



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS – PPGCA**

DANIEL RICARDO DIAS ALVES

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE COLETA DE AMOSTRA DE SANGUE
SECO PARA ESTIMATIVA DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO,
METAHEMOGLOBINA E MALONDIALDEÍDO, PARA USO EM ESTUDOS
POPULACIONAIS**

Macapá/AP
2021

DANIEL RICARDO DIAS ALVES

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE COLETA DE AMOSTRA DE SANGUE SECO PARA ESTIMATIVA DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO, METAHEMOGLOBINA E MALONDIALDEÍDO, PARA USO EM ESTUDOS POPULACIONAIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Ambientais, na área de concentração de Gestão, Tecnologia e Inovação Ambiental, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Araújo da Silva

Macapá/AP
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá
Elaborada por Jamile da Conceição da Silva – CRB-2/1010

- A474d Alves, Daniel Ricardo Dias.
Desenvolvimento e validação de coleta de amostra de sangue seco para estimativa de biomarcadores de estresse oxidativo, metahemoglobina e malondialdeído, para uso em estudos populacionais / Daniel Ricardo Dias Alves. - Macapá, 2021.
1 recurso eletrônico. 59 folhas.
- Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Campus Marco Zero, Universidade Federal do Amapá, Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Macapá, 2021.
Orientador: Professor Doutor Gabriel Araújo da Silva
- Modo de acesso: World Wide Web.
Formato de arquivo: Portable Document Format (PDF).
- Inclui referências e anexos.
1. Estresse oxidativo. 2. Metahemoglobina. 3. Biomonitoramento. I. Silva, Gabriel Araújo da, orientador. II. Título.

Classificação Decimal de Dewey, 22 edição, 615.9

ALVES, Daniel Ricardo Dias. **Desenvolvimento e validação de coleta de amostra de sangue seco para estimativa de biomarcadores de estresse oxidativo, metahemoglobina e malondialdeído, para uso em estudos populacionais.** Orientador: Gabriel Araújo da Silva. 2021. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Campus Marco Zero, Universidade Federal do Amapá, Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Macapá, 2021.

DANIEL RICARDO DIAS ALVES

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE COLETA DE AMOSTRA DE SANGUE SECO PARA ESTIMATIVA DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO, METAHEMOGLOBINA E MALONDIALDEÍDO, PARA USO EM ESTUDOS POPULACIONAIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Ambientais, na área de concentração de Gestão, Tecnologia e Inovação Ambiental, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Araújo da Silva

DATA DA APROVAÇÃO: 31/05/2021



Orientador: Prof. Dr. GABRIEL ARAÚJO DA SILVA



Examinador: Prof. Dra MARCELA NUNES VIDEIRA



Examinador: Prof. Dra LILIAN GRACE DA SILVA SOLON



Examinador: Prof. Dr. FÁBIO RODRIGUES DE OLIVEIRA

Macapá/AP
2021

AGRADECIMENTOS

A presente dissertação de mestrado não teria chegado onde chegou sem o precioso apoio de várias pessoas.

Agradeço ao meu orientador, Professor Doutor Gabriel Araújo da Silva, por toda a paciência, empenho e dedicação nas orientações que me foram feitas. Muito obrigado por me ter corrigido quando necessário, sempre acreditando e motivando até a conclusão deste trabalho.

Desejo igualmente agradecer a todos os meus colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais-PPGCA, turma 2018, que proporcionaram várias experiências que levarei comigo em minha memória.

Por último, quero agradecer à minha família, minha esposa Gerciane Alves, pelo seu amor e companheirismo, minha mãe Dileuza Dias, meu Pai Francisco Alves, minhas irmãs Dienny Alves e Daniella Alves e demais familiares que sempre torceram por mim. Meus amigos de longas datas que mesmo com o passar dos anos a amizade continuou a mesma e também a todos os amigos recentes que de alguma forma tornaram-se parte da minha vida e acreditaram em meu potencial para a elaboração deste trabalho.

À todos, meu muito obrigado!

RESUMO

No Brasil ainda existem milhares de trabalhadores que exercem suas funções em postos de combustíveis e estão em constante exposição à xenobióticos derivados de petróleo. Os estudos relacionados ao monitoramento de biomarcadores de efeito nesta população são escassos, em decorrência da dificuldade de coleta de amostras biológicas. Assim, o presente estudo desenvolveu e validou a metodologia coleta por sangue seco em papel para a dosagem de biomarcadores de estresse oxidativo, para futuro uso no monitoramento dos efeitos colaterais à saúde devido a exposição prolongada aos vapores de combustíveis. Para tanto, foram realizados ensaios de desenvolvimento e validação in house do método de coleta proposto, com avaliação do tipo e gramatura do papel, preservante/antioxidante (sem adição, ácido ascórbico ou hidroxitolueno butilado – BHT) e estabilidade da amostra a temperatura ambiente sem uso de dessecador. As concentrações de hemoglobina (Hb), Metahemoglobina (metHb) e malondialdeído (MDA) (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – SRAT – em equivalentes de malondialdeído) foram quantificados por métodos espectrofotométricos de rotina. As comparações entre os resultados obtidos método de coleta tradicional (punção venosa) e o sangue seco coletado e armazenado pelo método proposto foram realizadas. As concentrações de Hb mostraram pouca variação ($DPR = 8,95 \pm 5,36$) entre os dois métodos de coleta, assim os demais biomarcadores foram normalizados pela concentração de Hb (%metHb e SRAT/Hb). A correlação entre %metHb obtidas pelos diferentes tipos de coleta não apresentaram resultados satisfatórios ($R^2 = 0,0713$), sendo desaconselhado o uso de sangue seco em papel para esse biomarcador. Já os níveis de SRAT/Hb apresentaram forte correlação ($R^2 = 0,9394$) entre os resultados obtidos pelos dois métodos de coleta. Dessa forma, o método desenvolvido é estável até 4h e eficiente, medindo com exatidão e precisão as concentrações endógenas de SRAT, assim há a possibilidade do uso da tecnologia desenvolvida como alternativa viável para estimar os níveis deste biomarcador em estudos populacionais.

PALAVRAS-CHAVE: Biomonitoramento; Biomarcadores de efeito; Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; Metahemoglobina.

ABSTRACT

In Brazil, there are still thousands of workers who work at gas stations and are constantly exposed to petroleum-derived xenobiotics. Studies related to the monitoring of effect biomarkers in this population are scarce, due to the difficulty in collecting biological samples. Thus, the present study developed and validated the methodology for collecting dried blood spot for the determination of oxidative stress biomarkers, for future use in monitoring side effects to health due to prolonged exposure to fuel vapors. For this purpose, development tests and in-house validation of the proposed collection method were carried out, evaluating the type and weight of the paper, preservative / antioxidant (without addition, ascorbic acid or butylated hydroxytoluene - BHT) and sample stability at room temperature without use of desiccator. The concentrations of hemoglobin (Hb), methemoglobin (metHb) and malondialdehyde (MDA) (Thiobarbituric acid reactive substances - TBARS - in malondialdehyde equivalents) were quantified by routine spectrophotometric methods. The comparisons between the results obtained using the traditional collection method (venipuncture) and the dried blood spots collected and stored by the proposed method were performed. The Hb concentrations showed little variation ($DPR = 8.95 \pm 5.36$) between the two collection methods, so the other biomarkers were standardized by the Hb concentration (%metHb and SRAT/Hb). The correlation between %metHb obtained by the different types of collection show no satisfactory results ($R^2 = 0.0713$), and the use of dry blood spot collection for this biomarker is not recommended. The SRAT/Hb levels showed a strong correlation ($R^2 = 0.9394$) between the results obtained by the two collection methods. Thus, the method developed is stable up to 4h and efficient, measuring endogenous SRAT concentrations with accuracy and precision, so there is the possibility of using the developed technology as a viable alternative to estimate the levels of this biomarker in population studies.

KEYWORDS: Biomonitoring; Effect biomarkers; Substances reactive to thiobarbituric acid; Methaemoglobin.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Curvas de estabilidade dos analitos hemoglobina (Hb; A), metahemoglobina (%metHb; B) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRAT; C) nas amostras de voluntários coletadas em dispositivos de papel filtro 250g/m² com ácido ascórbico (50 µg/disco; azul) ou BHT (50 µg/disco; laranja), entre 0 – 24h após a coleta. 36
- Figura 2: Dispersão das médias de dados (n=3) das amostras coletadas por punção venosa (laranja) ou sangue seco (azul) para as determinações de concentração de hemoglobina (Hb; g/dL) (A, controle; B, exposto), porcentagem de metahemoglobina (%metHb) (C, controle; D, exposto) e concentração de Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRAT/TBARS; µmol/g) (E, controle; F, exposto). 41
- Figura 3: Correlações, linhas de tendência e equações da reta dos resultados de média (n=3) das amostras coletadas por punção venosa (X; sangue venoso) e por sangue seco em papel (Y; sangue seco) para %metHb e concentrações de SRAT. 42
- Figura 4: Dados das concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúricos (SRAT; µmol/g) em formato de blood spot (mediana ± erro) para as amostras coletadas por punção venosa (A) ou sangue seco (B). *** diferença estatística de $p < 0,001$. 45
- Figura 5: Dados das porcentagens de metahemoglobina (metHb; %) em formato de blood spot (mediana ± erro) para as amostras coletadas por punção venosa (A) ou sangue seco (B). ** diferença estatística de $p < 0,005$. 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Características da amostra de participantes da pesquisa para os dois grupos em estudo, controle e exposto (n=40).	39
Tabela 2:	Distribuição das médias (n=40), desvio padrão e limites das concentrações de hemoglobina (Hb), porcentagem de metahemoglobina (%metHb) e níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRAT).	40

SUMÁRIO

	CAPÍTULO I – APRESENTAÇÃO	11
1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
3	HIPÓTESES	20
3	OBJETIVOS	21
3.1	OBJETIVO GERAL	21
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
	CAPITULO II - ARTIGO	22
	RESUMO	24
	ABSTRACT	26
1	INTRODUÇÃO	28
2	MATERIAL E MÉTODOS	29
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
	REFERÊNCIAS	47
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
	REFERÊNCIAS	51
	ANEXOS	57

CAPÍTULO I - APRESENTAÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Combustíveis fósseis são misturas de hidrocarbonetos alifáticos, cíclicos e aromáticos policíclicos, e são obtidos pela destilação fracionada do petróleo. Gasolina, o combustível fóssil mais utilizado, também chamada de nafta, é uma mistura de hidrocarbonetos, e sua composição depende da natureza do petróleo bruto e o processo de produção adotado pela refinaria. A composição de hidrocarbonetos da nafta usada para preparar a gasolina pode variar dependendo desses fatores, todavia é composta principalmente por hidrocarbonetos com cadeias de 4-12 átomos de carbono. Em todo o mundo, há também a presença de adulterantes neste combustível, com aumento das concentrações de hexano, tolueno e benzeno (BABU; KRISHNA; MANI, 2017; BEZERRA, A. C. de M. *et al.*, 2019).

No Brasil, diferente da realidade de países desenvolvidos, ainda existem centenas de milhares de trabalhadores que exercem suas funções em postos de combustíveis, e estes estão em constante exposição à derivados de petróleo, que são compostos que podem causar diversos efeitos nocivos ao organismo humano. Devido à grande quantidade de postos de gasolina, que passam de 39 mil unidades em todo o Brasil, quanto de frentistas, que passam de 180 mil trabalhadores, a quantidade de estudos relacionados à biomarcadores e biomonitoramento desta aérea são considerados ainda muito escassos (AMARAL *et al.*, 2017).

Os combustíveis fósseis, em especial a gasolina, estão relacionados à alteração de parâmetros hematológicos e indução de estresse oxidativo, caracterizando uma provavelmente ameaça a saúde de trabalhadores expostos ocupacionalmente a estes xenobióticos (AHMADI *et al.*, 2019). O dano oxidativo está associado a vários tipos de doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, câncer, diabetes, obesidade, doenças neurodegenerativas e doenças inflamatórias crônicas. O estresse oxidativo pode contribuir como fator causal no desenvolvimento da doença ou, mais indiretamente, como consequência das doenças que promovem o desenvolvimento de outras patologias (IMLAY, 2003; PORTA, 2019).

Já existem estudos a respeito do monitoramento dos efeitos causados à saúde de trabalhadores de postos de combustível (AHMADI *et al.*, 2019; D'ALASCIO *et al.*, 2014; GRENDELE; TEIXEIRA, 2009; SANTI *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2017). No entanto, não há poucos estudos, principalmente por pesquisadores brasileiros, que tratam sobre a utilização da técnica de sangue seco, para o monitoramento dos efeitos colaterais à saúde (dano oxidativo) devido sua exposição ocupacional e prolongada a esses vapores de combustíveis fósseis.

Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivo desenvolver e validar a amostragem por sangue seco para o monitoramento populações, em especial de trabalhadores de postos de combustíveis, auxiliando no processo de triagem, avaliando as concentrações dos marcadores de estresse oxidativo, metahemoglobina e malondialdeído. Assim como, poderá ser aplicado a outras populações que também estejam expostas a xenobióticos, com caráter oxidante.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Biomarcadores e Biomonitoramento

As mudanças que vem acontecendo na vida do homem desde o século passado, sejam elas no ambiente de trabalho ou não, as o expuseram a uma quantidade gigantesca de substâncias químicas que podem ou não estar oferecendo riscos a sua saúde (GOUVEIA *et al.*, 2014)(GOUVEIA *et al.*, 2014).

As interações entre agentes químicos e o organismo podem alterar diversos parâmetros biológicos, tal interação poderá ser chamada de biomarcador se houver relação entre a quantidade de exposição e o efeito biológico provocado pela substância. Quando realizado de maneira sistemática e periódica, os biomarcadores podem ser utilizados para relacionar a causa-efeito ou dose-efeito da exposição de agentes químicos e seus potenciais riscos à saúde e desta forma recebe o nome de Biomonitoramento, podendo ser usado para entender se existe algum efeito tóxico e auxiliar na tomada de decisões para diminuir os efeitos da exposição (AMORIM, 2003; GOUVEIA *et al.*, 2014).

Entende-se como biomarcador, tanto a substância em si que está sendo alvo do estudo quanto os subprodutos das transformações que ocorrem ou podem ocorrer no organismo, podendo ser usados em diversas formas de estudo dependendo da forma da exposição, intensidade e efeitos causados no organismo (AMORIM, 2003).

Os biomarcadores são classificados em três grupos: de exposição, de efeito e de suscetibilidade. O primeiro, são aqueles em que é realizada dosagem/identificação direta do agente no sangue, urina, ou outra amostra biológica, enquanto que o segundo grupo a dosagem/identificação é feita de forma indireta, ou seja, através de uma resposta do organismo por estar ou ter sido exposto ao agente de estudo e o terceiro grupo compara a predisposição genética entre indivíduos expostos a um mesmo agente (AMORIM, 2003; GRENDELE; TEIXEIRA, 2009).

A gasolina tem em sua composição diversos agentes químicos que ao serem absorvidos pelo organismo, mesmo em baixas concentrações, podem agir como depressores do sistema nervoso central ou também causar danos, como seu efeito carcinogênico (AMARAL *et al.*, 2017).

Como exemplo pode ser citado o benzeno, que entra em contato com o organismo dos seres vivos, principalmente, pelas vias aéreas, mas há casos onde a contaminação se dá por ingestão ou por via cutânea quando o contato é direto com o agente. O benzeno presente na gasolina pode assumir papel de biomarcador tanto de efeito quanto de exposição, uma vez que

pode ser dosado no organismo tanto de forma direta, em análises do sangue, urina ou ar exalado, quanto pela dosagem dos metabólitos formados no organismo, que podem ser: ácido trans, trans-mucônico e o ácido S-fenilmercaptúrico (RABELO *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2017).

Além dos efeitos a nível celular, em alguns casos quando a exposição aos vapores dos componentes de combustíveis é prolongada ou mais acentuada, alguns sintomas mais aparentes podem caracterizar a intoxicação do organismo, e estes são: dispneia, xerostomia, rinite alérgica, cefaleia, tremores, vertigem ou em casos quando há ingestão ou inalação de grandes concentrações pode levar à morte (D'ALASCIO *et al.*, 2014).

A toxicologia ocupacional, área da toxicologia voltada aos estudos relacionados a intoxicações provocadas por agentes tóxicos que acarretam danos ao organismo provenientes do ambiente de trabalho, atua na tentativa de prevenir e monitorar a exposição através de biomarcadores ou de Indicadores Biológicos de Exposição-IBEs, diminuindo assim os riscos à saúde (RABELO *et al.*, 2017).

A dosagem dos IBEs ao benzeno no Brasil são realizadas utilizando, principalmente, a análise do sangue como matriz biológica de determinação, mesmo com as desvantagens do método de coleta tradicional que é considerado invasivo, pode gerar amostras heterogêneas e possui custo elevado por conta da necessidade de mão de obra especializada, cuidados especiais no armazenamento (tubos de coleta, controle de temperatura, etc.) e a análise do material que é realizada, geralmente, por cromatografia em fase gasosa acoplada a uma técnica de *headspace* (COUTRIM; DE CARVALHO; ARCURI, 2000).

2.2. Sangue Seco em Papel

Para estudos de biomonitoramento as amostras de sangue total e soro são tradicionalmente as mais utilizadas, pois facilitam a comparação dos resultados com estudos já realizados, porém a coleta de sangue total e soro acabam apresentando vários pontos negativos (logística, armazenamento, custo, método de coleta) fazendo com que se busquem alternativas para substituir este método de coleta (GOUVEIA *et al.*, 2014).

A utilização da técnica de sangue seco em papel (alternativa ao método de coleta de amostras de sangue seco e total) data do início da década de 60, quando foi utilizada para mensurar a quantidade de fenilalanina em recém nascidos com intuito de conseguir diagnosticar precocemente a fenilcetonúria, dando assim, um grande passo na triagem neonatal. No Brasil a técnica de sangue seco em papel é amplamente conhecida como “teste do pezinho” e faz parte do Programa Nacional de Triagem Neonatal-PNTN, que foi instituído pela Portaria GM/MS nº 822/2001 (GUTHRIE; SUSI, 1963).

Dentre as várias vantagens que o método de sangue seco em papel de filtro oferece, o método de coleta chama atenção devido a possibilidade dos próprios pacientes, seguindo as devidas instruções e com treinamento adequado, terem a possibilidade/conveniência de fazê-la quando necessário. A coleta pode ser realizada perfurando tanto a ponta dos dedos da mão quanto o calcanhar do paciente, utilizando lancetas descartáveis que perfurem cerca de 2mm de profundidade do local previamente higienizado (EDELBROEK; HEIJDEN; STOLK, 2009).

Existem outras vantagens da utilização do método de sangue seco em papel em relação aos métodos tradicionais (sangue total e soro), como por exemplo: a técnica é pouco invasiva, sendo necessário apenas poucos microlitros de sangue, o material utilizado para realizar a coleta é de baixo custo, a facilidade de armazenamento e transporte das amostras já que os cartões de coleta são leves e ocupam pouco espaço, facilidade na aplicação do método em grandes populações e é aplicável à vários métodos de análises (DEMIREV, 2013).

Apesar das grandes vantagens algumas questões devem ser levadas em consideração para a escolha do método de sangue seco em papel aos métodos tradicionais, pois alguns fatores limitantes da técnica devem ser considerados. A utilização do pouco volume de amostra limita a utilização deste tipo de coleta à métodos de análises com alta sensibilidade; devido as amostras serem secas o método se mostra inadequado para análises de materiais voláteis ou sensíveis ao ar; também vale ressaltar que existe a possibilidade da concentração do analito encontrado no sangue capilar ser diferente da concentração do mesmo analito no sangue venoso proveniente de uma coleta pelos métodos tradicionais (SHARMA *et al.*, 2014).

A técnica de sangue seco em papel também é utilizada para dosagem de biomarcadores de estresse oxidativo, principalmente o 8-epi-PGF_{2α}, mas sempre associado a métodos de análise complexos ou de alto custo, tais como a espectrometria de massa e a cromatografia líquida (BASTANI; GUNDERSEN; BLOMHOFF, 2012).

2.3. Radicais Livres e Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio

Radical livres são todos os átomos ou moléculas, que em sua camada de valência, tem um ou mais elétrons não pareados e, quando estão desta forma, são considerados instáveis. No corpo humano praticamente todos os elétrons existem em pares (pareados) e os átomos ou moléculas que em sua camada de valência tem todos os seus elétrons pareados são chamadas de estáveis (PIERCE; CACKLER; ARNETT, 2004).

Devido a oxidação ser essencial no metabolismo dos seres de vida aeróbica, a formação de radicais livres se dá a todo momento e estes radicais serão chamados, principalmente, de espécies reativas de oxigênio-ERO's ou espécies reativas de nitrogênio-ERN's, dependendo de

onde o elétron desemparelhado se encontrar, ou nos átomos de oxigênio ou de nitrogênio (BARREIROS; DAVID, 2006).

Os radicais livres podem existir tanto na forma de radicalar quanto na forma não radicalar, podendo citar exemplos de ERO's na forma radicalar o superóxido, a hidroxila, a peroxila, a alcoxila, dentre outros, e na forma não radicalar podemos citar peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso, ozônio, oxigênio *singlete*, etc. Os exemplos de ERN's radicalares são: óxido nítrico, dióxido de nitrogênio, etc... e os exemplos radicalares são: ácido nitroso, tetróxido de dinitrogênio, trióxido de dinitrogênio, peroxnitrito, ácido peroxinitreno, íon nitrônio, dentre outros (HALLIWELL, 1996).

No corpo humano, geralmente, os radicais livres tentam se tornar estáveis roubando elétrons de moléculas como: ácidos nucleicos, lipídeos, proteínas. O resultado da reação será que o radical livre agora passará a ser uma molécula ou átomo estável e a molécula de onde foi retirado este elétron se tornará um radical livre, podendo assim, dar início a uma reação em cadeia (HALLIWELL, 1996; PIERCE; CACKLER; ARNETT, 2004).

2.4. Sistemas de Defesa Antioxidante

Os antioxidantes são necessários para tentar reparar, combater e minimizar os danos, que são inevitáveis, produzidos pelas EROs e ERNs transformando-os em água para evitar que haja superprodução dos mesmos (ANDRADE *et al.*, 2010; HALLIWELL, 1996).

Os antioxidantes são divididos em dois grandes grupos: os enzimáticos ou antioxidantes naturais, com seus principais exemplos o Superóxido Dismutase (SOD), a Catalase (CAT), a Glutathione Peroxidase (GPx) e a Glutathione Redutase (GR), e os não enzimáticos ou sintéticos ou ainda suplementos de dieta, como também são conhecidos, com os principais exemplos: Glutathione, Coenzima Q (CoQ), Ácido Úrico, Vitamina E ou Tocoferol, Vitamina C ou Ascorbato, β -caroteno, Proteínas de transporte de metais de transição, Transferrina, Ceruloplasmina (ANDRADE *et al.*, 2010; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

O combate aos efeitos que podem ser causados pelas ERO's e ERN's é constante e ininterrupto e podemos citar como exemplo de atuação dos sistemas antioxidantes enzimáticos a catalase, que é de suma importância na oxidação dos ácidos graxos de cadeia longa, onde sua atividade pode ser medida através do aumento da concentração de oxigênio juntamente com o decaimento da concentração de H_2O_2 , enquanto que sobre os sistemas antioxidantes não enzimáticos podemos citar como exemplo a Coenzima Q que atua tanto na inibição quanto na propagação da peroxidação lipídica, impedindo que haja formação de radicais peroxila (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Os sistemas de defesa antioxidantes são divididos em três categorias, dependendo da atuação necessária no organismo, são elas: de prevenção, quando os antioxidantes impedem que haja estresse oxidativo ou que o mesmo evolua; de interceptação, quando as espécies reativas são formadas e precisam ser controladas; e de reparo que atuam para restaurar o dano causado pelos agentes oxidantes (HELMUT SIES; BERNDT; JONES, 2017).

2.5. Estresse Oxidativo

Durante o século 20 vários pesquisadores, como: Bucher, Chance, Klingenberg, Krebs, Michaelis, Szent-Gyriagy, Warburg, Wieland e vários outros, se dedicaram ao estudo na área de biologia redox (Oxidação-redução) contribuindo para o crescimento científico a respeito deste assunto e que estão disponíveis nos dias atuais (SIES, 2018).

O termo estresse oxidativo foi inserido na biologia redox e medicina somente em meados da década de 80, onde, principalmente na área da medicina, devido à grande quantidade de trabalhos publicados, houve uma diluição do significado do termo e até mesmo o uso incorreto do mesmo (SIES, 2015).

Devido as constantes reações causadas por condições onde os radicais livres estão em excesso e a deficiência da capacidade dos sistemas de proteção antioxidante do organismo em anular estas reações, ocorre um desequilíbrio entre a formação e a remoção das ERO's no organismo, caracterizando o que é chamado de estresse oxidativo (PISOSCHI; POP, 2015).

Para SIES (2015) estresse oxidativo foi conceituado de duas formas desde a criação do termo, sendo elas: "Um distúrbio no equilíbrio pró-oxidante-antioxidante em favor do primeiro" em 1985 e como "Um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, levando a uma ruptura da sinalização e controle redox e/ou danos moleculares" em 2007.

O estresse oxidativo, dependendo de onde esteja ocorrendo o dano, pode se manifestar como diversas patologias no organismo, como por exemplo: o câncer quando o dano ocorre no DNA ou membrana lipídica, o que pode levar a morte celular; diversas doenças cardiovasculares quando o processo de oxidação forma lipídios oxidados que tem efeito pró-inflamatório ou das lipoproteínas que estão presentes nas paredes dos vasos sanguíneos que podem desenvolver aterosclerose ou processos inflamatórios; doenças neurodegenerativas caso a produção de ERO's participe dos eventos onde a morte celular resulta em neurodegeneração; o diabetes quando o dano celular proveniente do estresse oxidativo altera as funções do pâncreas e várias outras doenças inflamatórias (PISOSCHI; POP, 2015).

