

Avaliação da capacidade de absorção e distribuição de amostras de sangue total em diferentes tipos de papel-filtro

Evaluation of the efficacy of total blood sample absorption and the blood smear diffusion on different types of filter paper

RIALA6/1007

Aparecida Helena S. GOMES^{1*}; Maria de Lourdes B. ARINE²; Rosa Maria SZAROTA³; Mayra David LANGER⁴

* Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz, Seção de Parasitologia – Rua Júlio Hansen, nº 105, Sorocaba, SP, CEP:18031-490

¹ Instituto Adolfo Lutz - Pesquisador Científico – Mestre em Ciências,

² Instituto Adolfo Lutz – Química – Mestre em Educação,

³ FATEC- Faculdade de Tecnologia de Sorocaba – Professora de Parasitologia,

⁴ Graduanda do Curso de Tecnologia em Saúde - FATEC – Sorocaba.

RESUMO

Realizou-se uma avaliação da capacidade de absorção e distribuição de sangue total em diferentes tipos de papel filtro, como meio alternativo para a coleta, o transporte e a conservação de amostras de sangue total em estudos epidemiológicos de diferentes patologias detectadas para métodos imunológicos. Foram analisados os papéis-filtro Whatman nº 1, Nalgon 80g, Nalgon 3550, Nalgon 3551, Nalgon 3552, Macherey-Nagel 640d, Macherey-Nagel 640m, Macherey-Nagel 640w, Macherey-Nagel 640we, Melitta, Jovita, Extra e Jprolab 42 os quais foram impregnados com sangue humano de um único doador. Após secagem dos papéis foram confeccionados confetes de 6 mm e eluídos em tampão PBS pH 7,2 +/- 0,1. A capacidade de absorção foi mensurada por espectrofotometria a 406,5 nm. Os papéis estudados apresentaram absorção não homogênea em toda a sua extensão, embora os papéis-filtro MN 640m, Nalgon 3551 e Nalgon 3552 e os papéis-filtro Mn 640 w e Nalgon 80g são equivalentes entre si em capacidade e absorção média de sangue total. Apesar de alguns papéis apresentarem similaridade de absorção, maiores estudos serão necessários para avaliar a qualidade dos resultados dos exames realizados por diferentes técnicas imunológicas, com o emprego das diferentes especificações de papel filtro, para que se observe a existência ou não de fatores de interferência.

Palavras-Chave. coleta, sangue, papel-filtro.

ABSTRACT

Evaluation of the total blood total blood sample absorption and the blood diffusion on different types of filter paper, was carried out. This surrogate procedure has been used as an alternative way for collection, transporting and storing up the blood samples for epidemiological studies of different diseases detected by means of immunological methods. Filter papers Whatman nº .1, Nalgon 80 g, Nalgon 3550, Nalgon 3551, Nalgon 3552, Macherey-Nagel 640d, Macherey-Nagel 640m, Macherey-Nagel 640w, Macherey-Nagel 640we, Melitta, Jovita, Extra and Jprolab 42 were analyzed. These filter papers were impregnated with human blood sample collected from a single donor. After the papers being dried, 6mm punches were made, and the respective eluates were obtained adding PBS pH 7.2 +/- 0.1. The blood absorption capacity was measured by spectrophotometry at 406.5 nm. The analyzed filter papers presented no homogeneous blood absorption in the whole extension, although the filter papers MN 640m, Nalgon 3551 and Nalgon 3552, and filter papers MN 640w and Nalgon 80g were equivalent among themselves respectively, as to their efficacy and average absorption of total blood. Although some filter papers showed similarity in blood absorption, further studies are necessary in order to assess the quality of the assays results carried out by means of different immunologic techniques, using diverse filter paper specifications, as to evaluate whether there is an occurrence of interfering factors.

