

DETERMINAÇÃO DE FOSFATIDILETANOL EM MANCHAS DE SANGUE SECO EM PAPEL POR UHPLC-MS/MS: AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE ÁLCOOL EM DEPENDENTES QUÍMICOS**Mariane Tegner^a, Fernanda S. Guterres^a, Isabela R. Ott^a, Lidiane T. da Motta^b, Deise T. Schmitz^b, Magda Perassolo^a, Rafael Linden^a e Marina V. Antunes^{a,*}**^aInstituto de Ciências da Saúde, Universidade Feevale, 93525-075 Novo Hamburgo – RS, Brasil^bHospital Sagrada Família, 95760-000 São Sebastião do Caí – RS, Brasil

Recebido em 07/07/2022; aceito em 05/10/2022; publicado na web em 05/12/2022

DETERMINATION OF PHOSPHATIDYLETANOL IN DRIED BLOOD SPOT BY UHPLC-MS/MS: EVALUATION OF ALCOHOL CONSUMPTION IN CHEMICAL DEPENDENTS. We developed and validated an UHPLC-MS/MS method for the quantification of phosphatidylethanol (PEth) in dried blood spots (DBS). Sample preparation was a liquid extraction and chromatographic separation was performed in an Acquity C8 column. The mobile phases were 4 mM ammonium acetate in water (A) and acetonitrile (B) at 24:76 (v/v). The total analytical run time was 6 minutes, with retention time of 3.36 min for PEth and 4.13 min for phosphatidylpropanol. The method was linear from 10 to 3000 ng mL⁻¹, specific, with precise and accurate. The analyte was stable in DBS stored from -20 to 45 °C for 21 days. Matrix effect was compensated with the internal standard (-5.21% to +6.09%). The method was applied in the evaluation of alcohol consumption in DBS from 25 chemical dependents. The PEth concentrations ranged from 14.5 to 2380.8 ng mL⁻¹, with significant correlation with the self-report alcohol consumption AUDIT scores ($r=0.41$).

Keywords: phosphatidylethanol; binge drinking; monitoring; dried blood spot; LC-MS/MS.

INTRODUÇÃO

O uso recreativo de etanol já se instalou como parte da cultura humana, é uma das drogas mais antigas ainda em uso. O consumo recorrente de etanol está associado com importante fator de risco para desenvolvimento de doenças crônicas.¹ Durante o período de 2013 a 2015, uma média de 85 mil mortes (1,4% do total) anuais foram atribuídas exclusivamente ao consumo de álcool. As causas de morte foram principalmente por doença hepática (63,9%) e distúrbios neuropsiquiátricos (27,4%), como a dependência.²

O teste AUDIT (*Alcohol Use Disorders Identification Test*) é uma ferramenta de triagem baseada em auto relato desenvolvida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para avaliar o consumo de álcool. O teste é composto por 10 perguntas sobre o uso recente de álcool, dependência, sintomas e ou problemas relacionados ao uso.³

Embora o teste AUDIT seja amplamente utilizado generalizado, ele é baseado no auto relato, o qual possui problemas inerentes como o viés de memória e lucidez. Estudos recentes utilizando produtos do metabolismo não oxidativo do etanol, fosfatidiletanol (PEth) e etil glicuronídeo (EtG) identificaram subnotificação significativas no questionário.⁴⁻⁶

A determinação de parâmetros bioquímicos tais como transaminases, as quais podem ser alterados pelo mecanismo da oxidação do etanol, embora contribuam para o diagnóstico do alcoolismo, são considerados marcadores indiretos da exposição ao etanol, pois refletem os efeitos tóxicos nos tecidos e não propriamente o seu consumo, sendo considerados inespecíficos.¹

O PEth é considerado um marcador direto do consumo de álcool, formado pela enzima fosfolipase-D (FLD) apenas na presença do etanol, por isso sua concentração está altamente relacionada com o consumo. Em condições normais a FLD catalisa a hidrólise de fosfolipídios, a presença do etanol gera uma competição com fosfolipídios pelos sítios de biotransformação. É determinado principalmente no sangue total visto que é encontrado em maiores

concentrações nas membranas dos glóbulos vermelhos, não sendo prejudicado pela diferença entre gêneros e por outras patologias.⁷

O PEth tende a se acumular, especialmente após episódios repetidos de consumo de álcool, permitindo uma janela maior de detecção e o potencial de detectar o consumo a longo prazo.⁸ Dessa forma, o uso de marcador pode diferenciar abstêmios e indicar o nível de consumo.¹ Seu tempo de meia vida é de 4 a 7 dias, sendo detectado em alguns indivíduos por até 28 dias.⁹ Em pacientes em desintoxicação, o PEth foi detectado no sangue por até quatro semanas após o início da abstinência (resultados foram positivos em 92,5% dos pacientes após uma semana e 64,3% após quatro semanas de abstinência).¹⁰

A coleta de sangue capilar em papel filtro, *dried blood spot* (DBS), vem se mostrando uma conveniente alternativa à punção venosa, principalmente por ser menos invasiva e não requerer um profissional especializado para a coleta.¹¹ O emprego de DBS também simplifica o transporte e armazenamento das amostras, tendo em vista que amostras secas são estocáveis a temperatura ambiente e de baixo risco pela inativação dos patógenos, vantagens que permitem também a redução de custos logísticos.^{12,13} A técnica de microamostragem em DBS tem se mostrado útil para a determinação de PEth,¹⁴⁻¹⁸ sendo ainda sugerido para eliminar o risco de formação *in vitro*.¹⁷

Nesse contexto, é relevante a disponibilidade de metodologias analíticas específicas para avaliar o consumo crônico de álcool. Em vista disso, o objetivo do presente estudo foi desenvolver e validar um método simples e rápido para determinação de PEth em DBS por cromatografia líquida de ultra eficiência associado a espectrometria de massas em sequencial (UHPLC-MS/MS). O método foi aplicado para a avaliação da comparabilidade entre amostras de DBS de sangue capilar e venoso, empregando voluntários que referiam consumo regular de álcool e haviam ingerido em até 5 horas antes da coleta.