O dano oxidativo no organismo pode ser avaliado pelos biomarcadores gerados consequentes das reações entre as ERO's e ERN's e as macromoléculas (lipídeos, açúcares, ácidos nucleicos e proteínas) disponíveis no organismo, podendo ser quantificado através de análises sanguíneas ou de fluidos corporais (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

3. HIPÓTESES

Segundo a revisão da literatura utilizada para o presente estudo, apresentam-se as seguintes hipóteses:

Hipótese Nula: É possível utilizar a técnica de sangue seco em papel para quantificar biomarcadores de estresse oxidativo para triagem de população.

Hipótese Alternativa: Não é possível utilizar a técnica de sangue seco em papel para quantificar biomarcadores de estresse oxidativo para triagem de população.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral:

Utilizar a técnica de sangue seco em papel de filtro para o biomonitoramento de populações através da dosagem do estresse oxidativo.

4.2. Objetivos Específicos:

- Dosar as substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico nas amostras-SRAT;
- Dosar hemoglobina e metahemoglobina nas amostras;
- Testar a estabilidade das amostras em diferentes períodos de tempo;
- Comparar os resultados obtidos das análises realizadas nas amostras coletadas em papel de filtro na forma de sangue seco com as amostras coletadas pelo método tradicional (punção venosa);
- Validar o método tendo como base os parâmetros de repetibilidade e reprodutibilidade;

CAPÍTULO II - ARTIGO

Artigo submetido à REVISTA SOCIEDADE & NATUREZA (UFU. ONLINE) – ISSN 1982-4513. Qualis A2 em Ciências Ambientais.

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE COLETA DE AMOSTRA DE SANGUE SECO PARA ESTIMATIVA DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO, METAHEMOGLOBINA E MALONDIALDEÍDO, PARA USO EM ESTUDOS POPULACIONAIS

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF DRY BLOOD SAMPLE COLLECTION FOR ESTIMATING OXIDATIVE STRESS BIOMARKERS, METHEMOGLOBIN AND MALONDIALDEHYDE, FOR USE IN POPULATION STUDIES

Autores: Daniel Ricardo Dias Alves¹, Cecília da Silva Gomes², Gabriel Araújo da Silva^{1,2}

Filiação: ¹ Programa de pós-graduação em Ciências Ambientais da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), Macapá, Amapá, Brasil; ² Laboratório de Química Orgânica e Bioquímica da Universidade do Estado do Amapá (UEAP), Macapá, Amapá, Brasil.

RESUMO:

No Brasil ainda existem milhares de trabalhadores que exercem suas funções em postos de combustíveis e estão em constante exposição à xenobióticos derivados de petróleo. Os estudos relacionados ao monitoramento de biomarcadores de efeito nesta população são escassos, em decorrência da dificuldade de coleta de amostras biológicas. Assim, o presente estudo desenvolveu e validou a metodologia coleta por sangue seco em papel para a dosagem de biomarcadores de estresse oxidativo, para futuro uso no monitoramento dos efeitos colaterais à saúde devido a exposição prolongada aos vapores de combustíveis. Para tanto, foram realizados ensaios de desenvolvimento e validação *in house* do método de coleta proposto, com avaliação do tipo e gramatura do papel, preservante/antioxidante (sem adição, ácido ascórbico ou hidroxitolueno butilado – BHT) e estabilidade da amostra a temperatura ambiente sem uso de dessecador. As concentrações de hemoglobina (Hb), Metahemoglobina (metHb) e malondialdeído (MDA) (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – SRAT – em equivalentes de malondialdeído) foram quantificados por métodos espectrofotométricos de rotina. As comparações entre os resultados obtidos método de coleta tradicional (punção venosa) e o sangue seco coletado e armazenado pelo método proposto foram realizadas. As concentrações de Hb mostraram pouca variação (DPR = $8,95 \pm 5,36$) entre os dois métodos de coleta, assim os demais biomarcadores foram normalizados pela concentração de Hb (%metHb e SRAT/Hb). A correlação entre %metHb obtidas pelos diferentes tipos de coleta não apresentaram resultados satisfatórios ($R^2 = 0,0713$), sendo desaconselhado o uso de sangue seco em papel para esse biomarcador. Já os níveis de SRAT/Hb apresentaram forte correlação ($R^2 = 0,9394$) entre os resultados obtidos pelos dois métodos de coleta. Dessa forma, o método desenvolvido é estável até 4h

e eficiente, medindo com exatidão e precisão as concentrações endógenas de SRAT, assim há a possibilidade do uso da tecnologia desenvolvida como alternativa viável para estimar os níveis deste biomarcador em estudos populacionais.

PALAVRAS-CHAVE: Biomonitoramento; Biomarcadores de efeito; Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; Metahemoglobina.

ABSTRACT:

In Brazil, there are still thousands of workers who work at gas stations and are constantly exposed to petroleum-derived xenobiotics. Studies related to the monitoring of effect biomarkers in this population are scarce, due to the difficulty in collecting biological samples. Thus, the present study developed and validated the methodology for collecting dried blood spot for the determination of oxidative stress biomarkers, for future use in monitoring side effects to health due to prolonged exposure to fuel vapors. For this purpose, development tests and in-house validation of the proposed collection method were carried out, evaluating the type and weight of the paper, preservative / antioxidant (without addition, ascorbic acid or butylated hydroxytoluene - BHT) and sample stability at room temperature without use of desiccator. The concentrations of hemoglobin (Hb), methemoglobin (metHb) and malondialdehyde (MDA) (Thiobarbituric acid reactive substances - TBARS - in malondialdehyde equivalents) were quantified by routine spectrophotometric methods. The comparisons between the results obtained using the traditional collection method (venipuncture) and the dried blood spots collected and stored by the proposed method were performed. The Hb concentrations showed little variation ($DPR = 8.95 \pm 5.36$) between the two collection methods, so the other biomarkers were standardized by the Hb concentration (%metHb and SRAT/Hb). The correlation between %metHb obtained by the different types of collection show no satisfactory results ($R^2 = 0.0713$), and the use of dry blood spot collection for this biomarker is not recommended. The SRAT/Hb levels showed a strong correlation ($R^2 = 0.9394$) between the results obtained by the two collection methods. Thus, the method developed is stable up to 4h and efficient, measuring endogenous SRAT concentrations with accuracy and precision, so there is the possibility of using the

developed technology as a viable alternative to estimate the levels of this biomarker in population studies.

KEYWORDS: Biomonitoring; Effect biomarkers; Substances reactive to thiobarbituric acid; Methaemoglobin.

1. INTRODUÇÃO

Combustíveis fósseis são misturas de hidrocarbonetos alifáticos, cíclicos e aromáticos policíclicos, e são obtidos pela destilação fracionada do petróleo. Gasolina, o combustível fóssil mais utilizado, também chamada de nafta, é uma mistura de hidrocarbonetos, e sua composição depende da natureza do petróleo bruto e o processo de produção adotado pela refinaria. A composição de hidrocarbonetos da nafta usada para preparar a gasolina pode variar dependendo desses fatores, todavia é composta principalmente por hidrocarbonetos com cadeias de 4-12 átomos de carbono. Em todo o mundo, há também a presença de adulterantes neste combustível, com aumento das concentrações de hexano, tolueno e benzeno (BABU; KRISHNA; MANI, 2017; BEZERRA, A. C. de M. *et al.*, 2019).

No Brasil, diferente da realidade de países desenvolvidos, ainda existem centenas de milhares de trabalhadores que exercem suas funções em postos de combustíveis, e estes estão em constante exposição à derivados de petróleo, que são compostos que podem causar diversos efeitos nocivos ao organismo humano. Devido à grande quantidade de postos de gasolina, que passam de 39 mil unidades em todo o Brasil, quanto de frentistas, que passam de 180 mil trabalhadores, a quantidade de estudos relacionados à biomarcadores e biomonitoramento desta aérea são considerados ainda muito escassos (AMARAL *et al.*, 2017).

Os combustíveis fosseis, em especial a gasolina, estão relacionados à alteração de parâmetros hematológicos e indução de estresse oxidativo, caracterizando uma provavelmente ameaça a saúde de trabalhadores expostos ocupacionalmente a estes xenobióticos (AHMADI *et al.*, 2019). O dano oxidativo está associado a vários tipos de doenças crônicas, como doenças cardiovasculares,

câncer, diabetes, obesidade, doenças neurodegenerativas e doenças inflamatórias crônicas. O estresse oxidativo pode contribuir como fator causal no desenvolvimento da doença ou, mais indiretamente, como consequência das doenças que promovem o desenvolvimento de outras patologias (IMLAY, 2003; PORTA, 2019).

Já existem estudos a respeito do monitoramento dos efeitos causados à saúde de trabalhadores de postos de combustível (AHMADI *et al.*, 2019; D'ALASCIO *et al.*, 2014; GRENDELE; TEIXEIRA, 2009; SANTI *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2017). No entanto, não há poucos estudos, principalmente por pesquisadores brasileiros, que tratam sobre a utilização da técnica de sangue seco, para o monitoramento dos efeitos colaterais à saúde (dano oxidativo) devido sua exposição ocupacional e prolongada a esses vapores de combustíveis fósseis.

Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivo desenvolver e validar a amostragem por sangue seco para o monitoramento populações, em especial de trabalhadores de postos de combustíveis, auxiliando no processo de triagem, avaliando as concentrações dos marcadores de estresse oxidativo, metahemoglobina e malondialdeído. Assim como, poderá ser aplicado a outras populações que também estejam expostas a xenobióticos, com caráter oxidante.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. DESENHO DO ESTUDO

A pesquisa compreende um estudo observacional transversal analítico, realizado por meio da análise de sangue utilizando a técnica de sangue seco em papel de filtro, como método de coleta e armazenamento, para o monitoramento de populações através da dosagem de biomarcadores de estresse oxidativo em trabalhadores de postos de combustíveis da cidade de Macapá, estado do Amapá, selecionados aleatoriamente.

2.2. DEFINIÇÃO DA POPULAÇÃO DO ESTUDO

A população do estudo foi de 40 pessoas divididas em 2 grupos, o primeiro denominado de controle ou não exposto (n=32) que não exercem suas atividades laborais em postos de combustíveis, ou ambientes de risco, considerados como pouco expostos à xenobióticos. E, o segundo foi denominado de grupo estudo ou exposto (n=8) que exercem suas atividades laborais em postos de combustíveis dentro do limite da área do local de estudo. Como critérios de exclusão foram elencados tabagismo, alcoolismo, o uso de drogas sabidamente oxidantes, gestação, diabetes mellitus, câncer ou outras patologias associadas com níveis elevados de biomarcadores de estresse oxidativo. O presente estudo foi aprovado pelo comitê de pesquisa com humanos da Universidade Federal do Amapá (CEP/UNIFAP – nº 38065320.8.0000.0003/2020).

2.3. CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

Foram incluídos no grupo exposto da pesquisa pessoas saudáveis pelo exame clínico e histórico médico autodeclarado que exercem suas atividades laborais em postos de combustíveis a pelo menos 6 meses, de ambos os sexos e sem limite de idade, enquanto para o controle (não-exposto) da pesquisa foram elegíveis pessoas saudáveis pelo exame clínico e histórico médico autodeclarado que pelo menos nos últimos 6 meses não exerceram nenhuma função laboral em postos de combustíveis, ou ambiente de risco, também de ambos os sexos e sem limite de idade.

2.4. COLETA DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

De cada voluntário, tanto do grupo exposto quanto do grupo não-exposto, foram coletadas duas amostras de sangue por um profissional capacitado, a primeira, de sangue total, foi coletada pela forma tradicional através da punção venosa, e o

sangue seco em papel que foi obtido pela perfuração da ponta de um dos dedos da mão utilizando um lancetador automático com lancetas descartáveis.

A amostra de sangue total coletado foi transportada em tubos específicos para coleta de sangue com EDTA como anticoagulante, enquanto o sangue capilar foi transportado seco em cartões de papel de filtro. Ambas as amostras ficaram armazenadas em seus locais de origem (tubo ou papel) até o momento da extração, que não excederam 4h entre a coleta e as análises.

2.5. EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS

Os processos de extração de amostras de sangue seco foram realizados utilizando um cortador de papel que perfurou 4 círculos iguais de 3mm de diâmetro, sendo este completamente preenchido pela amostra de sangue e em seguida, pesados e colocados em tubos de ensaio ao qual foram adicionados 800µL água destilada e homogeneizados em agitado do tipo vórtex por aproximadamente 10 segundos até a completa extração da amostra do papel.

2.6. ESCOLHA DO PAPEL

Para seleção do tipo de papel de filtro a ser utilizado neste método de coleta de sangue seco foram testados 5 tipos diferentes de papeis, avaliando a influência da gramatura no potencial de adsorção e estes foram: (1) Papel de Filtro Qualitativo 80g/m²; (2) Papel de Filtro Qualitativo 250g/m²; (3) Papel de Filtro Quantitativo Faixa Azul (filtração lenta); (4) Papel de Filtro Quantitativo Faixa Preta (filtração rápida); e (5) Papel cartão comercial.