Key Words. evaluation, collection, blood, filter paper

INTRODUÇÃO

A maioria dos estudos epidemiológicos, envolvendo testes imunológicos, necessita de coleta prévia de sangue e posterior centrifugação para obtenção do soro. Para executar os procedimentos de coleta do sangue, armazenamento e transporte são necessárias condições adequadas que, em determinadas regiões, não existem ou são precárias. A inexistência de energia elétrica, clima inadequado com variações bruscas de temperatura e umidade, têm sido os principais obstáculos na conservação desses materiais quando encaminhados até o laboratório de destino.

Estudos realizados em campo, como os inquéritos sorológicos relacionados com doenças de Chagas, toxoplasmose e leishmaniose visceral canina, tem sido motivo da busca de métodos alternativos na solução dos problemas aqui mencionados^{1,6}.

O método de coleta de sangue total por punção venosa oferece risco de perda, pois as condições de armazenagem e transporte podem ocasionar, a quebra do frasco⁸ ou desnaturação da amostra, resultando em alterações que prejudicam o estudo proposto. Estas dificuldades foram apontadas por pesquisadores em todo o mundo^{6,15} o que incentivou pesquisas de metodologia alternativa como o uso do papel-filtro para coleta. É uma técnica rápida, simples, barata, permitindo “maior facilidade de conservação e transporte do espécime”⁸. Estas características podem ser aliadas à praticidade das amostras poderem ser enviadas pelo correio, o paciente não precisa ser deslocado da sua cidade, podendo a amostra também ser coletada por pessoal não especializado, mas treinado para tal^{6,8,21}.

Embora muitos pesquisadores tenham demonstrado resultados similares com os obtidos utilizando soro, na detecção de anticorpos contra o vírus da Dengue¹⁶ e hepatite A, HIV-I², contra parasitos da malária²⁰, doença de Chagas^{10,14}, toxoplasmose¹⁹ e leishmaniose¹, determinações de PGL-I em pacientes com hanseníase¹⁵, níveis de glicose²¹, dosagem de ciclosporina^{8,9}, hemoglobinas⁵, entre outros, foi mencionada a tendência de títulos serem mais baixos quando eluatos eram utilizados, principalmente naqueles próximos do limite de positividade²⁰.

Os papéis-filtro, após serem impregnados com sangue, podem ser armazenados por um período de 15 a 30 dias sob temperatura ambiente⁹. Após esse período, é necessário manter a temperatura entre 2 e 4°C por um período de 3 a 5 meses. Segundo Walton¹⁹, passado esse período, o resultado dos exames sorológicos não serão mais confiáveis.

Os papéis-filtro impregnados com sangue, para realização de exames sorológicos quantitativos, devem ser picotados em tamanhos e áreas definidas e eluídos em volume de solução salina tamponada de fosfatos (PBS) ideal para a concentração desejada. Obtém-se assim o eluato¹.

Apesar desta técnica ser empregada com mais frequência devido à sua praticidade, observam-se alguns erros,

relacionados à concentração do eluato²⁰, ou seja, variação da quantidade de sangue absorvido por unidade de área de papel-filtro com diferentes especificações e do volume de diluente utilizado.

O objetivo deste trabalho foi o de avaliar as características de diferentes especificações de papéis-filtro levando em consideração a quantidade de sangue absorvido por unidade de área.

MATERIAL E MÉTODO

Papel-filtro

Algumas especificações dos papéis-filtro utilizados neste estudo foram as mesmas utilizadas por outros trabalhos citados na literatura como o Melitta®, Whatman® n°1 e o Schleicher & Schuell® (distribuído no Brasil pela Nalgon®). Os papéis-filtro estudados estão discriminados na Tabela 1. Foram confeccionadas fitas de 20x5cm para cada tipo de papel-filtro.

Para medir a espessura dos papéis sem informação, foi utilizado o micrômetro, Mitutoyo Sul América. Sua faixa de medição é de 0 a 25mm.

Sangue

O sangue foi coletado por punção venosa sem anticoagulante segundo as Normas de Ética em Pesquisa, resolução 196/96, com consentimento livre e esclarecido do doador. A coleta de sangue e todos os procedimentos práticos

Tabela 1. Especificações dos papéis-filtro estudados.