Além disso, o trabalho inovou sendo o primeiro estudo do sul do Brasil a empregar o PEth em DBS capilar em associação ao teste AUDIT para a avaliação do consumo de álcool em usuários de álcool e outras drogas, internados para reabilitação em Hospital Psiquiátrico no Rio Grande do Sul.

*e-mail: marinaantunes@fevale.br

PARTE EXPERIMENTAL

Reagentes e Soluções

Os padrões de fosfatidiletanol (PEth) 16:0–18:1 e fosfatidilpropanol 18:1 foram obtidos da Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabama, EUA). Metanol em grau HPLC foi adquirido da Merck (Darmstadt, Alemanha). A acetonitrila foi obtida da Honeywell - Riedel-de-Haën (Charlotte, EUA). A água purificada foi produzida através de um sistema purificador Elga Purelab Ultra® da Veolia Labwater (High Wycombe, Reino Unido). O acetato de amônio foi adquirido da Sigma-Aldrich (Missouri, EUA). Lanceta retrátil Medlance® Plus (2,0 mm x 0,8 mm) foi obtida da Medlance (Marietta, EUA) e o papel filtro Whatman 903® foi adquirido de GE Healthcare (Westborough, EUA).

Preparo das soluções e amostras controle

Soluções-estoque de PEth e padrão interno (PI) fosfatidilpropanol foram preparadas pela dissolução em metanol afim de se obter a concentração de 1 mg mL⁻¹. As soluções calibradoras foram preparadas através da dissolução em metanol da solução estoque nas seguintes concentrações 0,20; 0,50; 1; 2,5; 5,0; 10; 20; 40; 60 µg mL⁻¹. Para os ensaios de validação, amostras de sangue venoso de voluntários abstêmios ou não usuários de bebidas alcoólicas foram colhidas pelos autores no laboratório de análises clínicas da Universidade Feevale, e seu hematócrito (Hct) ajustado, adicionando ou removendo plasma a fim de obter Hct 39%. As soluções foram diluídas 1:20 (v/v) em sangue isento do analito com hematócrito (Hct) 39%, nas concentrações finais de 10; 25; 50; 125; 250; 500; 1000; 2000 e 3000 ng mL⁻¹. Os controles de qualidade foram preparados em metanol da mesma forma, nas concentrações de controle de qualidade baixo (CQB) 0,60 µg mL⁻¹, controle de qualidade médio (CQM) 18 µg mL⁻¹, controle de qualidade alto (CQA) 50 µg mL⁻¹. Os controles em sangue obtiveram as seguintes concentrações de CQB 30, CQM 900 e CQA 2500 ng mL⁻¹. Alíquotas de 30 µL de cada amostra calibradora/controle foram pipetadas no papel filtro Whatman 903® e mantidas em local seco a temperatura ambiente, média de 25 °C, de 3 a 24 horas até a extração. Amostras reservas foram armazenadas em envelope de papel pardo e mantidas nas mesmas condições.

Preparo das amostras

Um disco de DBS de 8 mm foi transferido para um tubo de polipropileno e adicionado de 500 µL de solvente de extração metanol:acetonitrila 80:20 (v/v), contendo fosfatidilpropanol 8 ng mL⁻¹, seguido de homogeneização em termobloco por 30 minutos a 25 °C, com agitação a 1000 rpm. Uma alíquota de 450 µL do sobrenadante foi transferida para um novo tubo de polipropileno de 1,5 mL e evaporada até a secura por 40 minutos a 45 °C. O extrato seco foi retomado com 100 µL acetato de amônio 4 mM:acetonitrila (50:50) e 3 µL foram injetados no sistema UHPLC-MS/MS.

Equipamentos e condições cromatográficas

Amostras foram analisadas em um sistema UHPLC Dionex Ultimate 3000 associado a espectrômetro de massas Quantum Access MAX, fornecidos pela Thermo Scientific (Waltham, EUA), com ionização por *electrospray* (EIS) em modo negativo. A separação foi realizada em coluna Acquity UHPLC® BEH C8 (100 x 2,1 mm; 1,7 µm), mantida a 30 °C, com eluição em modo isocrático com proporção 24:76 (v/v), sendo fase móvel (A) acetato de amônio

4 mmol L⁻¹ em água e (B) acetonitrila, com fluxo de 0,5 mL min⁻¹ e tempo total de corrida de 6 minutos. Temperatura do capilar foi de 200 °C, a temperatura do vaporizador foi de 350 °C e voltagem do *electrospray* foi de 4000 V. As transições de massas monitoradas no modo MRM para quantificação e qualificação respectivamente, foram (*m/z*): PEth 701,6-281,1 e 701,6-255; fosfatidilpropanol 741,6-281,8 e 741,6-476,9. As energias de colisão foram respectivamente (V): PEth 46 e 43; fosfatidilpropanol 42 e 30. A análise e processamento dos dados foi feita através do software Xcalibur da Thermo Scientific®.

Validação do método

Seletividade

Foram avaliadas, e analisadas separadamente, amostras de 10 voluntários que não consumiram bebidas alcoólicas em 30 dias e processadas conforme descrito no item “preparação das amostras” para analisar a presença de picos cromatográficos e verificar se esses podem interferir na detecção do analito e do PI.¹⁹

Linearidade

A linearidade foi avaliada em 9 níveis, em sextuplicata para cada nível. Analisou-se amostras calibradoras no intervalo de 10; 25; 50; 125; 250; 500; 1000; 2000 e 3000 ng mL⁻¹. As 6 réplicas de cada calibrador foram extraídas conforme item “preparação das amostras”. As curvas de calibração foram obtidas correlacionando as concentrações nominais das amostras de calibração com as razões de área de pico de PEth e respectivo PI. A homocedasticidade dos dados de calibração foi avaliada com o teste F ao nível de confiança de 95%. Os modelos de regressão ponderada foram avaliados com base em seus coeficientes de correlação (*r*) e pelo erro percentual cumulativo ($\Sigma\%$ RE), de acordo com Almeida *et al.*^{19,20}

