



MANCHAS DE SANGUE SECO EM PAPEL (*DRIED BLOOD SPOTS, DBS*) COMO TÉCNICA DE MICROEXTRAÇÃO EM TOXICOLOGIA FORENSE *POST MORTEM*

Palavras-Chave: TOXICOLOGIA FORENSE, DBS, SANGUE *POST MORTEM*

Autores/as:

LETÍCIA CRISTINA MOREIRA CARVALHO [UNICAMP]
Prof. Dr. JOSÉ LUIZ DA COSTA (orientador) [UNICAMP]

INTRODUÇÃO:

Em toxicologia analítica, resultados não confiáveis e imprecisos são fortemente influenciados por erros na fase pré-analítica, que envolve, entre outras etapas, o transporte e o armazenamento adequado das amostras. Na rotina dos laboratórios forenses do Brasil há um intervalo de tempo considerável entre a coleta da amostra, chegada ao laboratório e execução da análise, uma vez que frequentemente os laboratórios estão localizados longe (por vezes a centenas de quilômetros) das salas de necropsia. Assim, mudanças nas concentrações das substâncias podem ocorrer dependendo de características da própria substância, mas também do tempo e condições de estocagem em relação a coleta e/ou da hora da morte, levando à medidas errôneas ou até resultados falso negativos. Idealmente, o armazenamento e transporte de amostras biológicas para análises toxicológicas deve ser realizado em temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou menor [1], o que encarece sobremaneira a logística de materiais para laboratórios de toxicologia forense.

Mancha de sangue seco em papel (do inglês *dried blood spot*, DBS) é uma técnica de amostragem que requer pequenos volumes de sangue. A técnica de DBS oferece inúmeras vantagens em relação a outros métodos que se têm disponíveis, uma vez que a coleta de pequeno volume de amostra resulta em menores custos de transporte e armazenamento, e a torna menos invasiva para pacientes e animais de experimentação. E, ainda, estudos têm demonstrado que há inativação de enzimas e patógenos (incluindo o HIV) por ter sido submetida a processo de secagem, tornando a manipulação de amostras mais segura. Há também redução da degradação de compostos contendo ésteres e carbonatos por hidrólise química e enzimática, oferecendo maior estabilidade [2]–[5]. Estudos envolvendo a estabilidade de analitos quando armazenados em DBS mostraram, por exemplo, que a benzedrona quando estocada em DBS à temperatura ambiente é detectável por até 87 dias a mais em relação a amostras de sangue total armazenadas em mesma temperatura [6]. A cocaína, que é espontaneamente convertida à benzoilecgonina em fluidos biológicos, mostrou-se estável em DBS mantido à temperatura ambiente durante 30 dias [2].

O DBS é um exemplo de técnica de micro amostragem, que pode ser definida como a utilização de uma quantidade inferior a $50\text{ }\mu\text{L}$ de amostra biológica para realização de análises [4], [7]. Além disso, tem sido descrito por alguns autores como uma estratégia miniaturizada de preparo de amostras muito eficiente (ou micro extração), com baixo consumo de reagentes [3], [8]–[10]. Contudo, a aplicação do DBS como ferramenta de preparo de amostras *post mortem* ainda não foi investigada apropriadamente.

METODOLOGIA:

Amostras

Para preparo das amostras de DBS, serão utilizadas amostras de sangue total coletadas no final de sessões de necropsia realizadas no Núcleo de Perícias Médico- Legal de Campinas. A coleta de amostras deste projeto de pesquisa já foi avaliada e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (CAAE 58187816.6.0000.5404) e pela Comissão de Ética em Pesquisa da Superintendência da Polícia Técnico-Científica.

Para preparo dos cartões DBS, uma alíquota de 20 μ L do sangue será aplicada nos cartões, que serão submetidos à secagem por 3 horas em temperatura ambiente. Durante a aplicação das amostras, as manchas devem ser aplicadas espaçadas para que não ocorra sobreposição entre elas e o cartão não deve encostar-se a nenhuma superfície para que não ocorra o extravasamento e consequente perda do volume aplicado (ele pode ser fixado com auxílio de fita adesiva crepe, conforme **Figura 1**). Se as análises não forem realizadas logo após a secagem, o cartão será acondicionado em plástico com lacre do tipo zip contendo dois sachês de dessecante.



