UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação sistemática do uso do *Dried Blood Spot* para
determinação de elementos químicos em sangue capilar
visando estudos de biomonitoramento no Brasil**

Nara da Cruz Carolli Caran

**Ribeirão Preto
2015**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação sistemática do uso do *Dried Blood Spot* para determinação de
elementos químicos em sangue capilar visando estudos de
biomonitoramento no Brasil

Nara da Cruz Carolli Caran

Ribeirão Preto
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação sistemática do uso do *Dried Blood Spot* para determinação de
elementos químicos em sangue capilar visando estudos de
biomonitoramento no Brasil

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia
para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientada: Nara da Cruz Carolli Caran

Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Junior

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 24/03/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Caran, Nara da Cruz Carolli

Avaliação sistemática do uso do *Dried Blood Spot* para determinação de elementos químicos em sangue capilar visando estudos de biomonitoramento no Brasil. Ribeirão Preto, 2015.

61p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Barbosa Junior, Fernando.

1. Biomonitoramento. 2. Dried Blood Spot. 3. ICP-MS. 4. Sangue capilar.
5. Elementos químicos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nara da Cruz Carolli Caran

Avaliação sistemática do uso do *Dried Blood Spot* para determinação de elementos químicos em sangue capilar visando estudos de biomonitoramento no Brasil

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para
obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.
Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Junior

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A Deus, por sempre guiar meus caminhos.

Aos meus queridos pais, José Antônio e Lourdes e minha irmã Natália.

Ao meu namorado João Marcos.

E a todos meus amigos e pesquisadores que de certa forma ajudaram neste trabalho e na minha caminhada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meu caminho e minhas decisões.

Aos meus pais José Antônio e Lourdes, exemplos de amor, companheirismo, simplicidade, fé e dedicação, fonte de apoio incondicional durante minha caminhada.

À minha querida irmã Natália, pelos abraços, sorrisos, conselhos, força e compreensão.

Ao meu querido João Marcos, fonte de luz e amor na minha vida, pelo apoio incondicional e por tornar meus dias mais brandos, mostrando-se um verdadeiro companheiro e parceiro tanto nos momentos de alegria quanto nos de dificuldade.

Ao meu Orientador Prof. Fernando Barbosa Jr., pela confiança, amizade e oportunidade.

À técnica Vanessa, pela amizade, sugestões, atenção e auxílio nos experimentos.

A todos antigos e novos integrantes do Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, em especial à Milena, Maurílio, Maria Aparecida, Adriana, Maria Paula e Ana Cristina.

E a todos que não estão presentes nestas linhas, mas que, direta ou indiretamente, participaram da minha caminhada até a defesa deste mestrado.

Sonhe com o que você quiser. Vá para onde você queira ir. Seja o que você quer ser, porque você possui apenas uma vida e nela só temos uma chance de fazer aquilo que queremos. Tenha felicidade bastante para fazê-la doce. Dificuldades para fazê-la forte. Tristeza para fazê-la humana. E esperança suficiente para fazê-la feliz.

Clarice Lispector

RESUMO

CARAN, N. C. C. **Avaliação sistemática do uso do *Dried Blood Spot* para determinação de elementos químicos em sangue capilar visando estudos de biomonitoramento no Brasil.** 2015. 61f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

A biomonitorização humana ou biomonitoramento (BH) é definido como a medida periódica de determinada substância química ou seu metabólito em fluidos biológicos, principalmente sangue e urina, de uma população com o objetivo de avaliar a exposição e os riscos à saúde. Tal método tem se tornado comum em países desenvolvidos, porém ainda é uma prática pouco utilizada no Brasil. Isso ocorre pela dificuldade de coleta, armazenamento e transporte das amostras, principalmente em regiões sem infraestrutura e de difícil acesso. Diante disso, alguns procedimentos alternativos de coleta de amostra vêm sendo propostos. Um destes procedimentos é o *Dried Blood Spot* (DBS) ou coleta e armazenamento de amostra em papel-cartão. Este método oferece uma série de vantagens sobre os procedimentos de coleta convencionais, principalmente por reduzir consideravelmente o volume de amostra coletada. Entretanto, pouco se sabe sobre a estabilidade dos analitos após a deposição da amostra no cartão e do risco de contaminação da amostra pelo substrato sólido. Além disso, procedimentos de extração dos analitos do papel, para posterior quantificação, ainda não estão totalmente estabelecidos. Neste sentido, o presente trabalho avaliou de forma sistemática o procedimento de coleta de sangue por DBS visando sua futura aplicação em programas de biomonitoramento no Brasil para determinação dos elementos químicos As, Cd, Cu, Hg, Mn, Pb, Se e Zn por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Para isso, no estudo foram utilizadas três diferentes marcas comerciais de cartão coletor: *Whatman 903*TM, *Munktell*TM, e *DMPK-C*TM. Todas as marcas de cartão apresentaram baixas concentrações dos elementos químicos. Após a deposição da amostra no papel cartão verificou-se que a concentração dos elementos químicos manteve-se estável por um período de pelo menos 60 dias (temperatura ambiente e ao abrigo da luz). Foi otimizado o método de extração dos analitos do substrato, com melhor condição obtida após a imersão do papel (corte circular de diâmetro de 1/2”) por 60 minutos em solução extratora (0,5% v/v HNO₃ e 0,01% v/v TritonTM X-100) na proporção de 1:50 v/v, seguida de 10 segundos de agitação por *vortex*. Após a extração, a solução resultante contendo os analitos foi diretamente injetada no ICP-MS. Cabe também destacar que não foram observadas diferenças estatísticas nas concentrações dos elementos químicos com coleta de sangue da veia do antebraço (sangue venoso) ou do dedo (sangue capilar). Os resultados obtidos no presente estudo, devem contribuir para a implementação deste procedimento em análises de elementos químicos (biomonitoramento da população brasileira), principalmente considerando as dificuldades de coleta, armazenamento e transporte de amostras clínicas em nosso país por sua extensão territorial. Além disso, este procedimento pode facilitar estudos com populações vulneráveis e que vivem em áreas remotas e de difícil acesso.

Palavras chave: Biomonitoramento. *Dried Blood Spot*. ICP-MS. Sangue capilar. Elementos químicos.

ABSTRACT

CARAN, N. C. C. **Systematic evaluation of the use of Dried Blood Spot for determination of chemical elements in capillary blood in order biomonitoring studies in Brazil.** 2015. 61f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Human biomonitoring or biomonitoring (BH) is defined as the measurement of a particular chemical or metabolites in biological fluids, especially blood and urine, in a population to assess the level of exposure and health risks. Human biomonitoring is a common activity in developed countries, but is still an uncommon practice in Brazil. It mainly occurs due to the difficulty of collection, storage and transport of samples, particularly in regions without infrastructure and difficult access. Therefore, some alternative procedures for sample collection have been proposed. One of the procedures is the Dried Blood Spot (DBS). This method offers distinct advantages over conventional sample collection procedures, including the reduced sample volume required for analysis. However, little is known about the stability of analytes after sample deposition on the card and the possible risk of sample contamination by the solid substrate. In addition, the extraction procedures of elements from the substrate surface before determination are not yet fully established. In this sense, the present study evaluated systematically the DBS blood collection procedure aiming at its future application in biomonitoring studies in Brazil to determine the chemical elements As, Cd, Cu, Hg, Mn, Pb, Se and Zn by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). For this, the study used three different brands of collecting cards: Whatman 903™, Munktell™, and DMPK-C™. All card brands presented low concentrations of chemical elements. After sample deposition on cardboard it was found that the concentration of chemical elements remained stable for at least 60 days (at room temperature and protected from light). It was optimized the method of analytes extraction from the substrate, with the best condition obtained after immersing the paper (circular cutting diameter of 1/2 ") for 60 minutes in an extraction solution containing 0,5% v/v HNO₃ and 0,01% v/v Triton™ X-100 in the ratio 1:50 v/v, followed by 10 seconds of vortex. After extraction, the resulting solution containing the analytes was directly injected into the ICP-MS. It can also be pointed out that no statistical differences was found between the concentrations of elements determined in forearm vein blood (venous blood) and finger blood (capillary blood). Taken together, the results of the present study can contribute to the employment of the DBS procedure for the screening of chemical elements in the Brazilian population, especially considering the difficulties of collection, storage and transport of clinical specimens in our country. Moreover, studies in vulnerable populations living in remote areas and of difficult access should be simplified.

Keywords: Biomonitoring. Dried Blood Spot. ICP-MS. Capillary blood. Chemical elements.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Coleta de sangue feita através da punção do dedo da mão e impregnação da amostra nas marcações existentes no papel do cartão de coleta (WHO, 2005). 10
- Figura 2.** Cartão de coleta *Whatman 903TM*. Visualização da parte externa que oferece proteção e parte interna do cartão onde se encontra o papel para aplicação da amostra. Aplicação dos volumes de 10 μ L, 20 μ L, 30 μ L e 40 μ L de sangue na parte interna para ilustração da quantidade que cada tracejado consegue acomodar. Esses tracejados são impressos no papel. 12
- Figura 3.** Exemplo de suporte para a secagem dos cartões de coleta contendo as amostras de sangue (WHO, 2005). 12
- Figura 4.** Figura esquemática mostrando (A) o cartão de coleta com a impregnação de sangue nas cinco áreas impressas no papel e (B) os cortes nas áreas centrais e periféricas de uma única gota de sangue impregnada na área demarcada. 14
- Figura 5.** Cartão de coleta da marca *Whatman 903TM*. (A) Lado frontal do cartão mostrando a parte externa que protege o local onde será depositada a amostra e (B) lado traseiro onde é possível visualizar a parte interna do cartão que contém o papel com as marcações impressas para o depósito da amostra. 16
- Figura 6.** Cartão de coleta da marca *MunktellTM*. (A) Lado frontal do cartão mostrando a parte externa que protege o local onde será depositada a amostra e (B) lado traseiro onde é possível visualizar a parte interna do cartão que contém o papel com as marcações impressas para o depósito da amostra. 17
- Figura 7.** Cartão de coleta da marca *DMPK-CTM*. Lado frontal do cartão que contém o papel com as marcações impressas para o depósito da amostra. Neste cartão não há uma parte externa para a proteção das amostras. 17
- Figura 8.** Cortador de papel da marca eK Tool 17
- Figura 9.** Dimensão dos diâmetros dos diferentes cortadores. 18
- Figura 10.** Variação da massa de amostra de sangue aplicadas no papel em diferentes tempos, na temperatura de 30°C. 27
- Figura 11.** Variação do peso de amostras de sangue aplicadas no papel em diferentes tempos, na temperatura de 40°C. 28
- Figura 12.** Variação do peso de amostras de sangue aplicadas no papel em diferentes tempos, na temperatura de 50°C. 28
- Figura 13.** Avaliação da utilização de solução extratora e banho ultrassônico na extração da amostra de sangue com os elementos químicos. Foram obtidos diversas concentrações para cada elemento químico em diferentes tempos (5, 10, 15, 20 e 30 minutos) de banho ultrassônico. Obtenção do valor de referência (VR) para cada elemento analisado. (A) Média das concentrações de arsênio (μ g/L) nos diferentes tempos. (B) Média das concentrações de

cádmio ($\mu\text{g/L}$) nos diferentes tempos. (C) Média das concentrações de mercúrio ($\mu\text{g/L}$) nos diferentes tempos. (D) Média das concentrações de chumbo ($\mu\text{g/L}$) nos diferentes tempos. ...32

Figura 14. Avaliação da utilização da solução extratora (diluyente) em diferentes tempos juntamente com o agitador vortex por 10 segundos na retirada dos elementos químicos presentes na amostra de sangue. Foram obtidas as concentrações média para cada elemento químico em diferentes tempos de imersão na solução extratora (5, 30, 60 e 1440 minutos). Obtenção do valor de referência (VR) para cada elemento analisado. (A) Média das concentrações de arsênio ($\mu\text{g/L}$) nos diferentes tempos. (B) Média das concentrações de cádmio ($\mu\text{g/L}$) nos diferentes tempos. (C) Média das concentrações de mercúrio ($\mu\text{g/L}$) nos diferentes tempos. (D) Média das concentrações de chumbo ($\mu\text{g/L}$) nos diferentes tempos. ...35

Figura 15. Avaliação da utilização da solução extratora (diluyente) em diferentes tempos na extração dos elementos químicos presentes na amostra de sangue. Foram obtidas as concentrações média para cada elemento químico em diferentes tempos de imersão na solução extratora (5, 30, 60 e 1440 minutos). Obtenção do valor de referência (VR) para cada elemento analisado. (A) Média das concentrações de arsênio ($\mu\text{g/L}$) nos diferentes tempos. (B) Média das concentrações de cádmio ($\mu\text{g/L}$) nos diferentes tempos. (C) Média das concentrações de mercúrio ($\mu\text{g/L}$) nos diferentes tempos. (D) Média das concentrações de chumbo ($\mu\text{g/L}$) nos diferentes tempos.37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de referência de vários elementos químicos em sangue total ($\mu\text{g/L}$) em diferentes países.....	1
Tabela 2. Resultados da avaliação do branco dos cartões de coleta. Concentração média dos elementos químicos $\pm$ o desvio padrão ($\mu\text{g/L}$) obtidos para as marcas <i>Whatman 903TM</i> (n=10), <i>DMPK-CTM</i> (n=10) e <i>MunktellTM</i> (n=10).	38
Tabela 3. Concentração média e desvio padrão ($\mu\text{g/L}$) dos elementos químicos analisados nos papéis com (+) e sem (-) a utilização do cortador.	41
Tabela 4. Concentração média e desvio padrão ($\mu\text{g/L}$) dos elementos químicos extraídos das amostras de sangue (MR BE07-08) aplicadas no cartão de coleta (<i>Whatman 903TM</i>). Valores das concentrações mensuradas imediatamente após sua aplicação no cartão (0 dia), após 15 dias de sua aplicação, após 30 dias e após 60 dias.	43
Tabela 5. Concentração média e desvio padrão ($\mu\text{g/L}$) dos elementos químicos presentes nas amostras de sangue venoso (SV) coletadas na veia do braço e sangue capilar (SC) coletadas do dedo da mão de voluntários. Amostras de sangue analisadas diretamente, sem a aplicação no cartão coletor.	45
Tabela 6. Concentração média e desvio padrão ($\mu\text{g/L}$) dos elementos químicos presentes nas amostras de sangue capilar coletadas do dedo de voluntários. Amostras de sangue capilar (SC) analisadas diretamente e amostras de sangue capilar extraída do papel após aplicação no cartão coletor (SCC).	45
Tabela 7. Concentração média e desvio padrão ($\mu\text{g/L}$) dos elementos químicos presentes no hematócrito masculino (HM) e no hematócrito feminino (HF). Amostras de sangue venoso coletadas na veia do braço de voluntários.	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: análise de variância

As-i: arsênio inorgânico

As-o: arsênio orgânico

ATSDR: Agency for Toxic Substances and Disease Registry

BH: biomonitoramento humano

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

DBS: Dried Blood Spot

EtHg: etilmercúrio

EUA: Estados Unidos da América

GPx: glutathione peroxidase

HF: hematócrito feminino

Hg⁰: mercúrio elementar

Hg-i: mercúrio inorgânico

Hg-o: mercúrio orgânico

HIV: Human Immunodeficiency Virus

HM: hematócrito masculino

IARC: International Agency for Research on Cancer

ICP-MS: Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

MeHg: metilmercúrio

NIH: National Institutes of Health

PKU: Phenylketonuria

PNTN: Programa Nacional de Triagem Neonatal

SC: sangue capilar

SCC: sangue capilar cartão

SOD: superóxido dismutase

SV: sangue venoso

USEPA: United State Environmental Protection Agency

USP: Universidade de São Paulo

VR: valor de referência

v/v: volume por volume

LISTA DE SÍMBOLOS

As: arsênio

Cd: cádmio

cm: centímetro

Cu: cobre

g: grama

Hg: mercúrio

HNO₃: ácido nítrico

H₂O: água

Ir: irídio

L: litro

mg: miligrama

min: minutos

mL: mililitro

Mn: manganês

Pb: chumbo

s: segundos

Se: selênio

™: trademark

Zn: zinco

µg/L: micrograma por litro

µL: microlitro

°C: grau Celsius

′′: polegadas

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vi
LISTA DE SÍMBOLOS	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Biomonitoramento	1
1.2 Avaliação de elementos tóxicos e essenciais.....	2
1.2.1 Arsênio	3
1.2.2 Cádmio	4
1.2.3 Chumbo	5
1.2.4 Mercúrio	5
1.2.5 Cobre	6
1.2.6 Manganês.....	7
1.2.7 Selênio	7
1.2.8 Zinco.....	8
1.3 Sistemas alternativos para coleta de fluidos biológicos em estudos de biomonitoramento humano	9
1.3.1 Dried Blood Spot.....	9
2. OBJETIVOS	15
2.1 Geral	15
2.2 Específicos.....	15
3. MATERIAIS	16
3.1. Instrumentos e acessórios	16
3.2 Materiais de Referência	18
3.3 Amostra de sangue humano.....	19
3.4 Reagentes e Soluções.....	19
4. MÉTODOS	20
4.1 Escolha do tamanho do orifício a ser amostrado no papel cartão após a deposição de sangue	20
4.2 Cálculo da massa de sangue depositada no cartão	20
4.3 Cálculo do volume de sangue depositado no cartão.....	20
4.4 Avaliação da influência do tempo de secagem na perda de massa	21
4.5 Avaliação do branco dos cartões de coleta.....	21
4.6 Avaliação da contaminação pelo cortador.....	21
4.7 Determinação das condições de extração	22
4.8 Análise da estabilidade dos elementos químicos submetidos ao DBS.....	23

4.9 Verificação da diferença de concentração dos elementos químicos obtidos do sangue venoso e sangue capilar e diferença de concentração dos elementos químicos do sangue de homens e mulheres	24
4.10 Análise estatística	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1 Escolha do tamanho do corte.....	25
5.2 Cálculo da massa, volume e perda de massa do sangue.....	25
5.3 Determinação das condições de extração	29
5.4 Avaliação do branco dos cartões de coleta.....	38
5.5 Avaliação da contaminação pelo cortador.....	39
5.6 Análise da estabilidade dos elementos químicos submetidos ao DBS.....	42
5.7 Verificação da diferença de concentração dos elementos químicos obtidos do sangue venoso e sangue capilar e diferença entre hematócrito masculino e feminino.....	44
6. CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS	49
ANEXO.....	59
APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	59
APÊNDICE	60
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	60

1. INTRODUÇÃO

1.1 Biomonitoramento

A crescente utilização de substâncias químicas na indústria e agricultura, observada desde o século passado, expôs o homem a substâncias tanto em seu ambiente de trabalho como no seu macroambiente, exigindo um monitoramento desta população quanto a suas exposições. Esta medida periódica de determinada substância química ou seu metabólito em fluidos biológicos na população é denominada de Biomonitorização Humana ou biomonitoramento (BH) (ANGERER; EWERS; WILHELM, 2007; KUNO, 2009).