Sensibilidade

A sensibilidade foi determinada através do ponto mais baixo da curva de calibração (10 ng mL⁻¹). Esse experimento foi incluído na avaliação da precisão e exatidão do método (limite inferior de quantificação, LIQ) e foi avaliado em triplicata durante três dias. O coeficiente de variação (CV%) máximo aceitável intra ensaio e inter ensaio foi de 20%, e a exatidão entre 80% e 120%.¹⁹

Ensaios de precisão e exatidão

A precisão e exatidão do método foram avaliadas com amostras controle contendo PEth nas concentrações CQB 30 ng mL⁻¹, CQM 900 ng mL⁻¹ e CQA 2.500 ng mL⁻¹. As amostras foram processadas em triplicata e repetidas durante 5 dias diferentes. A precisão intra ensaio (variação entre as análises de um mesmo dia) e inter ensaio (variação entre os dias analisados), foram calculadas pela análise de variância (ANOVA), enquanto que a exatidão foi calculada como percentagem média obtida do valor teórico adicionado na amostra. O coeficiente de variação (CV%) aceito para a precisão foi de até 15%, e a exatidão entre 85 e 115%.¹⁹

Estabilidade

Para estimativa da estabilidade térmica de PEth em amostras DBS, amostras CQB, CQM e CQA foram mantidas a 4, 25 e 45 °C e analisadas em triplicata dentro de um período de 21 dias (dias 3, 7, 14 e 21). A estabilidade foi considerada aceitável se os resultados estivessem na faixa de 85 a 115% das concentrações medidas no início da série.

Efeito matriz e rendimento de extração

O efeito de matriz (EM) e o rendimento de extração (RE) foram determinados após a análise de três conjuntos, cada um com dez de

amostras (A, B e C), sendo o EM avaliado pelo método de adição pós-extração. O conjunto A foi composto por amostras de DBS CQB e CQA, preparadas e analisadas conforme descrito acima. O conjunto B foi composto por dez amostras de DBS isentas dos analitos, obtidos de diferentes voluntários abstêmios, que foram extraídas conforme descrito acima e apenas os extratos secos foram retomados com 100 μL de acetato de amônio 4 mmol L^{-1} e acetonitrila (50:50, v/v) contendo as concentrações padrões correspondendo à obtenção de 100% da recuperação dos CQB e CQA. O conjunto C foi composto de solvente de extração e os padrões utilizados no conjunto B, de modo que pudesse ser avaliado o efeito matriz na análise, através do percentual obtido da divisão do valor mais alto pelo mais baixo da variação das amostras. O efeito matriz (EM) foi definido através da comparação do conjunto A, controles extraídos normalmente, com o conjunto C, representando 100% recuperação, a partir da fórmula: $\text{EM}=[100\%-(A/C\%)]$. O rendimento da extração foi calculado a partir da área do analito obtido no conjunto (A) e pelo protocolo da extração do branco (B) usando a fórmula $\text{RE}=A/B\%$.

Influência do hematócrito na precisão

Alíquotas de sangue venoso em diferentes proporções de Hct (25, 40 e 50%) foram preparadas por centrifugação do sangue seguido de uma adição ou remoção de volumes apropriados de plasma.²¹ As amostras de sangue com diferentes níveis de Hct foram adicionadas ao padrão PEth a fim de obter as concentrações CQB, CQM e CQA. As amostras foram analisadas em triplicata para cada concentração e Hct%. A influência do Hct nas amostras de DBS foi determinada através da porcentagem das concentrações nominais dos controles. Os critérios de aceitação foram valores na faixa de 85-115%.

Influência do Hematócrito no rendimento de extração

O sangue venoso com diferentes níveis de Hct (25, 40 e 50%) foi preparado conforme descrito no item "Influência do Hct na precisão". Alíquotas de 15 μL de sangue de cada Hct contendo PEth na concentração de CQB, CQM e CQA foram adicionados ao papel filtro Whatman 903[®]. As amostras de CQ foram analisadas em triplicata conforme descrito em "Preparo das amostras". Extratos secos de sangue branco foram adicionadas com PEth para obter concentrações equivalentes a 100% de rendimento de extração para todas amostras de controle. O rendimento de extração foi calculado comparando as razões das áreas de PEth e PI obtidos nas amostras de QC e dos extratos brancos adicionados com o equivalente a 100% do rendimento.

Aplicação do método

O método foi aplicado na avaliação do perfil de consumo de álcool em usuários crônicos de álcool e drogas na internação em clínica de reabilitação. Para a validação clínica do ensaio, as concentrações de PEth em DBS de sangue capilar foram comparadas aos níveis estimados em DBS obtidos após aplicação de sangue venoso. Para tal, foram colhidas amostras pareadas de sangue capilar e sangue venoso de 25 pacientes internados para reabilitação e de um grupo adicional com 16 voluntários que reportaram consumir regularmente bebidas alcoólicas, totalizando 34 amostras pareadas. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Feevale (CEP) sob os pareceres nº 4.494.150 e 4.631.370.

Coleta das amostras

Após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), foram colhidas amostras de 5 mL de sangue venoso em tubo contendo EDTA, seguido de uma coleta de punção digital utilizando uma lanceta retrátil com 2 mm de penetração (Medlance). Na obtenção das manchas de sangue capilar foram colhidas duas

gotas de sangue em papel Whatman 903[®]. Para obtenção dos DBS de sangue venoso, imediatamente após a coleta, duas alíquotas com 30 μL de sangue venoso foram aplicadas no papel filtro Whatman 903[®]. Todos voluntários do estudo referiam consumo regular de álcool e haviam ingerido em até 5 horas antes da coleta. Se tratando de uma técnica de microamostragem em DBS que não requer transporte e armazenamento especializado, após o tempo necessário para secagem da amostra, mínimo 3 horas, as amostras foram transportadas e armazenadas em um envelope pardo mantido a temperatura ambiente até a análise do PEth. As amostras foram processadas de acordo com o item "preparo das amostras".

