestone, Itália), a 5% (v/v), para reduzir o pH e evitar a formação de hidróxidos metálicos (BATISTA et al., 2009). Ao final dessa sequência, foi observado o aspecto das soluções finais, afim de identificar a solubilização das amostras.

### 3.4.2 Decomposição por via úmida em meio ácido com aquecimento por radiação microondas

Para a decomposição em meio ácido foi seguido o método descrito por Coradini (2019), o qual se baseia na utilização de ácido nítrico e aquecimento por radiação microondas em sistema aberto para a decomposição de sangue total.

A decomposição foi feita em frascos de polipropileno de fundo cônico (CRAL<sup>®</sup>), onde foram transferidos um volume de 250  $\mu$ L de sangue total, de cada amostra em triplicata (N = 3), seguido da adição de 1,0 mL de ácido nítrico grau P.A. (65%, 14,4 mol L<sup>-1</sup>, Dinâmica, Indaiatuba, São Paulo) purificado em sistema de destilação abaixo do ponto de ebulição. Após repouso da amostra por 2 horas foi adicionado 1,0 mL de peróxido de hidrogênio 30% grau P.A., (Merck, Darmstadt, Alemanha), diluído para 10% (v/v). Para a etapa de irradiação, os frascos foram dispostos em uma estante para tubos tipo Falcon, em polipropileno, com capacidade para 30 frascos de 5 mL. Contudo, foram utilizadas apenas 15 posições, mantendo

uma posição livre entre cada frasco, para evitar possíveis contaminações cruzadas, caso ocorressem projeções da amostra no momento da irradiação, já que os frascos permaneceram semiabertos durante toda a decomposição para não correr o risco de aumento da pressão interna dos tubos e explosões.

Para o aquecimento foi utilizado um microondas convencional (Eletrolux<sup>®</sup>), com espaço interno de 34 L e potência máxima de 1300 W. Desta maneira, foram feitos 15 ciclos de aquecimento de 20 segundos, e intervalos de arrefecimento também de 20 segundos. Entretanto foi utilizado apenas 60% da potência do microondas, pois conforme descrito por Coradini (2019) temos nesse caso uma condição segura para o operador e menor risco de contaminações cruzadas entre as amostras, já que com maiores potências houve superaquecimento dos frascos e projeção da amostra. Após a decomposição, as amostras foram aferidas a 5 mL, com água ultrapura, previamente destilada, deionizada em coluna de troca iônica e posteriormente purificada em sistema de Milli-Q (Milipore, Estados Unidos), com resistividade de 18,2 M $\Omega$  cm.

### 3.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ELEMENTOS NAS AMOSTRAS

Conforme relatado na literatura, elementos como Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Rb, Se, Sn, Sr, V e Zn são considerados oligoelementos essenciais ou então possíveis elementos essenciais que fazem parte de sistemas bioquímicos importantes no corpo humano (ARAS; ATAMAN, 2007; BHATTACHARYA; MISRA; HUSSAIN, 2016; CARVALHO et al., 2015; FRIEDEN, 1985; LOMBECK et al., 1980). Sabendo disso, esses elementos foram escolhidos para posterior quantificação.

Por outro lado, elementos como Al, As, Ba, Cd, Pb e Sb são considerados elementos potencialmente tóxicos e já foram associados ao desenvolvimento de diferentes tipos de cânceres, como o câncer de mama, pulmão, pele, próstata e tumor neuroectodérmico (ARSLAN et al., 2011; BERTIN; AVERBECK, 2006; MARTINEZ et al., 2011; RONCATI et al., 2015; SAERENS et al., 2019; WALLACE, 2015). Atualmente as pessoas estão expostas diariamente a estes elementos, pois eles estão nos mais variados produtos industriais, como em antitranspirantes, cremes, utensílios domésticos, pesticidas, fertilizantes, alimentos contaminados e em fumaça de cigarro (WALLACE, 2015). Estudos revelam que estes elementos podem acabar se ligando ao DNA e causar danos na sua estrutura. Também podem se ligar seletivamente a enzimas e acabar modificando a expressão genica, além de poderem gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) (WALLACE, 2015; MARTINEZ et al., 2011).

Desta forma, os elementos Al, As, Ba, Cd, Pb e Sb também foram monitorados no sangue de pacientes com LLA, afim de identificar uma possível correlação entre a presença desses elementos e a patologia da LLA.

Para a quantificação desses elementos foi utilizado um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (modelo Elan DRC II, Perkin Elmer Sciex, Canadá) equipado com nebulizador concêntrico (Meinhard Associates, USA) e câmara de nebulização ciclônica do tipo "baffled" (Glass Expansion Inc., Australia), tocha de quartzo com tubo injeto de 2,0 mm de diâmetro interno e Argônio (99,999%, White Martins-Praxair, Brasil) foi usado para a geração do plasma. Na Tabela 3 estão descritas as condições instrumentais utilizadas nas determinações com ICP-MS, as quais foram adaptadas do trabalho descrito por Soares et al., (2016).

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

<b>Parâmetros</b>	<b>ICP-MS</b>
Potência do gerador de rádio frequência, W	1.300
Vazão de argônio principal, L.min <sup>-1</sup>	12,0
Vazão de argônio auxiliar, L.min <sup>-1</sup>	1,30
Vazão de argônio do gás nebulizador, L.min <sup>-1</sup>	1,00
Câmara de nebulização	Ciclônica
Nebulizador	Concêntrico
Cone de amostragem e skimmer	Pt
Dwell time, ms	20
Varreduras por replicata	5
Leituras por replicata	5
Replicatas	3

Fonte: autor.

Para a curva de calibração foi utilizada uma solução multielementar (SCP33MS, PlasmaCAL, Quebec, Canadá) em concentrações de 0,1 µg L<sup>-1</sup> até 40 µg L<sup>-1</sup>. Para verificar a exatidão da resposta do instrumento foi utilizada uma solução padrão de referência (NIST 1643f, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, USA) diluída em um fator de 10 vezes.

Para verificar se a matriz da amostra exercia algum tipo de efeito durante as determinações por ICP-MS foram feitas diluições de 10 e 20 vezes da amostra decomposta com a adição de 2,5 µg L<sup>-1</sup> da solução multielementar SCP33MS.

Elementos como o Ca, Fe, K e Mg também são essenciais para as atividades metabólicas e correto funcionamento do organismo (ARAS; ATAMAN, 2007; BHATTACHARYA; MISRA; HUSSAIN, 2016; CARVALHO et al., 2015). Desta forma, esses elementos foram determinados pela técnica de ICP OES, na qual foi utilizado um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (modelo Optima 4300 DV, Perkin Elmer, EUA), com vista axial e aquisição simultânea do sinal, equipado com câmera de nebulização ciclônica, e nebulizador concêntrico, tocha de quartzo com tubo injetor de alumina (2 mm d.i.), e argônio (99,999%, White Martins-Praxair, Brasil) foi usado para a geração do plasma. As condições operacionais utilizadas nas determinações com ICP OES, bem como os comprimentos de onda monitorados estão descritos na Tabela 4, as quais foram adaptadas do trabalho descrito por Neves (2018).

Tabela 4 - Condições instrumentais utilizadas para a determinação de elementos no sangue por ICP OES.

<b>Parâmetros</b>	<b>ICP OES</b>
Potência do gerador de rádio frequência, W	1.400
Vazão de argônio principal, L.min <sup>-1</sup>	15,0
Vazão de argônio auxiliar, L.min <sup>-1</sup>	0,2
Vazão de argônio do gás nebulizador, L.min <sup>-1</sup>	0,70
Câmera de nebulização	Ciclônica
Nebulizador	Concêntrico
Replicatas	3
Comprimento de onda espectral, nm	Ca (317,933) Mg (279,077) K (766,49) Fe (238,204)

Fonte: autor.

Para a curva de calibração foi utilizado uma solução multielementar SCP33MS, em concentrações de 1 a 100 µg L<sup>-1</sup> e uma solução multielementar (Merck IV, Certipur, Estados Unidos), em concentrações de 250 a 10.000 µg L<sup>-1</sup>. A exatidão da resposta do instrumento foi verificada com uma solução padrão de referência (NIST 1643f) diluída em um fator de 10 vezes. Para identificar possíveis efeitos de matriz na determinação dos elementos, foram feitas diluições de 10 vezes com a adição de concentrações entre 180 a 2400 µg L<sup>-1</sup> da solução multielementar SCP33MS e Merck IV. Além disso, foram feitas diluições de 10 vezes e adição de padrão de referência NIST 1643f diluído 10 vezes.