O BH vem sendo utilizado principalmente na avaliação da saúde, servindo de base para a adequação de padrões de cada substância. Assim, a monitorização da exposição de trabalhadores ou da população geral é um procedimento que consiste em uma rotina de avaliação e interpretação de parâmetros biológicos e/ou ambientais, com a finalidade de detectar os possíveis riscos à saúde (PASCHAL, 2007).

Os dados de BH têm crescido de tal forma que nos últimos anos vêm sendo utilizados para estabelecer e revisar limites de exposição ocupacional (KUNO, 2009). Na Tabela 1 são apresentados valores de referência de vários elementos químicos presentes no sangue da população em alguns países.

Tabela 1. Valores de referência de vários elementos químicos em sangue total ($\mu\text{g/L}$) em diferentes países.

Elemento\País	Brasil (NUNES et al., 2010)	França (GOULLÉ, et al., 2005)	Suécia (SCHULTZE, et al., 2013)
As	0,1-3,2	2,6-17,8	-
Cd	0,09-1,10	0,15-2,04	0,01 - 0,74
Cu	712-1732	-	692,37 - 933,03
Hg	-	0,94-8,13	0,59 - 4,89
Mn	6,9-18,4	-	5,52 - 10,32
Pb	5,1-163,0	11,4-62,8	7,69 - 30,99
Se	68-245	89-154	-
Zn	-	-	5491,2 - 7167,6

Nos últimos anos, o BH tem se tornado comum em países desenvolvidos, sendo uma importante ferramenta para o gerenciamento de políticas em saúde pública, visando à manutenção da saúde do indivíduo ou de uma população. Em geral no BH a concentração de um elemento químico em sangue é utilizada como um biomarcador de dose interna (ANGERER; EWERS; WILHELM, 2007; BATISTA et al., 2009; NEEDHAM; CALAFAT; BARR, 2007; NUNES et al., 2009).

Em países como os Estados Unidos da América (EUA) é grande a preocupação com o biomonitoramento da população, ao passo que existem diversas agências e instituições voltadas para tal avaliação, como é o caso do CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) que a cada quatro anos lança um relatório nacional sobre a exposição humana a substâncias químicas, o NIH (*National Institutes of Health*), o ATSDR (*Agency for Toxic Substances and Disease Registry*) e a USEPA (*United State Environmental Protection Agency*) que também exercem controle na verificação da exposição da população.

O último programa de biomonitoramento nos EUA, realizado pelo CDC, com os dados publicados na “Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals”, apresenta valores sobre 265 substâncias que incluem elementos químicos traço em urina e sangue (CDC, 2015).

Assim, a avaliação da deficiência de elementos químicos essenciais ou a presença de elementos tóxicos é uma prática comum em laboratórios clínicos de países desenvolvidos, visando melhorar a saúde da população.

No entanto, no Brasil o biomonitoramento humano para elementos tóxicos e essenciais ainda é uma prática pouco estabelecida, uma vez que não há estudos nacionais avaliando a exposição da população frente a substâncias químicas, principalmente aquelas com alto grau de toxicidade, dificultando assim a identificação de populações sob maior risco devido a exposição aumentada.

Visando atender a esta necessidade no nosso país, foi publicado o projeto “Primeiro Inquérito Nacional de Populações Expostas a Substâncias Químicas, 2008-2009”, no qual se obteve alguns resultados preliminares de metais tóxicos presentes no sangue e cabelo de determinadas faixas etárias da população do estado de São Paulo e Rio de Janeiro.

A publicação deste estudo piloto destacou as principais dificuldades encontradas e que devem ser aprimoradas de maneira a garantir a continuidade frequente do estudo e se destacam: a definição do tipo de amostra coletada (sangue, urina, cabelo, etc..), a adequação da coleta, o armazenamento e transporte das amostras, a inexistência de laboratórios com comprovada capacidade técnica para realizar as análises em quantidade e qualidade necessárias, a falta de infraestrutura adequada e a falta de pessoal capacitado em determinadas etapas do projeto (GOUVEIA et al., 2014).

1.2 Avaliação de elementos tóxicos e essenciais

O biomonitoramento se concentra na análise de fluidos biológicos para determinação das concentrações dos elementos essenciais e tóxicos ao organismo, visando, respectivamente, à

avaliação do estado nutricional e a exposição a elementos tóxicos (ANGERER; EWERS; WILHELM, 2007).

O estudo da toxicidade de elementos químicos deve levar em consideração muitas características dos grupos de toxicantes. Enquanto todos os elementos químicos são tóxicos em algum grau de exposição, muitos são nutrientes essenciais para a saúde humana. Assim, uma distinção deve ser feita entre um mínimo necessário de exposição e uma exposição tóxica. (CLARKSON, 1988)

Elementos denominados tóxicos são aqueles no qual se conhece nenhum efeito benéfico ao organismo, como é o caso, por exemplo, do Arsênio (As), Cádmio (Cd), Chumbo (Pb) e Mercúrio (Hg). Estes elementos interferem na saúde humana e, mesmo em baixas concentrações, levam a desordens irreversíveis no organismo (CASARETT; DOULL'S, 2013; PALMER et al., 2006).

Já os elementos essenciais podem ser classificados como de média e baixa toxicidade, onde serão necessárias maiores concentrações para gerar um efeito tóxico, no caso, por exemplo, do Cobre (Cu), Manganês (Mn), Selênio (Se) e Zinco (Zn) (CASARETT; DOULL'S, 2013; SAVORY, 1992).

Os tóxicos As, Cd, Pb e Hg são os principais elementos químicos investigados na população, devido ao fato de ocuparem as primeiras colocações na lista de prioridades de substâncias tóxicas (ATSDR, 2013). Já o Cu, Mn, Se e Zn também aparecem como os essenciais de maior interesse, por possuírem importante papel na fisiologia humana, uma vez que participam de eventos biológicos necessários a funções vitais como respiração celular, transporte de oxigênio, formação de enzimas e proteínas entre outros (CASARETT; DOULL'S, 2013).

1.2.1 Arsênio

Considerado um semimetal, o arsênio (As) é encontrado na natureza nas formas químicas orgânicas (As-o) e inorgânicas (As-i), sendo que os compostos inorgânicos apresentam maior toxicidade (FARIAS et al., 2012; WATANABE; HIRANO, 2013). É o elemento que ocupa a primeira colocação na lista de prioridades da ATSDR para substâncias tóxicas, em um total de 785 (ATSDR, 2013).

Sua liberação no ambiente se dá tanto por processos naturais, quanto por fontes antropogênicas, como a fundição de chumbo e indústrias químicas e de praguicidas, onde são encontradas as maiores concentrações da sua forma inorgânica. A exposição não ocupacional ao As ocorre principalmente por ingestão de água e alimentos contaminados (ATSDR, 2007b;

SMEDLEY; KINNIBURGH, 2002). O ser humano pode estar exposto ao As pela inalação e principalmente pela ingestão, além da absorção cutânea que ocorre em menor grau (ABERNATHY, 1999).

Os efeitos da exposição ao As vão desde gastroenterites e letalidade em exposições agudas, até aparecimento de câncer de pele, pulmão, bexiga e rim, assim como alterações na pele como hiperqueratose e alterações na pigmentação em exposições crônicas (APOSHIAN; APOSHIAN, 2006; BORBA; FIGUEIREDO; CAVALCANTI, 2004).

A principal via de excreção do As é a urinária, sendo esta matriz a de maior utilização para as dosagens das concentrações do elemento, porém também podem ocorrer investigações em sangue, cabelo e unha (CASARETT; DOULL'S, 2013; CDC, 2015).

1.2.2 Cádmio

O cádmio (Cd) é um dos mais importantes contaminantes ambientais. Ele é encontrado em atividades de metalurgia e siderurgia, em indústrias de fertilizantes, baterias e plásticos, mas sua principal emissão na atmosfera é causada pela incineração de lixo e combustíveis. (SEIZE OGA, 2008)

A principal fonte não ocupacional de exposição ao Cd presente no ar se dá por cigarros. Do total ingerido pelo ser humano, uma grande porcentagem é absorvida por via respiratória e, em menor proporção, por via gastrointestinal que é influenciada pela ingestão de proteínas, cálcio e ferro. (CASARETT; DOULL'S, 2013; SWIERGOSZ-KOWALEWSKA, 2001).

Devido ao fato de se acumular principalmente nos rins, formando complexo com a metalotioneína, o Cd se torna um elemento nefrotóxico, pois diminui a filtração glomerular levando a proteinúria e glicosúria (MOULIS, 2010). Ele pode permanecer armazenado neste órgão por décadas, afetando o metabolismo e excreção do cálcio e desencadeando problemas no sistema ósseo (ATSDR, 2012b; CASARETT; DOULL'S, 2013). Além disso, o Cd e alguns de seus compostos são reconhecidos pela IARC como carcinogênicos ao homem (IARC, 2012).

A principal via de excreção do cádmio é a urinária, quando a absorção se faz por via respiratória. Urina e sangue são as principais matrizes utilizadas para a dosagem das concentrações presentes no ser humano (ATSDR, 2012b; CDC, 2015).

1.2.3 Chumbo

O chumbo (Pb) é um dos metais do grupo dos elementos de transição mais abundantes na crosta terrestre e provavelmente é um dos contaminantes mais antigos já estudados (ATSDR, 2007a).

Nas últimas duas décadas a concentração de Pb na atmosfera tem diminuído significativamente, já que muitos países têm removido o chumbo tetraetila da gasolina (THOMAS et al., 1999). No entanto, os humanos podem estar expostos ao Pb por alimentos e água contaminados, poeira doméstica e por atividades industriais, como as indústrias de bateria (ATSDR, 2007a; BARBOSA et al., 2005).

A absorção do Pb pode ser feita através da via gastrointestinal ou por exposição inalatória. Tal elemento é distribuído para todos os órgãos por meio do sangue, porém apresenta maior afinidade por tecidos calcificados, uma vez que substitui o cálcio dos ossos e dentes, locais onde pode ficar armazenado por décadas, podendo voltar a corrente sanguínea durante o remodelamento ósseo (BARBOSA et al., 2005).

Os efeitos tóxicos de exposição ao Pb inorgânico envolvem vários órgãos e atividades bioquímicas. Vários estudos mostraram que o principal alvo é o sistema nervoso central podendo levar a disfunções neurológicas, incluindo a redução da capacidade intelectual (BARBOSA et al., 2005; CANFIELD et al., 2003; JUSKO et al., 2008; WAKEFIELD, 2002). Além disso, interfere na síntese do heme, levando a anemias e doenças cardiovasculares, como também pode interferir no metabolismo e homeostase do cálcio, alterando a síntese e liberação de hormônios. (CASARETT; DOULL'S, 2013; FLORA; GUPTA; TIWARI, 2012).

A excreção ocorre principalmente pela urina e fezes, no entanto o seu monitoramento é feito preferencialmente através do sangue (ATSDR, 2007a; CDC, 2015; HAYES, 2001).

1.2.4 Mercúrio

O mercúrio (Hg) é um dos mais tóxicos poluentes do meio ambiente, provenientes tanto de fontes naturais como antropogênicas. Ele existe basicamente em três formas: Mercúrio elementar (Hg^0 ou Hg metálico), mercúrio inorgânico (Hg-i), e o mercúrio orgânico (Hg-o), representado principalmente pelo metilmercúrio (MeHg), sendo que as formas orgânicas do Hg são mais tóxicas do que as formas inorgânicas (ATSDR, 1999; NAS, 2000; USEPA, 1997).

A principal fonte de exposição às formas orgânicas de Hg está no consumo de peixe ou de alimentos marinhos. Além disso, o uso de vacinas contendo timerosal pode contribuir

para exposição ao etilmercúrio (EtHg) (CORDLE; TOFFLESON, 1986; MAHAFFEY, 1999; MARQUES et al., 2007).

Por outro lado, a exposição às formas inorgânicas é mais comum pela inalação do vapor de Hg originário de amálgamas dentários ou de atividades mineradoras de ouro (ASK et al., 2002; ATSDR, 1999).

Os principais efeitos adversos atribuídos à exposição ao mercúrio são: efeitos gastrointestinais, renais, musculoesqueléticos, hepáticos, cardiovasculares e principalmente neurológicos, levando a quadros de neurotoxicidade (EBDON, 2001; KALES; GOLDMAN, 2002). Dentre as principais matrizes, o sangue é a mais utilizada para o monitoramento do Hg na avaliação da exposição de indivíduos (ATSDR, 1999; CDC, 2015).

1.2.5 Cobre

O cobre (Cu) é um metal avermelhado que ocorre naturalmente no solo, na água, nas plantas, nos animais e no ar, além de ser um elemento essencial para todos os organismos vivos, incluindo humanos e outros animais. O metal é utilizado principalmente na fabricação de arames, chapas, tubos e outros produtos metálicos, já os compostos de Cu são mais comumente usados na agricultura e no tratamento de água.

A exposição a este elemento ocorre, em menor quantidade, através do ar inalado ou pelo contato da pele com o solo, água e outras substâncias que contêm Cu e, em maior quantidade, através da ingestão de alimentos como carnes, nozes, sementes e grãos em geral (ATSDR, 2004).

No homem o Cu é necessário para o desenvolvimento do tecido conjuntivo, formação dos nervos e ossos, além de participar do metabolismo do ferro e carboidratos (CASARETT; DOULL'S, 2013).

Sua deficiência no homem é rara, mas quando ocorre leva a anemia normocítica e hipocrômica, leucopenia, neutropenia e osteoporose em crianças. Uma dieta em excesso de zinco pode causar deficiência de Cu (KANUMAKALA; BONEH; ZACHARIN, 2002).

A toxicidade crônica do cobre também é rara e na maioria das vezes associada ao dano no fígado. A intoxicação aguda por cobre leva a efeitos gastrintestinais caracterizados por dor, diarreia, vômitos e náusea. A presença de elevados teores de cobre no organismo também implica na redução da concentração de vitamina A no sangue e em problemas renais que, em casos agudos, podem levar a doença de *Wilson* (ATSDR, 2004; TSALEV, 1995).

Ele é encontrado normalmente em todos os tecidos do corpo, sangue, urina, fezes, cabelo e unhas, porém a dosagem de sua concentração é feita principalmente no soro sanguíneo (CDC, 2015).

1.2.6 Manganês

O manganês (Mn) está presente em todos os organismos vivos, sendo cofator de diversas reações enzimáticas. É o metal que compõe a enzima superóxido dismutase (SOD) no compartimento mitocondrial, que integra o sistema de defesa do organismo contra os radicais livres (BRESCIANI et al., 2015; HOLLEY et al., 2012; PRATT et al., 2015).

A exposição ao Mn se dá principalmente pela ingestão de alimentos como os grãos, nozes, algumas frutas e pimentas. Este metal também é utilizado em indústrias de fertilizantes, rações animais, cerâmicas, vidros e baterias (CASARETT; DOULL'S, 2013).

Além de prejudicar o combate contra os radicais livres, a deficiência do Mn no organismo está relacionada com distúrbios no crescimento devido a problemas na formação dos ossos e no sistema nervoso (BHANG et al., 2013; TSALEV, 1995). Em condições de deficiência aguda, verifica-se o aparecimento de osteoporose, acromegalia e esclerose múltipla (PATRIARCA et al., 1998; TSALEV, 1995).

O excesso de Mn no organismo reduz a absorção de ferro provocando anemia, além de afetar o sistema nervoso central, reprodutivo e respiratório. Em situações de intoxicação crônica verifica-se o desenvolvimento de psicoses maníaco depressivas, redução da resistência a infecções pulmonares e a maior incidência de abortos espontâneos (ASCHNER, 2005; CHEN et al., 2015; CROSSGROVE; ZHENG, 2004; HORNING et al., 2015; TSALEV, 1995).

As dosagens para verificação da sua concentração no organismo podem ser feitas através da urina, fezes, cabelo e sangue, mas é nesta última matriz onde são comumente realizados os testes (ATSDR, 2005; KIM et al., 2015).

1.2.7 Selênio

O selênio (Se), elemento essencial aos animais, ocorre naturalmente no ambiente, mas desigualmente distribuído no ambiente. As pessoas são diariamente expostas a baixos níveis através principalmente de alimentos e, em menor quantidade, através da água e ar (MASSARO, 1997; RAYMAN, 2000).

O Se elementar não é freqüentemente encontrado no ambiente, mas é geralmente combinado com outras substâncias. Seus compostos são usados em xampus anticaspa, suplementos vitamínicos e minerais e fungicidas (ATSDR, 2003).

Sua ação antioxidante indica que este elemento pode desempenhar um importante fator na prevenção do câncer. Essa ação preventiva ocorre principalmente devido ao papel desempenhado pelo Se no fígado, local onde substâncias carcinogênicas são metabolizadas através de um conjunto de oxidases. Além disso, é um metal importante para a produção da enzima antioxidante glutathione peroxidase (GPx), responsável por metabolizar o peróxido de hidrogênio, evitando a proliferação de radicais livres nos organismos vivos (ALLAN; LACOURCIERE; STADTMAN, 1999; GOYER, 1995; SAVORY; WILLS, 1992; TSALEV, 1995).

A deficiência de Se, além de aumentar a probabilidade do desenvolvimento de certos tipos de câncer, está associada a uma patologia observada na China, devido às baixas concentrações no solo daquela região: a doença de *Keshan* (SAVORY; WILLS, 1992). O Se também influi na toxicidade do mercúrio, protegendo o organismo contra os efeitos nocivos deste metal. A redução da toxicidade do mercúrio pode ser atribuída à ação antioxidante do Se, que minimiza os danos causados pelos radicais livres gerados pelo mercúrio nas membranas celulares (GOYER, 1995).