Figura 1. Exemplo da aplicação de amostra de sangue ao cartão de DBS no volume de 20 μ L por mancha. Todas as manchas são oriundas de uma mesma amostra

Em paralelo às análises por DBS, as amostras de sangue total serão analisadas por extração em fase líquida e LC-MS/MS, realizadas como parte do projeto de mestrado “Estudo da relação entre uso de substâncias psicoativas e suicídios através de análises toxicológicas *post mortem*”, conduzido pela aluna Aline Franco Martins (Programa de Pós-graduação em Farmacologia, FCM).

Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

Para a análise das amostras de DBS, um disco de tamanho fixo de 6 mm (maior do que a mancha gerada por 20 μ L de sangue), será cortado e transferido para tubo de polipropileno com capacidade de 2 mL. Uma solução metanólica (300 μ L) contendo padrão interno será adicionado ao tubo, que passará por agitação mecânica em vortex (5 min) e centrifugação (12.000 rpm/5 min), e 2 μ L do sobrenadante serão injetados no sistema LC-MS/MS.

As análises serão realizadas em cromatógrafo líquido de ultra eficiência acoplado a espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo (LCMS8060, Shimadzu, Japão), utilizando um método analítico já desenvolvido e utilizado no LTA-CIATox-Campinas (Centro de Informação e Assistência Toxicológica de Campinas, residente no Laboratório de Toxicologia Analítica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP). A separação dos analitos é realizada em coluna cromatográfica Raptor® Biphenyl (100 mm x 2,1 mm, 2,7 μ m), mantida à 40°C. A eluição dos analitos ocorre por gradiente, com fase móvel composta por água ultrapura (A) e metanol (B), ambas contendo 0,1% de ácido fórmico e 2 mmol/L de formiato de amônio.

Análise de dados

As substâncias psicoativas identificadas nas amostras analisadas serão quantificadas por calibração com ponto único [11], [12] e os resultados obtidos serão classificados entre três grupos (nível terapêutico, nível tóxico e nível fatal) de acordo com as concentrações obtidas e a literatura científica disponível [13].

Para comparação dos resultados obtidos nas análises por DBS e com os obtidos na extração convencional (considerada como referência) serão calculados a especificidade e sensibilidade da técnica de micro extração a partir da quantidade de falso-negativos (não detectado no DBS, mas detectado na extração convencional) e falso-positivos (detectado no DBS, mas não na extração convencional). Espera-se obter boa concordância entre os resultados, o que confirmará a hipótese que o DBS pode ser utilizado como técnica de preparo de amostras em toxicologia forense.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Contexto da revisão bibliográfica

Infelizmente, por causa da pandemia atual, a parte prática deste projeto não pode ser iniciada ainda. A autorização para dar continuidade às atividades laboratoriais por alunos de iniciação científica, no laboratório no qual o projeto será realizado, ainda não foi concedida. Portanto, em lugar de analisar amostras de sangue *post mortem* DBS e comparar os resultados com amostras de sangue total, foi feita uma revisão bibliográfica sobre o assunto.

Foram analisados artigos para o levantamento dos potenciais interferentes e problemas mais comuns encontrados em análises de DBS e como lidar com estes. Esta abordagem foi considerada importante, pois pode ajudar bastante caso alguma dessas ocasiões ocorra quando o projeto tiver andamento, facilitando a resolução do problema, poupando tempo e retrabalho. Os artigos revisados tinham como assunto a análise de amostras DBS utilizando LC-MS/MS, sendo elas feitas com o intuito de desenvolvimento de método ou análise de estabilidade de amostras, e foram procuradas informações sobre interferentes e situações potencialmente problemáticas para o andamento das análises de amostras DBS.

Diagnóstico e resolução de problemas em análises de amostras DBS

Uma prática muito comum em amostras de sangue é a adição de conservantes e anticoagulantes. O problema que este uso pode trazer é potenciais erros na interpretação de resultados analíticos realizados posteriormente. Isso pode acontecer porque essas duas substâncias podem interagir de maneira indesejada com outros compostos, como por exemplo, conservantes que podem acabar por acelerar a degradação de alguns compostos, e anticoagulantes que podem aumentar as concentrações de alguns medicamentos [2]. Esse é mais um motivo pelo qual a técnica de DBS é um procedimento muito promissor e merece maior investimento e estudo de aplicabilidade, pois pode descartar o uso dessas substâncias potencialmente interferentes na amostra, contando com essa fonte de erros potenciais a menos quando comparado à matriz sangue *post mortem* total. Neste projeto, caso alguma amostra de sangue *post mortem* total usada para preparar as amostras DBS contenha conservantes ou anticoagulantes, será feita uma pesquisa do composto específico para constatar que tipos de interações e alterações poderiam ocorrer a outras substâncias possivelmente presentes na amostra.