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para ambas as técnicas foram estimados a partir da média de 10 leituras do branco amostral, onde o desvio padrão (SD) da medida foi multiplicado por 3 e a média das leituras do branco foi somada a esse produto ( $LOD = \text{Branco} + 3SD$ ). Para o limite de quantificação o desvio padrão foi multiplicado por 10 e a média das leituras do branco foi somada a esse produto ( $LOQ = \text{Branco} + 10SD$ ).

### 3.6 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS RESULTADOS

Para a análise estatística dos resultados foi utilizado o *Software R* (R Core Team, 2021). Para tanto, foi aplicado o Teste ANOVA *one-way*, para avaliar se as médias de concentração dos analitos diferiram entre si, considerando um nível de confiança de 95%. Em casos em que os resultados apresentaram diferenças significativas, foi aplicado o teste de Tukey para identificar entre quais etapas as médias de concentração variaram significativamente. Além disso foi usado o *software* ChemoStat<sup>®</sup> (versão 2.0.0.1), para realizar uma análise multivariada dos dados por meio da construção de modelos de componentes principais (PCA). Através da elaboração destes modelos buscou-se identificar a formação de grupos entre as fases do tratamento e que se assemelham de acordo com a concentração dos elementos investigados.

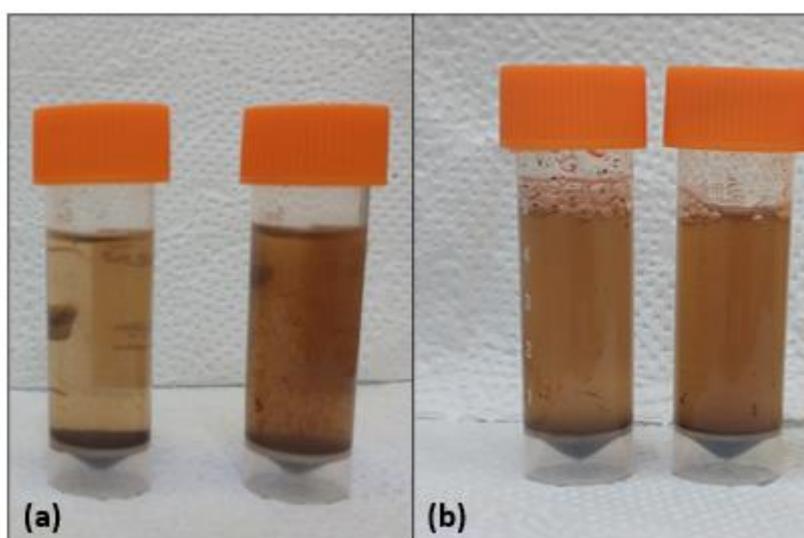
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 SOLUBILIZAÇÃO EM MEIO ALCALINO

A metodologia proposta nesse trabalho, mostrou algumas vantagens quando comparada a digestão em meio ácido, como a menor manipulação da amostra, menor quantidade de reagente usado, além da vantagem de ser necessário apenas instrumentos simples e de baixo custo para o aquecimento, nesse caso um comum sistema de banho maria. Estando assim de acordo com o que foi descrito por Batista et al. (2009), o qual fez a determinação de oligoelementos em amostras biológicas com o uso de TMAH para solubilização e quantificação por ICP-MS.

No ensaio realizado com 100 mg de sangue total e adição de 100 e 200  $\mu\text{L}$  de TMAH (25%), seguido de repouso por 15 minutos mais banho maria a 80°C por 1 hora e no teste realizado com 100 mg de sangue total e adição de 100 e 200  $\mu\text{L}$  de TMAH (25%), seguido de repouso por 24 horas, foi possível observar que ambas as soluções finais se mostraram turvas e com presenças de material suspenso, conforme é apresentado na Figura 1.

Figura 1- Testes realizados com solubilização em meio alcalino. (a) – 100 mg de sangue total + 100 e 200  $\mu\text{L}$  de TMAH (25%) + repouso / 15 min + banho maria a 80 °C / 1 hora; (b) – 100 mg de sangue total + 100 e 200  $\mu\text{L}$  de TMAH (25%) + repouso / 24 horas.



Fonte: autor.

Apesar desse método de preparo ter se mostrado mais simples e rápido do que a decomposição em meio ácido, a má solubilização da amostra impossibilitou a introdução da solução no ICP-MS. Conforme destacado por Nunes et al. (2013), esse tipo de preparo de amostra resulta em soluções opacas e com presença de partículas sólidas, o que pode gerar efeitos de matriz durante as determinações por ICP-MS e ICP OES. Entre os efeitos que a presença de matriz gera no ICP-MS podem ser destacados: a mudança nas características do aerossol, que afeta a distribuição do tamanho das gotículas e diminui a eficiência de transporte do aerossol. Pode haver diminuição da eficiência do nebulizador e separação do aerossol na câmara de nebulização, dessa forma o número de gotículas que realmente resultam em íons no plasma sofre alteração. Além disso, um sério problema pode ocorrer quando há carbono na amostra é a deposição de material sólido, como a fuligem, nos cones da interface, o que acaba gerando supressão do sinal dos analitos. Além do mais, o carbono no plasma promove um mecanismo de transferência de carga, devido ao aumento na população de átomos e íons no estado excitado para alguns elementos (AGATEMOR; BEAUCHEMIN, 2011).

#### 4.2 DECOMPOSIÇÃO EM MEIO ÁCIDO

Conforme descrito anteriormente, a presença de carbono remanescente na amostra pode acabar contribuindo para a geração de interferências nas determinações. Sabendo disso, é imprescindível que se faça a determinação do carbono remanescente na solução a ser analisada. De acordo, com Coradini (2019) o método de preparo de amostra utilizado em seu trabalho para decompor sangue, deixa aproximadamente  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  de carbono na solução. Entretanto, é observado que na análise por ICP-MS apenas concentrações de carbono acima de  $5000 \text{ mg L}^{-1}$  gera interferências perceptíveis de matriz, transporte ou ionização (GRINDLAY, 2013).

Contudo, antes de prosseguir com as determinações ainda foi verificado se de fato nenhum componente da matriz está gerando interferências. Desta forma, verificou-se que a recuperação para os analitos determinados por ICP-MS, quando realizadas diluições de 10 e 20 vezes com adição equivalente a  $2,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  da solução de referência (SCP33MS) na solução da amostra variaram de 89 a 111% e estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Avaliação do efeito de matriz durante as determinações elementares empregando ICP-MS, por meio do teste de diluição da solução da amostra e teste de recuperação dos analitos na amostra decomposta em meio ácido (N = 3).

Elemento	Recuperação (%)	
	Amostra 20X + 2,5 µg L <sup>-1</sup> (SCP33MS)	Amostra 10X + 2,5 µg L <sup>-1</sup> (SCP33MS)
<sup>27</sup> Al	89	97
<sup>51</sup> V	96	97
<sup>52</sup> Cr	100	97
<sup>55</sup> Mn	100	98
<sup>59</sup> Co	96	94
<sup>62</sup> Ni	97	97
<sup>63</sup> Cu	96	97
<sup>68</sup> Zn	111	98
<sup>75</sup> As	91	92
<sup>82</sup> Se	91	95
<sup>85</sup> Rb	99	99
<sup>88</sup> Sr	100	100
<sup>98</sup> Mo	101	93
<sup>111</sup> Cd	98	96
<sup>118</sup> Sn	99	99
<sup>121</sup> Sb	96	96
<sup>138</sup> Ba	95	98
<sup>208</sup> Pb	101	99

Fonte: autor.

O mesmo teste foi realizado para as determinações por ICP OES, contudo os elementos K, Ca e Mg não foram possíveis de serem determinados devido à alta contaminação nos frascos de coleta de sangue e decomposição das amostras. O mesmo tinha sido relatado por Coradini (2019). Desta forma, apenas o Fe foi determinado e feito teste de recuperação o qual está apresentado na Tabela 6.

Tabela 6 - Avaliação do efeito de matriz durante as determinações elementares empregando ICP OES, por meio do teste de diluição da solução da amostra e teste de recuperação do analito na amostra decomposta em meio ácido (N = 3).

Elemento	Recuperação (%)	
	Amostra 10X + 2.400 µg L <sup>-1</sup> (SCP33MS)	Amostra 10X + NIST 1643f 10X
Fe	108	93

Fonte: autor.