Já em elevadas concentrações no organismo o Se torna-se um elemento tóxico. Devido a sua similaridade química com o enxofre, o Se pode interferir no metabolismo deste composto, sendo incorporado a aminoácidos, além de alterar a estrutura de proteínas como a queratina, resultando em mudanças estruturais nos cabelos e unhas (TSALEV, 1995).

O Se pode ser medido no sangue, urina e unhas, no entanto sua dosagem se dá preferencialmente no sangue, uma vez que a concentração pode estar diminuída nas outras matrizes biológicas (CDC, 2015).

1.2.8 Zinco

O zinco (Zn) é um dos elementos mais comuns na crosta da Terra sendo encontrado no ar, solo e água, além de estar presente em todos os alimentos, principalmente vegetais e carnes. Este metal é utilizado na galvanização de ferro, aço, e na formação de ligas metálicas. Já seus compostos são amplamente utilizados tanto na produção de tintas brancas e cerâmicas, quanto na indústria farmacêutica como ingredientes de pomadas, desodorantes, suplementos, entre outros (ATSDR, 2005; PLUM; RINK; HAASE, 2010).

Este é um elemento essencial para o corpo humano e sua principal via de exposição é através da ingestão de alimentos. Sua essencialidade se deve ao fato de ser cofator indispensável de várias enzimas presentes nos mamíferos. Ele está envolvido nos processos de divisão celular, crescimento, cicatrização, regulação do metabolismo e do sistema imunológico (KNOELL; LIU, 2010; MAGGINI, 2010; MOCCHEGIANI et al., 2010; TERRAZZANO et al., 2014).

Os sintomas da deficiência de Zn estão relacionados principalmente ao aumento da susceptibilidade a infecções, devido à menor ação das células T do sistema imunológico, que são responsáveis pela resposta biológica do organismo contra células infectadas, fungos, parasitas e tecidos estranhos (KLOUBERT; RINK, 2015; PRASAD, 2009; SANDSTEAD, 1995; WALRAVENS, 1980).

O Zn atua também no metabolismo de glicose. Após a insulina ser clivada forma-se um monômero que, no interior da célula, entra em contato com o zinco formando um cristal dimérico possibilitando que a insulina seja armazenada e secretada (CHAUSMER, 1998; LIN; HUANG, 2015; RANASINGHE et al., 2015; RUTTER et al., 2015). Assim, elevadas doses de zinco podem causar hiperglicemia, além de afetar o intestino e o fígado (TSALEV, 1995). As dosagens para verificação da sua concentração no organismo é feita preferencialmente através do soro sanguíneo (ATSDR, 2005; CDC, 2015).

1.3 Sistemas alternativos para coleta de fluidos biológicos em estudos de biomonitoramento humano

1.3.1 Dried Blood Spot

Além das dificuldades gerais apresentadas no estudo piloto realizado no Brasil (GOUVEIA et al., 2014), estudos de biomonitoramento em países continentais e com diferenças sociais e econômicas entre regiões requerem o estabelecimento de procedimentos de armazenamento e transporte das amostras, associados a maiores complexidades e maiores desafios para não comprometer a integridade da amostra em estudo (BARBOSA, 2009).

Além disso, os laboratórios clínicos atuais devem estar preparados para o aumento da demanda de análises de elementos químicos em fluidos biológicos, em resposta ao aumento da preocupação à exposição ambiental e ocupacional (ANGERER; EWERS; WILHELM, 2007).

Neste sentido, existe uma necessidade crescente de se desenvolver novos procedimentos de coleta e armazenamento de amostras que sejam rápidos e simples, mantenham a

integridade dos analitos e permitam a análise química nos laboratórios clínicos brasileiros em rotina sem operações complexas (GOUVEIA et al., 2014).

Diante disso algumas alternativas na coleta de sangue vêm sendo propostas a fim de solucionar tais problemas. Uma destas é o uso da amostra (sangue), coletada e armazenada em papel cartão, do inglês *Dried Blood Spot* (DBS). No DBS o processo de coleta da amostra é feito através da punção do dedo ou calcanhar para liberação de sangue capilar e posterior impregnação no cartão de coleta (Figura 1) (LI; TSE, 2010).

A utilização do DBS para a coleta e análise de sangue humano teve origem no início dos anos 1960, quando o Dr. Robert Guthrie usou o método para demonstrar que a doença fenilcetonúria (PKU) poderia ser precocemente detectada pela determinação da concentração de fenilalanina em amostras de sangue seco colhido dos recém-nascidos em papel cartão. Desde então, vários programas de triagem neonatal foram implantados em todo o mundo, tornando-se parte fundamental dos programas de saúde pública (BOTLER et al., 2012; MAGALHÃES et al., 2009).

Figura 1. Coleta de sangue feita através da punção do dedo da mão e impregnação da amostra nas marcações existentes no papel do cartão de coleta (WHO, 2005).

Atualmente, mais de 95% dos recém-nascidos nos EUA são testados para doenças metabólicas hereditárias usando o DBS e a aplicação foi estendida para muitos outros campos, incluindo o monitoramento de drogas terapêuticas, elementos tóxicos e essenciais (ARAMENDÍA, 2012; LI; TSE, 2010).

A relação de doenças metabólicas testadas nos EUA varia de acordo com cada estado, como, por exemplo, em Nova Iorque, onde o exame é realizado para mais de 40 substância que podem caracterizar distúrbios envolvendo o sistema endócrino, os aminoácidos, erros inatos do metabolismo, hemoglobinopatias, além de doenças infecciosas e genéticas (NCBDDD, 2015; WADSWORTH, 2015).

No Brasil, o uso do DBS se verifica através do Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN). O PNTN foi instituído por meio da Portaria GM/MS nº 822, em 6 de junho de 2001, e é reconhecido pela população com o nome de “teste do pezinho” (LOPES, 2011).

Este teste tornou-se obrigatório em todo o país para as crianças nascidas em hospitais e maternidades, seja na rede pública ou na privada e prevê o diagnóstico de quatro doenças: hipotireoidismo congênito, PKU, anemia falciforme e fibrose cística. O “teste do pezinho” realizado nacionalmente e que inclui apenas estas quatro doenças é classificado como básico e, além de estar disponível para todos os recém-nascidos, é gratuito (CARVALHO et al., 2007; MAGALHÃES et al., 2009; PORTAL BRASIL, 2015).

O DBS oferece uma série de vantagens sobre os procedimentos de coleta convencionais de sangue:

1- Possibilita uma amostragem menos invasiva, em que a coleta é feita no dedo da mão ou do calcanhar, ao invés da punção venosa convencional, o que favorece o recrutamento de pessoas para os estudos, além de facilitar a coleta de sangue em neonatos.

2- O armazenamento da amostra é mais simples e o transporte menos complexo, pois não há exigência de freezers ou gelo seco. A amostra neste método pode ser facilmente coletada pelos próprios pacientes ou tutores com formação mínima e enviadas por correio para o laboratório designado, evitando custos desnecessários.

3- O DBS reduz o risco da infecção por HIV e outros patógenos infecciosos.

4- Requer um volume de sangue pequeno, inferior a 100 µL, em comparação com mais de 4 ml de sangue, que é geralmente obtida por coleta de amostra de sangue convencional (INGELS; LAMBERT; STOVE, 2010; LI; TSE, 2010; RELLO et al., 2013; STANTON et al., 1999; TANNA; LAWSON, 2011; TEMESI et al., 2013).

Esta última vantagem permite uma simplificação significativa também na coleta de amostra de sangue em recém-nascidos, crianças, pequenos animais e outros grupos especiais de voluntários (STANTON et al., 1999; TEMESI et al., 2013).

Em geral, a maioria dos cartões utilizados são compostos por uma parte externa que serve de proteção, fechamento e anotação de dados dos indivíduos analisados e a parte interna, onde se encontram impressas as marcações que delimitam o espaço para o depósito da amostra. Esta parte interna é composta de um papel com granulometria específica (Figura 2).

Existe um procedimento padrão recomendado para a coleta de amostras de sangue, no qual a gota de sangue, assim que formada, deve ser aplicada na marcação impressa no papel do cartão, permitindo que a quantidade de sangue seja suficiente para absorver e encher

completamente o círculo impresso (MICHIGAN DEPARTMENT OF COMMUNITY HEALTH, 2010).

Figura 2. Cartão de coleta *Whatman 903™*. Visualização da parte externa que oferece proteção e parte interna do cartão onde se encontra o papel para aplicação da amostra. Aplicação dos volumes de 10µL, 20µL, 30µL e 40µL de sangue na parte interna para ilustração da quantidade que cada tracejado consegue acomodar. Esses tracejados são impressos no papel.

O papel cartão não deve ser pressionado contra o local da punção no dedo e cada círculo impresso deve ser preenchido com uma única aplicação de sangue. O sangue deve penetrar uniformemente e saturar o papel na área delimitada para assegurar resultados fiáveis.

Após a coleta é necessário secar o papel cartão completamente, em uma superfície não absorvente, por no mínimo 20 minutos à temperatura ambiente e protegido da luz solar (Figura 3) (KEEVIL, 2011; MICHIGAN DEPARTMENT OF COMMUNITY HEALTH, 2010).

Figura 3. Exemplo de suporte para a secagem dos cartões de coleta contendo as amostras de sangue (WHO, 2005).

Mais recentemente, o DBS tem também sido aplicado em estudos de metabolismo de fármacos, onde se destacam as vantagens já mencionadas acima, como a facilidade de uso, pequena amostra requerida e armazenamento facilitado (LI; TSE, 2010; MANICKE et al., 2011; MEI et al., 2001).

Por outro lado, o método de coleta e armazenamento por DBS apresenta algumas desvantagens. Entre elas está o fato de não ser viável para estudos com analitos voláteis ou aqueles sensíveis quando expostos ao ar e/ou luminosidade. Além disso, caso ocorra uma deficiência na secagem do cartão, a umidade poderá afetar a qualidade das amostras de sangue no papel, induzindo o crescimento bacteriano, alterando a eficiência da extração durante a análise ou facilitando a degradação dos analitos instáveis (LI; TSE, 2010).

Ademais, alguns efeitos relacionados às propriedades do sangue também podem ocasionar problemas quanto à utilização do método DBS, tais como efeito do hematócrito, dificuldade de calcular o real volume de sangue coletado, e efeito de distribuição.

O efeito do hematócrito está relacionado ao hematócrito de cada pessoa que, dependendo da concentração de hemoglobina, pode apresentar-se alto ou baixo. Sendo assim, quanto maior o valor do hematócrito, maior será a concentração da hemoglobina e, como resultado, maior será a concentração do analito investigado dentro de um mesmo volume, podendo levar a erros na medição. Porém, como descrito por alguns autores, este efeito é caso dependente e haverá uma correlação positiva ou negativa de acordo com o analito (CHAUDHURI, et al., 2009; O'BROIN, 1993).

O efeito do volume se refere ao desconhecimento do real volume depositado no cartão quando se faz a coleta do sangue capilar, uma vez que a amostra é aplicada diretamente no cartão. Para que o analito possa ser dosado com melhor exatidão é necessário saber o volume total amostrado. Desta forma, os diferentes volumes apresentarão diferentes concentrações do analito, impossibilitando o cálculo correto das concentrações dos analitos.

Já o efeito de distribuição está relacionado à possível interação do sangue e/ou analito com o papel do cartão. Tal efeito resultará em uma maior ou menor dispersão da amostra, levando a uma diferença significativa na mensuração da concentração do analito quando se compara as áreas periféricas com as centrais de uma mesma região impregnada com a gota de sangue. Este efeito é observado em estudos que fazem diferentes recortes em uma mesma gota impregnada na área demarcada (Figura 4) (ADAM et al., 2000; LI; TSE, 2010; MCDADE; SHELL-DUNCAN, 2002; MEI et al., 2001).

Figura 4. Figura esquemática mostrando (A) o cartão de coleta com a impregnação de sangue nas cinco áreas impressas no papel e (B) os cortes nas áreas centrais e periféricas de uma única gota de sangue impregnada na área demarcada.

Uma das formas para resolver estas desvantagens seria determinar a massa de sangue depositada no papel ou depositar um volume conhecido da amostra, podendo representar a quantidade de analito em função da massa ou volume respectivamente.

Apesar de já haver estudos envolvendo o uso do DBS na área de análises clínicas, ainda é um método pouco estabelecido e muito pouco utilizado na determinação de elementos químicos em estudos de biomonitoramento. Além disso, várias limitações que restringem seu uso em rotina tais como, desconhecimento da estabilidade dos elementos químicos presentes na amostra depositada no cartão e métodos de extração e análise adequados das amostras, precisam ser avaliados.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar de forma sistemática o procedimento de coleta de sangue por DBS para os elementos tóxicos As, Cd, Hg, Pb e para os elementos essenciais Cu, Mn, Se, Zn, visando sua futura aplicação em programas de biomonitoramento no Brasil.

2.2 Específicos

Pretende-se com a avaliação sistemática a definição dos melhores parâmetros visando:

1. Avaliar a quantidade de amostra de sangue depositada no cartão de coleta utilizando a massa (balança analítica) ou volume (micropipeta).
2. Avaliação da influência do tempo de secagem da amostra na perda de massa em diferentes temperaturas.
3. Escolha do cartão de coleta através da análise dos brancos, ou seja, aqueles com menores concentrações dos elementos estudados para que não haja interferência nos valores adquiridos.
4. Escolha do melhor diâmetro para o corte das áreas impressas no papel do cartão.
5. Análise da possível contaminação pelo cortador utilizado para retirar a amostra de sangue impregnada no papel do cartão de coleta.
6. Determinação das condições de extração dos analitos do papel para análise por espectrometria de massas com plasma acoplado (ICP-MS).
7. Análise da estabilidade dos elementos químicos estudados, tanto os essenciais Cu, Mn, Se, Zn, quanto os tóxicos As, Cd, Hg, Pb presentes nas amostras submetidas ao DBS. A estabilidade será verificada em relação ao tempo de armazenagem em temperatura ambiente (27,5°C).
8. Verificação da existência de diferença na concentração dos elementos químicos quando obtidos de sangue venoso e obtidos de sangue capilar.
9. Verificação da existência de diferença na concentração dos elementos químicos nos hematócritos de homens e mulheres.

3. MATERIAIS

3.1. Instrumentos e acessórios

Na avaliação da quantidade de amostra de sangue depositada no cartão de coleta através da massa e na escolha do melhor diâmetro, para o corte das áreas impressas no papel cartão, foi utilizada uma balança analítica da marca *Bioprecisa (Eletronic balance, FA2104N, Curitiba, Brasil)*.

Na avaliação da quantidade de amostra de sangue depositada no cartão de coleta, através do volume, ou na pipetagem dos reagentes e soluções, foram utilizadas micropipetas de 100 µL da marca *Eppendorf (Hamburg, Germany)*.

Para a avaliação da influência do tempo de secagem da amostra na perda de massa, utilizou-se a balança analítica acoplada em uma câmara incubadora com temperatura controlada da marca *Marconi (MA 420- Shaker, Piracicaba, Brasil)*. Este acoplamento se deu com a colocação da balança analítica dentro da incubadora.

Durantes todos os experimentos que necessitaram do cartão de coleta, foi utilizada a marca:

- *Whatman 903™* - Lote: 6940712W113, *GE Healthcare, Uppsala, Sweden*, medidas: 8,9cm x 6,6cm (Figura 5).

Apenas nos experimento para a análise do branco dos cartões e análise da possível contaminação do cortador é que foram incluídas as marcas:

- *Munktell™*- Lote: 09-053, *Ahlstrom Munktell, Falun, Sweden*, medidas: 8,6cm x 6,6cm (Figura 6).
- *DMPK-C™* - Lote: ET6953713, *GE Healthcare, Uppsala, Sweden*, medidas: 8,4cm x 5,2cm (Figura 7).

Figura 5. Cartão de coleta da marca *Whatman 903™*. (A) Lado frontal do cartão mostrando a parte externa que protege o local onde será depositada a amostra e (B) lado traseiro onde é possível visualizar a parte interna do cartão que contém o papel com as marcações impressas para o depósito da amostra.

Figura 6. Cartão de coleta da marca *Munktell*TM. (A) Lado frontal do cartão mostrando a parte externa que protege o local onde será depositada a amostra e (B) lado traseiro onde é possível visualizar a parte interna do cartão que contém o papel com as marcações impressas para o depósito da amostra.

Figura 7. Cartão de coleta da marca *DMPK-C*TM. Lado frontal do cartão que contém o papel com as marcações impressas para o depósito da amostra. Neste cartão não há uma parte externa para a proteção das amostras.

Utilizou-se o cortador de papel da marca *eK Tool*TM (*EK Success Ltd, Clifton, EUA*) (Figura 8) com formato circular, nos diâmetros de 1/2 polegadas (") (1/2 inch circle punch #54-10062), que equivale à 1,27cm, 3/8" (3/8 inch circle punch #54-10061) que equivale à 0,95cm, 1/4" (1/4 inch circle punch # 54-10060) que equivale a 0,63cm e 3/16" (3/16 inch circle punch- #54-10059) que equivale à 0,47cm (Figura 9).

Figura 8. Cortador de papel da marca *eK Tool*

Figura 9. Dimensão dos diâmetros dos diferentes cortadores.

Para a determinação dos elementos químicos foi utilizado um espectrômetro de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) equipado com cela de reação dinâmica modelo ELAN DRC II (*PerkinElmer, EUA*) e autoamostrador (*AS93 plus PerkinElmer, EUA*). Esse equipamento encontra-se instalado, no Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, em uma sala limpa classe “1000”.

No processo de extração da amostra de sangue do papel cartão foi utilizado um banho ultrassônico com temporizador da marca *Unique (1400A, Indaiatuba, Brasil)* de frequência ultrassônica 40KHz e potência 135 watts.

Tanto no processo de extração da amostra quanto durante outras análises se utilizou um agitador de tubos vortex da marca *Biomixer (QI901, Araraquara, Brasil)*.

Nas análises que necessitavam de controle de temperatura, principalmente a que se verificou a estabilidade dos elementos químicos presentes nas amostras de sangue que estavam impregnadas nos cartões, foi utilizado um termohigrômetro da marca *Incoterm (7666.02.0.00, Porto Alegre, Brasil)*.