Os papeis de filtro quantitativo faixa azul, o papel qualitativo 80g/m² e o papel cartão não mostraram resultados satisfatórios sendo assim eliminados, uma vez que devido a sua pouca espessura, ao adicionar a amostra, tanto no papel de filtro quantitativo faixa azul quanto no papel de filtro quantitativo 80g/m², ficavam

encharcados, com aspecto frágil e o sangue extravasava de um lado para o outro no papel. O papel cartão, devido sua estrutura mais rígida e lisa, não permitia que a amostra fosse adsorvida em sua estrutura e desta forma a amostra de sangue ao secava e cristalizava fora da estrutura no papel e ao se tentar fazer a extração, parte do material era perdido.

Assim, para o desenvolvimento do método de coleta de sangue seco os papéis de (2) filtro qualitativos 250g/m² e o (4) quantitativo faixa preta foram utilizados, após o desenvolvimento e determinação das variáveis do tipo de antioxidante, procedeu-se a validação do método.

2.7. ADIÇÃO DE ANTIOXIDANTES NOS CARTÕES DE COLETA

Para avaliar se a adição de antioxidantes nos cartões de coleta resultaria em efeitos positivos na estabilidade das amostras, fazendo com que as amostras oxidassem menos com o passar do tempo, foram adicionados 50µL, no local demarcado para coleta do cartão, dois antioxidantes diferentes: o BHT, hidroxitoluenobutilado (1 mg/mL), ou o ácido ascórbico (1 mg/mL), e assim comparados com os valores obtidos de amostras que foram coletadas em cartões sem antioxidantes.

2.8. VALIDAÇÃO DO DISPOSITIVO DE COLETA

A validação do método seguiu as normativas brasileiras, descritas na Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017 baseadas na repetibilidade, reprodutibilidade e estabilidade dos resultados obtidos, com adaptações. Para validação foram utilizadas amostras de um mesmo voluntário.

A linearidade do método foi realizada pela diluição seriada (1/2; 1/4; 1/6; 1/8 e 1/10) de um pool de amostras padrões, e analisadas pelo coeficiente de correlação (R^2) e média de recuperação. Para analisar a seletividade ou a influência de

interferentes nos resultados obtidos para hemoglobina, metahemoglobina e Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (SRAT) cada amostra foi analisada em 3 réplicas mais brancos por amostra (papel sem amostra; e amostra de sangue diluída e sem reagentes) analisados em comprimentos de onda específicos para cada analito. Para determinar a repetibilidade (precisão intradiária) foram realizadas réplicas (n=5) da mesma amostra pelo mesmo analista no mesmo dia e os resultados foram expressos pelo grau de dispersão entre medições independentes a partir de uma mesma amostra e representada pelo desvio padrão relativo. A reprodutibilidade foi determinada pela precisão inter-dia, com réplicas (n=5) realizadas em dia diferentes de amostras do mesmo indivíduo, e foram analisados a dispersão dos resultados obtidos nas mesmas condições operacionais entre as análises das réplicas.

Para testar a estabilidade das amostras coletadas pelo método de sangue seco em papel as análises foram repetidas em cinco tempos distintos para verificar a diminuição dos valores obtidos de hemoglobina e aumento dos valores de Metahemoglobina e SRAT devido a oxidação, já esperada. Os tempos foram: 0h, 2h, 4h, 6h e 24h após a coleta das amostras.

2.9. ANÁLISE INSTRUMENTAL DAS AMOSTRAS POR MÉTODOS DE ROTINA

As análises das amostras foram realizadas no Laboratório de Química Orgânica e Bioquímica da Universidade do Estado do Amapá.

2.10. DOSAGEM DE HEMOGLOBINA E METAHEMOGLOBINA

A dosagem de hemoglobina e metahemoglobina foram determinadas pelo método colorimétrico, sendo após a extração das amostras dos cartões, e com as amostras já diluídas em água realizada a leitura da absorvância em um espectrofotômetro UV (UV-M51, BEL Eng.®, Itália) na faixa de 540nm para

hemoglobina e 630nm para metahemoglobina, para o branco foram utilizados apenas o solvente de diluição das amostras. As concentrações de hemoglobina foram determinadas por coeficiente de extinção molar $2,2 \times 10^5 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. A porcentagem de metHb (%metHb) foram determinadas pela equação $\% \text{metHb} = A_{630\text{nm}}/A_{540\text{nm}} * 100$ (VITOR *et al.*, 2016; YU *et al.*, 2020).

2.11. DOSAGEM DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO

Para a dosagem de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (SRAT), após a dosagem de hemoglobina e meta-hemoglobina a amostra foi adicionada a um novo tubo de ensaio contendo 200 μL de ácido tricloroacético (TCA 15%) e homogeneizada por 10 segundos em um agitador tipo vórtex e em seguida centrifugada por 3 minutos à 3000 RPM. Após a centrifugação o material sobrenadante foi transferido para um novo tubo de ensaio, seguida da adição de 1000 μL de ácido tiobarbitúrico diluído em TCA (0,73%/15%). A amostra foi aquecida em banho-maria por 60 minutos e em seguida adicionada 800 μL de álcool butílico (butanol), agitado por 10 segundos em agitador tipo vórtex e centrifugado por 3 minutos à 3000RPM. Após a centrifugação foi realizada a leitura da absorvância do material sobrenadante em espectrofotômetro na faixa de 535nm (UV-M51, BEL Eng.®, Itália). Os valores TBARS foram calculados pelo coeficiente de extinção molar de TBARS de $1,56 \times 10^5 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. E os valores foram expressos em μmol de equivalentes de MDA/g de Hb (BEZERRA, F. J. L. *et al.*, 2004).

2.12. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises descritivas foram realizadas no Microsoft Excel® versão 2007. As amostras foram divididas em dois grupos, um grupo que trabalham em postos de combustível (Estudo ou exposto; n=8) e um grupo de pessoas que não trabalham em postos de combustível (Controle ou não exposto; n=32). De posse dos dados foi

realizada a estatística descritiva dos valores obtidos para hemoglobina, metahemoglobina, e SRAT, obtendo assim os valores das médias, máximo, mínimo e desvio-padrão.

Para avaliar se existiu diferença significativa entre os valores obtidos entre os dados dos dois grupos analisados, Controle e Estudo, os dados foram analisados pelo Test t, caso os dados sejam paramétricos, ou pelo teste de Mann-Whitney, caso os valores dos dados sejam não-paramétricos. O nível de confiança adotado para todas as análises será de 95%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

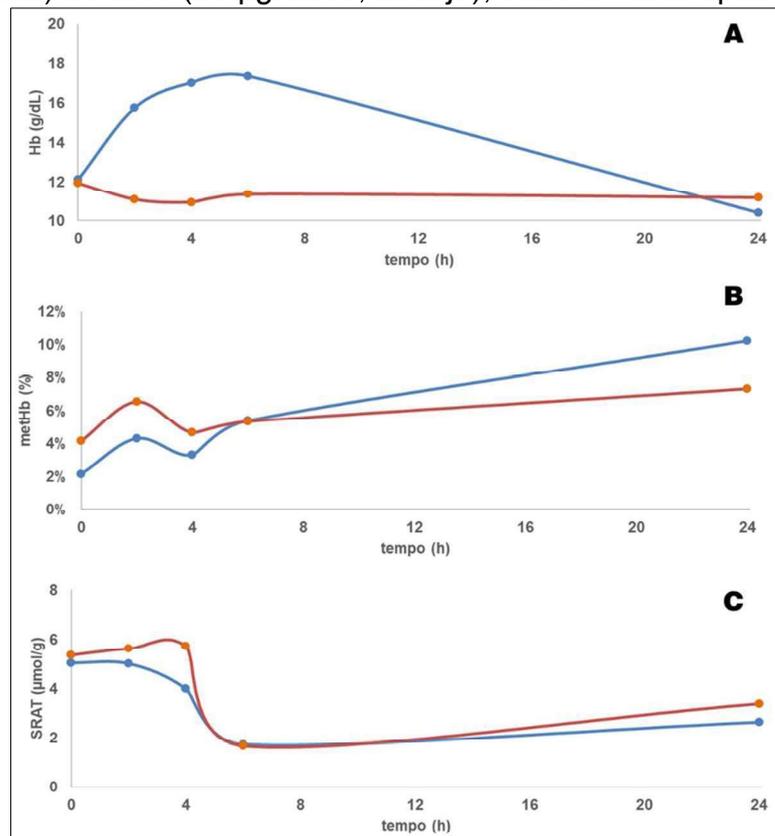
3.1. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO DISPOSITIVO DE COLETA

Em nosso estudo, após análises de adsorção e secagem dos papéis testados, escolhemos papel de filtro Papel de Filtro Qualitativo 250g/m² (grau 3, círculos, 125 mm de diâmetro) como uma matriz para manchas de sangue, que apresentou melhores resultados (dados não mostrados). Vários estudos que mostraram adequação de papéis de filtro de grau específico para coleta de amostras de sangue na técnica de sangue seco estão disponíveis (BECK *et al.*, 2018; LUCKWELL *et al.*, 2013; MANAK *et al.*, 2018). O uso de filtro papéis em vez de discos especializados torna o método mais acessível para muitos pesquisadores, uma vez que o discos especializados pode ser de acesso limitado e elevado custo (NAVALE; PATEL; TANDEL, 2020).

Ao analisar o uso de antioxidante, verificou-se que o uso de compostos com atividade antioxidante previu a oxidação das moléculas, evitando aumento dos níveis de SRAT e %metHb nas primeiras horas (Figura 1). Foram avaliadas a adição prévia de BHT e ácido ascórbico, antioxidantes comerciais de baixo custo. O ácido ascórbico é um antioxidante endógeno com participação na fase aquosa, atuando,

principalmente devido a sua elevada polaridade, na regeneração de tióis e neutralização de espécies reativas de oxigênio que não foram neutralizadas por antioxidantes lipofílico (FREI; ENGLAND; AMES, 1989; PANDAY; KAR; KAVDIA, 2021). O BHT é um antioxidante sintético, com polaridade intermediária, que permite a permeabilidade na membrana plasmática atuando em fase aquosa e lipídica. O potencial antioxidante dos dois aditivos testados é similar, porém possivelmente devido as características físico-químicas e polaridade, o BHT se mostrou com melhores resultados (LANIGAN; YAMARIK; ANDERSEN, 2002).

Figura 1 – Curvas de estabilidade dos analitos hemoglobina (Hb; A), metahemoglobina (%metHb; B) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRAT; C) nas amostras de voluntários coletadas em dispositivos de papel filtro 250g/m² com ácido ascórbico (50 µg/disco; azul) ou BHT (50 µg/disco; laranja), entre 0 – 24h após a coleta.



O BHT em dispositivos de coleta de sangue seco com a ação de antioxidante/preservante é muito utilizado, principalmente para conservação de vitamina E e outras vitaminas lipossolúveis (ARREDONDO; CRAFT, 2016; RUBIÓ *et*

al., 2020), e inibição da oxidação de ácido graxos poli-insaturados (BASTANI; GUNDERSEN; BLOMHOFF, 2012; KANĎÁR *et al.*, 2016; METHEREL *et al.*, 2013), todavia não foram encontrados na literatura ensaios que associem os efeitos antioxidantes do BHT a quantificação de %metHb ou SRAT por amostragem em sangue seco, sendo este o primeiro trabalho deste tipo.

Assim, optou-se pelo uso de BHT (50 µg/disco) como antioxidante/preservante para manutenção dos níveis de SRAT. Já para %metHb, não foi possível com os antioxidantes e concentrações testadas prevenir a conversão da Hb em metHb. Desta forma, recomenda-se o uso do dispositivo de coleta desenvolvido no presente artigo para avaliação de biomarcadores de lipoperoxidação, uma vez que estes marcadores de efeito mais sensíveis e possuem boa correlação com os níveis de %metHb (PALMEN; EVELO, 1998).

Após o desenvolvimento do dispositivo de coleta e determinação das variáveis do tipo de papel e preservante, procedeu-se a validação. Todos os analitos estudados apresentaram coeficientes de linearidade satisfatórios ($R^2 > 0,98$) e a recuperação percentual média para as amostras de sangue seco diluídas 2, 4, 6, 8 e 10 vezes foram cerca de 87 – 98%, 99 – 108%, 82 – 106%, 88 – 112% e 85 – 108%, indicando linearidade por diluição aceitável (80-120%). A seletividade foi determinada em *pool* de amostras de voluntários, e também foi determinada em todas as amostras do estudo, assim os papéis, reagentes ou amostras utilizadas no presente estudo não apresentaram presença de interferentes nos métodos propostos, com as concentrações nos brancos sendo determinadas entre 0,02% - 0,16% do valor observado nas amostras para cada analito, dentro limite de aceitação de < 5%.