A partir das taxas de recuperação obtidas foi possível verificar que a matriz não interfere nas determinações, tanto em ICP-MS como em ICP OES. Desta forma, as amostras foram analisadas diluindo-se somente 10 vezes.

#### 4.3 DETERMINAÇÃO DOS ELEMENTOS EM SANGUE

Conforme já descrito, as amostras de sangue foram analisadas em triplicata ( $N = 3$ ), e os valores referentes ao erro relativo não ultrapassaram 10% da margem de erro. Na tabela 7 estão apresentados os valores referentes aos limites de detecção e quantificação dos elementos determinados pela técnica de ICP-MS.

Tabela 7 - Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) dos elementos pela técnica de ICP-MS.

Elemento	LOD ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
<sup>27</sup> Al	0,739	0,754
<sup>51</sup> V	0,0004	0,0009
<sup>52</sup> Cr	0,0114	0,0147
<sup>55</sup> Mn	0,0464	0,0470
<sup>59</sup> Co	0,0002	0,00003
<sup>62</sup> Ni	0,0049	0,0114
<sup>63</sup> Cu	0,0116	0,0118
<sup>68</sup> Zn	0,3361	0,3505
<sup>75</sup> As	0,0014	0,0022
<sup>82</sup> Se	0,0399	0,0515
<sup>85</sup> Rb	0,00002	0,00008
<sup>88</sup> Sr	0,0026	0,0027
<sup>98</sup> Mo	0,00008	0,0003
<sup>111</sup> Cd	0,00006	0,0002
<sup>118</sup> Sn	0,0016	0,0020
<sup>121</sup> Sb	0,00007	0,0002
<sup>138</sup> Ba	0,0175	0,0194
<sup>208</sup> Pb	0,0024	0,0025

Fonte: autor.

Em comparação com outros trabalhos descritos na literatura, Laur, et al. (2020) fizeram a quantificação por ICP-MS de alguns elementos essenciais em sangue total de recém nascidos e de lactantes e obtiveram limites de quantificação para Mg, Cu, Zn e Se de  $1,50 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $5,50 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $9,50 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $24,20 \mu\text{g L}^{-1}$  respectivamente. No método proposto por eles,  $100 \mu\text{L}$  de sangue total foi solubilizado em  $200 \mu\text{L}$  de  $\text{HNO}_3$ , 65% (v/v) e  $100 \mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , seguido de incubação por 90 min a  $60^\circ\text{C}$ . Em outro estudo realizado por Tanvir et al. (2020), foram obtidos limites de quantificação para V, Mn, Co, Cu, As, Zn, Se, Sr, Cd e Pd de  $0,04 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $0,23 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $0,007 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $2,77 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $0,04 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $15,03 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $0,42 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $0,21 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $0,06 \mu\text{g L}^{-1}$  e

0,19  $\mu\text{g L}^{-1}$  respectivamente. Nesse estudo, foi realizada a digestão ácida de 100  $\mu\text{L}$  de sangue total e 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{HNO}_3$  ultrapuro e posterior quantificação por ICP-MS.

Para o elemento Fe, o qual foi determinado pela técnica de ICP OES, os limites de detecção e quantificação foram de 15,0  $\mu\text{g g}^{-1}$  e 17,5  $\mu\text{g g}^{-1}$  respectivamente. Em comparação a outros estudos realizados, Harrington et al. (2014) obtiveram limites de detecção e de quantificação para o Fe de 1460  $\text{ng mL}^{-1}$  e 10.000  $\text{ng mL}^{-1}$  respectivamente. Nesse estudo, os autores realizaram a digestão ácida de 250  $\mu\text{L}$  de sangue total com 1 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado e 750  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% (v/v) e posterior quantificação por ICP OES.

Na literatura poucos trabalhos avaliam a variação de uma maior gama de oligoelementos no sangue de pacientes com LLA e que estejam em diferentes fases do tratamento. É possível verificar que muitos trabalhos medem apenas a variação de elementos antes de iniciar o tratamento e após a quimioterapia. Neste sentido, Zekavat et al. (2021), avaliaram a concentração de elementos como o Fe, Zn, Cu, Mg, Mn e Cr em pacientes com LLA, antes e após concluírem o tratamento. Nesse estudo, eles observaram que todos os elementos tiveram uma redução considerável ao término do tratamento, e que de acordo com os autores isso pode estar associado a falta de alimentação complementar e saudável. Já em outro estudo, realizado por Demir et al. (2011), os níveis séricos de Zn, Mg e Mn foram menores em pacientes recém diagnosticados com leucemia aguda do que em pessoas que não estavam em tratamento. No entanto os níveis séricos de Cu, Pb e Cd foram significativamente maiores nos pacientes com leucemia aguda, do que no grupo controle. Para o Fe e o Co não foi observado diferença significativa entre os dois grupos.

Nas amostras de sangue decompostas em meio ácido neste estudo, foi possível quantificar os oligoelementos V, Cr, Mn, Cu, Zn, Se, Rb, Sr e Fe, visto que os demais estavam abaixo do LOQ. Desta forma, os resultados obtidos foram inseridos no *software R* para realização dos testes estáticos. Na Tabela 8 estão resumidos os dados obtidos para cada variável, no qual são apresentados os valores mínimos e máximos, a média e o desvio padrão das concentrações para cada fase do tratamento.

Tabela 8 - Resumo dos resultados referentes aos valores mínimos, máximos, médios e o desvio padrão das concentrações para os elementos essenciais determinados em diferentes fases do tratamento contra a LLA.

V					Cr				
Fase	Média ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	SD ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	min	máx	Fase	Média ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	SD ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	min	máx
AntTr	0,0093	0,0091	0	0,021	AntTr	0,617	0,048	0,576	0,707
IND	0,0084	0,0113	0	0,026	IND	0,628	0,207	0,059	0,789
CoRem	0,0144	0,0124	0	0,027	CoRem	0,693	0,044	0,631	0,748
INT	0,0108	0,0079	0	0,019	INT	0,624	0,151	0,319	0,826
CTRD	0,0116	0,0093	0	0,028	CTRD	0,656	0,219	0,088	0,896
MNT	0,0139	0,0112	0	0,035	MNT	0,726	0,176	0,057	0,970
FT	0,0143	0,0129	0	0,025	FT	0,738	0,237	0,464	0,887
Mn					Cu				
Fase	Média ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	SD ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	min	máx	Fase	Média ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	SD ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	min	máx
AntTr	0,046	0,043	0	0,090	AntTr	0,827	0,496	0	1,287
IND	0,052	0,045	0	0,118	IND	1,14	0,497	0,081	1,687
CoRem	0,054	0,065	0	0,172	CoRem	1,183	0,426	0,474	1,694
INT	0,068	0,048	0	0,124	INT	1,024	0,340	0,590	1,631
CTRD	0,048	0,047	0	0,162	CTRD	0,70	0,496	0	1,445
MNT	0,075	0,065	0	0,210	MNT	0,759	0,336	0	1,547
FT	0,063	0,06	0	0,120	FT	0,953	0,092	0,092	1,037
Zn					Se				
Fase	Média ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	SD ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	min	máx	Fase	Média ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	SD ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	min	máx
AntTr	2,378	2,281	0	4,868	AntTr	0,030	0,038	0	0,085
IND	3,286	2,960	0	7,783	IND	0,068	0,069	0	0,193
CoRem	2,841	2,470	0	6,009	CoRem	0,062	0,040	0	0,095
INT	4,004	1,139	2,303	5,981	INT	0,062	0,052	0	0,144
CTRD	3,154	2,019	0	6,670	CTRD	0,060	0,063	0	0,163
MNT	4,154	2,455	0	8,259	MNT	0,057	0,050	0	0,149
FT	5,090	1,036	3,90	5,795	FT	0,117	0,052	0,07	0,175
Rb					Sr				
Fase	Média ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	SD ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	min	máx	Fase	Média ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	SD ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	min	máx
AntTr	2,552	0,473	2,018	3,265	AntTr	0,006	0,010	0	0,021
IND	1,970	1,187	0,100	3,675	IND	0,005	0,010	0	0,027
CoRem	2,715	0,911	1,322	4,243	CoRem	0,011	0,012	0	0,025
INT	2,701	0,609	1,774	3,656	INT	0,008	0,013	0	0,035
CTRD	2,826	1,119	0,096	4,998	CTRD	0,005	0,008	0	0,022
MNT	2,726	0,910	0,078	4,983	MNT	0,009	0,013	0	0,038
FT	3,471	0,604	2,805	3,987	FT	0,008	0,014	0	0,024
Fe									
Fase	Média ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	SD ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	min	máx					
AntTr	301,207	51,567	248,266	396,272					
IND	296,936	42,714	243,240	375,158					
CoRem	269,995	34,815	214,240	310,096					
INT	303,556	82,599	180,494	424,299					
CTRD	634,555	121,209	154,176	540,277					
MNT	638,422	80,937	210,870	518,451					
FT	431,052	105,986	369,084	553,432					

Fonte: autor.