Nas verificações da existência de diferença de concentração dos elementos químicos em relação ao sangue capilar e o sangue venoso e entre os hematócritos masculinos e femininos utilizou-se para coleta e armazenamento do sangue tubo a vácuo da marca *BD Vacutainer (New Jersey, EUA)* e lancetas de acionamento automático da marca *Premium 21G (Tianchang, China)*.

Em todas as análises foram utilizados tubo cônico estéril da marca *BD Falcon* de 15 mL.

3.2 Materiais de Referência

Durante a maior parte do estudo foi utilizado material de referência (MR) de sangue proveniente do *Wadsworth Center – New York State Department of Health (EUA, Whole*

blood NYSDOH). Foram utilizados dois materiais de referência, o BE07-07 e BE07-08, com diferentes concentrações dos analitos estudados (As, Cd, Cu, Hg, Mn, Pb, Se e Zn).

3.3 Amostra de sangue humano

Nas etapas em que se utilizaram como amostra de estudo sangue humano, foram selecionados 20 voluntários aleatoriamente, sendo 10 homens e 10 mulheres na faixa de 18 a 65 anos. Para cada voluntário foi puncionado o sangue em dois locais diferentes: o sangue venoso (SV) foi obtido através da punção da veia na parte anterior do braço, próximo a dobra do cotovelo e o sangue capilar (SC) foi obtido através da ponta de um dos dedos da mão.

3.4 Reagentes e Soluções

Em todo trabalho foi utilizada água deionizada de alta pureza obtida pelo sistema Milli-Q (*Millipore™, Bedford, MA, EUA*). O ácido nítrico (HNO_3) 65% v/v (*Synth, Diadema, Brasil*) utilizado em todos os experimentos foi purificado por sub-boiling em destilador de quartzo (*Kürner Analysentechnik, Rosenheim, Alemanha*) para eliminação de impurezas. Utilizou-se Triton™ X-100 supra puro (*Sigma-Aldrich, Missouri, EUA*).

Todos os outros reagentes utilizados foram de grau de pureza analítica. As soluções e amostras foram armazenadas em frascos de polietileno após prévio tratamento para eliminação de contaminantes (20% v/v HNO_3 por 24 horas, lavados 5 vezes com água Milli-Q e secos em capela de fluxo laminar).

Como padrão interno foi utilizado o irídio (Ir) (1mg/mL). Foi utilizada solução estoque multi-elementar (10mg/L) PerkinElmer (*Shelton, CT, EUA*) contendo As, Cd, Cu, Mn, Pb, Se e Zn para o preparo da curva analítica e análise dos elementos totais. Foi utilizada solução estoque de mercúrio (10mg/L) PerkinElmer (*Shelton, CT, EUA*) contendo Hg para o preparo da curva analítica e análise do elemento nas amostras.

O diluente empregado na diluição das amostras de sangue após extração do papel cartão e determinação dos elementos químicos em sangue por ICP-MS foi o mesmo proposto por Batista et al. (2009), que consiste na simples diluição das amostras (1:50 v/v) com solução contendo 0,5% v/v HNO_3 + 0,01% v/v Triton™ X-100.

Este método de diluição foi utilizado tanto para a análise das amostras de sangue diretamente em solução, quanto para as aplicadas no papel cartão coletor. Tal solução também exerceu função extratora, uma vez que proporcionou a extração dos elementos químicos presentes no sangue aplicado no papel cartão.

4. MÉTODOS

4.1 Escolha do tamanho do orifício a ser amostrado no papel cartão após a deposição de sangue

A escolha do diâmetro para o corte no papel cartão que contém a amostra se baseou na necessidade de se eliminar uma das desvantagens apresentadas pelo método DBS, o efeito de distribuição.

4.2 Cálculo da massa de sangue depositada no cartão

Com o objetivo de avaliar a quantidade de amostra de sangue depositada no cartão através da massa, primeiramente foram cortados 30 circunferência de papel cartão (*Whatman 903TM*) no tamanho de 1/2'', pois é este o tamanho das marcações impressas no cartão. Estes 30 cortes foram pesados em balança analítica a fim de conhecer o peso médio que este tamanho apresentava.

O intuito desta análise foi avaliar a variação das massas entre diferentes amostras de um mesmo cartão, a fim de descontá-la do peso final da soma = papel + amostra de sangue depositada, para que assim pudéssemos obter apenas a massa da amostra de sangue.

Em seguida, o volume de 40µL de sangue (MR BE 07-07) foi pipetado no papel cartão, tanto nas circunferências que já haviam sido cortadas, quanto nas marcações impressas no papel cartão de novos cartões (*Whatman 903TM*). As circunferências cortadas foram imediatamente pesadas após depósito do sangue, que serviram como um controle, já os novos cartões foram colocados em um suporte para secagem (Figura 3). Após completa secagem do sangue aplicado nestes cartões (20 minutos) é que ocorreu o corte no papel para a obtenção da circunferência com a amostra seca. Após os procedimento de secagem e corte, a circunferência com a amostra foi pesada para que sua massa pudesse ser comparada com a obtida das circunferências pesadas imediatamente após aplicação do sangue.

4.3 Cálculo do volume de sangue depositado no cartão

Para o cálculo do volume depositado no cartão foi utilizado uma micropipeta. Uma vez que o volume da micropipeta é fixo haverá apenas a necessidade de se pipetar o sangue e depositá-lo no cartão dentro da área delimitada.

Este método foi utilizado tanto para as outras análises, que utilizaram o material de referência (BE07-08), quanto para a coleta do sangue capilar obtido dos voluntários. Na coleta do sangue capilar foi necessária uma maior atenção para que não houvesse erros, uma vez que

a pipetagem ocorreu diretamente no dedo do voluntário. Esta atenção estava voltada para que o sangue não escorresse pelo dedo do voluntário, ocasionando possível contaminação da amostra, e para que não ocorresse a pipetagem de ar, causando erros de imprecisão do volume coletado.

4.4 Avaliação da influência do tempo de secagem na perda de massa

Nesta avaliação, amostras do material de referência de sangue (BE 07-07) foram depositadas no papel cartão (*Whatman 903TM*) já cortado no tamanho de 1/2''. Foi depositado o volume de 40µL em cada corte. Os cortes contendo as amostras foram colocados em uma balança analítica que estava acoplada dentro de uma câmara incubadora com temperatura controlada. As amostras foram testadas para as temperaturas de 30°C, 40°C e 50°C. Para cada temperatura em cada tempo foram analisadas 3 amostras (n=3). A massa de cada amostra, para cada temperatura, foi obtida nos tempos: t=0 segundo (s) (imediatamente após o depósito da amostra), t= 10 segundos, t=20 segundos, t= 30 segundos e t= 40 segundos.

4.5 Avaliação do branco dos cartões de coleta

A avaliação dos brancos foi feita nos cartões *Whatman 903TM*, *MunktellTM* e *DMPK-CTM*. Foram feitos 10 cortes (n=10) de 1/2'' nas áreas demarcadas no papel cartão para cada um dos três cartões. Cada corte foi colocado em tubo Falcon e imerso em solução preparada com HNO₃ 0,5% v/v, TritonTM 0,01% v/v e Ir 0,001% v/v (BATISTA et al., 2009). Esta solução foi a mesma utilizada para a construção das curvas de calibração e branco reagente.

Estas 30 amostras, contendo o corte do papel juntamente com a solução, permaneceram por 60 minutos em repouso e em seguida foram submetidas ao agitador vortex por 10 segundos. Na sequência foram analisadas no ICP-MS para os analitos As, Cd, Cu, Hg, Mn, Pb, Se e Zn.

4.6 Avaliação da contaminação pelo cortador

Nesta análise os cortes nos papéis cartão foram feitos com e sem a utilização do cortador. Foram utilizadas as três marcas de cartões (*Whatman 903TM*, *MunktellTM* e *DMPK-CTM*) e o cortador de tamanho 1/2''. Utilizando o cortador, foram feitos 3 cortes (n=3) nas áreas demarcadas no papel cartão. Sem o auxílio do cortador, foram feitos 3 cortes (n=3) nas áreas demarcadas rasgando-se o papel com a mão. Houve o cuidado para que todos os cortes feitos com e sem o uso do cortador estivessem do mesmo tamanho. Cada corte foi colocado em tubo Falcon e imerso na solução preparada com HNO₃ 0,5% v/v, TritonTM 0,01% v/v e Ir

0,001% v/v. Esta solução foi a mesma utilizada para a construção das curvas de calibração e branco reagente. Estas 18 amostras, contendo o corte do papel imersos na solução, permaneceram por 60 minutos em repouso e em seguida foram submetidas ao agitador vortex por 10 segundos. Na sequência foram analisadas no ICP-MS para os analitos As, Cd, Cu, Hg, Mn, Pb, Se e Zn.

4.7 Determinação das condições de extração

As condições testadas foram:

- 1) Solução extratora durante 60 minutos + banho ultrassônico durante 5, 10, 15, 20 e 30 minutos.
- 2) Solução extratora durante 5, 30, 60 e 1440 minutos + uso do agitador vortex por 10 segundos.
- 3) Apenas solução extratora durante 5, 30, 60 e 1440 minutos.

Foi obtido um total de 65 cortes de 1/2'' das áreas demarcadas no papel cartão (*Whatman 903™*). Esses cortes foram divididos da seguinte forma: 25 cortes para a condição 1 (5 amostras para o tempo de 5 minutos, 5 para o tempo de 10 minutos, 5 para o tempo de 15 minutos, 5 para o tempo de 20 minutos e 5 para o tempo de 30 minutos), 20 cortes para a condição 2 (5 amostras para 5 minutos no extrator, 5 amostras para 30 minutos no extrator, 5 amostras para 60 minutos no extrator e 5 amostras para 1440 minutos no extrator) e 20 cortes para a condição 3 (5 amostras no extrator por 5 minutos, 5 amostras no extrator por 30 minutos, 5 amostras no extrator por 60 minutos e 5 amostras no extrator por 1440 minutos). Em cada corte foi pipetado 40µL de sangue (MR BE07-07) para posterior secagem durante 20 minutos.

Na condição 1: cada corte foi colocado em tubo Falcon e imerso na solução extratora por 60 minutos. Em seguida as 25 amostras (5 amostras para o tempo de 5 minutos, 5 para o tempo de 10 minutos, 5 para o tempo de 15 minutos, 5 para o tempo de 20 minutos e 5 para o tempo de 30 minutos) foram colocadas no banho ultrassônico nos respectivos tempos e analisadas no ICP-MS.

Na condição 2: cada corte foi colocado em tubo Falcon e imerso na solução extratora durante os respectivos tempo e posterior agitação em vortex por 10 segundos, ou seja, 5 amostras por 5 minutos no extrator + 10 segundos de agitação, 5 amostras por 30 minutos no extrator + 10 segundos de agitação, 5 amostras por 60 minutos no extrator + 10 segundos de agitação e 5 amostras por 1440 minutos no extrator + 10 segundos de agitação. Em seguidas amostras resultantes foram analisadas no ICP-MS.

Na condição 3: cada corte foi colocado em tubo Falcon e imerso na solução extratora durante os tempos de interesse, sendo 5 amostras no extrator por 5 minutos, 5 amostras no extrator por 30 minutos, 5 amostras no extrator por 60 minutos e 5 amostras no extrator por 1440 minutos, em seguida foram analisadas no ICP-MS.

A solução extratora utilizada em todas as condições foi preparada com HNO_3 0,5% v/v, Triton™ 0,01% v/v e Ir 0,001% v/v. Esta solução foi a mesma utilizada para a construção das curvas de calibração, branco da curva e branco reagente.

O volume de solução extratora adicionado em cada tubo foi de 1,96mL para que se mantivesse a diluição de 1:50 v/v (BATISTA et al., 2009). Para cada condição analisada foi preparada uma amostra contendo sangue (MR BE07-07) pipetado diretamente na solução, mantendo a proporção de 1:50 v/v. Esta amostra forneceu os valores de referência (VR) de cada elemento químico para posterior comparação com os valores obtidos na extração dos elementos do papel. Para cada condição estudada foram feitos brancos do papel cartão para que possíveis contaminações presentes no cartão não interferissem na concentração dos elementos químicos na amostra de sangue que estava sendo analisada. Os valores encontrados na análise do branco foram descontados do valor final de cada elemento químico.

4.8 Análise da estabilidade dos elementos químicos submetidos ao DBS

Para esta etapa do estudo aplicou-se 40µL de sangue (MR BE07-08) em todas as marcações impressas no papel cartão (5 marcações por cartão, *Whatman 903™*), utilizando um total de quatro cartões. Cada cartão serviu para a análise da concentração dos elementos químicos em quatro tempos diferentes: 1) análise no mesmo dia da aplicação da amostra de sangue no papel, 2) análise após 15 dias da aplicação do sangue no papel, 3) análise após 30 dias da aplicação do sangue no papel e 4) análise após 60 dias da aplicação do sangue no papel.

Os 5 cortes em cada cartão foram feitos com cortador de 1/2'' nas áreas demarcadas no papel cartão. Também foram feitos 5 cortes de 1/2'' no papel cartão fora da área demarcada, ou seja, área sem a presença de amostra de sangue. Os cortes com e sem a amostra foram colocados em tubo Falcon e imersos na solução extratora durante 60 minutos e, em seguida, submetidos ao agitador vortex por 10 segundos. Na sequência foram analisados no ICP-MS para os analitos As, Cd, Cu, Hg, Mn, Pb, Se e Zn. O volume de solução extratora adicionado em cada tubo foi de 1,96mL para que se mantivesse a diluição de 1:50 v/v (BATISTA et al., 2009).

Até o momento da análise, os cartões com as amostras de sangue ficaram armazenados em saco com fechamento hermético, em local seco e ao abrigo da luz, em temperatura média de 27,5°C.

4.9 Verificação da diferença de concentração dos elementos químicos obtidos do sangue venoso e sangue capilar e diferença de concentração dos elementos químicos do sangue de homens e mulheres

Nesta etapa do estudo foi coletado sangue de voluntários saudáveis na faixa etária de 18 a 65 anos, sendo 10 homens e 10 mulheres (APÊNCIDE). Para cada voluntário foi puncionado o sangue em dois locais diferentes: o sangue venoso (SV) foi obtido através da punção da veia na parte anterior do braço, próximo a dobra do cotovelo e o sangue capilar (SC) foi obtido através da ponta de um dos dedos da mão. Com a ajuda de um profissional qualificado foi feita a punção venosa utilizando uma agulha e coletado aproximadamente 3 mL de sangue em tubo *BD Vacutainer*. Após a coleta foi pipetado 40µL deste sangue e depositado em tubo Falcon juntamente com a solução de HNO₃ 0,5% v/v, Triton™ 0,01% v/v e Ir 0,001% v/v. Foram preparadas duas amostras nestas condições para posterior análise dos elementos químicos no ICP-MS.

Para a perfuração da ponta do dedo da mão utilizou-se lancetas de acionamento automático. Com o sangue extravasado, foi feita uma coleta direta no dedo utilizando-se uma micropipeta, obtendo um total de 160µL. Este volume foi dividido em quatro partes, sendo que duas partes (40µL cada) foram depositadas diretamente em tubo Falcon e as outras duas (40µL cada) foram depositadas em um corte de papel de 1/2". Esperou-se a completa secagem destes cortes para que fossem colocados em tubo Falcon. Em seguida foi adicionada a solução de HNO₃ 0,5% v/v, Triton™ 0,01% v/v e Ir 0,001% v/v nos quatro tubos para análise dos elementos no ICP-MS.

4.10 Análise estatística

O tratamento estatístico dos dados foi feito utilizando o programa estatístico Prism 5.0 para análise dos resultados. Os testes aplicados foram *t* de Student pareado para diferenciação entre amostras de grupos dependentes e Análise de Variância (ANOVA - Tukey) para diferenciação entre grupos emparelhados. Valores de $p < 0,05$ foram considerados com diferença estatística.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Escolha do tamanho do corte

O cortador utilizado para este estudo, considerando as marcações impressas no papel cartão, apresenta lâmina de corte no formato circular. Tais cortadores apresentam este formato em diversos tamanhos, ou seja, diversos diâmetros. A escolha do diâmetro para o corte no papel cartão que contém a amostra de sangue se baseou na necessidade de se eliminar uma das desvantagens apresentadas pelo método DBS, o efeito de distribuição. Esta desvantagem está relacionada com possíveis interações que os elementos químicos possam ter com as estruturas que compõe o papel cartão, fazendo com que quando ocorresse a dispersão da amostra houvesse uma diferença de concentração na parte central e periférica de cada marcação (LI; TSE, 2010). Ao se escolher o tamanho que conseguisse abranger toda a marcação no papel e, conseqüentemente, toda a amostra ali depositada, fica garantido que não haverá diferenças de concentração, já que toda a amostra será analisada. Além disso, como muitos dos elementos analisados apresentam baixas concentrações, quanto maior for a quantidade de amostra analisada, mais fácil será sua quantificação. Por exemplo, cortes de 1/4'' permitem uma amostragem de sangue de volume 5µL, enquanto áreas de 1/2'' permitem uma amostragem de até 40µL de sangue. Sendo assim, o tamanho ideal de corte e que a necessidade citada acima foi a de 1/2''.

5.2 Cálculo da massa, volume e perda de massa do sangue

A quantidade de amostra coletada no papel cartão (volume) é um parâmetro difícil de ser monitorado, uma vez que ao se fazer a punção do dedo, a gota de sangue liberada é diretamente aplicada no cartão e não há como mensurar o que foi depositado. Este problema está relacionado com uma das desvantagens apresentada pelo método DBS, ou seja, é necessário saber a quantidade de amostra depositada para conseguir fazer o cálculo da concentração do elemento químico corretamente (LI; TSE, 2010). Em geral, é estabelecido que em uma determinada área cortada do papel cartão haverá um certo volume fixo de sangue, considerando que o espalhamento da amostra ocorre na superfície do papel de forma homogênea. No entanto, esta distribuição não é sempre homogênea, principalmente considerando o efeito hematócrito.

Esta necessidade não se faz presente nos testes para doenças metabólicas, aquelas que compõe o chamado “Teste do pezinho”, uma vez que neste caso, apesar de ser usado o mesmo método, não são realizadas análises das concentrações, mas apenas uma avaliação qualitativa.