Outro parâmetro que frequentemente influencia os resultados da análise analítica é a porcentagem de volume ocupada pelos glóbulos vermelhos no volume total de sangue, chamado de hematócrito. O hematócrito afeta as propriedades do sangue, como a uniformidade e a viscosidade, e por esse motivo ele também influencia a difusão do sangue nos cartões de papel DBS, podendo acarretar diferenças no tamanho da mancha de sangue no papel, na homogeneidade das substâncias dentro de um *spot* e até mesmo o tempo de secagem [14], o que pode afetar o resultado da análise da amostra posteriormente. A solução mais utilizada pelos autores dos artigos consultados foi a determinação de um volume específico para cada gota de sangue depositada no papel DBS e posteriormente analisar toda a gota [14]–[16]. Isso permite que todo o conteúdo do volume desejado seja analisado e que as diferentes concentrações dentro de uma gota de sangue no DBS, potencialmente causadas pelo hematócrito, não afetem o resultado de maneira relevante.

O sangue, apesar de ser uma matriz biológica amplamente utilizada, é uma das que mais contém interferentes em sua própria composição, como hemácias, células de defesa, proteínas, sais e até alguns

metabólitos, que acabam por dificultar as análises. Geralmente, a extração realizada com as amostras de DBS inclui o uso de água ou soluções tampão aquosas, que podem extrair do papel tanto os compostos de interesse quanto esses outros componentes sanguíneos. Por esse motivo, quando ocorre essa extração abrangente do DBS, posteriormente é necessária uma etapa de tratamento da amostra para retirar esses interferentes. Essa etapa adicional pode ser feita através de uma extração líquido-líquido (LLE), de uma extração em fase-sólida (SPE), ou da adição de solventes orgânicos para precipitação de proteínas. Uma alternativa para evitar essa etapa adicional de tratamento, seria encontrar uma maneira de fazer a extração de compostos do DBS que não englobasse também a extração dessas substâncias indesejáveis, utilizando então uma extração com solventes orgânicos hidrofílicos, como metanol e aceto nitrila, ou uma mistura de solventes orgânicos [17]. Essa abordagem permite que as proteínas e sais presentes no sangue não sejam extraídos para a solução junto com os componentes desejados, descartando a necessidade de uma etapa adicional de limpeza amostral antes da análise.

Ao contrário do último tópico retratado, onde se prevê um meio de realizar uma extração menos abrangente do papel DBS, também pode ser possível que a extração não esteja sendo eficaz suficiente e alguns compostos desejados não sejam extraídos como deveriam para a solução amostral. Essa dessorção incompleta de analitos do papel de DBS pode ser resolvida através do aumento de pressão durante a extração [18], o que facilita a dissolução de moléculas na solução, ou através de sonicação [15]. A sonicação é um procedimento que consiste no uso de energia das ondas sonoras, que auxilia no processo de agitação das partículas no recipiente em questão, assim acelerando a dissolução de substâncias em um solvente. Geralmente, o tempo de sonicação utilizado é de dez minutos [15], podendo este ser aumentado caso não se mostre suficientemente eficaz.

CONCLUSÕES:

A revisão bibliográfica realizada, apesar de extremamente importante e relevante para o andamento do projeto, não proporcionou os resultados esperados. Há planos futuros muito próximos para que possam ser feitas as análises laboratoriais referentes ao projeto em questão a partir do mês de setembro, podendo assim mais resultados serem demonstrados no relatório final do projeto assim como na apresentação durante o XXIX Congresso de Iniciação Científica UNICAMP.

BIBLIOGRAFIA

- [1] F. T. Peters, "Stability of analytes in biosamples-an important issue in clinical and forensic toxicology?," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 388, no. 7, pp. 1505–1519, 2007, doi: 10.1007/s00216-007-1267-2.
- [2] A. A. Alfazil and R. A. Anderson, "Stability of benzodiazepines and cocaine in blood spots stored on filter paper," *J. Anal. Toxicol.*, vol. 32, no. 7, pp. 511–515, 2008, doi: 10.1093/jat/32.7.511.
- [3] S. Odoardi, L. Anzillotti, and S. Strano-Rossi, "Simplifying sample pretreatment: Application of dried blood spot (DBS) method to blood samples, including postmortem, for UHPLC-MS/MS analysis of drugs of abuse," *Forensic Sci. Int.*, vol. 243, pp. 61–67, 2014, doi: 10.1016/j.forsciint.2014.04.015.
- [4] R. Linden, M. V. Antunes, and J. L. Costa, *Mass spectrometry for the quantification of drugs in biosamples*, vol. 7. 2020.
- [5] N. B. Andriguetti *et al.*, "Analytical and clinical validation of a dried blood spot assay for the determination of paclitaxel using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry," *Clin. Biochem.*, vol. 54, no. December 2017, pp. 123–130, 2018, doi: 10.1016/j.clinbiochem.2018.02.020.
- [6] K. F. da Cunha, M. N. Eberlin, and J. L. Costa, "Long-term stability of synthetic cathinones in dried blood spots and whole blood samples: a comparative study," *Forensic Toxicol.*, vol. 36, no.