Avaliação do PEth com escore AUDIT em pacientes internados para reabilitação

Foram incluídos no estudo 25 pacientes usuários de álcool e outras drogas ilícitas, internados para reabilitação em Hospital Psiquiátrico no Rio Grande do Sul. Os pacientes responderam ao questionário AUDIT, composto por 10 perguntas de auto relato com escore de 0 a 40 pontos, de acordo com as diretrizes estabelecidas pela OMS. A pontuação atingida permite a classificação do uso de álcool, sendo de: baixo risco (0 a 7 pontos); uso de risco (8 a 15 pontos); uso nocivo (16 a 19 pontos) e provável dependência (20 a 40 pontos).³

Isoladamente a pergunta 3 do questionário consiste em avaliar o consumo pesado episódico (BPE). Considerado um padrão definido como a ingestão de 60 ou mais gramas (5 a 6 doses) de álcool em uma única ocasião. Essa avaliação é importante tendo em vista que o volume de álcool ingerido está relacionado com diversas consequências como intoxicação, lesões e violência.

Os participantes também forneceram amostras de sangue capilar e venoso, coletado conforme descrito acima, sendo também obtidas informações no prontuário acerca da idade, sexo e tempo de internação dos pacientes. Os resultados foram analisados em associação para determinar a classificação de uso para cada paciente e reduzir a ocorrência de subnotificação.

Análise estatística

Inicialmente, foi realizada uma análise descritiva das variáveis do estudo. A concordância entre as matrizes foi avaliada por meio de análise de regressão Passing-Bablok, gráficos de Bland-Altman, análise de correlação e teste de Cusun. Para amostras clínicas foram adotados os valores de cut-off para o PEth descrito por Schröck *et al.*,⁴ sendo $\leq 10 \text{ ng mL}^{-1}$ abstêmio; 11 a 111 ng mL^{-1} consumo moderado e $\geq 112 \text{ ng mL}^{-1}$ consumo excessivo. Foram determinados média e desvio padrão para dias de internação, idade e escore AUDIT e utilizado mediana para níveis de PEth. As análises estatísticas foram realizadas com o software Medcalc[®] (Ostend, Bélgica) e SPSS versão 26.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cromatografia e preparação da amostra

O UHPLC-MS/MS mostrou-se apropriado para determinação do PEth em amostras de DBS. Foi utilizado uma coluna de fase reversa C8 e fase móvel com eluição isocrática que permitiu uma separação eficiente do PEth e PI em uma corrida de 6 min, com tempos de retenção de 3,36 min para PEth e 4,13 min para fosfatidilpropanol. Na Figura 1 é apresentado cromatograma de íons totais e fragmentos monitorados.

Durante a análise de seletividade não foram identificados picos interferentes que possam impactar na detecção dos analitos, com áreas superiores a 10% do LIQ. Na Figura 2 são apresentados cromatogramas para amostra limite inferior de quantificação e paciente.

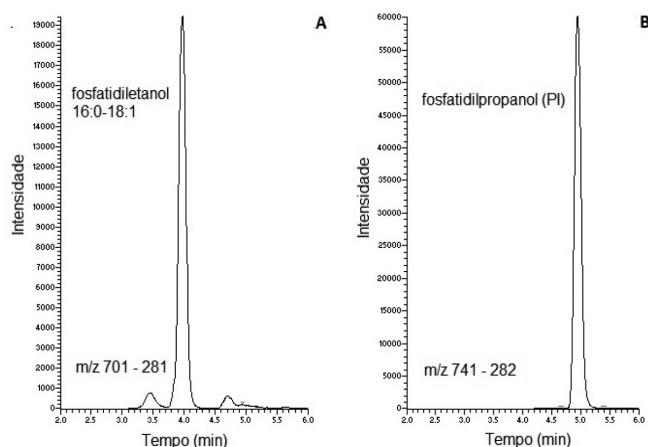


Figura 1. Cromatogramas obtidos nas análises de DBS. íons totais e fragmentos monitorados

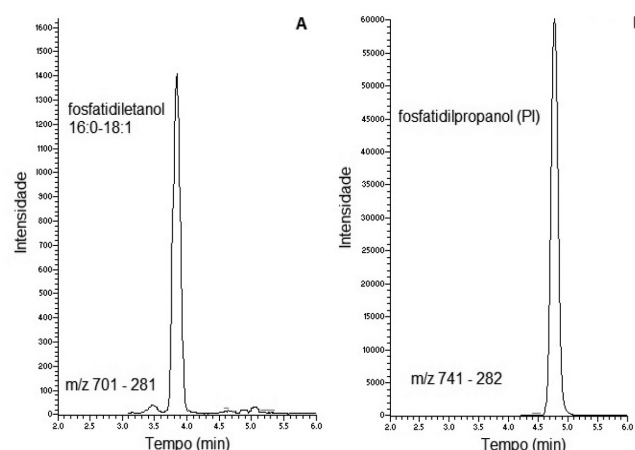


Figura 2. Amostra calibradora no limite inferior de quantificação. 2A: PEth 10 ng mL⁻¹, 2B: Padrão interno

A técnica utilizada para o preparo das amostras foi relativamente simples, com extração líquida com metanol e acetonitrila, seguida de evaporação da fase orgânica, com recuperação média do PEth ~70%. O acetato de amônio adicionado na ressuspensão do extrato permitiu uma ionização mais eficiente dos analitos com maior sensibilidade no ensaio.

Validação do método

O método foi linear no intervalo de 10 a 3000 ng mL⁻¹. Todas as curvas de calibrações incluíram este amplo intervalo, devido a grande diferença nas concentrações encontradas entre as coletas realizadas neste estudo. Os dados da curva de calibração, apresentado na Tabela 1, possuem heterocedasticidade significativa, com $F_{exp} = 987,2$. Diferentes fatores ponderais foram avaliados para a seleção modelo de

Tabela 1. Dados para linearidade e fator ponderal 1/x

Valor de F	987,2
Modelo ponderal	1/x
Inclinação	0,478
Intercepto	0,001
Valor de R	0,999
Soma dos resíduos	$1,53 \times 10^{-12}$
Soma do erro relativo	$5,69 \times 10^{-12}$

regressão a ser empregado. Dentre os modelos avaliados, a regressão utilizando o fator ponderal 1/x apresentou menor Σ Resíduos e coeficiente de correlação de 0,9988.