A precisão do dispositivo é definida como a proximidade de medidas individuais de um analito quando o procedimento é aplicado repetidamente a múltiplos

alíquotas de volume homogêneo único de produtos biológicos na matriz. A repetibilidade do dispositivo desenvolvido foi estudada por precisão intradiária e a reprodutibilidade dispositivo por precisão inter-dia. Cinco réplicas de cada amostra foram realizadas e foram observados os desvios padrões relativos. A Precisão intradiária para as amostras coletadas do mesmo voluntário no mesmo dia apresentaram as médias de DPR dentro da faixa de aceitação de $\pm 15\%$, para Hb e SRAT/Hb. Até 4h após a coleta, o desvio padrão relativo (DPR) encontrado está entre 5,48 – 12,59% e 0,69 – 8,33% para Hb e SRAT/Hb respectivamente. Os dados de DPR para %metHb não atenderam os parâmetros de repetibilidade após 2h (16,54 – 17,41 %) para precisão intra-dia.

A reprodutibilidade foi analisada entre analistas diferentes, utilizando as amostras coletas do mesmo voluntário em dias diferentes (<5 dias). Foram observados DPR abaixo do limite aceitável de 20% para Hb e SRAT/Hb (17,35 – 18,08% e 3,79 – 16,86%, respectivamente). Já para %metHb o dispositivo não se mostrou reprodutível entre os dias (19,25 – 20,88 %). A estabilidade das amostras foi novamente avaliada (n=5) nas condições estabelecidas para uso do dispositivo e observou-se estabilidade das concentrações de Hb e SRAT/Hb até 4 h após a coleta das amostras (DPR > 15%), dentro da faixa de aceitação de $\pm 20\%$. Corroborando com os dados obtidos no desenvolvimento do dispositivo, optou-se por utilizar o arranjo de papel de filtro qualitativo de 250g/m² com o antioxidante/preservante BHT no período de até 4 horas após a coleta das amostras, limite que resultados se mostraram mais homogêneos.

Dentre os limitantes do desenvolvimento e validação do dispositivo de coleta de sangue seco é válido relatar que o presente estudo obteve resultados satisfatórios para o que foi proposto, mas ainda se faz necessário a aplicação do método em um

grupo de estudo com tamanho amostral maior (estudo populacional) para que seja possível testar a exatidão do método, assim como para verificar a eficácia da seletividade ao ser aplicado em populações que fazem uso de certos medicamentos, álcool ou drogas ilícitas, pois tais substâncias já tem conhecidos efeitos oxidativos no corpo humano (FINKEL; HOLBROOK, 2000; SIES, 2015).

3.2. COMPARAÇÃO ENTRE SANGUE VENOSO E SANGUE SECO

O dispositivo desenvolvido e validado foi desenhado para coleta capilar, ou seja, sangue arterial. Porém, as coletas convencionais para determinação dos analitos propostos no estudo é por punção venosa. Com isso, para determinar a validade dos resultados obtidos pelo dispositivo *versus* dados obtidos por coleta padrão, foram realizados estudos de equivalência em todas com todas as amostras (n=40). A amostra incluiu 40 participantes de várias idades, ambos os gêneros binários, valores de IMC e idades (Tabela 1).

Tabela 1 – Características da amostra de participantes da pesquisa para os dois grupos em estudo, controle e exposto (n=40).

	Controle (n=32)	Expostos (n=8)
	(% média ± DP)	(% média ± DP)
Idade (anos)	30 ± 8	33 ± 8
IMC (kg/m ²)	26,2 ± 5,5	24,6 ± 3,5
Gênero		
Mulher	56,3	50
Homem	43,7	50

As médias, desvios padrão e valores mínimos e máximos para os dados brutos obtidos no sangue seco e valores séricos para Hb, %metHb e SRAT são mostrados na Tabela 2.

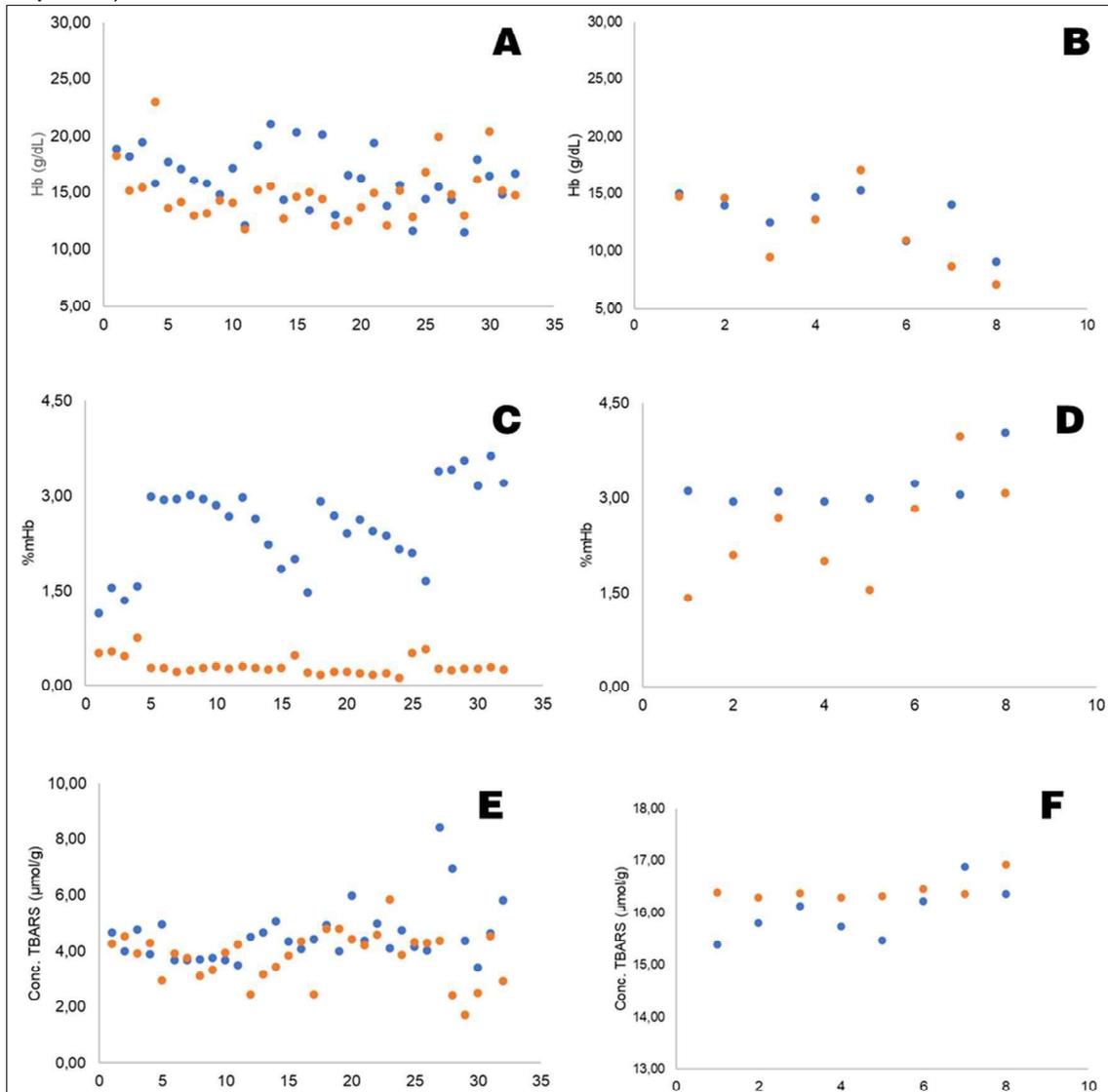
Tabela 2 – Distribuição das médias (n=40), desvio padrão e limites das concentrações de hemoglobina (Hb), porcentagem de metahemoglobina (%metHb) e níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRAT).

Analito (unidade)	Tipo de coleta	Média	DP	Limite mínimo	Limite máximo
Hemoglobina (g/dL)	Sangue seco	15,63	2,09	9,11	21,08
	Punção venosa	14,35	2,75	7,11	22,97
Metahemoglobina (%)	Sangue seco	2,75	0,68	1,41	4,04
	Punção venosa	^a 2,92	0,72	0,93	3,98
SRAT (µmol/g)	Sangue seco	6,32	5,17	1,71	16,92
	Punção venosa	6,85	4,73	3,41	16,88

SRAT (µmol/g): µmol de equivalentes de malondialdeído por g de Hb; ^a diferença estatística entre os resultados obtidos para punção venosa e sangue seco p < 0,05.

Com os resultados obtidos através das comparações entre os tipos de coleta apenas observamos diferença estatística entre as determinações das concentrações de %metHb. A Hb tem funções além de transportar oxigênio para os tecidos e regula o tônus vascular e a inflamação por meio de um par redox com metHb. A Hb possui ferro na valência reduzida Fe (II) e a metahemoglobina possui ferro na valência oxidada Fe (III), com energia livre capaz de produzir água a partir do oxigênio. A oxidação da Hb em metHb é uma reação espontânea, que ocorre na presença de gás oxigênio, com produção de anión superóxido, com indução da reação entre os radicais livres de cátions de hidrogênio e a formação de peróxido de hidrogênio, que leva a degradação da metHb em íons ferro livre e anel porfirina, que justifica a redução alterações das %metHb nas amostras coletadas no sangue seco (FOSSEN JOHNSON, 2019; UMBREIT, 2007).

Figura 2 – Dispersão das médias de dados (n=3) das amostras coletadas por punção venosa (laranja) ou sangue seco (azul) para as determinações de concentração de hemoglobina (Hb; g/dL) (A, controle; B, exposto), porcentagem de metahemoglobina (%metHb) (C, controle; D, exposto) e concentração de Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRAT/TBARS; $\mu\text{mol/g}$) (E, controle; F, exposto).

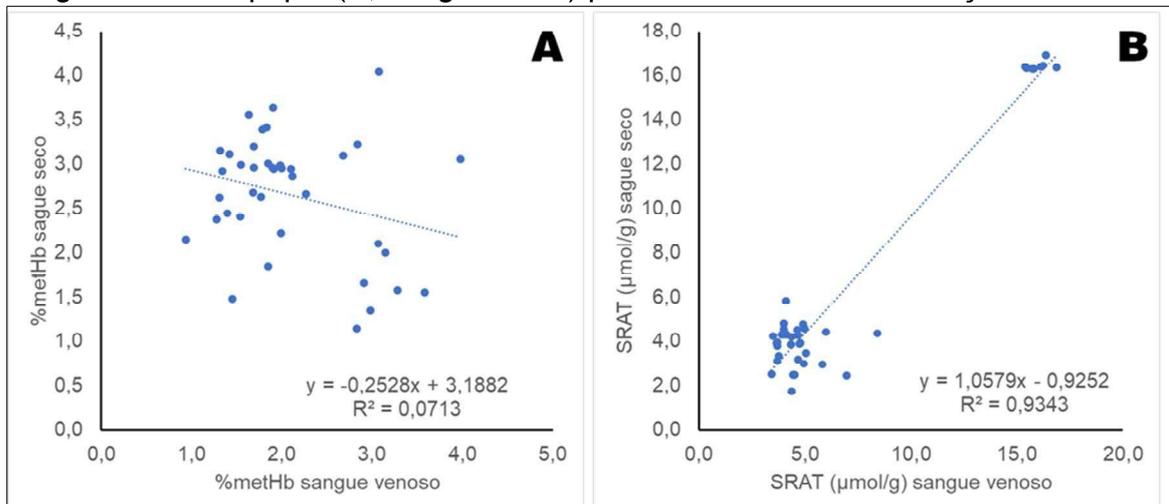


Os resultados obtidos quando comparamos os diferentes métodos de coleta dentro do mesmo grupo, exposto ou controle, apresentaram dispersão homogênea dos dados das concentrações de hemoglobina (Figura 2A e 2B) e SRAT (Figura 2E e 2F), porém a dispersão dos dados para %metHb (Figura 2C e 2D) demonstra tendência de aumento dos valores no grupo controle e exposto coletado por sangue seco ($p < 0,05$), devido a oxidação da Hb em metHb. O padrão de diminuição dos

valores no sangue seco em papel não é evidente nas dispersões para os dados de concentração de Hb, devido a alta concentração deste analito em relação a metHb.

As análises de correlação (Figura 3) entre os valores obtidos em amostras de sangue seco e punção venosa foram realizadas após a normalização dos resultados de %metHb e SRAT pela concentração de Hb, minimizando as influências da desidratação das amostras do sangue seco e o aumento de concentração dos analitos observada nas coletas com este tipo de dispositivo.

Figura 3 – Correlações, linhas de tendência e equações da reta dos resultados de média (n=3) das amostras coletadas por punção venosa (X; sangue venoso) e por sangue seco em papel (Y; sangue seco) para %metHb e concentrações de SRAT.



Na figura 03, gráficos de regressão linear, foi plotado os resultados obtidos das análise de %metHb e SRAT provenientes dos dois métodos de coleta, abrangendo os todos os indivíduos participantes do estudo (n=40), e obteve-se uma correlação, considerada forte ($R^2 = 0,9343$), para as concentrações de SRAT, desta forma demonstrando que é possível substituir o método de coleta tradicional pela coleta de sangue seco em papel para análises de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico com normalização pela concentração de Hb e desta forma é possível o uso na triagem de populações e estudos populacionais.