AntTr: antes do tratamento; IND: indução; CoRem: consolidação da remissão; INT: intensificação; CTRD: consolidação tardia; MNT: manutenção; FT: fora do tratamento.

Para identificar possíveis variações significativas na média entre cada etapa do tratamento foi realizado o teste Anova *One-way*, o qual permite fazer comparações das médias de 3 ou mais variáveis explanatórias. Desta forma, ao aplicar o teste, foi possível constatar que as médias de concentração dos elementos não tiveram variações significativas entre as fases do tratamento da LLA, com um nível de confiança de 95%, visto que o valor de  $p$  foi maior que 0,05. Apenas para o Fe foi identificada variação significativa ( $p < 0,05$ ) entre as fases de consolidação da remissão e manutenção e entre a consolidação da remissão e pacientes fora do tratamento. Conforme descrito na Figura 2, na fase de consolidação da remissão o grupo de pacientes teve a menor média de Fe no sangue, a qual acabou aumentando consideravelmente em pacientes na manutenção e fora do tratamento.

O aumento nos níveis de Fe no sangue está geralmente associado a transfusões recorrentes de concentrado de hemácias, que na pior das hipóteses pode levar a uma sobrecarga de ferro no organismo e, conseqüentemente, acabar gerando outras doenças. Entre elas estão a anemia falciforme, anemia aplásica refratária, síndromes mielodisplásicas, além de poder gerar recaídas em pacientes que tinham algum tipo de leucemia (BRISSOT, 2019). Estudos realizados por Olcay et al. (2014), identificaram que de 53 pacientes com LLA ou LMA, 75% apresentaram sobrecarga de Fe, antes do início do tratamento e após a quimioterapia. Nesses casos o nível de ferritina foi maior que  $1000 \text{ ng mL}^{-1}$ .

Indivíduos que não estão em tratamento quimioterápico absorvem normalmente de 1 a 2 mg de Fe por dia, já pacientes que recebem transfusão sanguínea, podem absorver de 8 a 16 mg de Fe por dia. Contudo, o corpo humano não consegue adaptar suas vias excretoras para eliminar o excesso de Fe e, conseqüentemente ele acaba acumulando-se nos tecidos. Inicialmente o excesso de Fe é armazenado intracelularmente na ferritina em macrófagos e em casos de continuidade da sobrecarga, ele acumula-se em células do parênquima hepático, do miocárdio e de órgãos endócrinos (BRASIL, 2018).

Para melhor observar as diferenças na variação das concentrações dos elementos em cada fase do tratamento, foram plotados gráficos do tipo *boxplot*, conforme a Figura 2, os quais estão separados por elementos. Nesses, as barras pretas de maior espessura representam a média dos resultados, e os limites dos retângulos cinzas indicam o 1º e 3º quartil, as linhas tracejadas indicam limites calculados matematicamente, visto que acima ou abaixo destes limites podem estar amostras que foram consideradas *outliers*.

Figura 2 - Gráficos do tipo boxplot, referente a variação da concentração dos elementos essenciais determinados ao longo das fases do tratamento contra a LLA.

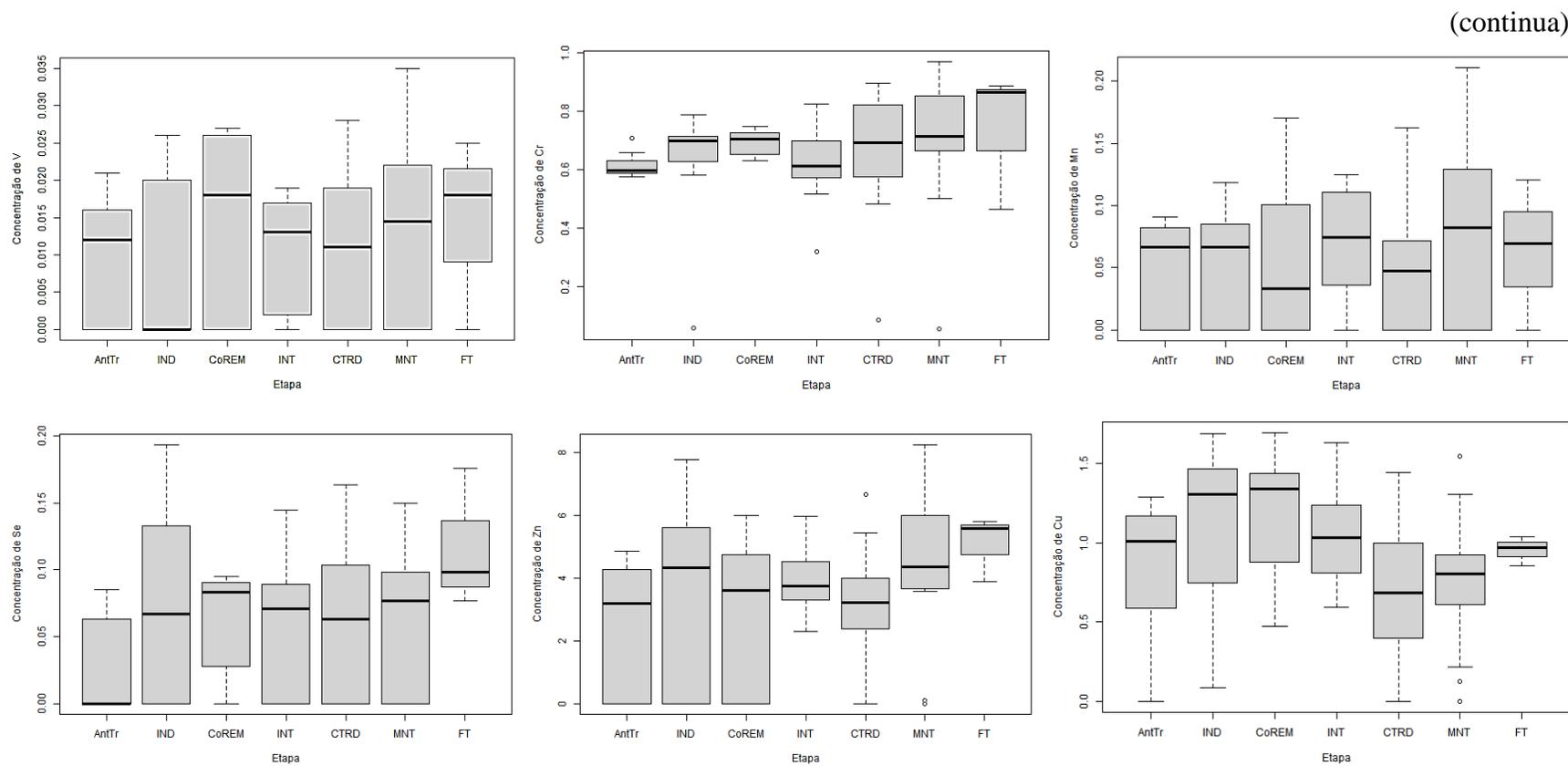
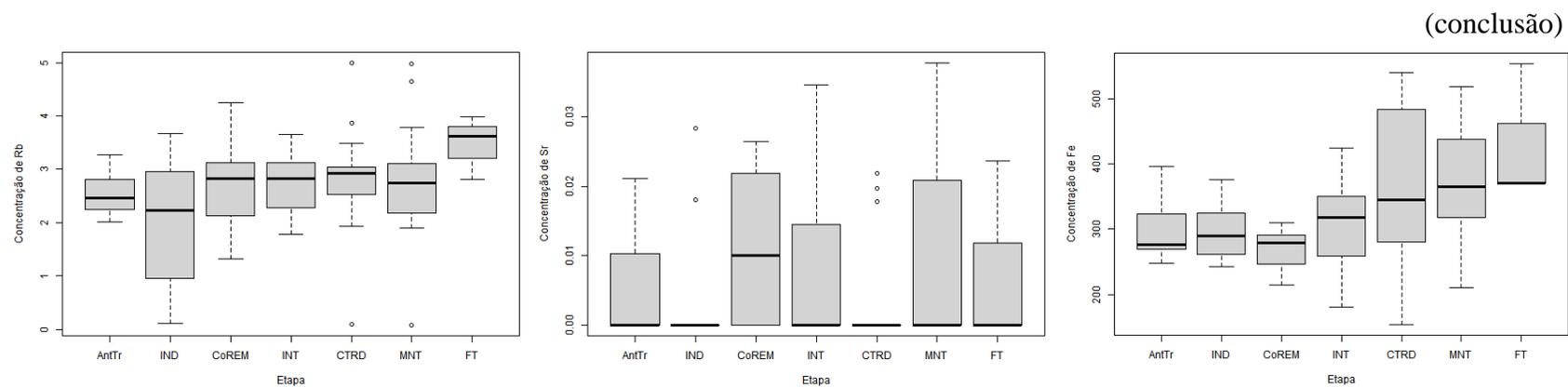


Figura 2 - Gráficos do tipo boxplot, referente a variação da concentração dos elementos essenciais determinados ao longo das fases do tratamento contra a LLA.