Os resultados de precisão e exatidão foram adequados, conforme a Tabela 2. A precisão intra-ensaio apresentou CV de 2,9 a 13,7% e a precisão inter-ensaio CV entre 5,9 e 14,8%, demonstrando adequada repetibilidade do método. A exatidão foi estimada entre 93,5 a 113,8%, também dentro dos critérios de aceitação para métodos bioanalíticos preconizados pelo *Scientific Working Group for Forensic Toxicology* (SWGTOX).¹⁹

O efeito matriz foi avaliado para verificar a ocorrência de supressão de íons ou efeito de aumento causado por co-eluição de moléculas originárias da matriz da amostra com o composto de interesse. Adotando a compensação pelo PI, o efeito matriz para CQA variou de -1,58 a +14,72% (média + 6,09%), CQM apresentou uma variação de -12,1 a 4,25% (média -5,21%) e CQB -13,64 a +8,33% (média -5,61%). Esta avaliação demonstrou um efeito de ionização entre -5,21 e +6,09%, inferior aos $\pm 25\%$ indicados pela SWGTOX,¹⁹ ou CV 15%. indicando que a co-eluição com os componentes da matriz parecem ter efeito mínimo com os compostos de interesse, apresentados na Tabela 2.

A estabilidade do PEth (min) foi testada em diferentes temperaturas, 4, 25 e 45 °C, as quais simulam condições térmicas que as amostras poderiam ser expostas. As amostras foram estáveis em todas as temperaturas para os dois níveis de controle durante o período de 21 dias, sendo essa uma vantagem intrínseca das amostras secas, o significativo aumento na estabilidade. Não foi levado em consideração a umidade relativa do ar. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.

A maioria dos estudos de estabilidade, abrangem a avaliação da amostra em temperatura ambiente e refrigerada, não abordando temperaturas mais altas.^{22,23} Levando em consideração as temperaturas registradas em países tropicais como o Brasil, é de suma importância avaliar também em temperaturas mais altas.

A técnica de DBS, somado a estabilidade do analito em temperatura ambiente, bem como em variações até 45 °C, viabiliza o transporte postal globalizado, visando também a segurança devido à inativação de patógenos no papel filtro. O que favorece também a coleta em locais remotos, bem como no ambiente de trabalho e centros de reabilitação.^{12,13}

Tabela 2. Parâmetros de validação do método, linearidade, sensibilidade, precisão e exatidão, rendimento de extração e efeito matriz

Amostra CQ	Concentração nominal (ng mL ⁻¹)	Precisão (CV %)		Exatidão (%)	Rendimento extração (%)	Efeito matriz (%)
		Intra-ensaio	Inter-ensaio			
CQLQ	10	13,7	14,8	113,8	-	-
CQB	30	7,1	12,0	108,4	70	-5,61
CQM	900	2,9	6,4	93,5	69	-5,21
CQA	2500	3,6	5,9	101,8	67	+6,09

CQLQ: controle de qualidade limite inferior de quantificação, CQB: controle de qualidade baixo, CQM: controle de qualidade médio, CQA: controle de qualidade alto.

Tabela 3. Teste de estabilidade

Amostra CQ	Concentração nominal (ng mL ⁻¹)	Temperatura (°C)	Dia 3	Dia 7	Dia 14	Dia 21
CQB	30	4	107	89	112	92
		25	103	95	105	110
		45	106	89	111	107
CQA	2500	4	100	110	113	110
		25	101	100	93	100
		45	109	98	100	91

CQB: controle de qualidade baixo, CQA: controle de qualidade alto.

A utilização de coleta capilar para microamostragem seca em substituição da tradicional punção venosa vem se mostrando um diferencial para evitar a formação *in vitro* como também a degradação pré-analítica. É sabido que em sangue fresco o PEth não apresenta estabilidade adequadas para o armazenamento, exceto a -80 °C, devido a ocorrência de falsos positivos em amostras que contenham etanol.^{17,24} Também a presença de fosfatidilcolina fosfolipase C (PLC) em eritrócitos está relacionada com a degradação de PEth.^{17,25}

Kummer *et al.*²⁴ confirmou a estabilidade do analito em sangue fresco quando armazenado a -80 °C por até seis meses, bem como em DBS quando armazenadas em temperatura ambiente pelo mesmo período. Ressaltando a simplicidade referida pela técnica de DBS, não fazendo necessário a aquisição de um freezer de ultrabaixa temperatura para a obtenção dos mesmos resultados.

Sendo assim, a utilização da punção capilar diretamente no papel filtro é a técnica ideal para mensurar níveis de PEth, pois mimetiza os riscos de complicações *in vitro* pré analíticas,^{17,24,25} considerando o tempo e a demanda necessários para aplicação do sangue venoso em DBS, sendo a janela de tempo entre a coleta e o transporte até o laboratório o suficiente para obtenção de resultados duvidosos.¹⁷

A escolha da utilização do papel filtro Whatman 903[®] foi um diferencial para a estabilidade desse estudo. Beck *et al.* avaliaram a aplicabilidade de três dispositivos volumétricos de microamostragem de sangue seco (DBS), por também ser um fator a considerar no momento de precisar concentrações. Foi observada a formação *in vitro* pré-analítica em todos dispositivos, embora em graus variados, após a secagem e armazenamento em temperatura ambiente. Acredita-se que a causa provável para esse fenômeno seria o tempo de secagem e a evaporação do etanol, sendo muito mais lento nos dispositivos quando comparado com o papel filtro que ocorre abertamente.¹⁷

A Tabela 4 apresenta os resultados do impacto do Hct na exatidão e no rendimento da extração. Embora nossos resultados indiquem uma tendência de maiores recuperações em menor Hct, isso não pareceu impactar significativamente na exatidão do método, pois todos os dados estavam dentro da faixa aceitável de 85-115%. À medida que a viscosidade do sangue aumenta com o Hct, menores volumes de sangue são obtidos no disco de 8 mm em níveis baixos de Hct, isso provavelmente compensou o impacto de maiores recuperações na exatidão para Hct 25%, enquanto o oposto para o Hct 50%.