3.3. APLICAÇÃO DO DISPOSITIVO DE COLETA EM SAGUE SECO

De acordo com os resultados obtidos no desenvolvimento e validação do dispositivo e análise da correlação/intercambialidade dos dados entre as duas formas de coleta, é possível afirmar que o dispositivo desenvolvido e validado no presente estudo pode ser utilizado para determinação das concentrações de Hb e SRAT, devendo realizar a normalização das concentrações de SRAT pelas concentrações de Hb, obtendo ao final o resultados intercambiável, com forte correlação em μmol , de equivalentes de malonaldeído/g de Hb.

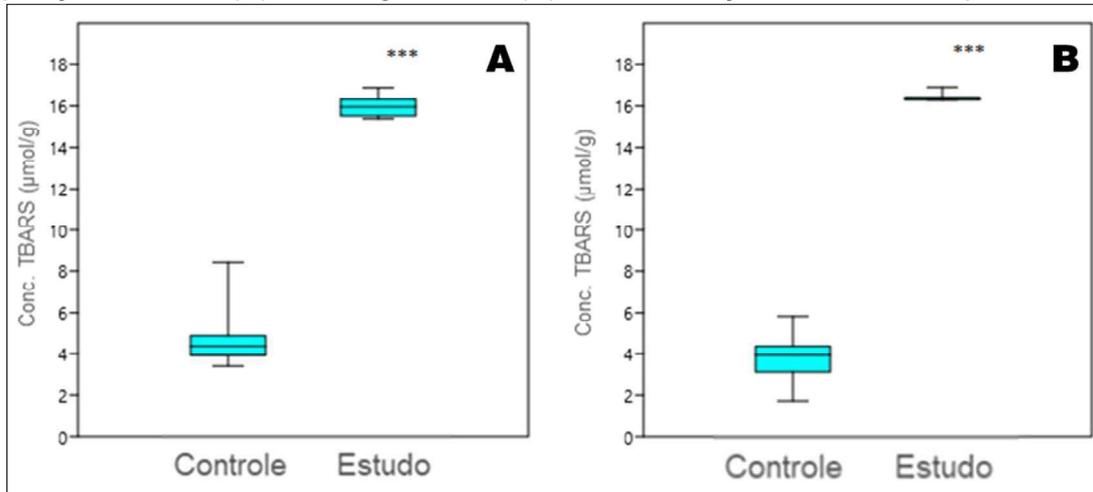
Nosso estudo fornece validação adicional para o uso da metodologia de sangue seco para análise de Hb, %metHb, e coleta de biomarcador SRAT, contribuindo para a crescente literatura sobre a validação de biomarcadores por esta metodologia (por exemplo, BRINDLE *et al.*, 2010; CRIMMINS *et al.*, 2014; LACHER *et al.*, 2013; SAMUELSSON *et al.*, 2015). O presente estudo permitiu a intercambialidade de valores de sangue seco com equivalência aos valores de soro pela normalização com uso da concentração de Hb, que argumentamos como possibilidade de permitir a interpretação dos valores sangue seco em uma escala clínica, com a capacidade de fornecer valiosos dados de diagnósticos e preditivos de biomarcadores de risco de exposição ocupacional. Este método de normalização para equivalência de valores permite a identificação e consideração de fontes pré-analíticas de erro nos valores finais, assim as amostras de sangue seco exibem maior variação e erro de ensaio para os analitos testados, sugerindo que sangue seco pode ter maior utilidade em estudos de grupo ou população e podem ser menos úteis em estudos individuais e para decisões clínicas do que as amostras de punção venosa padrão. Um diferencial particular do presente estudo é a sua demonstração através do uso de amostras controles, que comprovaram a estabilidade das amostras e permanecem

razoavelmente constante ao longo do tempo, particularmente para o analito SRAT. O método de sangue seco permite uso para ensaios de biomarcadores a serem implementados em estudos usando amostras maiores de base comunitária e aqueles que visam populações mais vulneráveis, ampliando a aplicabilidade e generalização do uso de biomarcadores na pesquisa de exposição ocupacional.

Assim, o dispositivo foi aplicado no diagnóstico de trabalhadores de postos de gasolina através do estudo piloto de duas populações, Controle e Estudo, como esperado, não é possível utilizar a técnica de sangue seco em papel para dosagem de metahemoglobina (%metHb).

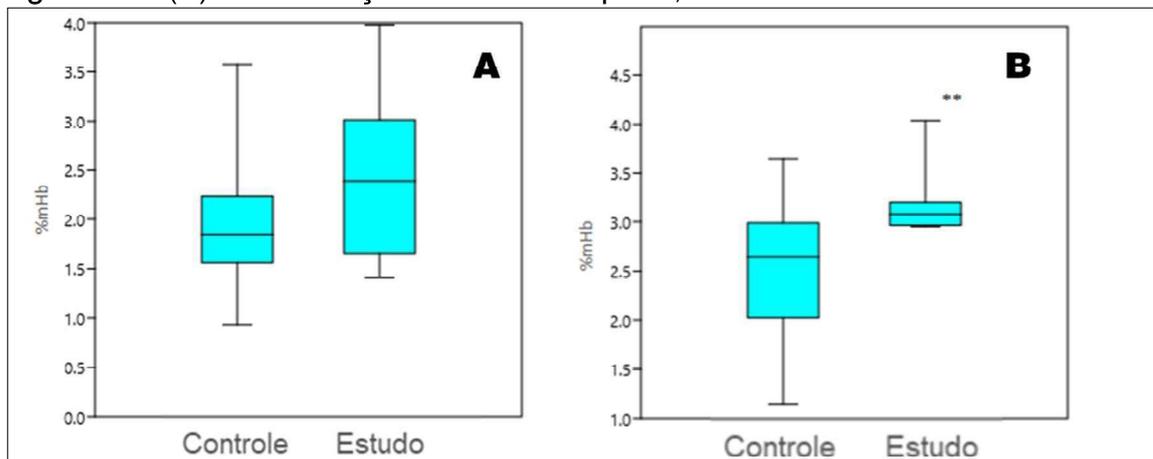
Observamos que os níveis de SRAT nas amostras coletadas pelas amostras em sangue seco ou punção venosa não diferiram entre si, todavia ao comparar os grupos, controle e exposto (estudo), foram observados níveis elevados de SRAT no grupo exposto (Figura 4). As SRAT avaliam a intensidade do processo de lipoperoxidação. A oxidação de lipídeos de membrana consiste em uma cascata de reações resultantes da ação de espécies reativas de oxigênio (ERO) sobre os lipídios. O processo é iniciado pela reação de um radical livre (RL), geralmente derivado do oxigênio molecular, com um ácido graxo insaturado, sendo esse processo propagado por radicais peroxilas, gerando ao final dienos e aldeídos. As SRAT, são bases de Schiff formadas entre o ácido tiobarbitúrico e os aldeídos presentes na amostra, principalmente o malonaldeído (MDA), um dos principais produtos da lipoperoxidação (SU *et al.*, 2019). É sabido que os combustíveis fósseis são fonte de xenobióticos, com potencial oxidante, tais como benzeno, hexano e tolueno (BABU; KRISHNA; MANI, 2017; BEZERRA, A. C. de M. *et al.*, 2019).

Figura 4 – Dados das concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúricos (SRAT; $\mu\text{mol/g}$) em formato de blot spot (mediana \pm erro) para as amostras coletadas por punção venosa (A) ou sangue seco (B). *** diferença estatística de $p < 0,001$.



Em consonância com essas descobertas, muitos estudos relataram que a exposição ao benzeno, tolueno e xileno aumenta a produção intracelular de EROs e diminuição da capacidade antioxidante, que por sua vez pode danificar macromoléculas intracelulares, principalmente os lipídios de membrana (PILAPONG; PONGPIAJUN; MANKHETKORN, 2015; XIA *et al.*, 2017), assim a exposição ocupacional sem equipamentos de proteção individual (EPI) pelos frentistas, uma realidade do presente estudo (em sua totalidade os trabalhadores não tinham EPIs), evidenciou que houve danos oxidativos significativo nesta amostra avaliada.

Figura 5 – Dados das porcentagens de metahemoglobina (metHb; %) em formato de blot spot (mediana \pm erro) para as amostras coletadas por punção venosa (A) ou sangue seco (B). ** diferença estatística de $p < 0,005$.



Neste estudo, também descobrimos que a capacidade antioxidante sérica sistêmica no grupo exposto apresentou tendência de aumento em relação aos controles, devido a oxidação de proteínas plasmáticas, em especial a Hb, no grupo exposto foi significativamente maior do que nos controles para as amostras do sangue seco em papel, confirmando a tendência ($p < 0,005$). Todas essas descobertas denotam que atendentes de postos de gasolina têm maior nível de oxidação ou maiores níveis de estresse oxidativo em comparação com aqueles que não trabalham nessas estações. Uma diminuição significativa na capacidade antioxidante sistêmica pode ser atribuído ao consumo de antioxidantes endógenos e exógenos em vários papéis protetores contra oxidantes (ANLAR *et al.*, 2017; WALDMAN; RENTERIA; MCALLISTER, 2020).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um dispositivo eficaz foi desenvolvido para a quantificação de SRAT em sangue seco em e a estabilidade deste marcador foi analisada usando esta plataforma de coleta de amostra. Usando amostras sangue seco em cartões pré-condicionados com BHT foram obtidos resultados ideais para reduzir a auto-oxidação e foi evitada a degradação dos analitos ou formação de interferentes. Este método é sensível, específico, eficiente e pode medir com precisão as concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em amostra de sangue seco, com intercambialidade de resultados para dados obtidos por punção venosa usando a normatização dos dados pela concentração de Hb. Assim, oferece uma abordagem diagnóstica para medir SRAT por um novo dispositivo de coleta de amostra que é menos invasivo do que a coleta convencional e podem ser usados no futuro para avaliar quantitativamente os níveis de estresse oxidativo e exposição ocupacional em grandes populações.

REFERÊNCIAS

- AHMADI, Zahed *et al.* Association of environmental exposure with hematological and oxidative stress alteration in gasoline station attendants. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 26, n. 20, p. 20411–20417, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05412-7>
- AMARAL, Isabele Campos Costa *et al.* Avaliação ambiental de BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno, xilenos) e biomarcadores de genotoxicidade em trabalhadores de postos de combustíveis. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, [s. l.], v. 42, n. suppl 1, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/2317-6369000124515>
- ANLAR, Hatice Gul *et al.* Effects of Occupational Silica Exposure on OXIDATIVE Stress and Immune System Parameters in Ceramic Workers in TURKEY. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, [s. l.], v. 80, n. 13–15, p. 688–696, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1286923>
- ARREDONDO, Francisco X; CRAFT, Neal E. Effect of Antioxidants on Vitamins A, E and Carotenoid Stability in Dried Blood Spots. **The FASEB Journal**, [s. l.], v. 30, p. 892.7-892.7, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1096/FASEBJ.30.1_SUPPLEMENT.892.7. Acesso em: 26 maio 2021.
- BABU, Vimal; KRISHNA, Rama; MANI, Naga. Review on the Detection of Adulteration in Fuels through Computational Techniques. **Materials Today: Proceedings**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 1723–1729, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2017.02.013>
- BASTANI, Nasser E.; GUNDERSEN, Thomas E.; BLOMHOFF, Rune. Dried blood spot (DBS) sample collection for determination of the oxidative stress biomarker 8-epi-PGF 2 α in humans using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, [s. l.], v. 26, n. 6, p. 645–652, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/rcm.6149>
- BECK, Olof *et al.* Study of measurement of the alcohol biomarker phosphatidylethanol (PEth) in dried blood spot (DBS) samples and application of a volumetric DBS device. **Clinica Chimica Acta**, [s. l.], v. 479, n. January, p. 38–42, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.01.008>
- BEZERRA, Andressa Cristina de Mattos *et al.* Quantification of anhydrous ethanol and detection of adulterants in commercial Brazilian gasoline by Raman spectroscopy. **Instrumentation Science and Technology**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 90–106, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10739149.2018.1470535>
- BEZERRA, Francisco José Lucena *et al.* Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico como indicador da peroxidação lipídica em ratos tratados com sevoflurano. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, [s. l.], v. 54, n. 5, p. 640–649, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0034-70942004000500004>
- BRINDLE, Eleanor *et al.* Serum, plasma, and dried blood spot high-sensitivity C-

reactive protein enzyme immunoassay for population research. **Journal of Immunological Methods**, [s. l.], v. 362, n. 1–2, p. 112–120, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jim.2010.09.014>

CRIMMINS, Eileen *et al.* Validation of blood-based assays using dried blood spots for use in large population studies. **Biodemography and Social Biology**, [s. l.], v. 60, n. 1, p. 38–48, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19485565.2014.901885>

D'ALASCIO, Renato Gomes *et al.* Sintomas relacionados à exposição ocupacional ao benzeno e hábitos ocupacionais em trabalhadores de postos de revenda de combustíveis a varejo na região sul de Santa Catarina. **Revista Brasileira de Medicina do Trabalho**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 21–29, 2014.