Fonte: autor.

Conforme apresentado nos gráficos boxplot, é possível identificar a falta de variação significativa na concentração da maioria dos elementos essenciais, exceto para o Fe. A não variação pode estar relacionada também as transfusões sanguíneas muito recorrentes durante o tratamento contra a LLA. desta forma, quando um paciente recebe uma transfusão sanguínea, a concentração dos elementos pode ser alterada indeterminadamente, o que acaba dificultando a observação de diferenças significativas.

Dos elementos potencialmente tóxicos avaliados, apenas As e Sb foram quantificados, visto que os demais elementos estavam abaixo do limite de quantificação. Na Tabela 9 estão apresentados os resultados obtidos para As e Sb, referentes aos valores mínimos, máximos a média e o desvio padrão das concentrações para cada fase do tratamento.

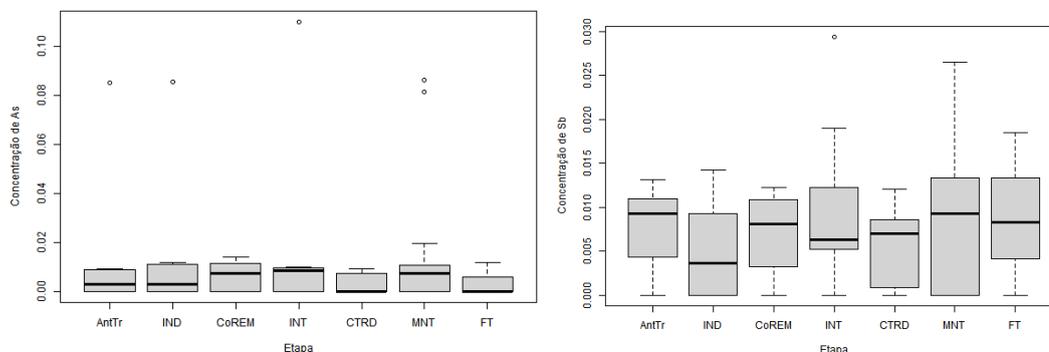
Tabela 9 - Resumo dos resultados referentes aos valores mínimos, máximos, médios e o desvio padrão das concentrações para os elementos potencialmente tóxicos determinados em diferentes fases do tratamento contra a LLA.

As					Sb				
Fase	Média ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	SD ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	min	máx	Fase	Média ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	SD ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	min	máx
AntTr	0,015	0,031	0	0,084	AntTr	0,006	0,004	0	0,013
IND	0,012	0,025	0	0,086	IND	0,005	0,004	0	0,013
CoRem	0,007	0,006	0	0,014	CoRem	0,007	0,004	0	0,011
INT	0,015	0,034	0	0,011	INT	0,010	0,005	0	0,028
CTRD	0,004	0,003	0	0,009	CTRD	0,006	0,009	0	0,012
MNT	0,011	0,021	0	0,085	MNT	0,007	0,005	0	0,025
FT	0,004	0,007	0	0,012	FT	0,009	0,008	0	0,017

Fonte: Autor.

Conforme comprovado pelo teste estatístico, as médias obtidas para os elementos potencialmente tóxicos em cada fase do tratamento não tiveram variações significativas ( $p < 0,05$ ). Pelo gráfico boxplot, apresentado na Figura 3, também é possível observar a baixa variação da concentração de As e Sb ao longo das fases do tratamento contra a LLA. Na literatura, poucos trabalhos relatam os níveis adequados de As e Sb no sangue, visto que geralmente esses elementos são monitorados pela análise de urina. Segundo o Conselho Nacional de pesquisa (EUA) é considerado normal um nível de arsênio na urina de 5 a 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Figura 3 - Gráficos do tipo boxplot referente a variação da concentração dos elementos potencialmente tóxicos ao longo das fases do tratamento contra a LLA.



Fonte: Autor.

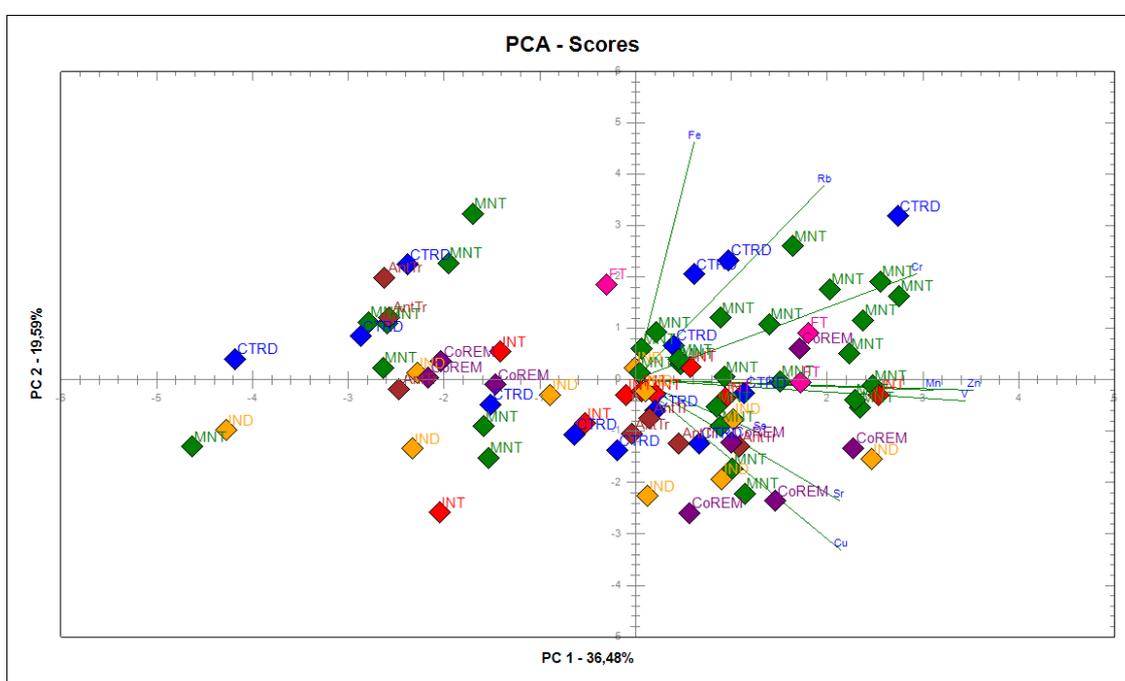
Sabe-se que a ingestão de As ocorre principalmente pela alimentação com frutos do mar. Contudo, no grupo estudado, 20 pacientes responderam que não costumam comer frutos do mar, e 4 pacientes comem apenas em datas especiais. Além disso, como pode ser observado na Figura 3, os níveis de As permaneceram praticamente inalterados durante todas as fases, o que pode indicar que esses pacientes não estavam expostos a condições ambientais ou alimentares que viessem a aumentar o nível de As no organismo.

O Sb pode ser absorvido facilmente por meio de alimentos, água, ar e remédios. Na literatura Squadrone et al. (2019), verificaram que pessoas saudáveis possuíam um nível de Sb no sangue em média de  $4,4 \mu\text{g L}^{-1}$ . Conforme os resultados obtidos nesta pesquisa, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de Sb dos pacientes com LLA, indicando desta forma que este elemento, neste caso específico, não foi um agravante na patologia da LLA, e os pacientes não estiveram expostos a dosagens elevadas de Sb.