Levando em consideração a simplicidade de preparo das amostras com extração de mancha com 8 mm contendo aproximadamente 18 µL de sangue, permitiu uma alta recuperação mesmo dentro de diferentes concentrações de Hct, com uma média de 70%, não divergindo significativamente da recuperação avaliada em Hct 40% (Tabela 2). A SWGTOX não indica valores críticos para o rendimento da extração, contudo, é importante avaliar se o rendimento é proporcional em todos os níveis da curva. Ainda, esse parâmetro está diretamente relacionado à especificidade e sensibilidade do método. No presente estudo, o

Tabela 4. Impacto do Hct na exatidão e rendimento da extração

Hct (%)	Amostra CQ	Concentração nominal (ng mL ⁻¹)	Exatidão (%)	Rendimento da extração (%)
25	CQB	30	90	75
	CQM	900	86	78
	CQA	2.500	87	74
40	CQB	30	98	70
	CQM	900	106	69
	CQA	2.500	104	67
50	CQB	30	110	71
	CQM	900	114	65
	CQA	2.500	112	61

CQB: controle de qualidade baixo, CQM: controle de qualidade médio, CQA: controle de qualidade alto.

rendimento foi próximo em todos os níveis avaliados, sem impacto significativo do Hct, possibilitando análises com alta sensibilidade e sem efeito matriz importante.

Aplicação do método

Comparabilidade entre DBS capilar e DBS venoso

Os resultados obtidos na análise de PEth em DBS capilar entre as 41 amostras variaram de 14,50 a 2.380,80 ng mL⁻¹ (mediana 326,55 ng mL⁻¹). Para os resultados da análise de DBS venoso, a variação foi de 17,00 a 2.389,70 ng mL⁻¹ (mediana 288,50 ng mL⁻¹).

As concentrações de DBS entre sangue capilar e venoso tiveram alta correlação, com $r=0,924$ ($p > 0,001$). Em regressão *Passing-Bablok* não foram identificados erros constantes entre as medidas obtidas em DBS capilar e DBS venoso, com intervalo de confiança (IC) de 95% do intercepto de -15,290 a 7,768 ou erros proporcionais, IC 95% da inclinação entre 0,9515 e 1,0477 (Figura 3). A comparabilidade da matriz também foi avaliada via *Bland-Altman*, com média das diferenças entre as medidas em DBS capilar e DBS venoso próxima a zero, de 0,8 ng mL⁻¹ com IC 95% -3,46 a 4,97. Além disso, as diferenças foram distribuídas em ambos os lados da média, indicando que não existem erros sistemáticos. Apenas um resultado ficou fora da faixa dos dois desvios ao redor da média, demonstrando a comparabilidade entre sangue capilar e DBS de sangue venoso e a viabilidade no uso de sangue capilar para a determinação de PEth em aplicações clínicas.

Avaliação do PEth com score AUDIT em pacientes internados para reabilitação

A maior parte dos pacientes eram do sexo masculino (84%), sendo 21 homens e 4 mulheres. A faixa etária variou de 20 a

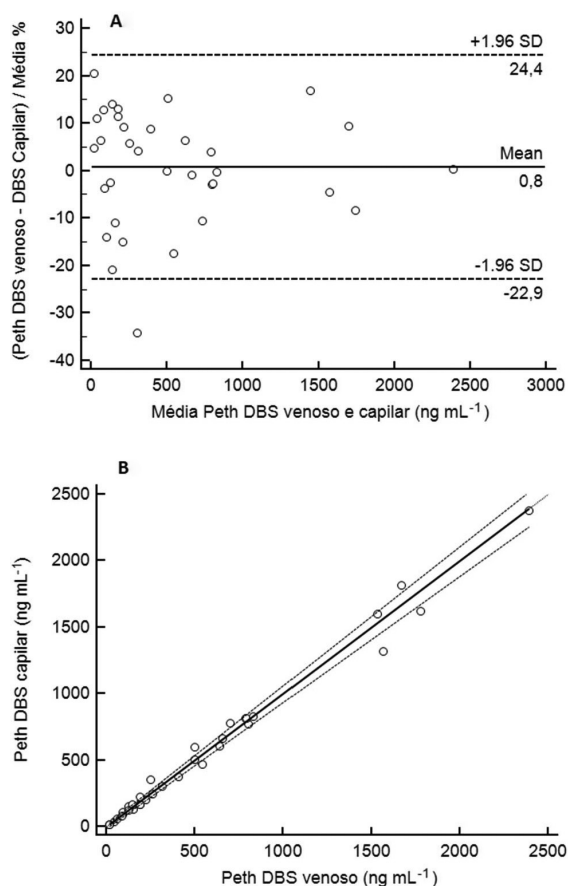


Figura 3. Bland-Altman (A) e Passing-Blablock (B). A1-B1: Regressão de DBS venoso versus DBS capilar

61 anos, com média e desvio padrão de 41 ± 10 anos. As coletas das amostras e aplicação do teste AUDIT respeitaram o limite de até 4 dias de internação, com média de $1,9 \pm 1,0$ dias entre os pacientes. As informações dos voluntários do estudo estão apresentadas na Tabela 5.

Ainda não existe um consenso estabelecido para valores de cortes e a classificação do consumo. Kummer *et al.*¹⁵ sugeriu o valor de corte >274 ng mL⁻¹ para consumo excessivo e crônico. Luginbühl *et al.*⁸ e Ulwelling *et al.*²⁶ sugeriram concentrações >200 ng mL⁻¹. Foram adotados os valores de corte sugeridos por Schröck *et al.*⁴ sendo ≤ 10 ng mL⁻¹ abstinência; 11 a 111 ng mL⁻¹ consumo moderado e ≥ 112 ng mL⁻¹ consumo excessivo.