FINKEL, Toren; HOLBROOK, Nikki J. **Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing**. [S. l.]: Nature, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/35041687>. Acesso em: 26 maio 2021.

FOSSEN JOHNSON, Sarah. Methemoglobinemia: Infants at risk. **Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care**, [s. l.], v. 49, n. 3, p. 57–67, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cppeds.2019.03.002>

FREI, Balz; ENGLAND, Laura; AMES, Bruce N. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma (oxidant stress/lipid peroxidation/protein thiols/α-tocopherol). **Medical Sciences**, [s. l.], v. 86, n. August, p. 6377–6381, 1989.

GRENDELE, Gracieli Lorenzetti; TEIXEIRA, Mário Lettieri. Avaliação de ácido hipúrico como biomarcador de exposição ocupacional em trabalhadores de postos de combustíveis. **Revista Saúde e Pesquisa**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 319–324, 2009. Disponível em: <http://periodicos.unicesumar.edu.br/index.php/saudpesq/article/view/1205>

IMLAY, James A. Pathways of Oxidative Damage. **Annual Review of Microbiology**, [s. l.], v. 57, p. 395–418, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090938>

KANĎÁR, Roman *et al.* Determination of selected fatty acids in dried sweat spot using gas chromatography with flame ionization detection. **Journal of Separation Science**, [s. l.], v. 39, n. 22, p. 4377–4383, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jssc.201600513>

LACHER, David A. *et al.* Comparison of dried blood spot to venous methods for hemoglobin A1c, glucose, total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, and C-reactive protein. **Clinica Chimica Acta**, [s. l.], v. 422, p. 54–58, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.03.032>

LANIGAN, Rebecca S.; YAMARIK, Torill A.; ANDERSEN, F. Alan. **Final report on the safety assessment of BHT**. [S. l.: s. n.], 2002. ISSN 10915818.v. 21 Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10915810290096513>

LUCKWELL, Jacquelynn *et al.* Assessment of the within- and between-lot variability of Whatman™ FTA(®) DMPK and 903(®) DBS papers and their suitability for the quantitative bioanalysis of small molecules. **Bioanalysis**, [s. l.], v. 5, n. 21, p. 2613–

2630, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.4155/bio.13.227>

MANAK, Mark M. *et al.* Stability of human immunodeficiency virus serological markers in samples collected as hemaspot and whatman 903 dried blood spots. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 56, n. 10, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JCM.00933-18>

METHEREL, Adam H. *et al.* Butylated hydroxytoluene can protect polyunsaturated fatty acids in dried blood spots from degradation for up to 8 weeks at room temperature. **Lipids in Health and Disease**, [s. l.], v. 12, n. 1, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1476-511X-12-22>

NAVALE, Archana Mohit; PATEL, Vichika R.; TANDEL, Falguni B. Chromatographic method for estimation of vitamin E from dried blood spot sample. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 1–9, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s43094-020-00025-1>

PALMEN, Nicole G.M.; EVELO, Chris T.A. Oxidative effects in human erythrocytes caused by some oximes and hydroxylamine. **Archives of Toxicology**, [s. l.], v. 72, n. 5, p. 270–276, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s002040050501>

PANDAY, Sheetal; KAR, Saptarshi; KAVDIA, Mahendra. How does ascorbate improve endothelial dysfunction? - A computational analysis. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 165, p. 111–126, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.01.031>

PILAPONG, Chalermchai; PONGPIAJUN, Siwatt; MANKHETKORN, Samlee. Visualizing reactive oxygen species inside cancer cells after stimulation with polycyclic aromatic hydrocarbon via spontaneous formation of Au nanoclusters. **Materials Letters**, [s. l.], v. 140, p. 162–165, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2014.10.157>

PORTA, Eduardo A. Role of Oxidative Damage in the Aging Process. *In*: CELLULAR ANTIOXIDANT DEFENSE MECHANISMS. [S. l.]: CRC Press, 2019. p. 1–52. Disponível em: <https://doi.org/10.1201/9780429289323-1>. Acesso em: 26 maio 2021.

RUBIÓ, Laura *et al.* **Application of Dried Blood Spot Cards combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry to determine eight fat-soluble micronutrients in human blood.** [S. l.]: Elsevier LTD, 2020. ISSN 1873376X.v. 1152 Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122247>

SAMUELSSON, Laura B. *et al.* Validation of biomarkers of CVD risk from Dried blood spots in community-based research: Methodologies and study-specific serum equivalencies. **Biodemography and Social Biology**, [s. l.], v. 61, n. 3, p. 285–297, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19485565.2015.1068105>

SANTI, Rosemari *et al.* Exposição ao benzeno em postos de combustíveis: estratégia de ações integradas de Vigilância em Saúde do Trabalhador na região dos Vales/RS. [s. l.], v. 6369, n. supl 1, p. 1–11, 2017.

SANTOS, Marcus Vinicius Corrêa dos *et al.* Aspectos toxicológicos do benzeno, biomarcadores de exposição e conflitos de interesses. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, [s. l.], v. 42, n. supl 1, 2017. Disponível em:

<https://doi.org/10.1590/2317-6369nota00017>

SIES, Helmut. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, [s. l.], v. 4, p. 180–183, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>

SU, Lian Jiu *et al.* Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2019, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2019/5080843>

UMBREIT, Jay. Methemoglobin - It's not just blue: A concise review. **American Journal of Hematology**, [s. l.], v. 82, n. 2, p. 134–144, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ajh.20738>

VITOR, João *et al.* Determinação de metemoglobina em voluntários fumantes e não fumantes. **Journal of the Health Sciences Institute**, [s. l.], v. 34, n. January 2016, p. 38–43, 2016.

WALDMAN, Hunter S.; RENTERIA, Liliana I.; MCALLISTER, Matthew J. Time-restricted feeding for the prevention of cardiometabolic diseases in high-stress occupations: A mechanistic review. **Nutrition Reviews**, [s. l.], v. 78, n. 6, p. 459–464, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuz090>

XIA, Bing *et al.* Increased oxidative stress and plasma Hsp70 levels among gasoline filling station attendants. **Toxicology and Industrial Health**, [s. l.], v. 33, n. 2, p. 171–181, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0748233715616554>

YU, Miao *et al.* Untargeted metabolomics profiling and hemoglobin normalization for archived newborn dried blood spots from a refrigerated biorepository. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 191, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113574>

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De posse dos dados obtidos durante o período de validação, e que se confirmaram na aplicação do método em campo tanto em pessoas do grupo controle quanto do grupo de estudo, não havendo limitação de idade ou sexo, foi possível concluir que o método de coleta de sangue seco em papel se mostra como alternativa viável para dosagem de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico-SRAT como biomarcador de estresse oxidativo no sangue, pois apresentou resultados satisfatórios e que seguem a mesma tendência de valores obtidos para a mesma análise, mas com o sangue sendo coletado da forma tradicional em tubos de coleta com EDTA. Devido ao tamanho amostral do grupo de estudo ter sido muito reduzido, recomenda-se que seja feito um estudo com um grupo amostral maior para que se possa avaliar a estabilidade, robustez e exatidão do método.

REFERÊNCIAS

- AHMADI, Zahed et al. Association of environmental exposure with hematological and oxidative stress alteration in gasoline station attendants. *Environmental Science and Pollution Research*, [s. l.], v. 26, n. 20, p. 20411–20417, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05412-7>
- AMARAL, Isabele Campos Costa et al. Avaliação ambiental de BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno, xilenos) e biomarcadores de genotoxicidade em trabalhadores de postos de combustíveis. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*, [s. l.], v. 42, n. suppl 1, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/2317-6369000124515>
- AMORIM, Leliane Coelho André. O uso dos biomarcadores na avaliação da exposição ocupacional a substâncias químicas. *Revista Brasileira de Medicina do Trabalho*, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 124–132, 2003. Disponível em: <http://www.rbmt.org.br/details/242/pt-BR/o-uso-dos-biomarcadores-na-avaliacao-da-exposicao-ocupacional-a-substancias-quimicas>. Acesso em: 6 jan. 2019.
- ANDRADE, E R et al. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes Consequences of production of reactive oxygen species in reproduction and main antioxidant mechanisms. [s. l.], v. 34, n. 2, p. 79–85, 2010.
- ANLAR, Hatice Gul et al. Effects of Occupational Silica Exposure on OXIDATIVE Stress and Immune System Parameters in Ceramic Workers in TURKEY. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues*, [s. l.], v. 80, n. 13–15, p. 688–696, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1286923>

ARREDONDO, Francisco X; CRAFT, Neal E. Effect of Antioxidants on Vitamins A, E and Carotenoid Stability in Dried Blood Spots. *The FASEB Journal*, [s. l.], v. 30, p. 892.7-892.7, Disponível em: https://doi.org/10.1096/FASEBJ.30.1_SUPPLEMENT.892.7. Acesso em: 26 maio 2021.

BABU, Vimal; KRISHNA, Rama; MANI, Naga. Review on the Detection of Adulteration in Fuels through Computational Techniques. *Materials Today: Proceedings*, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 1723–1729, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2017.02.013>

BARREIROS, André L B S; DAVID, Juceni P. Estresse Oxidativo: Relação Entre Geração de Espécies Reativas e Defesa do Organismo. *Química Nova*, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000100021>

BASTANI, Nasser E.; GUNDERSEN, Thomas E.; BLOMHOFF, Rune. Dried blood spot (DBS) sample collection for determination of the oxidative stress biomarker 8-epi-PGF 2 α in humans using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, [s. l.], v. 26, n. 6, p. 645–652, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/rcm.6149>

BECK, Olof et al. Study of measurement of the alcohol biomarker phosphatidylethanol (PEth) in dried blood spot (DBS) samples and application of a volumetric DBS device. *Clinica Chimica Acta*, [s. l.], v. 479, n. January, p. 38–42, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.01.008>

BEZERRA, Andressa Cristina de Mattos et al. Quantification of anhydrous ethanol and detection of adulterants in commercial Brazilian gasoline by Raman spectroscopy. *Instrumentation Science and Technology*, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 90–106, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10739149.2018.1470535>

BEZERRA, Francisco José Lucena et al. Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico como indicador da peroxidação lipídica em ratos tratados com sevoflurano. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, [s. l.], v. 54, n. 5, p. 640–649, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0034-70942004000500004>

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 166, de 24 de Julho de 2017, Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. *Diário Oficial da União* N° 141, 25 de Julho de 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde, Gabinete do Ministro, Portaria N° 822, de 06 de Julho de 2001, Instituir, no âmbito do Sistema Único de Saúde, o Programa Nacional de Triagem Neonatal/PNTN.

BRINDLE, Eleanor et al. Serum, plasma, and dried blood spot high-sensitivity C-reactive protein enzyme immunoassay for population research. *Journal of Immunological Methods*, [s. l.], v. 362, n. 1–2, p. 112–120, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jim.2010.09.014>

COUTRIM, M X; DE CARVALHO, L R F; ARCURI, A S A. AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE METABÓLITOS DO BENZENO COMO POTENCIAIS BIOMARCADORES DE EXPOSIÇÃO HUMANA AO BENZENO NO AR. *Quimica Nova*, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 653–663, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422000000500015>

CRIMMINS, Eileen et al. Validation of blood-based assays using dried blood spots for use in large population studies. *Biodemography and Social Biology*, [s. l.], v. 60, n. 1, p. 38–48, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19485565.2014.901885>

D'ALASCIO, Renato Gomes et al. Sintomas relacionados à exposição ocupacional ao benzeno e hábitos ocupacionais em trabalhadores de postos de revenda de combustíveis a varejo na região sul de Santa Catarina. *Revista Brasileira de Medicina do Trabalho*, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 21–29, 2014.

DEMIREV, Plamen A. Dried blood spots: Analysis and Applications. *Analytical Chemistry*, [s. l.], v. 85, n. 2, p. 779–789, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ac303205m>

EDELBROEK, Peter M; HEIJDEN, Jacques Van Der; STOLK, Leo M L. Dried Blood Spot Methods in Therapeutic Drug Monitoring : Methods , Assays , and Pitfalls. *Ther Drug Monit*, [s. l.], v. 31, p. 327–336, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/FTD.0b013e31819e91ce>

FINKEL, Toren; HOLBROOK, Nikki J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. [S. l.]: *Nature*, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/35041687>. Acesso em: 26 maio 2021.

FOSSEN JOHNSON, Sarah. Methemoglobinemia: Infants at risk. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, [s. l.], v. 49, n. 3, p. 57–67, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cppeds.2019.03.002>

FREI, Balz; ENGLAND, Laura; AMES, Bruce N. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma (oxidant stress/lipid peroxidation/protein thiols/a-tocopherol). *Medical Sciences*, [s. l.], v. 86, n. August, p. 6377–6381, 1989.

