

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

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.

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 gastrintestinal 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 frequentemente 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 glutationa 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 sague, 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).

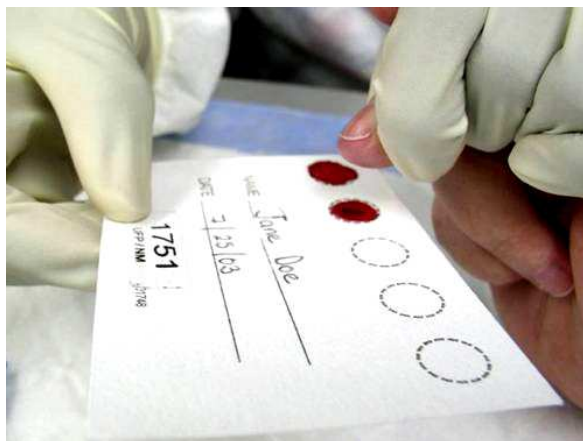


Figura 1. Coleta de sangue feita através da punção do dedo da mão e impregnação da amostra nas marcações existentes no papel do cartão de coleta (WHO, 2005).

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).

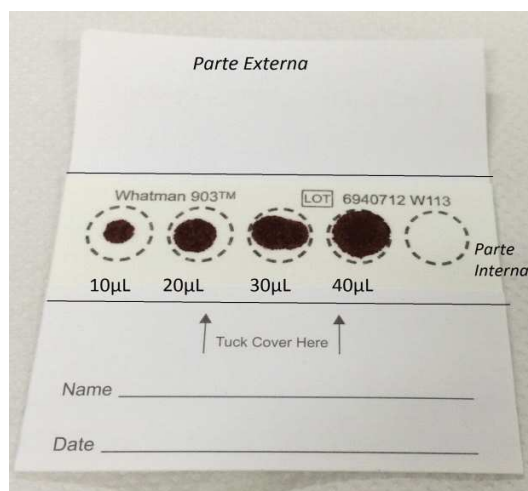


Figura 2. Cartão de coleta *Whatman 903TM*. Visualização da parte externa que oferece proteção e parte interna do cartão onde se encontra o papel para aplicação da amostra. Aplicação dos volumes de 10µL, 20µL, 30µL e 40µL de sangue na parte interna para ilustração da quantidade que cada tracejado consegue 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).

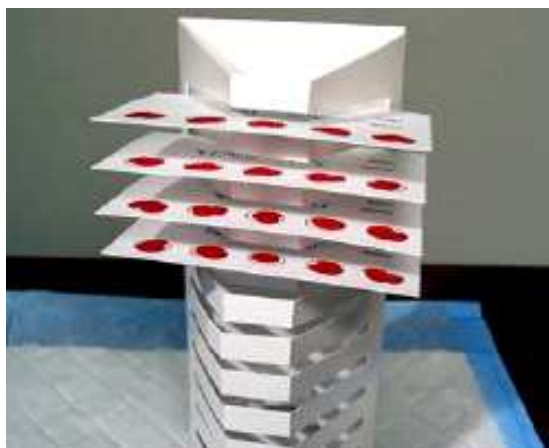


Figura 3. Exemplo de suporte para a secagem dos cartões de coleta contendo as amostras de sangue (WHO, 2005).

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).

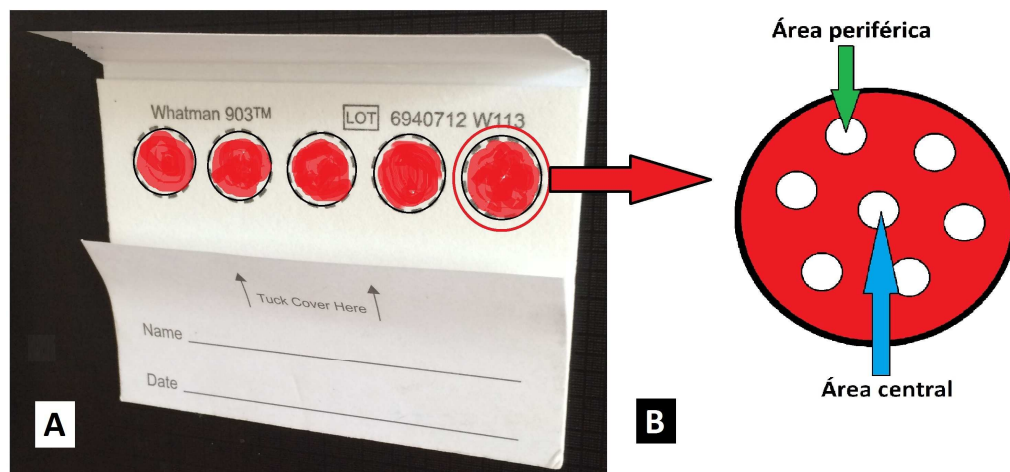


Figura 4. Figura esquemática mostrando (A) o cartão de coleta com a impregnação de sangue nas cinco áreas impressas no papel e (B) os cortes nas áreas centrais e periféricas de uma única gota de sangue impregnada na área demarcada.

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.

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 element 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.