O exame se limita a declarar se o teste foi positivo ou negativo para a substância de interesse, como é o caso da doença PKU que pode ser diagnosticada através da dosagem de fenilalanina. Em caso positivo, um novo exame é realizado, mas agora com a punção de sangue venoso e dosagem da concentração da substância para confirmação do diagnóstico (CARVALHO et al., 2007).

Desta forma, para a determinação de elementos químicos existe a obrigatoriedade de se conhecer a quantidade de amostra impregnada no papel.

Uma das alternativas que poderia eliminar tal desvantagem é o conhecimento prévio da massa de sangue depositada no papel cartão. Para verificar a possibilidade de se utilizar a massa de amostra no papel cartão para a determinação da concentração final dos analitos em estudo, foi necessário fazer uma análise previa da variação da massa de diversos cortes no papel de 1/2'' sem a amostra (branco). Caso este valor não apresentasse diferenças significativas nas massas entre diversos cartões, poderíamos adotar um valor médio de massa de cartão para obtenção da massa apenas da amostra de sangue. Desta forma a amostra poderia ser aplicada nas marcações impressas no cartão, sem a necessidade deste já estar cortado, para que após completada secagem ocorresse o corte, pesagem e análise do material.

Porém durante este experimento foi verificado que com a espera pela secagem do sangue ocorreu uma grande perda de massa de amostra devido à evaporação de água (H_2O). Logo, uma pequena perda de H_2O iria refletir em um erro no cálculo da amostra depositada no papel e consequentemente no cálculo da concentração dos elementos químicos. Esta observação foi possível com a sucessiva comparação de massas das mesmas amostras pesadas antes e depois de vários tempos.

Para isso, para cada tempo e temperatura em estudo, foram utilizadas 3 cortes de papel cartão contendo 40 μL de sangue. Os tempos de 0, 10, 20, 30 e 40 segundos foram analisados individualmente para as temperaturas de 30°C, 40°C e 50°C. A escolha dos tempos de análise foi feita baseada na observação de pré-testes que indicavam uma alta evaporação da H_2O em um curto período de tempo.

Já a escolha das temperaturas foi pensada no fato do Brasil possuir um clima predominantemente tropical e ser um país de grande extensão territorial, apresentando regiões com elevadas temperaturas. Outro fato ponderado nesta escolha foi uma possível exposição das amostras a elevadas temperaturas durante o seu transporte até os centros que realizarão as análises.

A Figura 10 mostra os valores das médias das massas das amostras em função do tempo de secagem, mantendo-se a temperatura em 30°C.

O tempo de 0 segundo significa que a massa da amostra (corte de papel + sangue) foi obtida imediatamente, ou seja, assim que o sangue foi pipetado no papel, a amostra foi colocada na balança acoplada dentro da incubadora com temperatura controlada de 30°C e retirada assim que foi obtido o valor da massa correspondente. Este procedimento foi feito para 3 amostras, obtendo-se o valor de $0,0625 \pm 0,0011\text{g}$.

No tempo de 10 segundos, o sangue, assim que depositado no papel, foi colocado na balança para o início da contagem do tempo e, finalizando o período, o valor apresentado pela balança foi anotado. Este procedimento foi feito para 3 amostras obtendo-se o valor de $0,0579 \pm 0,0016\text{g}$.

O procedimento adotado para os tempos de 20, 30 e 40 segundos foi o mesmo realizado para os tempos anteriores, variando apenas o período em que cada amostra permaneceu dentro da incubadora. Os valores obtidos foram: $0,0535 \pm 0,0015\text{g}$ para o tempo de 20 segundos; $0,0489 \pm 0,0022\text{g}$ para o tempo de 30 segundos; $0,0448 \pm 0,0027\text{g}$ para o tempo de 40 segundos (Figura 10).

Figura 10. Variação da massa de amostra de sangue aplicadas no papel em diferentes tempos, na temperatura de 30°C.

Diante destes valores é possível perceber que com o aumento do período de exposição da amostra à uma temperatura de 30°C, ocorre uma diminuição de massa decorrente da perda de H₂O por evaporação. Quando comparamos o valor obtido no tempo de 0 segundo com o de 40 segundos chegamos à perda média de 0,0177g, ou seja, em 40 segundos, à uma temperatura de 30°C, houve uma perda de aproximadamente 28% de H₂O.

Nas Figuras 11 e 12 é possível verificar os valores das médias das massas das amostras para cada tempo nas temperaturas de 40°C e 50°C, respectivamente. Os procedimentos realizados para os cinco tempos (0, 10, 20, 30 e 40 segundos), na temperatura de 30°C, foram os mesmos para as temperaturas de 40°C e 50°C.

Os valores obtidos para 40°C foram: $0,0636 \pm 0,0013\text{g}$ para o tempo de 0 segundo; $0,0571 \pm 0,0019\text{g}$ para o tempo de 10 segundos; $0,0506 \pm 0,0021\text{g}$ para o tempo de 20 segundos; $0,0441 \pm 0,0024\text{g}$ para o tempo de 30 segundos; $0,0382 \pm 0,0024\text{g}$ para o tempo de 40 segundos. Da mesma forma que para 30°C, é possível perceber que com o aumento do período de exposição da amostra à uma temperatura de 40°C, ocorre uma diminuição da massa decorrente da perda de H_2O por evaporação. Quando comparamos o valor obtido no tempo de 0 segundo com o de 40 segundos chegamos à perda aproximada de 0,0254g, ou seja, em 40 segundos, à uma temperatura de 40°C, houve uma perda de aproximadamente 40% de H_2O .

Figura 11. Variação do peso de amostras de sangue aplicadas no papel em diferentes tempos, na temperatura de 40°C.

Os valores obtidos para 50°C foram: $0,0641 \pm 0,0013\text{g}$ para o tempo de 0 segundo; $0,0555 \pm 0,0015\text{g}$ para o tempo de 10 segundos; $0,0469 \pm 0,0015\text{g}$ para o tempo de 20 segundos; $0,0383 \pm 0,0019\text{g}$ para o tempo de 30 segundos; $0,0305 \pm 0,0023\text{g}$ para o tempo de 40 segundos. Quando comparamos o valor obtido no tempo de 0 segundo com o de 40 segundos chegamos à perda de 0,0336g, ou seja, em 40 segundos, à uma temperatura de 50°C, houve uma perda aproximada de 52% de H_2O .

Figura 12. Variação do peso de amostras de sangue aplicadas no papel em diferentes tempos, na temperatura de 50°C.

A perda de H₂O observada nas três temperaturas é extremamente significativa, principalmente na de 50°C onde este valor ultrapassa a metade da massa total da amostra.

Levando em consideração que a amostra de sangue aplicada no papel leva em média 20 minutos para sua completa secagem e posterior recorte, e que com um tempo de 40 segundos é possível ter uma perda de mais de 50% em massa, fica claro que não é possível esperar o tempo de secagem para se obter a massa de amostra depositada no papel cartão.

A alternativa que resolveria tal problema seria a imediata pesagem da amostra, porém esta alternativa esbarra no quesito da secagem. Esta secagem se faz necessária pois, caso o papel ainda esteja molhado na hora de usar o cortador, corre-se o risco de rasgá-lo ou ainda haver perda de amostra que poderá ficar retida na lâmina do cortador.

Diante de todos os problemas encontrados com a pesagem das amostras e sem que houvesse uma alternativa que conseguisse eliminá-los de forma que o método fosse eficiente, ficou estabelecido que a quantidade de amostra depositada no cartão deveria ser avaliada com a utilização de uma micropipeta. Com a utilização deste instrumento para a coleta do sangue, diretamente da ponta do dedo, é possível saber o exato volume que será aplicado no cartão, sem que o problema da perda de água interferisse na posterior dosagem da concentração dos elementos químicos, eliminando também a desvantagem de não se conhecer o real volume aplicado no papel cartão.

5.3 Determinação das condições de extração

Nesta etapa do estudo foram feitos diferentes testes para avaliar qual método era mais eficiente na extração dos analitos presentes na amostra de sangue depositada no papel cartão. Nas três condições analisadas foi utilizada a solução extratora (HNO₃ 0,5% v/v e Triton™ 0,01% v/v), seja sozinha ou combinada com os métodos que utilizam o banho ultrassônico ou o agitador vortex. Este diluente, aqui chamado de solução extratora, foi utilizado tanto nesta etapa do estudo, quanto nas que se utilizou a análise direta da amostra no ICP-MS, com simples diluição do sangue coletado em tubos a vácuo. A escolha desta solução extratora ocorreu pelo fato da mesma já ser utilizada na diluição das amostras de sangue previamente à análise direta por ICP-MS (BATISTA et al., 2009).

Com o intuito de avaliar possíveis contaminações dos papéis de coleta com elementos químicos, foram feitos brancos dos papéis para as três condições que estavam sendo analisadas, ou seja, 1) solução extratora durante 60 minutos + banho ultrassônico durante 5, 10, 15, 20 e 30 minutos, 2) solução extratora durante 5, 30, 60 e 1440 minutos + uso do agitador vortex por 10 segundos e 3) apenas solução extratora durante 5, 30, 60 e 1440

minutos e os valores obtidos foram descontados dos valores finais para cada elemento químico. Para este estudo, utilizou amostras de sangue referência MR BE07-07 com concentrações conhecidas dos elementos químicos.

Na primeira condição (condição 1) foi avaliada a utilização de solução extratora juntamente com o banho ultrassônico. Todas as 25 amostras ficaram imersas na solução por um período de 60 minutos e em seguida separadas em cinco grupos com cinco amostras cada. O primeiro grupo, após imersão, foi submetido ao banho ultrassônico por 5 minutos e, em seguida, as cinco amostras foram analisadas no ICP-MS. O mesmo processo ocorreu para os outros quatro grupos variando apenas o tempo no banho ultrassônico que foram de 10, 15, 20 e 30 minutos.

A Figura 13 apresenta os gráficos com as concentrações médias ($\mu\text{g/L}$) e desvios padrão dos elementos químicos As, Cd, Hg e Pb avaliados nesta primeira condição de estudo juntamente com os valores de referência (VR) na amostra de cada elemento. Para cada elemento químico foi feita a análise estatística confrontando os valores das concentrações médias obtidas em cada variável (5, 10, 15, 20 e 30 minutos) com o valor de referência.

Os valores obtidos para o As no tempo de 5 minutos ($28,9 \pm 2,0\mu\text{g/L}$), 10 minutos ($28,8 \pm 0,1\mu\text{g/L}$), 15 minutos ($29,3 \pm 0,3\mu\text{g/L}$), 20 minutos ($29,4 \pm 0,5\mu\text{g/L}$) e 30 minutos ($30,1 \pm 1,7\mu\text{g/L}$) de extração foram significativos ($p < 0,05$) quando comparados individualmente com a média do valor de referência ($38,3 \pm 1,0\mu\text{g/L}$), ou seja, as concentrações médias de cada variável são diferentes da concentração média do VR.

Os valores obtidos para o Cd no tempo de 5 minutos ($4,2 \pm 1,0\mu\text{g/L}$), 10 minutos ($6,8 \pm 0,04\mu\text{g/L}$), 15 minutos ($5,8 \pm 1,3\mu\text{g/L}$), 20 minutos ($6,8 \pm 0,3\mu\text{g/L}$) e 30 minutos ($6,8 \pm 0,6\mu\text{g/L}$) foram significativos ($p < 0,05$) quando comparados individualmente com a média do valor de referência ($8,7 \pm 0,7\mu\text{g/L}$), ou seja, as concentrações médias de cada variável são diferentes da concentração média do VR.

Os valores obtidos para o Hg no tempo de 5 minutos ($7,5 \pm 1,2\mu\text{g/L}$), 10 minutos ($8,8 \pm 0,4\mu\text{g/L}$), 15 minutos ($8,4 \pm 0,4\mu\text{g/L}$), 20 minutos ($8,9 \pm 1,2\mu\text{g/L}$) e 30 minutos ($9,2 \pm 2,5\mu\text{g/L}$) foram significativos ($p < 0,05$) quando comparados individualmente com a média do valor de referência ($15,0 \pm 1,5\mu\text{g/L}$), ou seja, as concentrações médias de cada variável são diferentes da concentração média do VR.

Os valores obtidos para o Pb no tempo de 5 minutos ($129 \pm 0,5\mu\text{g/L}$), 10 minutos ($133 \pm 5,5\mu\text{g/L}$), 15 minutos ($153 \pm 3,4\mu\text{g/L}$), 20 minutos ($152 \pm 1,1\mu\text{g/L}$) e 30 minutos ($153 \pm 0,10\mu\text{g/L}$) foram significativos ($p < 0,05$) quando comparados individualmente com a média do

valor de referência ($184 \pm 1,7\mu\text{g/L}$), ou seja, as concentrações médias de cada variável são diferentes da concentração média do VR.

Os demais elementos químicos (Cu, Mn, Se e Zn) apresentaram o mesmo perfil de resultados que os mostrados neste estudo com o As, Cd, Hg e Pb.

Diante dos resultados apresentados observa-se que nesta primeira condição de extração avaliada, em que houve o uso da solução extratora com o banho ultrassônico em diferentes tempos, não foi verificada uma extração quantitativa dos analitos presentes na amostra de sangue depositada no papel, uma vez que as médias obtidas em cada tempo foram estatisticamente diferentes do valor de referência médio.

Figura 13. Avaliação da utilização de solução extratora e banho ultrassônico na extração da amostra de sangue com os elementos químicos. Foram obtidos diversas concentrações para cada elemento químico em diferentes tempos (5, 10, 15, 20 e 30 minutos) de banho ultrassônico. Obtenção do valor de referência (VR) para cada elemento analisado. (A) Média das concentrações de arsênio (µg/L) nos diferentes tempos. (B) Média das concentrações de cádmio (µg/L) nos diferentes tempos. (C) Média das concentrações de mercúrio (µg/L) nos diferentes tempos. (D) Média das concentrações de chumbo (µg/L) nos diferentes tempos.

Na segunda condição (condição 2) de extração avaliada, foi verificado a influência do tempo de submersão dos cortes de papel cartão impregnados com sangue na solução extratora com uma posterior agitação em vortex. Tais amostras (n=20) foram separadas em quatro grupos com cinco amostras cada e ficaram imersas na solução por períodos de 5, 30, 60 e 1440 minutos.

O primeiro grupo, após imersão de 5 minutos na solução extratora, foi submetido ao agitador vortex por 10 segundos e, em seguida, as cinco amostras foram analisadas no ICP-MS. O mesmo processo ocorreu para os outros três grupos, variando apenas o tempo na solução extratora (30, 60 e 1440 minutos). O tempo de agitação no vortex foi igual para todas as amostras.

A Figura 14 apresenta os gráficos com as concentrações médias ($\mu\text{g/L}$) e desvios padrão dos elementos químicos As, Cd, Hg e Pb avaliados na segunda condição juntamente com os valores de referência (VR) de cada um. Para cada elemento químico foi feita a análise estatística confrontando os valores das concentrações médias obtidas em cada variável (5, 30, 60 e 1440 minutos) com o valor de referência.

Os valores obtidos para o As nos tempos de 5 minutos ($12,6 \pm 0,4\mu\text{g/L}$) e 30 minutos ($23,2 \pm 1,3\mu\text{g/L}$) foram significativos ($p < 0,05$) quando comparados individualmente com a média do valor de referência ($38,3 \pm 1,0\mu\text{g/L}$). Já os valores obtidos nos tempos de 60 minutos ($36,3 \pm 2,2\mu\text{g/L}$) e 1440 minutos ($36,5 \pm 0,5\mu\text{g/L}$) não foram estatisticamente significativos ($p > 0,05$) quando confrontados com o valor de referência.

Os valores obtidos para o Cd nos tempos de 5 minutos ($2,1 \pm 0,8\mu\text{g/L}$) e 30 minutos ($6,0 \pm 1,4\mu\text{g/L}$) foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$) quando comparados individualmente com a média do valor de referência ($8,7 \pm 0,7\mu\text{g/L}$). Já os valores obtidos nos tempos de 60 minutos ($8,6 \pm 0,4\mu\text{g/L}$) e 1440 minutos ($8,2 \pm 0,4\mu\text{g/L}$) não foram estatisticamente significativos ($p > 0,05$) quando confrontados com o valor de referência.

Os valores obtidos para o Hg nos tempos de 5 minutos ($5,6 \pm 0,6\mu\text{g/L}$) e 30 minutos ($7,3 \pm 1,3\mu\text{g/L}$) foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$) quando comparados individualmente com a média do valor de referência ($15,0 \pm 1,5\mu\text{g/L}$). Já os valores obtidos nos tempos de 60 minutos ($14,0 \pm 0,2\mu\text{g/L}$) e 1440 minutos ($14,5 \pm 0,8\mu\text{g/L}$) não foram estatisticamente significativos ($p > 0,05$) quando confrontados com o valor de referência.

Os valores obtidos para o Pb nos tempos de 5 minutos ($107 \pm 3,6\mu\text{g/L}$) e 30 minutos ($131 \pm 2,4\mu\text{g/L}$) foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$) quando comparados individualmente com a média do valor de referência ($184 \pm 1,7\mu\text{g/L}$). Já os valores obtidos

nos tempos de 60 minutos ($183 \pm 0,6\mu\text{g/L}$) e 1440 minutos ($184 \pm 0,5\mu\text{g/L}$) não foram estatisticamente significativos ($p>0,05$) quando confrontados com o valor de referência.

Os demais elementos químicos (Cu, Mn, Se e Zn) apresentaram o mesmo perfil de resultados que os mostrados neste estudo com o As, Cd, Hg e Pb.

Diante dos resultados apresentados pode-se dizer que nesta segunda condição, em que os papéis cartão ficaram imersos na solução extratora por diferentes tempos com posterior aplicação do agitador vortex por 10 segundos, que nos tempos de 5 e 30 minutos não houve uma extração eficiente (quantitativa) dos elementos químicos presentes na amostra de sangue, uma vez que as médias obtidas em cada tempo foram diferentes quando comparadas com as do valor de referência. Por outro lado, os tempos de 60 e 1440 minutos apresentaram valores favoráveis à extração dos elementos químicos, já que as médias das concentrações não foram diferentes da obtida no valor de referência.

Na terceira condição (condição 3) de extração foi avaliado somente o tempo em que os cortes de papel cartão, impregnados com sangue, permaneceram submersos na solução extratora. As amostras ($n=20$), que foram divididas em quatro grupos de cinco, ficaram imersas na solução extratora por períodos de 5, 30, 60 e 1440 minutos de acordo com o grupo pertencente.