GOUVEIA, Nelson et al. Projeto-piloto do Primeiro Inquérito Nacional de Populações Expostas a Substâncias Químicas, 2008-2009. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 553–558, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.5123/S1679-49742014000300019>

GRENDELE, Gracieli Lorenzetti; TEIXEIRA, Mário Lettieri. Avaliação de ácido hipúrico como biomarcador de exposição ocupacional em trabalhadores de postos de combustíveis. *Revista Saúde e Pesquisa*, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 319–324, 2009. Disponível em: <http://periodicos.unicesumar.edu.br/index.php/saudpesq/article/view/1205>

GUTHRIE, Robert; SUSI, Ada. A Simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics*, [s. l.], 1963.

HALLIWELL, B. Antioxidants in Human Health and Disease. *Annual Review of Nutrition*, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 33–50, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.16.1.33>

HELMUT SIES; BERNDT, Carsten; JONES, Dean P. Oxidative Stress. *Annual Review of Biochemistry*, [s. l.], v. 86, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>

IMLAY, James A. Pathways of Oxidative Damage. *Annual Review of Microbiology*, [s. l.], v. 57, p. 395–418, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090938>

KANĎÁR, Roman et al. Determination of selected fatty acids in dried sweat spot using gas chromatography with flame ionization detection. *Journal of Separation Science*, [s. l.], v. 39, n. 22, p. 4377–4383, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jssc.201600513>

LACHER, David A. et al. Comparison of dried blood spot to venous methods for hemoglobin A1c, glucose, total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, and C-reactive protein. *Clinica Chimica Acta*, [s. l.], v. 422, p. 54–58, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.03.032>

LANIGAN, Rebecca S.; YAMARIK, Torill A.; ANDERSEN, F. Alan. Final report on the safety assessment of BHT. [S. l.: s. n.], 2002. ISSN 10915818.v. 21 Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10915810290096513>

LUCKWELL, Jacquelynn et al. Assessment of the within- and between-lot variability of Whatman™ FTA(®) DMPK and 903(®) DBS papers and their suitability for the quantitative bioanalysis of small molecules. *Bioanalysis*, [s. l.], v. 5, n. 21, p. 2613–2630, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.4155/bio.13.227>

MANAK, Mark M. et al. Stability of human immunodeficiency virus serological markers in samples collected as hemaspot and whatman 903 dried blood spots. *Journal of Clinical Microbiology*, [s. l.], v. 56, n. 10, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JCM.00933-18>

METHEREL, Adam H. et al. Butylated hydroxytoluene can protect polyunsaturated fatty acids in dried blood spots from degradation for up to 8 weeks at room temperature. *Lipids in Health and Disease*, [s. l.], v. 12, n. 1, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1476-511X-12-22>

NAVALE, Archana Mohit; PATEL, Vichika R.; TANDEL, Falguni B. Chromatographic method for estimation of vitamin E from dried blood spot sample. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 1–9, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s43094-020-00025-1>

PALMEN, Nicole G.M.; EVELO, Chris T.A. Oxidative effects in human erythrocytes caused by some oximes and hydroxylamine. *Archives of Toxicology*, [s. l.], v. 72, n. 5, p. 270–276, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s002040050501>

PANDAY, Sheetal; KAR, Saptarshi; KAVDIA, Mahendra. How does ascorbate improve endothelial dysfunction? - A computational analysis. *Free Radical Biology and Medicine*, [s. l.], v. 165, p. 111–126, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.01.031>

PIERCE, Janet D; CACKLER, Amanda B; ARNETT, Melinda G. Why should you care about free radicals? RN, [s. l.], v. 67, n. 1, p. 38–42; quiz 43, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14979192>. Acesso em: 6 jan. 2019.

PILAPONG, Chalermchai; PONGPIAJUN, Siwatt; MANKHETKORN, Samlee. Visualizing reactive oxygen species inside cancer cells after stimulation with polycyclic aromatic hydrocarbon via spontaneous formation of Au nanoclusters. *Materials Letters*, [s. l.], v. 140, p. 162–165, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2014.10.157>

PISOSCHI, Aurelia Magdalena; POP, Aneta. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, [s. l.], v. 97, p. 55–74, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>

PORTA, Eduardo A. Role of Oxidative Damage in the Aging Process. In: *CELLULAR ANTIOXIDANT DEFENSE MECHANISMS*. [S. l.]: CRC Press, 2019. p. 1–52. Disponível em: <https://doi.org/10.1201/9780429289323-1>. Acesso em: 26 maio 2021.

RABELO, Ana Cláudia et al. Avaliação toxicológica de frentistas expostos diretamente a combustíveis automotivos da cidade de Lagoa da Prata – MG. *Revista Acadêmica Conecta FASF*, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 333–345, 2017.

RUBIÓ, Laura et al. Application of Dried Blood Spot Cards combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry to determine eight fat-soluble micronutrients in human blood. [S. l.]: Elsevier LTD, 2020. ISSN 1873376X.v. 1152 Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122247>

SAMUELSSON, Laura B. et al. Validation of biomarkers of CVD risk from Dried blood spots in community-based research: Methodologies and study-specific serum equivalencies. *Biodemography and Social Biology*, [s. l.], v. 61, n. 3, p. 285–297, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19485565.2015.1068105>

SANTI, Rosemari et al. Exposição ao benzeno em postos de combustíveis: estratégia de ações integradas de Vigilância em Saúde do Trabalhador na região dos Vales/RS. [s. l.], v. 6369, n. supl 1, p. 1–11, 2017.

SANTOS, Marcus Vinicius Corrêa dos et al. Aspectos toxicológicos do benzeno, biomarcadores de exposição e conflitos de interesses. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*, [s. l.], v. 42, n. suppl 1, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/2317-6369nota00017>

SHARMA, Abhisheak et al. Dried blood spots: Concepts, present status, and future perspectives in bioanalysis. *Drug Testing and Analysis*, [s. l.], v. 6, n. 5, p. 399–414, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/dta.1646>

SIES, Helmut. On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. *Current Opinion in Toxicology*, [s. l.], v. 7, p. 122–126, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2018.01.002>

SIES, Helmut. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, [s. l.], v. 4, p. 180–183, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>

SU, Lian Jiu et al. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, [s. l.], v. 2019, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2019/5080843>

UMBREIT, Jay. Methemoglobin - It's not just blue: A concise review. *American Journal of Hematology*, [s. l.], v. 82, n. 2, p. 134–144, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ajh.20738>

VASCONCELOS, Sandra Mary Lima et al. Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio, Antioxidantes e Marcadores de Dano Oxidativo em Sangue Humano: Principais Métodos Analíticos para sua Determinação. *Química Nova*, [s. l.], v. 30, n. 5, p. 1323–1338, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000500046>

VITOR, João et al. Determinação de metemoglobina em voluntários fumantes e não fumantes. *Journal of the Health Sciences Institute*, [s. l.], v. 34, n. January 2016, p. 38–43, 2016.

WALDMAN, Hunter S.; RENTERIA, Liliana I.; MCALLISTER, Matthew J. Time-restricted feeding for the prevention of cardiometabolic diseases in high-stress occupations: A mechanistic review. *Nutrition Reviews*, [s. l.], v. 78, n. 6, p. 459–464, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuz090>

XIA, Bing et al. Increased oxidative stress and plasma Hsp70 levels among gasoline filling station attendants. *Toxicology and Industrial Health*, [s. l.], v. 33, n. 2, p. 171–181, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0748233715616554>

YU, Miao et al. Untargeted metabolomics profiling and hemoglobin normalization for archived newborn dried blood spots from a refrigerated biorepository. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, [s. l.], v. 191, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113574>

ANEXOS

ANEXO A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

(Resolução 466/2012 CNS/CONEP)

O(a) sr.(a) está sendo convidado(a) a participar da pesquisa intitulada “DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE TECNOLOGIA DE AMOSTRAGEM DE SANGUE SECO PARA TRIAGEM DE POPULAÇÕES A PARTIR DA DOSAGEM DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO” e está sendo desenvolvida por Daniel Ricardo Dias Alves, aluno de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Federal do Amapá.

O objetivo deste trabalho é verificar a possibilidade do uso da técnica de coleta de sangue seco em papel para triagem de populações a partir da dosagem de biomarcadores de estresse oxidativo. A sua participação na pesquisa terá grande importância pois ajudará na determinação dos riscos de exposição aos xenobióticos (compostos químicos estranhos ao organismo humano, como os combustíveis), em trabalhadores de postos de combustíveis.

Inicialmente, serão solicitadas algumas informações sobre o seu estado de saúde, os seus hábitos e o seu tempo de trabalho no posto. Em seguida, ocorrerá a coleta de sangue de dois locais diferentes: da ponta de um dedo da mão e da veia do seu braço. Essas coletas serão muito importantes para se determinar a quantidade de compostos químicos estranhos que estão presentes em seu organismo e assim saber o seu nível de exposição.

A pessoa que coletará o seu sangue é habilitada a utilizar os procedimentos adequados para não haver riscos para o(a) sr.(a). Entretanto, observamos que há a possibilidade de ocorrer riscos e desconfortos relacionados à coleta de sangue, ainda que raros e passageiros, como dor localizada, hematoma, desmaio e infecção.

Os dados pessoais e os termos de consentimento serão mantidos em total segurança, e apenas o pesquisador terá acesso a essas informações. Os seus dados de identificação serão mantidos em sigilo, e só serão utilizados para estudos estatísticos, no nível coletivo.

Sua participação é voluntária e o(a) sr.(a) pode interromper a entrevista mesmo depois de ter concordado em participar. O(a) sr.(a) tem liberdade para não responder a qualquer pergunta do questionário.

Caso o(a) sr.(a) tenha qualquer dúvida sobre esta pesquisa pode entrar em contato com o pesquisador através do telefone: (96) 98106-4190. O(a) senhor(a) também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Amapá Rodovia JK, s/n – Bairro Marco Zero do Equador - Macapá/AP, para obter informações sobre esta pesquisa e/ou sobre a sua participação, através dos telefones 4009-2804, 4009-2805.

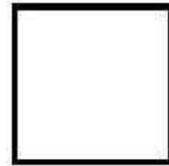
Desde já lhe agradeço!

Data: _____ / _____ / _____

Daniel Ricardo Dias Alves – Pesquisador

Considerando, que fui informado(a) dos objetivos e da relevância do estudo proposto, de como será minha participação, dos procedimentos e riscos decorrentes deste estudo, declaro o meu consentimento em participar da pesquisa, como também concordo que os dados obtidos na investigação sejam utilizados para fins científicos (divulgação em eventos e publicações). Estou ciente que receberei uma via desse documento.

Macapá, ____ de _____ de 2020.



Assinatura do participante

Polegar direito (caso não assine)

ANEXO B

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ-UNIFAP									
Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais-PPGCA									
Rod. Juscelino Kubitschek, km 02 - Jardim Marco Zero, Macapá - AP									
Desenvolvimento e validação de tecnologia de amostragem de sangue seco para triagem de populações a partir da dosagem de biomarcadores de estresse oxidativo									
Características sócio demográficas, de saúde e laborais								Nº de identificação	
1 Idade(anos):									
2 Gênero: <input type="checkbox"/> masc. <input type="checkbox"/> fem. <input type="checkbox"/> Outros									
3 Estado civil: <input type="checkbox"/> Casado(a)/união consensual <input type="checkbox"/> Solteiro(a) <input type="checkbox"/> Divorciado(a) <input type="checkbox"/> Separado(a) <input type="checkbox"/> Viúvo(a)									
4 Nº de filhos: <input type="checkbox"/>									
5 Escolaridade <input type="checkbox"/> Educação básica <input type="checkbox"/> Ensino médio <input type="checkbox"/> Ensino superior									
6 Renda pessoal mensal: R\$ <input type="text"/>									
7 Renda familiar total: R\$ <input type="text"/>									
8 Tabagismo: <input type="checkbox"/> Fumante <input type="checkbox"/> Ex-fumante <input type="checkbox"/> Não fumante									
9 Atividade física: <input type="checkbox"/> Nenhuma <input type="checkbox"/> Até 2 vezes por semana <input type="checkbox"/> 3 ou mais vezes por semana									
10 Consumo regular de bebidas alcoólicas: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não									
11 Uso de medicamentos para hipertensão arterial: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não									
12 Uso de medicamentos para diabetes: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não									
13 Uso de medicamentos para distúrbios do sono: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não									
14 Uso recente de vermifugo ou antibiótico: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não									
15 Uso de inseticidas em casa: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/>									
16 Presença das seguintes doenças crônicas: <input type="checkbox"/> Diabetes <input type="checkbox"/> Câncer <input type="checkbox"/> Hipertensão <input type="checkbox"/> Outras									
17 Horas de sono: <input type="text"/>									
18 Dieta equilibrada: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não									
19 Peso(em quilogramas): <input type="text"/>									
20 Altura(em metros): <input type="text"/>									
21 Mora em região altamente poluída: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não									
22 Que função exerce: <input type="text"/>									
23 Há quanto tempo trabalha(em anos): <input type="text"/>									
24 Por quanto tempo se expõem por dia(em horas): <input type="text"/>									
25 Por quanto tempo se expõem por semana(em dias): <input type="text"/>									
26 Se alimenta no local de trabalho: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não									
27 Consome água no local de trabalho: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não									
28 Tem estresse emocional no trabalho: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não									
29 Faz uso de equipamento de proteção individual-EPI: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não									