Além disso, também foram construídos histogramas de distribuição normal dos dados, os quais estão apresentados no ANEXO 1. Os histogramas por sua vez representam a frequência com que os diferentes valores de concentração são determinados. Desta forma, quanto mais alta a barra, mais frequente é aquele intervalo de concentração. Os histogramas não estão segmentados por fase de tratamento, mas mostram como os 80 valores medidos se distribuem para cada elemento. Com base nos histogramas foi possível identificar que dos elementos essenciais apenas Cr, Cu, Rb e Fe tiveram uma distribuição normal. Já os elementos V, Mg, Zn, Se e Sr não possuíram uma distribuição normal dos valores. Para os elementos não essenciais quantificados As e Sb pode-se verificar que ambos não tiveram uma distribuição normal dos dados.

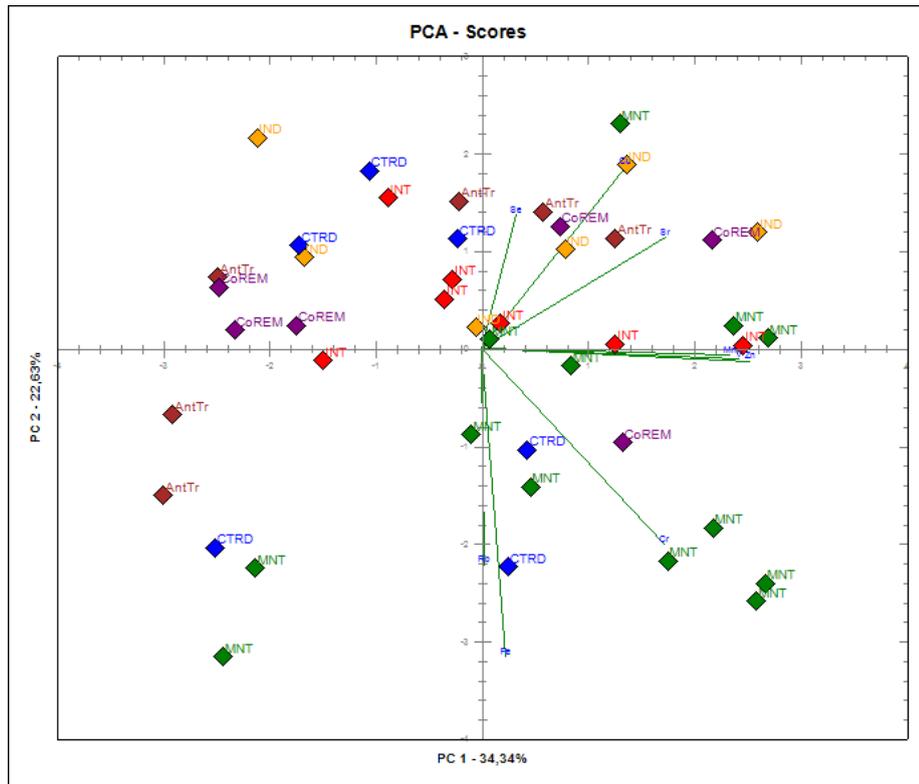
Para melhor elucidar a variação dos elementos no sangue dos pacientes com LLA, foi realizado a análise de componentes principais (PCA), onde foram construídos três modelos de PCA. Para tanto, foram considerados apenas os oligoelementos, afim de identificar possíveis diferenças nas variações elementares no grupo total de pacientes e entre meninos e meninas. No primeiro modelo, demonstrado na Figura 4, trabalhou-se com todos os 80 resultados obtidos, provenientes do total de pacientes que participaram da pesquisa. Na Figura 5 está apresentado o modelo de PCA referente apenas a amostras de pacientes do sexo masculino e na Figura 6 é mostrado o modelo de PCA referente a amostras de pacientes do sexo feminino.

Figura 4 - Modelo de PCA referente a distribuição dos elementos no sangue em todos os pacientes.



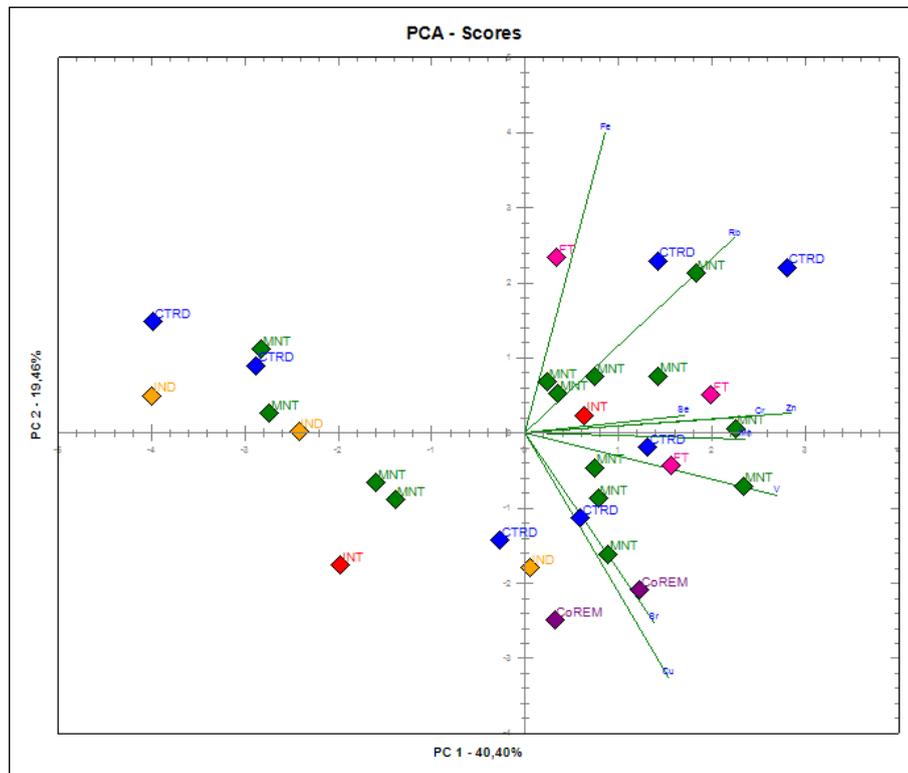
Fonte: autor.

Figura 5 - Modelo de PCA referente as amostras de sangue de pacientes do sexo masculino.



Fonte: autor.

Figura 6 - Modelo de PCA referente as amostras de sangue de pacientes do sexo feminino.



Fonte: autor.

De acordo com as PCAs construídas, é possível observar que não houve separação dos grupos que indicavam uma mesma fase do tratamento. Esse padrão se repetiu para todos os modelos, o que confirma novamente que não houve variações significativas na concentração dos elementos. Contudo, pode-se observar uma correlação entre algumas variáveis, na Figura 4 observa-se que Fe, Rb e Cr estão no lado positivo da PC1, Mn, Zn e V ficaram sobre o eixo positivo da PC1 e Se, Sr e Cu ficaram no lado negativo da PC2. Com isso podemos identificar que estas variáveis possuem correlações entre o grupo a qual pertencem, ou seja aumentam juntas. A mesma separação é observada na Figura 5, para os pacientes do sexo masculino. Na Figura 6 é observado correlações entre Sr, Cu e V, que ficaram do lado negativo da PC2, Cr, Zn, Se e Mn que ficaram sobre o eixo positivo da PC1, e Fe e Rb que ficaram do lado positivo da PC1. Entretanto, ainda não existem pesquisas que abordem a relação entre estes elementos.

O fato de não haver diferenças nos níveis de oligoelementos no sangue de pacientes com LLA, pode estar relacionado a diversos fatores, como a alimentação, as influencias ambientais da região onde o paciente reside, e principalmente as transfusões sanguíneas que são realizadas ao longo do tratamento, desta forma sempre que um paciente recebe uma transfusão sanguínea, os níveis do oligoelementos podem aumentar ou diminuir, e com isso torna-se difícil observar de fato se há variações desses elementos no sangue.