Figura 14. Avaliação da utilização da solução extratora (diluente) em diferentes tempos juntamente com o agitador vortex por 10 segundos na retirada dos elementos químicos presentes na amostra de sangue. Foram obtidas as concentrações média para cada elemento químico em diferentes tempos de imersão na solução extratora (5, 30, 60 e 1440 minutos). Obtenção do valor de referência (VR) para cada elemento analisado. (A) Média das concentrações de arsênio (µg/L) nos diferentes tempos. (B) Média das concentrações de cádmio (µg/L) nos diferentes tempos. (C) Média das concentrações de mercúrio (µg/L) nos diferentes tempos. (D) Média das concentrações de chumbo (µg/L) nos diferentes tempos.

O primeiro grupo, após imersão de 5 minutos na solução extratora, foi analisado no ICP-MS. O mesmo processo ocorreu para os outros três grupos variando apenas o tempo na solução extratora que foi de 30, 60 e 1440 minutos.

A Figura 15 apresenta os gráficos com as concentrações médias ($\mu\text{g/L}$) e desvios padrão dos elementos químicos As, Cd, Hg e Pb avaliados na terceira condição juntamente com os valores de referência (VR) de cada um. Para cada elemento químico foi feita a análise estatística confrontando os valores das concentrações médias obtidas em cada variável (5, 30, 60 e 1440 minutos) com o valor de referência.

Os valores obtidos para o As nos tempos de 5 minutos ($11,6 \pm 0,8\mu\text{g/L}$), 30 minutos ($22,0 \pm 1,6\mu\text{g/L}$) e 60 minutos ($27,6 \pm 0,5\mu\text{g/L}$) foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$) quando comparados individualmente com a média do valor de referência ($38,3 \pm 1,0\mu\text{g/L}$). Já o valor obtido no tempo de 1440 minutos ($37,9 \pm 0,2\mu\text{g/L}$) não foi estatisticamente significativo ($p > 0,05$) quando confrontado com o valor de referência.

Os valores obtidos para o Cd nos tempos de 5 minutos ($3,2 \pm 1,5\mu\text{g/L}$), 30 minutos ($5,2 \pm 0,2\mu\text{g/L}$) e 60 minutos ($5,6 \pm 0,6\mu\text{g/L}$) foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$) quando comparados individualmente com a média do valor de referência ($8,7 \pm 0,7\mu\text{g/L}$). Já o valor obtido no tempo de 1440 minutos ($8,1 \pm 0,4\mu\text{g/L}$) não foi estatisticamente significativo ($p > 0,05$) quando confrontado com o valor de referência.

Os valores obtidos para o Hg nos tempos de 5 minutos ($4,7 \pm 0,2\mu\text{g/L}$), 30 minutos ($6,4 \pm 0,06\mu\text{g/L}$) e 60 minutos ($8,6 \pm 0,4\mu\text{g/L}$) foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$) quando comparados individualmente com a média do valor de referência ($15,0 \pm 1,5\mu\text{g/L}$). Já o valor obtido no tempo de 1440 minutos ($13,4 \pm 1,5\mu\text{g/L}$) não foi estatisticamente significativo ($p > 0,05$) quando confrontado com o valor de referência.

Os valores obtidos para o Pb nos tempos de 5 minutos ($102 \pm 0,1\mu\text{g/L}$), 30 minutos ($112 \pm 1,6\mu\text{g/L}$) e 60 minutos ($132 \pm 3,1\mu\text{g/L}$) foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$) quando comparados individualmente com a média do valor de referência ($184 \pm 1,7\mu\text{g/L}$). Já o valor obtido no tempo de 1440 minutos ($182 \pm 2,7\mu\text{g/L}$) não foi estatisticamente significativo ($p > 0,05$) quando confrontado com o valor de referência.

Figura 15. Avaliação da utilização da solução extratora (diluente) em diferentes tempos na extração dos elementos químicos presentes na amostra de sangue. Foram obtidas as concentrações média para cada elemento químico em diferentes tempos de imersão na solução extratora (5, 30, 60 e 1440 minutos). Obtenção do valor de referência (VR) para cada elemento analisado. (A) Média das concentrações de arsênio (µg/L) nos diferentes tempos. (B) Média das concentrações de cádmio (µg/L) nos diferentes tempos. (C) Média das concentrações de mercúrio (µg/L) nos diferentes tempos. (D) Média das concentrações de chumbo (µg/L) nos diferentes tempos.

Os demais elementos químicos (Cu, Mn, Se e Zn) apresentaram o mesmo perfil de resultados que os mostrados neste estudo com o As, Cd, Hg e Pb.

A partir dos resultados apresentados pode-se dizer que nesta terceira condição, em que os papéis cartão ficaram imersos na solução extratora por diferentes tempos, nos tempos de 5, 30 e 60 minutos não houve uma extração eficiente (quantitativa) dos elementos químicos presentes na amostra de sangue, uma vez que as médias obtidas em cada tempo foram diferentes quando comparadas com as do valor de referência. Por outro lado, o tempo de 1440 minutos apresentou valor favorável à extração dos elementos químicos, já que a média da concentração não foi diferente do valor de referência.

5.4 Avaliação do branco dos cartões de coleta

A análise do branco dos cartões de coleta teve por objetivo verificar a quantidade dos elementos químicos (As, Cd, Cu, Hg, Mn, Pb, Se e Zn) presentes nos papéis cartão. Esta avaliação foi feita para que os resultados obtidos na determinação dos elementos não sofresse interferência de possíveis contaminações do papel e apresentasse valores acima da real concentração.

A Tabela 2 apresenta os resultados das concentrações médias dos elementos químicos e seus desvios padrão ($\mu\text{g/L}$) para cada marca de cartão coletor juntamente com os valores de referência (VR) obtidos nos países Brasil e Suécia.

Tabela 2. Resultados da avaliação do branco dos cartões de coleta. Concentração média dos elementos químicos $\pm$ o desvio padrão ($\mu\text{g/L}$) obtidos para as marcas *Whatman 903TM* (n=10), *DMPK-CTM* (n=10) e *MunktelTM* (n=10).

	WHATMAN 903 TM	DMPK-C TM	MUNKTELL TM	VR
As	0,005 $\pm$ 0,003	0,006 $\pm$ 0,005	0,013 $\pm$ 0,007	0,10 - 3,20
Cd	0,009 $\pm$ 0,002	0,007 $\pm$ 0,003	0,010 $\pm$ 0,002	0,09 - 1,10
Cu	1,013 $\pm$ 0,049	1,138 $\pm$ 0,367	1,828 $\pm$ 0,185	712 - 1732
Hg	0,014 $\pm$ 0,016	0,021 $\pm$ 0,016	0,094 $\pm$ 0,039	0,59 - 4,89*
Mn	0,675 $\pm$ 0,040	0,168 $\pm$ 0,013	2,309 $\pm$ 1,379	6,90 - 18,40
Pb	0,085 $\pm$ 0,008	0,143 $\pm$ 0,065	0,180 $\pm$ 0,015	5,10 - 163
Se	0,066 $\pm$ 0,027	0,054 $\pm$ 0,026	0,073 $\pm$ 0,046	68 - 245
Zn	4,842 $\pm$ 2,175	5,641 $\pm$ 3,355	7,206 $\pm$ 2,558	5491 - 7167*

VR: valor de referência ($\mu\text{g/L}$) dos elementos químicos encontrados no sangue da população brasileira.

* valor de referência ($\mu\text{g/L}$) dos elementos químicos encontrados no sangue da população sueca.

As três marcas de cartões de coleta analisadas foram *Whatman 903TM*, *MunktelTM* e *DMPK-CTM*. Elas foram submetidas ao processo que envolve a submersão do papel na

solução extratora durante 60 minutos com posterior aplicação do agitador vortex por 10 segundos. Foi escolhida esta condição devido ao fato de ser a que apresentou resultado satisfatório na extração dos elementos químicos e maior agilidade em relação ao tempo total de análise.

Confrontando as médias obtidas das três marcas de cartões coletores com os valores de referência, é possível notar uma grande diferença nas concentrações da maioria dos elementos químicos analisados presentes como contaminantes nos papéis e os valores esperado nas amostras de sangue das populações (valor de referência para a população brasileira). Com isso, a utilização destes cartões é viável para a dosagem dos elementos uma vez que as concentrações encontradas não contribuem significativamente para uma alteração do resultado final, ou seja, não haverá contaminação significativa dos papéis nas amostras de sangue.

Esta avaliação não almejava escolher uma única marca de cartão coletor para ser utilizada na rotina de laboratórios, mas apenas mostrar quais eram apropriadas para um estudo de biomonitoramento na população brasileira.

Para uma maior precaução e obtenção exata dos valores dos elementos químicos, em cada análise, e para evitar contaminações com a utilização dos cartões coletores é recomendável que se faça o branco do cartão para cada lote de cartões utilizados no estudo. Esta precaução se baseia em possíveis contaminações advindas do armazenamento e manipulação destes cartões pelo laboratório.

5.5 Avaliação da contaminação pelo cortador

Uma das grandes preocupações com a utilização do cortador, tanto para o corte do papel impregnado com amostra de sangue, quanto para o corte do papel sem a amostra, era a ocorrência de possíveis contaminações devido a composição da lâmina do cortador. Esta lâmina, produzida através de uma liga metálica, apresenta uma grande concentração de elementos químicos, principalmente metais, o que poderia contaminar as amostras. Havendo a contaminação, os valores obtidos na análise destes elementos poderiam se apresentar maiores do que a real concentração, levando a falsos resultados.

Nesta avaliação foram utilizadas as três marcas de cartão coletor (*Whatman 903TM*, *DMPK-CTM* e *MunktellTM*). Dos seis cortes feitos em cada cartão coletor, três foram com a utilização do cortador e os outros três sem a sua utilização, para comparação dos resultados.

Os cortes dos cartões foram submetidos ao processo que envolve a submersão do papel na solução extratora durante 60 minutos com posterior aplicação do agitador vortex por 10 segundos.

Após a obtenção dos valores das concentrações de cada analito foi possível fazer a análise estatística para a comparação entre o uso ou não do cortador.

Na Tabela 3 é possível verificar a concentração média e o desvio padrão ($\mu\text{g/L}$) dos elementos químicos, bem como o valor do nível de significância (p) entre os resultados.

O valor de p foi obtido através da comparação das médias de cada marca de cartão coletor para cada elemento. Não houve a comparação entre as médias dos diferentes cartões, pelo fato destes apresentarem composições específicas de cada analito.

Com base nos valores apresentados podemos verificar que a diferença estatística não é significativa ($p>0,05$) quando se compara as concentrações dos elementos utilizando o cortador e sem a sua utilização. Resultados similares foram observados para as três marcas de cartão coletor.

Tabela 3. Concentração média e desvio padrão ($\mu\text{g/L}$) dos elementos químicos analisados nos papéis com (+) e sem (-) a utilização do cortador.

	WHATMAN 903 TM			DMPK-C TM			MUNKTELL TM		
	+(n=3)	-(n=3)	p	+(n=3)	-(n=3)	p	+(n=3)	-(n=3)	p
As	0,014 $\pm$ 0,003	0,017 $\pm$ 0,006	0,574	0,021 $\pm$ 0,007	0,022 $\pm$ 0,008	0,444	0,017 $\pm$ 0,003	0,020 $\pm$ 0,002	0,286
Cd	0,017 $\pm$ 0,002	0,018 $\pm$ 0,004	0,774	0,015 $\pm$ 0,003	0,014 $\pm$ 0,003	0,825	0,015 $\pm$ 0,004	0,016 $\pm$ 0,005	0,382
Cu	0,886 $\pm$ 0,012	0,897 $\pm$ 0,013	0,456	0,728 $\pm$ 0,019	0,741 $\pm$ 0,023	0,214	1,139 $\pm$ 0,107	1,148 $\pm$ 0,128	0,763
Hg	0,026 $\pm$ 0,004	0,025 $\pm$ 0,003	0,816	0,033 $\pm$ 0,007	0,035 $\pm$ 0,003	0,751	0,045 $\pm$ 0,005	0,051 $\pm$ 0,010	0,509
Mn	0,674 $\pm$ 0,014	0,681 $\pm$ 0,034	0,650	0,180 $\pm$ 0,007	0,181 $\pm$ 0,009	0,946	0,461 $\pm$ 0,029	0,490 $\pm$ 0,045	0,520
Pb	0,094 $\pm$ 0,003	0,086 $\pm$ 0,019	0,517	0,162 $\pm$ 0,009	0,158 $\pm$ 0,006	0,377	0,198 $\pm$ 0,004	0,192 $\pm$ 0,006	0,094
Se	0,054 $\pm$ 0,006	0,060 $\pm$ 0,008	0,069	0,045 $\pm$ 0,011	0,057 $\pm$ 0,022	0,186	0,045 $\pm$ 0,014	0,051 $\pm$ 0,032	0,812
Zn	10,691 $\pm$ 1,419	10,335 $\pm$ 0,675	0,520	10,607 $\pm$ 0,462	10,820 $\pm$ 0,319	0,502	11,679 $\pm$ 2,705	11,910 $\pm$ 3,326	0,952

(+): Com o uso do cortador

(-): Sem o uso do cortador

p: nível de significância

5.6 Análise da estabilidade dos elementos químicos submetidos ao DBS

Nesta etapa do estudo foi verificado o comportamento dos elementos químicos (As, Cd, Cu, Hg, Mn, Pb, Se e Zn) quando submetidos ao método do *Dried Blood Spot*, ou seja, quando as amostras de sangue (MR BE07-08) são aplicadas no cartão de coleta (*Whatman 903™*) e permanecem neste meio até o momento de serem analisadas. O comportamento foi verificado através da dosagem da concentração dos elementos químicos em diferentes tempos: 0 dias, 15 dias, 30 dias e 60 dias.

A amostra de sangue foi aplicada no mesmo momento para todos os tempos avaliados, porém a análise ocorreu somente após decorrido o prazo. O tempo de 0 (zero) compreende a análise das concentrações no mesmo dia em que a amostra de sangue foi aplicada no cartão.

Até o momento da data para a análise, os cartões com as amostras de sangue ficaram armazenados em saco de fechamento hermético, em local seco e ao abrigo da luz, em temperatura média de 27,5°C. A temperatura média foi calculada através das temperaturas máximas e mínimas adquiridas pelo termohigrômetro presente no mesmo local em que as amostras estavam armazenadas.

Para cada tempo (0, 15, 30 e 60 dias) foram analisadas 10 amostras do cartão de coleta, sendo que 5 foram obtidas com o corte das áreas onde estava aplicado o sangue e as outras 5 foram adquiridas do mesmo cartão, porém em áreas sem a presença do sangue. Este procedimento foi adotado para garantir que nenhuma contaminação do papel ou da manipulação do cartão interferisse na correta dosagem dos elementos químicos. Os cortes feitos no papel cartão foram submetidos ao processo que envolve a submersão do papel na solução extratora durante 60 minutos com posterior aplicação do agitador vortex por 10 segundos.

Na Tabela 4 é possível verificar os resultados da concentração média e desvio padrão ($\mu\text{g/L}$) obtidos neste estudo juntamente com o valor de referência dos elementos químicos ($\mu\text{g/L}$) presentes na amostra de sangue utilizada (MR BE07-08) e o nível de significância (p). O valor de p foi obtido através da comparação das médias de cada tempo para cada elemento. Com base nos resultados apresentados podemos verificar que a diferença estatística não é significativa ($p > 0,05$) quando se compara as concentrações dos elementos químicos dosadas nos diferentes tempos.

Todos os valores de todos os analitos foram comparados com o valor de referência (VR) apresentado pelo material de referência. A partir desta comparação podemos verificar que não ocorre variação na concentração dos elementos, mesmo com as amostras de sangue que ficaram impregnadas no cartão pelo período máximo do estudo de 60 dias.

Tabela 4. Concentração média e desvio padrão ($\mu\text{g/L}$) dos elementos químicos extraídos das amostras de sangue (MR BE07-08) aplicadas no cartão de coleta (*Whatman 903TM*). Valores das concentrações mensuradas imediatamente após sua aplicação no cartão (0 dia), após 15 dias de sua aplicação, após 30 dias e após 60 dias.

	MR BE07-08					p
	VR 07-08	0 dia	15 dias	30 dias	60 dias	
As	$27,4 \pm 2,4$	$27,2 \pm 1,9$	$27,2 \pm 1,0$	$27,0 \pm 1,9$	$27,0 \pm 1,6$	0,9925
Cd	$3,9 \pm 0,4$	$3,8 \pm 0,3$	$3,7 \pm 0,4$	$3,7 \pm 0,3$	$3,8 \pm 0,3$	0,8530
Cu	1248 ± 174	1240 ± 141	1246 ± 134	1242 ± 55	1245 ± 90	0,9998
Hg	$2,9 \pm 0,8$	$2,9 \pm 0,2$	$2,9 \pm 0,2$	$2,8 \pm 0,2$	$2,8 \pm 0,4$	0,7847
Mn	$32,7 \pm 3$	$34 \pm 2,9$	$33,5 \pm 2,6$	$33,6 \pm 2,6$	$33,6 \pm 1,8$	0,9972
Pb	270 ± 14	$272 \pm 8,7$	270 ± 13	$271 \pm 5,9$	$272 \pm 3,4$	0,9460
Se	264 ± 26	266 ± 24	268 ± 25	270 ± 14	270 ± 21	0,9898
Zn	8406 ± 682	8433 ± 627	8421 ± 509	8443 ± 540	8425 ± 236	0,9990

MR 07-08: material de referência sangue BE07-08

VR 07-08: Valores de referência do material BE07-08 ($\mu\text{g/L}$)

p: nível de significância

5.7 Verificação da diferença de concentração dos elementos químicos obtidos do sangue venoso e sangue capilar e diferença entre hematócrito masculino e feminino

O intuito desta etapa do estudo foi verificar a existência de diferença na concentração dos elementos químicos quando a amostra de sangue for obtida através da punção do sangue venoso (SV) e quando for obtida através do sangue coletado da ponta do dedo da mão, ou seja, o sangue capilar (SC). Como o método *Dried Blood Spot* é baseado na coleta de amostra de sangue capilar, esta comparação se faz necessária uma vez que será possível estabelecer a independência do local de onde se é coletado o sangue do indivíduo.