- 2, pp. 424–434, Jul. 2018, doi: 10.1007/s11419-018-0418-9.
- [7] P. M. Edelbroek, J. van der Heijden, and L. M. L. Stolk, “Dried Blood Spot Methods in Therapeutic Drug Monitoring: Methods, Assays, and Pitfalls,” *Ther. Drug Monit.*, vol. 31, no. 3, pp. 327–336, Jun. 2009, doi: 10.1097/FTD.0b013e31819e91ce.
- [8] J. A. Michely, M. R. Meyer, and H. H. Maurer, “Dried urine spots – A novel sampling technique for comprehensive LC-MSn drug screening,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 982, pp. 112–121, 2017, doi: 10.1016/j.aca.2017.05.033.
- [9] S. Soares, T. Castro, T. Rosado, N. Fernández, M. Barroso, and E. Gallardo, “New analytical approach to determine organophosphorus insecticides in blood by dried matrix spots sampling and GC-MS/MS,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 410, no. 30, pp. 7955–7964, 2018, doi: 10.1007/s00216-018-1417-8.
- [10] M. Moretti *et al.*, “Determination of benzodiazepines in blood and in dried blood spots collected from post-mortem samples and evaluation of the stability over a three-month period,” *Drug Test. Anal.*, vol. 11, no. 9, pp. 1403–1411, 2019, doi: 10.1002/dta.2653.
- [11] G. M. J. Meyer, A. A. Weber, and H. H. Maurer, “Development and validation of a fast and simple multi-analyte procedure for quantification of 40 drugs relevant to emergency toxicology using GC-MS and one-point calibration,” *Drug Test. Anal.*, vol. 6, no. 5, pp. 472–481, 2014, doi: 10.1002/dta.1555.
- [12] J. A. Michely and H. H. Maurer, *A multi-analyte approach to help in assessing the severity of acute poisonings – Development and validation of a fast LC-MS/MS quantification approach for 45 drugs and their relevant metabolites with one-point calibration*, vol. 10, no. 1, 2018.
- [13] M. Schulz, S. Iwersen-Bergmann, H. Andresen, and A. Schmoltdt, “Therapeutic and toxic blood concentrations of nearly 1,000 drugs and other xenobiotics,” *Crit. Care*, vol. 16, no. 4, p. R136, 2012, doi: 10.1186/cc11441.
- [14] H. Wang *et al.*, “An LC-MS/MS method for comparing the stability of ethanol’s non-oxidative metabolites in dried blood spots during 90 days,” *Alcohol*, vol. 83, pp. 29–35, 2020, doi: 10.1016/j.alcohol.2019.05.007.
- [15] M. Moretti *et al.*, “Determination of antidepressants and antipsychotics in dried blood spots (DBSs) collected from post-mortem samples and evaluation of the stability over a three-month period,” *Molecules*, vol. 24, no. 20, 2019, doi: 10.3390/molecules24203636.
- [16] K. F. da Cunha, M. N. Eberlin, and J. L. Costa, “Development and validation of a sensitive LC-MS/MS method to analyze NBOMes in dried blood spots: evaluation of long-term stability,” *Forensic Toxicol.*, vol. 36, no. 1, pp. 113–121, 2018, doi: 10.1007/s11419-017-0391-8.
- [17] S. Sadler Simões, A. Castañera Ajenjo, and M. J. Dias, “Dried blood spots combined to an UPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of drugs of abuse in forensic toxicology,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 147, pp. 634–644, 2018, doi: 10.1016/j.jpba.2017.02.046.
- [18] S. Gaugler, J. Rykl, M. Grill, and V. L. Cebolla, “Fully automated drug screening of dried blood spots using online LC-MS/MS analysis,” *J. Appl. Bioanal.*, vol. 4, no. 1, pp. 7–15, 2018, doi: 10.17145/jab.18.003.