## 5 CONCLUSÕES

Ao final desta pesquisa foi possível concluir que no grupo estudado os oligoelementos (V, Cr, Mg, Cu, Zn, Se, Rb e Sr) não apresentaram diferenças significativas entre as fases do tratamento. Apenas o elemento Fe obteve um aumento significativo entre as fases de consolidação da remissão e manutenção, e entre a fase de consolidação da remissão e pacientes fora do tratamento. Este aumento está geralmente associado a transfusões sanguíneas que são realizadas durante as fases do tratamento da LLA, e muitas vezes pode acarretar em uma sobrecarga de ferro no organismo do paciente. Consequentemente, podem ser desencadeadas outras doenças pelo fato do corpo humano não conseguir se adaptar para excretar o excesso de ferro recebido.

O fato de não ocorrer diferenças significativas nos níveis dos outros oligoelementos pode estar relacionado a diversos fatores, como a alimentação, características ambientais da região onde o paciente reside, como o ar, solo, água, entre outros. Além disso, tem-se as transfusões sanguíneas, as quais, independente da fase de tratamento em que o paciente esteja, podem gerar aumento ou diminuição dos níveis elementares. Também, cabe destacar que o ideal seria investigar os mesmos pacientes ao longo de todas as fases de tratamento, para que assim se tenha de fato uma comparação adequada de possíveis variações dos oligoelementos, o que nesta pesquisa não foi possível avaliar.

Os níveis dos elementos não essenciais que foram quantificados (As e Sb) também não apresentaram variações significativas, o que indica que possivelmente os pacientes não estavam expostos a presenças elevadas destes elementos durante o período de estudo. Consequentemente, não foram observadas possíveis correlações entre estes elementos e a LLA.

Para a solubilização em meio alcalino foi possível verificar que este método é de fato mais rápido, utiliza um menor volume de reagente e requer instrumentos simples e de baixo custo. Porém, para a solubilização de sangue ele não se mostrou eficiente, visto que a solução final tem aspecto turvo e com material suspenso. Desta forma, não foi possível analisar a amostra por ICP-MS.

Por outro lado, a decomposição empregando ácido nítrico, conforme descrito por Coradini (2019), foi apropriada para as determinações dos elementos estudados. Isto foi confirmado através de testes de adição e recuperação dos analitos e por diferentes fatores de diluição, onde foram verificadas recuperações da ordem de 89 a 111%.

## REFERÊNCIAS

- AKHGARJAND, C. et al. Comparing serum levels of zinc, copper, certain antioxidant vitamins and dietary intakes in acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients before and after chemotherapy. **American Journal of Blood Research**, v. 8, n. 3, p. 21, 2018.
- ALVARNAS, J. C. et al. Acute lymphoblastic leukemia, version 2.2015. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 13, n. 10, p. 1240-1279, 2015.
- AMMANN, A. A. Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS): a versatile tool. **Journal of Mass Spectrometry**. v. 42, p. 419–427, 2007.
- ARAS, N. K.; ATAMAN, O. Y. **Trace element analysis of food and diet**. Royal Society of Chemistry, 2007, 362 p.
- ARSLAN, M. et al. Trace elements, heavy metals and other biochemical parameters in malignant glioma patients. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 12, n. 2, p. 447-451, 2011.
- Associação brasileira de Linfoma e Leucemia. **Manual – LLA: Tudo sobre a Leucemia Linfóide Aguda**. 2020. Disponível em: < <https://www.abrale.org.br/wp-content/uploads/2020/11/Manual-de-LLA.pdf> >. Acesso em: 07 fev. 2022.
- BATISTA, B. L. et al. Determination of trace elements in biological samples by inductively coupled plasma mass spectrometry with tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature. **Analytica Chimica Acta**, v. 646, n. 1-2, p. 23-29, 2009.
- BEAUCHEMIN, D. (Ed.). **Sample Introduction Systems in ICP-MS and ICP OES**. Newnes, 2020.
- BERTIN, G.; AVERBECK, D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). **Biochimie**, v. 88, n. 11, p. 1549-1559, 2006.
- BHATTACHARYA, P. T.; MISRA, S. R.; HUSSAIN, M. Nutritional aspects of essential trace elements in oral health and disease: an extensive review. **Scientifica**, v. 2016, 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Conjunta nº 7, de 23 de fevereiro de 2018. Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Sobrecarga de Ferro. Brasília, 2018.
- BRASIL. VIGILÂNCIA SANITÁRIA: **Manual de Vigilância Sanitária para o transporte de Sangue e Componentes no âmbito da hemoterapia**. 2. Ed, 2016.
- BRISSOT, E. et al. Too much iron: A masked foe for leukemias. **Blood Reviews**, v. 39, p. 100617, 2020.
- BUITENKAMP, T. D. et al. Acute lymphoblastic leucemia in children with Down syndrome: a retrospective analysis from the Ponte di Legno study group. **Blood**, v. 123, n. 1, 2014.

CARVALHO, D. C. et al. The oligoelements. **Handbook of mineral elements in food**, 2015, p. 109-122.

CHEMOSTAT, versão 2.0.0.1. Disponível em: <http://www.chemostat.com.br/>. Acesso em: 09 mar. 2022.

CONSELHO NACIONAL DE PESQUISA (EUA). **Arsenic in drinking water**. 1999. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK230898/>>. Acesso em: 8 mar. 2022.

CORADINI, Alcides Ferreira. **Metais no Sangue e sua correlação com a Leucemia Linfocítica Aguda**. 2019. 65 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2019.

DEMIR, C. et al. Altered serum levels of elements in acute leukemia cases in Turkey. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 12, n. 12, p. 3471-4, 2011. Disponível em: <[http://conitec.gov.br/images/Protocolos/PCDT\\_Sobrecarga\\_Ferro.pdf](http://conitec.gov.br/images/Protocolos/PCDT_Sobrecarga_Ferro.pdf)>. Acesso em: 8 mar. 2022.

DUAN, W. et al. Levels of a mixture of heavy metals in blood and urine and all-cause, cardiovascular disease and cancer mortality: A population-based cohort study. **Environmental Pollution**, v. 263, 2020.

FRIEDEN, E. New perspectives on the essential trace elements. **Journal of Chemical Education**, v. 62, n 11, 1985.

GERINIERE, L. et al. Heterogeneity of acute lymphoblastic leukemia in HIV-seropositive patients. **Annals of oncology**, v. 5, n. 5, p. 437-440, 1994.

GERMAN J. Bloom's syndrome. XX. The first 100 cancers. **Cancer Genet Cytogenet**. v. 93, n. 1, 1997.

GHOLAMI, M. et al. A simple design for microwave assisted digestion vessel with low reagent consumption suitable for food and environmental samples. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2016.

GINÉ, Maria Fernanda. **Espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente:(ICP-AES)**. CENA/USP, 1998.

GRINDLAY, G. et al. A systematic study on the influence of carbon on the behavior of hard-to-ionize elements in inductively coupled plasma–mass spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 86, p. 42-49, 2013.

HARRINGTON, J. M. et al. Analysis of human serum and whole blood for mineral content by ICP-MS and ICP-OES: development of a mineralomics method. **Biological trace element research**, v. 160, n. 1, p. 132-142, 2014.

HUANG, L. et al. Rapid nitric acid digestion of plant material with an open-vessel microwave system. **Communications in Soil Science and plant analysis**, v. 35, n. 3-4, p. 427-440, 2004.

HUNGER, S. P.; MULLIGHAN, C. G. Acute lymphoblastic leukemia in children. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 16, p. 1541-1552, 2015.

IAQUINTA, F. et al. Development of an Alkaline Method for the Determination of Cu, Mo, and Zn in Beef Samples. **Food Analytical Methods**, v. 14, n. 1, p. 156-164, 2021.

INCA – Instituto Nacional do Câncer; Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>. Acesso em: 09 mar. 2022.

KATO, M.; MANABE, A. Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Pediatrics International**, v. 60, n. 1, p. 4-12, 2018.

LAUR, N. et al. ICP-MS trace element analysis in serum and whole blood. **Plos One** v.15, n. 5, 2020.

LEMOS, M. S.; CRUZ, A. S.; DANTAS, K. G. F. Sample Preparation Using TMAH and Nitric Acid for Multielement Determination in Crustacean Samples by MIP OES. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 32, p. 455-461, 2021.

LOMBECK, I. et al. Rubidium—A possible essential trace element. **Biological trace element research**, v. 2, n. 3, p. 193-198, 1980.

MANJUSHA, R.; SHEKHAR, R.; KUMAR, Sunil Jai. Ultrasound-assisted extraction of Pb, Cd, Cr, Mn, Fe, Cu, Zn from edible oils with tetramethylammonium hydroxide and EDTA followed by determination using graphite furnace atomic absorption spectrometer. **Food Chemistry**, v. 294, p. 384-389, 2019.