Neste estudo foram selecionados 20 voluntários saudáveis na faixa de 18 a 65 anos, sendo 10 homens e 10 mulheres. O sangue venoso obtido através da veia na parte anterior do braço foi coletado com a utilização de uma agulha acoplada em tubo a vácuo (BD Vacutainer) e o sangue capilar obtido da ponta de um dos dedos da mão foi coletado utilizando uma lanceta automática. Este sangue capilar foi coletado utilizando uma micropipeta.

Para cada voluntário foi preparada seis amostras que foram divididas em três grupos: 1- duas amostras com o sangue venoso (SV), 2- duas com o sangue capilar (SC) e 3- duas com o sangue capilar extraído do cartão de coleta, chamado de sangue capilar cartão (SCC), totalizando 120 amostras divididas nos três grupos com 40 amostras cada. A comparação dos valores obtidos do grupo 1(SV) com os do grupo 2 (SC) teve como objetivo a verificação de diferença nas concentrações dos analitos quando coletados de locais diferentes. A comparação dos valores obtidos do grupo 2 (SC) com os do grupo 3 (SCC) teve como objetivo verificar diferenças nas concentrações dos analitos quando dosados diretamente e quando extraídos do papel após aplicação no cartão de coleta.

As amostras do grupo 3 (SCC) foram submetidas ao processo que envolve a submersão do papel na solução extratora durante 60 minutos com posterior aplicação do agitador vortex por 10 segundos. Neste procedimento foi realizada a análise do branco dos cartões para garantir que nenhuma contaminação do papel ou da manipulação do cartão interferisse na correta dosagem dos elementos químicos.

Na Tabela 5 é possível verificar a concentração média e o desvio padrão ($\mu\text{g/L}$) dos elementos químicos presentes nas amostras de sangue venoso (SV) coletadas na veia do braço e sangue capilar (SC) coletadas do dedo de voluntários, bem como o valor do nível de significância (p) entre os resultados. O valor de p foi obtido através da comparação das médias entre o sangue venoso e o sangue capilar para cada elemento. Com base nos valores apresentados podemos verificar que a diferença estatística não é significativa ($p>0,05$) quando

se compara as concentrações dos elementos presentes na amostra de sangue coletada de locais diferentes.

Tabela 5. Concentração média e desvio padrão ($\mu\text{g/L}$) dos elementos químicos presentes nas amostras de sangue venoso (SV) coletadas na veia do braço e sangue capilar (SC) coletadas do dedo da mão de voluntários. Amostras de sangue analisadas diretamente, sem a aplicação no cartão coletor.

	SV (n=40)	SC (n=40)	p
As	$8,1 \pm 1,3$	$8,0 \pm 1,3$	0,8965
Cd	$0,80 \pm 0,25$	$0,84 \pm 0,27$	0,6562
Cu	1405 ± 554	1469 ± 441	0,5281
Hg	$5,0 \pm 4,0$	$5,3 \pm 2,9$	0,7621
Mn	$18,1 \pm 5,0$	$17,5 \pm 2,6$	0,6449
Pb	$14,5 \pm 5,1$	$15,0 \pm 3,6$	0,7315
Se	126 ± 45	113 ± 35	0,2074
Zn	8611 ± 1527	8450 ± 1608	0,7389

p: nível de significância

Na Tabela 6 é possível verificar a concentração média e o desvio padrão ($\mu\text{g/L}$) dos elementos químicos presentes nas amostras de sangue capilar (SC) coletadas no dedo da mão e de sangue capilar extraído do papel após aplicação no cartão (SCC), bem como o valor do nível de significância (p) entre os resultados.

O valor de p foi obtido através da comparação das médias entre o sangue capilar e o sangue capilar cartão para cada elemento. Com base nos valores apresentados podemos verificar que a diferença estatística não é significativa ($p > 0,05$) quando se compara as concentrações dos elementos presentes na amostra de sangue capilar que foi analisada diretamente e a amostra de sangue capilar analisada após extração do cartão de coleta.

Tabela 6. Concentração média e desvio padrão ($\mu\text{g/L}$) dos elementos químicos presentes nas amostras de sangue capilar coletadas do dedo de voluntários. Amostras de sangue capilar (SC) analisadas diretamente e amostras de sangue capilar extraída do papel após aplicação no cartão coletor (SCC).

	SC (n=40)	SCC (n=40)	p
As	$8,0 \pm 1,3$	$8,3 \pm 2,9$	0,7300
Cd	$0,84 \pm 0,27$	$0,82 \pm 0,35$	0,8297
Cu	1469 ± 441	1665 ± 444	0,2006
Hg	$5,3 \pm 2,9$	$4,8 \pm 2,2$	0,5575
Mn	$17,5 \pm 2,6$	$18,2 \pm 2,9$	0,4741
Pb	$15,0 \pm 3,5$	$14,6 \pm 3,9$	0,6619
Se	113 ± 35	122 ± 34	0,4638
Zn	8450 ± 1608	8019 ± 1301	0,4761

p: nível de significância

Para a avaliação das diferenças existentes na concentração dos elementos químicos do sangue de homens e mulheres foram utilizados os valores obtidos na análise da amostra de sangue venoso coletadas dos 20 voluntários. Os resultados foram separados em dois grupos, homens (n=10) e mulheres (n=10), e verificada a concentração média e desvio padrão ($\mu\text{g/L}$) dos elementos químicos presentes nas amostras.

Na Tabela 7 é possível verificar as concentrações dos elementos analisados nos hematócritos masculino (HM) e hematócritos feminino (HF), bem como o valor do nível de significância (p) entre os resultados.

O valor de p foi obtido através da comparação das médias entre o hematócrito masculino e feminino para cada elemento. Com base nos valores apresentados podemos verificar que a diferença estatística não é significativa ($p > 0,05$) quando se compara as concentrações dos elementos presentes na amostra de sangue venoso de homens e mulheres.

O efeito do hematócrito está relacionado ao hematócrito de cada pessoa que, dependendo da concentração de hemoglobina, pode apresentar-se alto ou baixo. Confrontando as concentrações dos elementos químicos obtidos do sangue masculino com os obtidos de sangue feminino, não houve diferença estatística significativa que pudesse interferir na concentração dos analitos e impedir a aplicação do método em estudos de biomonitoramento.

Tabela 7. Concentração média e desvio padrão ($\mu\text{g/L}$) dos elementos químicos presentes no hematócrito masculino (HM) e no hematócrito feminino (HF). Amostras de sangue venoso coletadas na veia do braço de voluntários.

	HM (n=10)	HF (n=10)	p
As	$8,0 \pm 1,4$	$8,2 \pm 1,3$	0,7033
Cd	$0,67 \pm 0,24$	$0,93 \pm 0,20$	0,1636
Cu	1390 ± 677	1421 ± 434	0,83
Hg	$5,8 \pm 4,3$	$4,2 \pm 3,8$	0,385
Mn	$17,0 \pm 6,5$	$19,1 \pm 2,7$	0,3759
Pb	$15,8 \pm 6,3$	$13,2 \pm 3,4$	0,217
Se	110 ± 18	142 ± 58	0,1756
Zn	8723 ± 1539	8498 ± 1588	0,6691

p: nível de significância

6. CONCLUSÃO

Este é o primeiro trabalho avaliando sistematicamente o uso do *Dried Blood Spot* (coleta e armazenamento de sangue em papel cartão) para determinação de elementos químicos em sangue capilar visando possíveis aplicações em futuros estudos de biomonitoramento no Brasil. Neste estudo de avaliação sistemática do DBS importantes fatores foram analisados para que seu uso seja aplicado na rotina de laboratórios e um melhor monitoramento da população possa ser implementado.

Os elementos químicos que foram analisados (As, Cd, Cu, Hg, Mn, Pb, Se e Zn) apresentaram comportamento semelhante, sem que houvesse algum que não se enquadrasse no padrão das análises ou não apresentasse boa resposta frente a aplicação do DBS, após a otimização dos parâmetros avaliados neste estudo.

Para o tamanho do diâmetro do corte ficou estabelecido que o de 1/2'' atende as necessidades requeridas. Também ficou estabelecido que o uso da micropipeta para a coleta da amostra de sangue diretamente da ponta do dedo da mão é a única maneira de se eliminar os problemas que envolviam o conhecimento do volume correto amostrado.

Em relação à extração da amostra de sangue contendo os elementos químicos do papel cartão, ficou evidente que duas condições de extração podem ser aplicadas: 60 minutos de imersão na solução extratora + 10 segundos de agitação vortex ou 1440 minutos de imersão na solução extratora. A escolha por uma das opções pode ser baseada no tempo e rotina de um laboratório.

A análise dos cartões de coleta comerciais utilizados neste trabalho mostrou que são viáveis para este tipo de investigação, uma vez que não apresentam altas concentrações de elementos químicos que pudessem interferir no estudo. O cortador metálico avaliado também não apresentou nenhum tipo de contaminação das amostras.

A estabilidade dos elementos químicos submetidos ao método foi avaliada em relação ao tempo que a amostra de sangue permaneceu intacta e com as concentrações constantes. O resultado mostrou que em até 60 dias não ocorreu nenhuma variação significativa que alterasse o resultado final das concentrações.

Outra importante variável avaliada neste trabalho foi em relação à inexistência de diferença na concentração dos elementos químicos quando obtidos de amostras de sangue venoso e sangue capilar.

Finalmente, ficou também comprovado que não há diferença na concentração dos elementos químicos quando se compara diferentes hematócritos, neste caso entre o hematócrito masculino e feminino.

Os resultados obtidos no presente estudo, associados às inúmeras vantagens do procedimento de amostragem por DBS descritas acima, devem contribuir para a implementação deste procedimento em análises de elementos químicos (biomonitoramento da população brasileira), principalmente considerando as dificuldades de coleta, armazenamento e transporte de amostras clínicas em nosso país por sua extensão territorial. Além disso, este procedimento pode facilitar estudos com populações vulneráveis e que vivem em áreas remotas e de difícil acesso.

REFERÊNCIAS

ABERNATHY, C. O.; LIU, Y. P.; LONGFELLOW, D.; APOSHIAN, H. V.; BECK, B.; FOWLER, B.; GOYER, R.; MENZER, R.; ROSSMAN, T.; THOMPSON, C.; WAALKES, M. Arsenic: health effects, mechanisms of actions and research issues. **Environmental Health Perspectives**, v.107, p.7, 1999.

ADAM, B.W.; ALEXANDER, J. R.; SMITH, S. J.; CHACE, D. H.; LOEBER, J. G.; ELVERS, L. H.; HANNON, W. H. Recoveries of phenylalanine from two sets of dried blood-spot reference materials: prediction from hematocrit, spot volume, and paper matrix. **Clinical Chemistry**, v.46(1), p.126-128, 2000.

ALLAN, C. B.; LACOURCIERE, G. M.; STADTMAN, T. C. Responsiveness of selenoproteins to dietary selenium. **Annual review of nutrition**, v.19, p.1-16, 1999.

ANGERER, J.; EWERS, U.; WILHELM, M. Human biomonitoring: state of the art. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v.210, p.201-208, 2007.

APOSHIAN, H. V.; APOSHIAN, M. M. Arsenic Toxicology: Five Questions. **Chemical Research in Toxicology**, v.19, p.1-15, 2006.

ARAMENDÍA, M.; RELLO, L.; VANHAECKE, F.; RESANO, M. Direct Trace-elemental Analysis of Urine Samples by Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry after Sample Deposition on Clinical Filter Papers. **Analytical Chemistry**, v.84, p.8682-8690, 2012.

ASCHNER, M.; ERIKSONM, K. M.; DORMAN, D. C. Manganese dosimetry: species differences and implications for neurotoxicity. **Critical Reviews in Toxicology**, v.35, p.1-32, 2005.

ASK, K.; AKESSON, A.; BERGLUND, M.; VAHTER, M. Inorganic mercury and methylmercury in placentas of swedish women. **Environmental Health Perspectives**, v.110, p.523-526, 2002.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registries. Toxicological profile for mercury. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, March 1999.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registries. Toxicological profile for selenium. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, September 2003.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registries. Toxicological profile for copper. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, September 2004.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registries. Toxicological profile for zinc. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, August 2005.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registries. Toxicological profile for lead. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, August 2007a.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registries. Toxicological profile for arsenic. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, August 2007b.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registries. Toxicological profile for manganese. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, September 2012a.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registries. Toxicological profile for cadmium. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, September 2012b.

ATSDR – Agency for Toxic Substances and Disease Registries. Summary data for priority list of hazardous substances, Division of Toxicology & Human Health Sciences, Atlanta, 2013.

BARBOSA, F.; TANUS-SANTOS, J. E.; GERLACH, R. F.; PARSONS, P. A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead advantages, limitations and future needs. **Environmental Health Perspectives**, v.13, p.1669-1674, 2005.

BARBOSA, F.; FILLION, M.; LEMIRE, M.; PASSOS, C. J. S.; RODRIGUES, J. L.; PHILIBERT, A.; GUIMARÃES, J. R.; MERGLER, D. Elevated blood lead levels in a riverside population in Brazilian Amazon, **Environmental Research**, v.109, p.594-599, 2009.

BATISTA, B. L.; RODRIGUES, J. L.; NUNES, J. A.; SOUZA, V. C. O.; BARBOSA, F. J.; Exploiting dynamics reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry (DRC-ICP-MS) for sequential determination of trace elements in blood using a dilute-and-shoot procedure. **Analytica Chimica Acta**, v.639, p.13-18, 2009.

BHANG, S. Y.; CHO, S. C.; KIM, J. W.; HONG, Y. C.; SHIN, M. S.; YOO, H. J.; CHO, I. H.; KIM, Y.; KIM, B. N. Relationship between blood manganese levels and children's attention, cognition, behavior, and academic performance a nationwide cross-sectional study. **Environmental Research**, v.126, p.9-16, 2013.

BORBA, R. P.; FIGUEIREDO, B. R.; CAVALCANTI, J. A. Arsênio na água subterrânea em Ouro Preto e Mariana, Quadrilátero Ferrífero (MG). **Revista Escola de Minas**, v.57(1), 2004.

BOTLER, J.; CAMACHO, L. A. B.; CRUZ, M. M. Phenylketonuria, congenital hypothyroidism and haemoglobinopathies: public health issues for a Brazilian newborn screening program. **Cadernos de Saúde Pública**, v.28(9), p.1623-1631, 2012.

BRESCIANI, G.; DA CRUZ, I. B.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. Manganese superoxide dismutase and oxidative stress modulation. **Advances in Clinical Chemistry**, v.68, p.87-130, 2015.

CANFIELD, R. L.; HENDERSON, C. R.; CORY-SLECHTA, D. A.; COX, C.; JUSKO, T. A.; LANPHEAR, B. P. Intellectual impairment in children with blood lead concentration below 10µg per deciliter. **The New England Journal of Medicine**, v.248, 2003.

CARVALHO, T. M.; SANTOS, H. P.; SANTOS, I. C. G. P.; VARGAS, P. R.; PEDROSA, J. Newborn screening: a national public health programme in Brazil. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v.30, p.615, 2007.

CASARETT & DOULL'S. Toxicology, the Basic Science of Poisons, 8th ed, 2013.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. Department of Health and Human Services, 2015.

CHAUDHURI, S. N.; BUTALA, S. J. M.; BALL, R. W.; BRANIFF, C. T. Pilot study for utilization of dried blood spots for screening of lead, mercury and cadmium in newborns. **Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology**, v.19, p.298-316, 2009.

CHAUSMER, A. B. Zinc, insulin and diabetes. **Journal of the American College of Nutrition**, v.17(2), p.109-115, 1998.

CHEN, P.; CHAKRABORTY, S.; MUKHOPADHYAY, S.; LEE, E.; PAOLIELLO, M. M.; BOWMAN, A. B.; ASCHNER, M. Manganese homeostasis in the nervous system. **Journal of Neurochemistry**, v.134(4), p.601-610, 2015.

CLARKSON, Y. W.; FRIERG, L.; NORBERG, G. F.; SAGER, P. R. Biological monitoring of toxic metals, New York, 686, 1988.

CROSSGROVE, J.; ZHENG, W. **Manganese** toxicity upon overexposure. *NMR Biomedicine* National Institute of Health (NIH), v.17(8), p.544-553, 2004.

EBDON, L.; PITTS, L.; CORNELLIS, R.; CREWS, H.; DONARD, O. F. X.; QUEVAUVILLER, P. The trace element speciation for environment, food and health, **The Royal Society of Chemistry**, p.55-69, 2001

FARIAS, J. S.; MILANI, M. R.; NIENCHESKI, L. F. H.; PAIVA, M. L. Especificação química de As inorgânico no estuário da Laguna dos Patos (RS, Brasil). **Química Nova**, v.35, p.1401, 2012.

FLORA, G.; GUPTA, D.; TIWARI, A. Toxicity of lead: a review with recent updates. **Interdisciplinary Toxicology**, v.5, p.47-58, 2012.

FUNK, W. E.; MCGEE, J. K.; OLSHAN, A. F.; GHIO, A. J. Quantification of arsenic, lead, mercury, and cadmium in newborn dried blood spots. **Biomarkers**, v.18(2), p.174-177, 2013.

GOULLÉ, J. P.; MAHIEU, L.; CASTERMANT, J.; NEVEU, N.; BONNEAU, L.; LAINÉ, G.; BOUIGE, D.; LACROIX, C. Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair reference values. **Forensic Science International**, v.153, p.39-44, 2005.

GOUVEIA, N.; KUNO, R.; ASMUS, C. F.; BARROCAS, P. R. G.; LEMES, V. R. R.; TAMBELLINI, A. T.; MEYER, A.; CÂMARA, V. M.; MOREIRA, J. C.; AGUIAR, A. G. O.; CHRISMAN, J. R.; CAVALCANTI, V. A.; KUSSUMI, T. A.; NAKANO, V. E.; ROCHA, S. O. B.; OLIVEIRA, M. C. C.; KIMURA, I. A.; BARBOSA, F. Projeto piloto do primeiro inquérito nacional de populações expostas a substâncias químicas, 2008-2009. **Epidemiologia e Serviço de Saúde**, v.23(2), p.361-368, 2014.

GOYER, R. A. Nutrition and metal toxicity. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.61, p.646S-650S, 1995.