As concentrações de Peth em DBS capilar variaram de 14,5 a 2380,8 ng mL⁻¹, sendo que 21 pacientes (84%) apresentaram resultados ≥ 112 ng mL⁻¹, se enquadrando no consumo excessivo de álcool. Com relação ao auto relato no consumo de álcool, os escores do AUDIT variaram entre 1 e 37, com média e desvio padrão de $23 \pm 9,6$ pontos, com 88% dos pacientes apresentando escore ≥ 8 , sugerido como o ponto de corte para identificar pessoas que beberam de forma problemática no último ano.³

Mesmo com um pequeno número de participantes pode-se observar uma correlação significativa com $r=0,417$ ($p < 0,05$), no entanto fraca. É possível observar uma tendência de valores de Peth serem mais altos em maiores escores AUDIT. Também vale ressaltar período de análise, o questionário abrange uma avaliação anual do consumo, enquanto que o Peth abrange uma avaliação em dias. De forma geral, os escores AUDIT foram bem expressivos, com média de 23 pontos, levando em consideração que o escore 8 representa consumo de álcool de alto risco. Sendo assim, em virtude da característica da população estudada, a maioria dos pacientes

apresentaram escores e concentrações de Peth elevados. Dessa forma, o estudo não contou com uma ampla faixa de variações de escores e concentrações do metabólito que pudessem ser mais representativas de exposições menores.

Houve uma alta concordância com o uso do questionário AUDIT e as dosagens do Peth na identificação do consumo excessivo, seguindo a indicação do Serviço de Intervenções nos Comportamentos Aditivos e nas Dependências²⁷ como referência na classificação. Pode-se concluir que nessa população, sendo um grupo já buscando uma intervenção de tratamento, o questionário acaba tendo uma alta concordância em termos de diagnóstico em associação com o Peth, mesma que a correlação tenha sido fraca.

Um paciente apresentou escore AUDIT 7, baixo risco, com nível de Peth de 154,2 ng mL⁻¹, indicando subestimação do consumo e nível de risco no autor relato. Outros dois pacientes apresentaram escore 1 com classificação de risco baixo e concentrações de Peth de 77,3 e 16,2 ng mL⁻¹, evidenciando que os pacientes não representam de fato problemas com o uso de álcool. Entretanto, levando em consideração o valor de corte de Peth adotado ambos pacientes foram classificados com consumo moderado de álcool, nível maior do que reportado no questionário.

Um paciente apresentou escore 27 com classificação de consumo de alto risco e concentração de Peth de 36,5 ng mL⁻¹. O auto relato de consumo não condiz com o achado analítico, entretanto o mesmo se encontrava a três dias internado em abstinência. Essa divergência pode ser explicada pelo metabolismo e tempo de meia vida do Peth.

A maior parte dos pacientes (83,3%) reportaram BPE com frequência, sendo que 38,9% consomem 6 doses ou mais semanalmente e 38,9% diariamente ou quase que diariamente, demonstrando que a população do estudo apresenta um limiar de consumo expressivo, por se tratar de dependentes em situação de internação.

Foi observado um caso de subnotificação do risco no consumo de álcool. Houve uma concordância de 88% na classificação do nível de risco entre o questionário AUDIT e nível de Peth. O alto nível de concordância entre os resultados pode ser atribuído a característica da população, por se tratar de um grupo com problemas no consumo de álcool já previamente estabelecido e por estarem em um programa de reabilitação.

Embora o uso do Peth como biomarcador direto no consumo de álcool já tenha sido explorado em diversos cenários, como em emergências,^{5,6} exposição prenatal,¹⁶ renovação da licença para direção¹⁵ e no monitoramento da abstinência,^{8,28-30} a aplicabilidade do marcador com coleta capilar em DBS no cenário de internações em programas de reabilitação em associação ao teste AUDIT para avaliação do consumo de álcool ainda foi pouco explorado.

A coleta de DBS capilar é significativa para a determinação do consumo de álcool, por oferecer vantagens distintas como coleta simples e menos invasiva, redução de custos e estabilidade que se estende durante o transporte e armazenamento implicando em resultados com menor viés pré-analítico em relação as amostras frescas.

Limitações do estudo

Entre as limitações do estudo podemos apontar falta da informação do horário e a concentração exata ingerida de álcool que antecede a coleta, informações que poderiam ajudar a explicar a concentração sanguínea encontrada. Também, por se tratar de um teste baseado no auto relato, as informações a partir do teste AUDIT são suscetíveis a discrepâncias levando a pontuas divergências encontradas na tabela de comparação entre escore, nível de risco, BPE, concentração sanguínea e classificação de consumo.

Tabela 5. Escores do AUDIT-C e níveis de PEth no voluntário do estudo

Paciente	Sexo	Idade	Dias de internação	AUDIT-C			PEth	
				Escore	CLASS AUDIT*	BPE	ng mL ⁻¹	Consumo**
11	F	44	1	1	Baixo	Nunca	77,3	Moderado
12	F	27	1	1	Baixo	Nunca	16,2	Moderado
15	M	25	1	15	Moderado	Semanalmente	14,5	Moderado
7	M	41	1	17	Alto	Nunca	223,3	Excessivo
13	M	48	3	18	Alto	Diariamente	1318,9	Excessivo
18	M	34	1	19	Alto	Diariamente	167,5	Excessivo
14	M	51	1	20	Alto	Semanalmente	1814,5	Excessivo
3	M	47	3	21	Alto	Semanalmente	352,5	Excessivo
6	M	42	1	22	Alto	Semanalmente	1602,8	Excessivo
16	M	39	3	22	Alto	Semanalmente	466,1	Excessivo
1	F	44	4	24	Alto	Semanalmente	126,0	Excessivo
10	F	27	1	26	Alto	Mensalmente	594,7	Excessivo
5	M	48	3	27	Alto	Diariamente	36,5	Moderado
8	M	47	3	29	Alto	Diariamente	248,5	Excessivo
17	M	61	1	29	Alto	Semanalmente	831,1	Excessivo
4	M	58	1	30	Alto	Diariamente	2380,8	Excessivo
2	M	39	3	31	Alto	Diariamente	199,2	Excessivo
9	M	49	3	32	Alto	Diariamente	375,4	Excessivo