MANNING, T. J.; GROW, W. R. Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. **The chemical educator**, v. 2, n. 1, p. 1-19, 1997.

MARTINEZ, V. D. et al. Arsenic exposure and the induction of human cancers. **Journal of toxicology**, v. 2011, 2011.

MAY, T. W.; WIEDMEYER, R. H. A table of polyatomic interferences in ICP-MS. **Atomic spectroscopy-norwalk connecticut-**, v. 19, p. 150-155, 1998.

MICHELS, N. et al. Minimal residual disease, long-term outcome, and IKZF1 deletions in children and adolescents with Down syndrome and acute lymphocytic leukaemia: a matched cohort study. **The Lancet Haematology** v. 8, n. 10 p. 700-710, 2021.

MÜLLER, E. I. et al. Wet digestion using microwave heating. In: **Microwave-assisted sample preparation for trace element analysis**. Elsevier, 2014. p. 99-142.

NEVES, V. M. **Efeitos causados por nanopartículas de La<sub>2</sub>O<sub>3</sub> em *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Perderson e estudo da distribuição de elemento por LA-ICP-MS**. 2018. 70 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2018.

NUNES, A. M. et al. Fast determination of Fe, Mg, Mn, P and Zn in meat samples by inductively coupled plasma optical emission spectrometry after alkaline solubilization. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 32, n. 1, p. 1-5, 2013.

OLCAY, L. et al. Biochemical, radiologic, ultrastructural, and genetic evaluation of iron overload in acute leukemia and iron-chelation therapy. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 36, n. 4, p. 281-292, 2014.

R CORE TEAM, 2021. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>. Acesso em: 28 jan. 2022.

RODRIGUES, A. D. et al. **Hematologia básica**. Porto Alegre: Grupo A, 2019. 9788595027688. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788595027688/>. Acesso em: 09 Fev. 2022.

RONCATI, L. et al. Heavy metal bioaccumulation in an atypical primitive neuroectodermal tumor of the abdominal wall. **Ultrastructural Pathology**, v. 39, n. 4, p. 286-292, 2015.

SAERENS, A. et al. Risk of cancer for workers exposed to antimony compounds: a systematic review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 22, p. 4474, 2019.

SEHGAL, S. et al. High incidence of Epstein Barr virus infection in childhood acute lymphocytic leukemia: A preliminary study. **Indian journal of pathology and microbiology**, v. 53, n. 1, p. 63-67 2010.

SHAH, A.; JOHN, B. M.; SONDHI, V. Acute Lymphoblastic Leukemia with Treatment-Naïve Fanconi Anemia. **Indian pediatrics**, v. 50, n. 5, 2013.

SITARESMI, Mei N. et al. Health-related quality of life assessment in Indonesian childhood acute lymphoblastic leukemia. **Health and Quality of Life Outcomes**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2008.

SOARES, J. et al. Simultaneous determination of As, Bi, Sb, Se, Sn and Te in lead alloy using flow injection-hydride generation-inductively coupled plasma mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 8, n. 37, p. 6805-6814, 2016.

SOUZA, T. A. (org.). **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. 6. ed. Rio de Janeiro: Inca, 2020.

SPECTOR, L. G. et al. Epidemiology and etiology. In: **Childhood Leukemias**. 2. ed. Cambridge university press, 2006. p. 48-66.

SQUADRONE, S. et al. Trace elements profile in the blood of Huntington's disease patients. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 57, p. 18-20, 2020.

STANIĆ, Vojislav. Boron-Containing Bioactive Glasses for Bone Regeneration. In: **Biomedical, Therapeutic and Clinical Applications of Bioactive Glasses**. Woodhead Publishing, 2019. p. 219-249.

TANVIR, E. M. et al. Development and validation of an ICP-MS method and its application to determine multiple trace elements in small volumes of whole blood and plasma. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 44, n. 9, p. 1036-1046, 2020.

TORRES, D. P. et al. Sequential factorial designs for method development of the determination of Cd and Pb in fish and shrimp by GF AAS after sample freeze-drying and tetramethylammonium hydroxide solubilization. **Analytical Methods**, v. 8, n. 21, p. 4263-4271, 2016.

WALLACE, David R. Nanotoxicology and metalloestrogens: Possible involvement in breast cancer. **Toxics**, v. 3, n. 4, p. 390-413, 2015.

WANG, Y. et al. Maternal prenatal exposure to environmental factors and risk of childhood acute lymphocytic leukemia: A hospital-based case-control study in China. **Cancer Epidemiology**, v. 58, p. 146-152, 2019.

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

ZAZZO, Jean-Fabien. Oligo-éléments, vitamines et immunité. **Nutrition Clinique et Métabolisme**, v. 7, n. 2, p. 121-129, 1993.

ZEKAVAT, O. R. et al. Trace Elements in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 22, n. S1, p. 43-47, 2021.

## APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE

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

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Valderi Luiz Dressler

Instituição de origem do pesquisador: UFSM

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

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

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

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

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

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

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

As informações do estudo serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas sem identificação dos voluntários. As fichas das avaliações bem como a entrevista respondida por você ficarão guardadas com os pesquisadores e serão destruídas por incineração após a conclusão do estudo.

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

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

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

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

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

---

Assinatura do Pesquisador Responsável

---

Assinatura do participante

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

## APÊNDICE B – TERMO DE ASSENTIMENTO



### Termo de Assentimento

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

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Valderi Luiz Dressler

Instituição de origem do pesquisador: UFSM

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

Telefone para contato: (55) 3220-9445

Você está sendo convidado para participar, de forma voluntária, da pesquisa: **“METAIS NO SANGUE E SUA CORRELAÇÃO COM A LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA”**. Este estudo irá avaliar a presença de metais no seu sangue. Estes metais são importantes para sua saúde.

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

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

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

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

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

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

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

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

\_\_\_\_\_  
Assinatura ou nome do participante



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

Telefone para contato:

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

## APÊNDICE C – TERMO DE CONFIDENCIALIDADE



### Termo de Confidencialidade

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

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Valderi Luiz Dressler

Instituição de origem do pesquisador: UFSM

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

Telefone para contato: (55) 3220-9445

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

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

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

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

---

Prof. Dr. Valderi Luiz Dressler

## APÊNDICE D – QUESTIONÁRIO DE CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA



### Questionário de caracterização da amostra

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

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Valderi Luiz Dressler

Instituição de origem do pesquisador: UFSM

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

Telefone para contato: (55) 3220-9445

Nome: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ anos Data de Nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Sexo: **Masculino**      **Feminino**

Peso: \_\_\_\_\_ kg Altura: \_\_\_\_\_

Condição Clínica: \_\_\_\_\_

**Você pratica esportes com que frequência?**

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

**Quanto tempo, em média, dura esta atividade física?**

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

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

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

**Quantos dias da semana você costuma comer feijão?**

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

**Qual tipo de carne você mais consome na sua semana?**

- Gado       Aves  
 Porco       Peixe

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

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

**Com que frequência você costuma comer fígado bovino ou suíno?**

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

**Com que frequência você costuma comer frutas e verduras?**

- Não tenho o hábito       2 vezes por semana  
 1 vez por semana       3 vezes por semana ou mais 63

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

- Banana       Limão       Abacaxi       Melão       Mamão  
 Maçã       Laranja       Morango       Melancia       Manga

Outras: \_\_\_\_\_

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

- Geralmente cozidos ou servidos em sopa.  
 Geralmente apenas lavados e cortados, como salada.

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

- Alface       Cenoura       Alimentos Integrais       Lentilha  
 Rúcula       Beterraba       Espinafre       Amendoim  
 Tomate       Cebola       Castanha       Abóbora

Outras: \_\_\_\_\_

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

- Não costumo / Sou intolerante       3 vezes por semana  
 1 vez por semana       4 vezes por semana  
 2 vezes por semana       5 vezes por semana ou mais

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

- Pão Francês       Queijo       Vagem  
 Farinha de Trigo       Ovos       Repolho  
 Castanha do Pará       Arroz       Milho

**Você costuma comer frutos do mar?**

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

**Você costuma usar sal para temperar sua comida?**

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

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

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

**Com que frequência você costuma beber refrigerante?**

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

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

- Café da manhã       Café da Tarde  
 Almoço       Janta

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

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

## ANEXO A – HISTOGRAMAS DE DISTRIBUIÇÕES DOS ELEMENTOS DETERMINADOS