HAYES, W. A. Principles and methods of toxicology. **Taylor & Francis, Philadelphia**, v.4, p.654-682, 2001.

HOLLEY, A. K.; DHAR, S. K.; XU, Y.; ST CLAIR, D. K. Manganese superoxide dismutase: beyond life and death. **Amino Acids**, v.42(1), p.139-158, 2012.

HORNING, K. J.; CAITO, S. W.; TIPPS, K. G.; BOWMAN, A. B.; ASCHNER, M. Manganese is essential for neuronal health. **Annual Review of Nutrition**, v.35, p.71-108, 2015.

IARC- International Agency For Research On Cancer. Cadmium and cadmium compounds. **Iarc Monograph Evaluation of Carcinogens Risks in Humans**, v.100, p.121-145, 2012.

INGELS, ANN-SOFIE M. E.; LAMBERT, W. E.; STOVE, C. P. Determination of gamma-hydroxybutyric acid in dried blood spots using a simple GC-MS method with direct "on spot" derivatization. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.398, p.2173-2182, 2010.

JUSKO, T. A.; HENDERSON, C. R.; LANPHEAR, B. P.; CORY-SLECHTA, D. A.; PARSONS, P. J.; CANFIELD, R. L. Blood lead concentration < 10µg/dL and child intelligence at 6 years of age. **Environmental Health Perspectives**, v.116(2), 2008.

KALES, S. N.; GOLDMAN, R. H. Mercury exposure: current concepts, controversies, and a clinic's experience. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v.44(2), p.143-154, 2002.

KANUMAKALA, S.; BONEH, A.; ZACHARIN, M. Pamidronate treatment improves bone mineral density in children with Menkes disease. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v.25, p.391-398, 2002.

KEEVIL, B. G. The analysis of dried blood spot samples using liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Clinical Biochemistry**, v.44, p.110-118, 2011.

KIM, G.; LEE, H. S.; SEOK BANG, J.; KIM, B.; KO, D.; YANG, M. A current review for biological monitoring of manganese with exposure, susceptibility, and response biomarkers. **Journal of environmental Science and health**, v.33(2), p.229-254, 2015.

KLOUBERT, V.; RINK, L. Zinc as a micronutrient and its preventive role of oxidative damage in cells. **Food & Function**, v.6(10), p.3195-3204, 2015.

KNOELL, D. L.; LIU, M. J. Impact of zinc metabolism on innate immune function in the setting of sepsis. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v.80(4-5), p.271-277, 2010.

KUNO, R. Valores de referência para chumbo, cádmio e mercúrio em população adulta da região metropolitana de São Paulo [tese]. **São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo**, 166p, 2009.

LI, W.; TSE, F. L. S. Dried blood spot sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules. **Biomedical Chromatography**, v.24, p.49-65, 2010.

LIN, C. C.; HUANG, Y. L. Chromium, zinc and magnesium status in type 1 diabetes. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v.18(6), p.588-592, 2015.

LOPES, M. E. M. The successful “guthrie test” celebrates its 10th birthday in Brazil! **Ciência & Saúde Coletiva**, v.16(1), p.716-717, 2011.

MAGALHÃES, P. K. R.; TURCATO, M. F.; ANGULO, I. L.; MACIEL, L. M. Z. Neonatal screening programa the university hospital of the Ribeirão Preto school of medicine, São Paulo University, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, v.25(2), p.445-454, 2009.

MAGGINI, S.; WENZLAFF, S.; HORNIG, D. Essential role of vitamin C and zinc in child immunity and health. **The Journal of International Medical Research**, v.38(2), p.386-414, 2010.

MAHAFFEY, K. R. Methylmercury: a new look at the risk. **Public Health Reports**. v.114, p.397-413, 1999.

MANICKE, N. E.; ABU-RABIE, P.; SPOONER, N.; OUYANG, Z.; COOKS, R. G. Quantitative analysis of therapeutic drugs in dried blood spot samples by paper spray mass spectrometry: an avenue to therapeutic drug monitoring. **Journal American Society for Mass Spectrometry**, v.22, p.1501-1507, 2011.

MARQUES, R. C.; DOREA, J. G.; FONSECA, M. F.; BASTOS, W. R.; MALM, O. Hair mercury in breast-fed infants exposed to thimerosal-preserved vaccines. **European Journal of Pediatrics**, v.166, p.935-941, 2007.

MASSARO, E. J. Handbook of Human Toxicology. CRC Press, 1997.

MCDADE, T. W.; SHELL-DUNCAN, B. Whole blood collected on filter paper provides a minimally invasive method for assessing human transferrin receptor level. **The Journal of Nutrition**, v.132, p.3760-3763, 2002.

MEI, J. V.; ALEXANDER, J. R.; ADAM, B. W.; HANNON, W. H. Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens. **The Journal of Nutrition**, v.131, p.1631S-1636S, 2001.

MICHIGAN DEPARTMENT OF COMMUNITY HEALTH. Collection procedures for capillary blood lead specimens. **Bureau of laboratories division of Chemistry & Toxicology trace metals lead section**, 2010.

MOCCHIGIANI, E.; MALAVOLTA, M.; COSTARELLI, L.; GIACCONI, R.; CIPRIANO, C.; PIACENZA, F.; TESEI, S.; BASSO, A.; PIERPAOLI, S.; LATTANZIO, F. Zinc, metallothioneins and immunosenescence. **The Proceedings of Nutrition Society**, v.69(3), p.290-299, 2010.

MOULIS, J. M. Cellular mechanisms of cadmium toxicity related to the homeostasis of essential metals. **Biometals**, v.23(5), p.877-896, 2010.

NAS - National Academy of Sciences. Toxicological Effects of Methylmercury. National Research Council, 2000.

NCBDDD – National Center on Birth Defects and Developmental Disabilities. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncbddd/newbornscreening>, acesso em outubro de 2015.

NEEDHAM, L. L.; CALAFAT, A. M.; BARR, D. B. Uses and issues of biomonitoring. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v.210, p.229-238, 2007.

NUNES, J. A.; BATISTA, B. L.; RODRIGUES, J. L.; CALDAS, N. M.; NETO, J. A. G.; BARBOSA, F. A simple method based on ICP-MS for estimation of background levels of arsenic, cadmium, copper, manganese, nickel, lead, and selenium in blood of the brazilian population. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v.73, p.878-887, 2010.

O'BROIN, S. D. Influence of hematocrit on quantitative analysis of 'blood spots' on filter paper. **Clinical Chemistry**, v.39(6), p.1354-1355, 1993.

PALMER, C. D.; LEWIS, M. E.; GERAGHTY, C. M.; BARBOSA, F.; PARSONS, P. J. Determination of lead, cadmium and mercury in blood for assessment of environmental exposure: a comparison between inductively coupled plasma mass spectrometry and atomic absorption spectrometry. **Spectrochim, Acta part B**, v.61, p.980-990, 2006.

PASCHAL, D. Biological monitoring of toxic elements. **Journal of Chemical Health and Safety**, v.15, p.8-13, 2007.

PATRIARCA, M.; MENDITTO, A.; DI FELICE, G.; PETRUCCI, F.; CAROLI, S.; MERLI, M.; VALENTE, C. Recent developments in trace elemento analysis in the prevention, diagnosis and treatment of diseases. **Microchemical Journal**, v.59(2), p.194-202, 1998.

PLUM, L. M.; RINK, L.; HAASE, H.; The essential toxin: impact of zinc on human health. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.7(4), p.1342-1365, 2010.

PORTAL BRASIL. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/saude/2012/12/teste-do-pezinho-amplia-exame-em-mais-seis-estados>, publicado em 03/12/2012 16h55, acesso em outubro de 2015.

PRASAD, A. S. Impact of the discovery of human zinc deficiency on health. **Journal of the American College of Nutrition**, v.28(3), p.257-265, 2009.

PRATT, A. J.; DIDONATO, M.; SHIN, D. S.; CABELLI, D. E.; BRUNS, C. K.; BELZER, C. A.; GORRINGE, A. R.; LANGFORD, P. R.; TABATABAI, L. B.; KROLL, J. S.; TAINER, J. A.; GETZOFF, E. D. Structural, functional and immunogenic insights on Cu, Zn superoxide pathogenic virulence factors from neisseria meningitidis and brucella abortus. **Journal of Bacteriology**, 2015.

RANASINGHE, P.; PIGERA, S.; GALAPPATTHY, P.; KATULANDA, P.; CONSTANTINE, G. R. Zinc and diabetes mellitus: understanding molecular mechanisms and clinical implications. **Journal of Faculty of Pharmacy Tehran University of Medical Sciences**, v.23(1), p.44, 2015.

RAYMAN, M. P. The importance of selenium to human health. **Lancet**, v.356, p.233–241, 2000.

RELLO, L.; LAPEÑA, A. C.; ARAMENDÍA, M.; BELARRA, M. A.; RESANO, M. A dried urine spot test to simultaneously monitor Mo and Ti levels using solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v.81, p.11-19, 2013.

RESANO, M.; RELLO, L.; GARCIA-RUIZ, E.; BELARRA, M. A. minimally-invasive filter paper test in combination with solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry for Pb determination in whole blood. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.22, p.1250-1259, 2007.

RUTTER, G. A.; CHABOSSEAU, P.; BELLOMO, E. A.; MARET, W.; MITCHELL, R. K.; HODSON, D. J.; SOLOMOU, A.; HU, M. Intracellular zinc in insulin secretion and action: a determinant of diabetes risk? **The Proceedings of the Nutrition Society**, v.13, p.1-12, 2015.

SANDSTEAD, H.H. Requirements and toxicity of essential trace elements, illustrated by zinc and copper. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.61, p.621S-624S, 1995.

SAVORY, J.; WILLS, M. R. Trace metals – essencial nutrientes or toxins. **Clinical Chemistry**, v.38, p.1565-1573, 1992.

SEIZE OGA, Fundamentos de toxicologia, 3ª ed, Atheneu, 2008.

SMEDLEY, P.L.; KINNIBURGH, D .G. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. **Applied Geochemistry**, v.17, p.517-568, 2002.

STANTON, N. V.; MANEY, J. M.; JONES, R. Evaluation of filter paper blood lead methods: results of a pilot proficiency testing program. **Clinical Chemistry**, v.45, p.2229-2235, 1999.

SWIERGOSZ-KOWALEWSKA, R. Cadmium distribution and toxicity in tissues of small rodents. **Microscopy Research and Technique**, v.55, p.208-222, 2001.

TANNA, S.; LAWSON, G.; Analytical methods used in conjunction with dried blood spots. **Analytical Methods**, v.3, p.1709-1718, 2011.

TEMESI, D.; SWALES, J.; KEENE, W.; DICK, S. The stability of amitriptyline N-oxide and clozapine N-oxide on treated and untreated dry blood spot cards. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.76, p.164-168, 2013.

TERRAZZANO, G.; RUBINO, V.; DAMIANO, S.; SASSO, A.; PETROZZIELLO, T.; UCCI, V.; PALATUCCI, A. T.; GIOVAZZINO, A.; SANTILLO, M.; FELICE, B.; GARBI, C.; MONDOLA, P.; RUGGIERO, G. Tcell activation induces CuZn superoxide dismutase (SOD)-1 intracellular re-localization, production and secretion. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v.1843(2), p.265-274, 2014.

THOMAS, V. M.; SOCOLOW, R. H.; FANELLI, J. J.; SPIRO, T. G. Effects of reducing lead in gasoline: an analysis of internal experience. **Environmental Science and Techonology**, v.33(22), 1999.

TOFFLESON, L.; CORDLE, F. Methylmercury in fish: a review of residual levels, fish consumption and regulatory action in the United States. **Environmental Health Perspectives**, v.68, p.203-208, 1986

TSALEV, D. L. Atomic absorption spectrometry in occupational and environmental health practice, v.3, **CRC Press**, New York, 1995.

USEPA – U.S. Environmental Protection Agency. Mercury study report to congresso. Environmental Protection Agency, v.1, 1997.

WADSWORTH- Wadsworth Center, Department of Health, New York State, Disponível em: http://www.wadsworth.org/newborn/nbs_brochure_for_families.pdf, acesso em: outubro de 2015

WAKEFIELD, J. Lead effects. **Environmental Health Perspectives**, v.110(10), 2002.

WALRAVENS, P. A. Nutritional importance of copper and zinc in neonates and infants. **Clinical Chemistry**, v.26(2), p.185-189, 1980.

WATANABE, T.; HIRANO, S. Metabolism of arsenic and its toxicological relevance. **Archives of Toxicology**, v.87(6), p.969-79, 2013.

WHO - World Health Organization, Participant manual, Module 14: EQA - Dried Blood Spots, p.1-13, 2005.

ANEXO
APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. CEP/FCFRP nº. 050/2015
dfav

Ribeirão Preto, 2 de dezembro de 2015.

À pós-graduanda
Nara da Cruz Carolli Caran
Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior
FCFRP/USP

Prezados Pesquisadores,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado “**AVALIAÇÃO SISTEMÁTICA DO USO DO DRIED BLOOD SPOT PARA DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS QUÍMICOS EM SANGUE CAPILAR VISANDO ESTUDOS DE BIOMONITORAMENTO NO BRASIL**”, apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo **CEP/FCFRP nº. 290 - CAAE nº 48425815.6.0000.5403**, foi aprovado *ad referendum* pelo Comitê de Ética em Pesquisa em 01/12/2015.

Lembramos que, de acordo com a Resolução 466/2012, item IV.5, letra d, o TCLE deverá “ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. Em ambas as vias deverão constar o endereço e contato telefônico ou outro, dos responsáveis pela pesquisa e do CEP local”.

Informamos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe, através da interposição de emenda na Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

PROFª. DRª. CLENI MARA MARZOCCHI MACHADO
Coordenadora do CEP/FCFRP

APÊNDICE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

“Avaliação sistemática do uso do “*Dried Blood Spot*” para determinação de elementos químicos em sangue capilar visando estudos de biomonitoramento no Brasil.”

O(a) senhor(a) está sendo convidado(a) para participar de uma pesquisa, sob a responsabilidade da pesquisadora Nara da Cruz Carolli Caran, sobre uma nova maneira de apanhar o seu sangue para medir a quantidade de substâncias prejudiciais ao seu organismo.

A coleta normal do sangue é feita com a retirada do mesmo de uma veia no meio do seu braço, usando uma seringa com uma agulha que irá furar a veia e puxar o sangue, podendo levar a um maior desconforto e dor. Nesta nova forma de coletar o sangue, não haverá necessidade de furar a sua veia do braço, pois o sangue será retirado da ponta de um dos seus dedos da mão. Para isso, será feito um pequeno furo na ponta do seu dedo com uma pequena agulha, e a gota de sangue que sair será pingada em um papel. Como não será necessário furar a sua veia, essa nova maneira de coleta, retirará pouco sangue, causará pequena dor, será mais rápida, e não deixará mancha roxa.

Esta pesquisa será realizada para saber se a quantidade de substâncias prejudiciais presentes no sangue coletado na veia do braço é a mesma do sangue coletado no dedo.

Esperamos que cerca de 20 pessoas, sendo 10 homens e 10 mulheres, aceitem participar desta pesquisa através da coleta de sangue no braço e no dedo.

Este documento foi escrito para lhe dar as informações necessárias e aquelas que o(a) Sr.(a) julgue importante conhecer sobre esta pesquisa. Antes de decidir sobre sua participação neste estudo, é muito importante que o(a) Sr.(a) saiba a razão pelo qual a pesquisa está sendo desenvolvida e o que ela irá envolver.

Por que é importante fazer esta pesquisa?

Esta pesquisa é importante para avaliarmos se a nova forma de coleta de sangue no dedo pode ser utilizada de forma confiável para medir a quantidade de substâncias prejudiciais presentes no organismo das pessoas e, assim, conseguir identificar e tratar essas pessoas.

Quais serão os procedimentos realizados?

1) Coletaremos uma amostra de sangue, aproximadamente 2 colheres de sopa do Sr.(a) através da coleta comum na veia do braço. O sangue será retirado da veia utilizando uma seringa com uma agulha na ponta.

2) Com uma pequena agulha, será feito um pequeno furo na ponta do dedo. A gota de sangue será pingada em um papel. Pegaremos três gotas de sangue.

Se o(a) Sr.(a) não concordar em participar, não haverá nenhum problema. Caso concorde em participar, o Sr.(a) também terá a liberdade de desistir a qualquer momento.

Quais os riscos e desconfortos ao participar desta pesquisa?

A coleta de sangue na veia do braço pode provocar uma pequena dor ou desconforto, ou uma pequena mancha roxa. A coleta será feita por um profissional qualificado. O procedimento de coleta de sangue do dedo pode causar uma pequena dor.

Quais os benefícios de participar deste estudo?

O benefício será a aplicação de uma nova maneira de coleta de sangue no dedo da mão para avaliar as substâncias prejudiciais a saúde na população. Assim que o método estiver funcionando, será possível identificar populações que estão sendo contaminadas por estas substâncias.

Custos

É importante lembrar que o(a) Sr.(a) não terá que pagar nada com a pesquisa e que sua participação é voluntária. O(a) Sr.(a) não receberá nenhum valor.

Privacidade / Confidencialidade

Os resultados do estudo serão usados somente para esta pesquisa e seu nome não será revelado em nenhum momento.

O(a) Sr.(a) poderá desistir de participar a qualquer momento, mesmo depois de ter doado o sangue. Para isto, o(a) Sr.(a) deverá informar sua decisão aos pesquisadores, e sua amostra de sangue será descartada.

Contatos

Você poderá solicitar informações entrando em contato com os pesquisadores: Professor Fernando Barbosa Jr e Nara da Cruz Carolli Caran pelo telefone (16)3315-4701, de segunda a sexta feira das 08:00 às 17:00. O telefone (16)98108-2402 estará disponível para solicitar informações a qualquer momento, inclusive ligação a cobrar.

Você ainda poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de São Paulo, pelo telefone (16) 3315-4213, de segunda a sexta feira das 08:00 às 17:00.

“Ao fornecer meu consentimento assinando este documento, eu concordo que fui informado(a) dos objetivos da pesquisa de maneira clara e detalhada. Esclareci todas as minhas perguntas no momento lendo este documento. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar da pesquisa.”

_____/_____/____

Data

Voluntário

Pesquisador Responsável

Nara da Cruz Carolli Caran

CPF: 364.560.098-12