BPE: Beber pesado episódico; *SICAD²⁶; ** Schröck *et al.*⁴

CONCLUSÕES

Foi desenvolvido e validado um método sensível e específico para a determinação de PEth em DBS, mostrando uma performance satisfatória sem impactos expressivos do efeito do hematócrito na exatidão. A comparabilidade entre amostra de DBS capilar e DBS venoso indicou a viabilidade da utilização de sangue seco de punção digital para a determinação de PEth em ambiente clínico. Foi demonstrada a estabilidade do analito em temperatura ambiente e principalmente em temperatura mais elevadas e a aplicação da metodologia em associação ao teste AUDIT em pacientes usuários de álcool e outras drogas em reabilitação.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Universidade Feevale, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq Universal processo 432940/2018-9) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Ingall, G. B.; *Clin. Lab. Med.* **2012**, 32, 391. [Crossref]
- <https://www.paho.org/pt/noticias/12-4-2021-cerca-85-mil-mortes-cada-ano-sao-100-atribuidas-ao-consumo-alcool-nas-americas>, acessada em novembro 2022.
- <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-MSD-MSB-01.6a>, acessada em novembro 2022.
- Schröck, A.; Wurst, F. M.; Thon, N.; Weinmann, W.; *Drug Alcohol Depend.* **2017**, 178, 80. [Crossref]
- Gerbase, F. E.; Tegner, M.; Krutzmann, M. E.; Muller, V. V.; Alff, J. de A.; da Silva, V. B.; Sagrilo, O. P.; Linden, R.; Antunes, M. V.; *Clin. Toxicol.* **2021**, 59, 418. [Crossref]
- Kip, M. J.; Spies, C. D.; Neumann, T.; Nachbar, Y.; Alling, C.; Aradottir, S.; Weinmann, W.; Wurst, F. M.; *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **2008**, 32, 1284. [Crossref]
- Maenhout, T. M.; De Buyzere, M. L.; Delanghe, J. R.; *Clin. Chim. Acta* **2013**, 415, 322. [Crossref]
- Luginbühl, M.; Stöth, F.; Schröck, A.; Gaugler, S.; Weinmann, W.; *Nat. Protoc.* **2021**, 16, 283. [Crossref]
- Hill-Kapturczak, N.; Dougherty, D. M.; Roache, J. D.; Karns-Wright, T. E.; Lopez-Cruzan, M.; Javors, M. A.; *Neurosci. Alcohol* **2019**, 567. [Crossref]
- Wurst, F. M.; Thon, N.; Aradottir, S.; Hartmann, S.; Wiesbeck, G. A.; Lesch, O.; Skala, K.; Wolfersdorf, M.; Weinmann, W.; Alling, C.; *Addict. Biol.* **2010**, 15, 88. [Crossref]
- Enderle, Y.; Foerster, K.; Burhenne, J.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, 130, 231. [Crossref]
- Dégion, J.; Thomas, A.; Mangin, P.; Staub, C.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, 402, 2485. [Crossref]
- Edelbroek, P. M.; Van Der Heijden, J.; Stolk, L. M. L.; *Ther. Drug Monit.* **2009**, 31, 327. [Crossref]
- Faller, A.; Richter, B.; Kluge, M.; Koenig, P.; Seitz, H. K.; Thierauf, A.; Gnann, H.; Winkler, M.; Mattern, R.; Skopp, G.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, 401, 1163. [Crossref]
- Kummer, N.; Wille, S. M. R.; Poll, A.; Lambert, W. E. E.; Samyn, N.; Stove, C. P.; *Drug Alcohol Depend.* **2016**, 165, 191. [Crossref]
- Bakhireva, L. N.; Savich, R. D.; Raisch, D. W.; Cano, S.; Annett, R. D.; Leeman, L.; Garg, M.; Goff, C.; Savage, D. D.; *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **2013**, 37, 1008. [Crossref]
- Beck, O.; Mellring, M.; Löwbeer, C.; Seferaj, S.; Helander, A.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2021**, 413, 5601. [Crossref]
- Beck, O.; Modén, N. K.; Seferaj, S.; Lenk, G.; Helander, A.; *Clin. Chim. Acta* **2018**, 479, 38. [Crossref]
- SWGTOX; *J. Anal. Toxicol.* **2013**, 37, 452. [Crossref]
- Almeida, A. M.; Castel-Branco, M. M.; Falcão, A. C.; *J. Chromatogr. B* **2002**, 774, 215. [Crossref]
- Antunes, M. V.; Charão, M. F.; Linden, R.; *Clin. Biochem.* **2016**, 49, 1035. [Crossref]
- Bakhireva, L. N.; Shrestha, S.; Gutierrez, H. L.; Berry, M.; Schmitt, C.; Sarangarm, D.; *Alcohol Alcohol.* **2016**, 51, 275. [Crossref]

23. Faller, A.; Richter, B.; Kluge, M.; Koenig, P.; Seitz, H. K.; Skopp, G.; *Int. J. Legal Med.* **2013**, *127*, 603. [Crossref]
24. Kummer, N.; Ingels, A. S.; Wille, S. M. R.; Hanak, C.; Verbanck, P.; Lambert, W. E. E.; Samyn, N.; Stove, C. P.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408*, 825. [Crossref]
25. Viel, G.; Boscolo-Berto, R.; Cecchetto, G.; Fais, P.; Nalesso, A.; Ferrara, S. D.; *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 14788. [Crossref]
26. Ulwell, W.; Smith, K.; *J. Forensic Sci.* **2018**, *63*, 1634. [Crossref]
27. https://www.sicad.pt/PT/Intervencao/RedeReferenciacao/SitePages/detalhe.aspx?itemId=2&lista=SICAD_INSTRUMENTOS&bkUrl=/BK/Intervencao/RedeReferenciacao/, acessada em novembro 2022.
28. Luginbühl, M.; Weinmann, W.; Butzke, I.; Pfeifer, P.; *Drug Test. Anal.* **2019**, *11*, 859. [Crossref]
29. Helander, A.; Böttcher, M.; Dahmen, N.; Beck, O.; *Alcohol Alcohol.* **2019**, *54*, 251. [Crossref]
30. Helander, A.; Hermansson, U.; Beck, O.; *Alcohol Alcohol.* **2019**, *54*, 567. [Crossref]