Especificações			
Papel-filtro	Peso (g/m ²)	Espessura (mm)	Porosidade
Extra®*	55	0.14	Sem referência
Jovita®*	52	0.12	13 micra
JP 42®	82	0.13	Sem referência
Melitta®*	55	0.15	15 micra
MN 640d®**	85	0.17	1.5 micra
MN 640m®**	85	0.20	5.5 micra
MN 640w®**	85	0.20	9.5 micra
MN 640we®**	85	0.22	18.5 micra
N 3550®**	80	0.18	6.5 micra
N 3551®**	80	0.19	7.5 micra
N 3552®**	80	0.16	2.0 micra
N 80g®**	80	0.20	3.0 micra
Whatman 1®*	87	0.16	11 micra

*Papéis-filtro qualitativos (são usados em análises qualitativas para determinar e identificar elementos).

**Papéis-filtro quantitativos (são usados para análises gravimétricas e preparação de amostras para análise em equipamentos específicos).

foram realizados no Instituto Adolfo Lutz Laboratório Regional I Sorocaba.

O sangue total, com o auxílio de pipeta, foi rapidamente impregnado nos papéis até que absorvessem dos dois lados¹⁶. A rapidez foi necessária, uma vez que o sangue não continha anticoagulante simulando, assim, uma situação que ocorreria na zona rural. Posteriormente, foram secos à temperatura ambiente^{14,16,19,21}. Após a secagem foram colocados entre películas de plástico formando “caderninhos” e colocados em um saco plástico^{6,9,14} para armazenamento em temperatura ambiente e posteriormente em refrigerador^{7,8,10,19}.

Para a confecção dos confetes, foi utilizado um picotador de uso laboratorial com um furo de 6mm de diâmetro. Os confetes foram identificados e armazenados em tubos plásticos em refrigerador à temperatura entre 2 e 4°C^{5,16,15,9}.

Comprimento de onda

Foram escolhidos três papéis-filtro mais citados na literatura: Melitta®, Schleicher & Schuell® e Whatman® nº1. Dois confetes de cada tipo de papel foram eluídos em 10mL de tampão PBS, utilizando o agitador do tipo KLINE, por cerca de 40 minutos, para eluir o sangue. A varredura dos espectros dos eluatos foi realizada entre 350 e 500 nm de forma a obter uma varredura de 10nm/min, usando-se o espectrofotômetro da marca HITACHI®, modelo Model U-2010.

O melhor comprimento de onda foi escolhido em função do menor erro de concentração e do valor máximo de absorbância encontrado.

Curva padrão

Cada picote de 6 mm de cada tipo de papel-filtro foi impregnado com volumes conhecidos de sangue total, variando de 1 a 6 µL, eluídos em 10 mL de PBS e homogeneizados em agitador do tipo KLINE por 40 minutos. Traçadas as curvas padrões para cada tipo papel os resultados das leituras foram lançados no Programa Prisma GraphPad obtendo-se o gráfico de distribuição das absorbâncias mínima e máxima dos papéis.

A curva padrão foi construída com a respectiva equação da reta, na qual foi interpolado a média da absorbância, procedimento este, realizado para cada tipo de papel estudado.

Volume de sangue absorvido nos confetes

Uma vez que a absorbância ou transmitância é correlacionada com a concentração do analito responsável pela absorção e com o caminho óptico do recipiente¹, o volume dos papéis-filtro foram calculados por duas maneiras diferentes: geometricamente utilizando-se a área do picote pela espessura de cada tipo de papel-filtro e por meio de curva padrão de absorção, onde determinou-se o volume absorvido, pela média das absorbâncias obtidas para 10 picotes de cada tipo de papel-filtro eluído em 10 mL de PBS, lidos nas respectivas curvas padrões. Através das similaridades das médias de absorbância os diferentes papéis-filtro foram separados em 8 grupos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A varredura do espectro de absorção do eluato utilizando papéis-filtro (Whatman® nº1, Melitta® e Nalgon® 80g) apresentou o comprimento de onda de 406,5 nm como o de máxima absorção (Figura 1), sendo este o comprimento de onda escolhido para realizar as curvas padrões para os diferentes papéis-filtro. A figura 2 é um exemplo de curva padrão (papel-filtro MN 640we) cuja equação da reta foi de $y = 0,1142x + 0,0217$. As curvas para os demais papes foram:

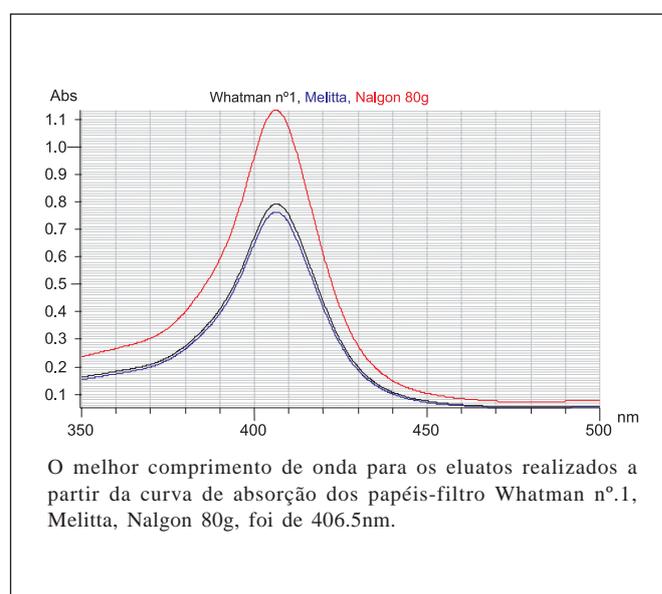


Figura 1. Curva de absorção dos eluatos realizados a partir dos papéis-filtro Whatman nº.1, Melitta, Nalgon 80g.

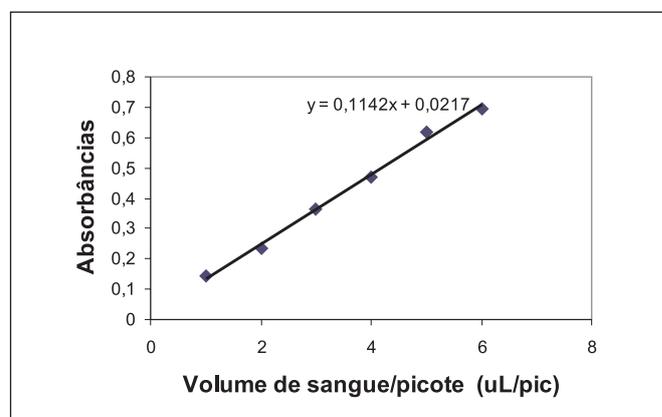


Figura 2. Curva padrão ($\lambda = 406,5$ nm) para Papel-filtro MN 640we.

Tabela 2. Médias das absorbâncias e respectivos desvios-padrão, obtidos de 10 amostras de cada um dos diferentes tipos de papel-filtro.

Papel-filtro	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Média	Desvio Padrão
Extra	0,231	0,24	0,263	0,226	0,222	0,242	0,24	0,206	0,312	0,235	0,24	0,03
Jovita	0,477	0,473	0,479	0,524	0,522	0,463	0,483	0,501	0,469	0,393	0,48	0,04
JP 42	0,31	0,389	0,362	0,275	0,529	0,41	0,314	0,42	0,401	0,355	0,38	0,07
Melitta	0,313	0,429	0,333	0,469	0,441	0,378	0,424	0,443	0,501	0,549	0,43	0,07
MN 640d	0,503	0,368	0,345	0,463	0,454	0,384	0,366	0,333	0,383	0,443	0,40	0,06
MN 640m	0,499	0,565	0,515	0,435	0,521	0,627	0,489	0,54	0,468	0,564	0,52	0,05
MN 640w	0,741	0,521	0,59	0,575	0,595	0,619	0,65	0,542	0,649	0,702	0,62	0,07
MN 640we	0,691	0,599	0,769	0,825	0,578	0,693	0,801	0,684	0,578	0,649	0,69	0,09
N3550	0,386	0,571	0,504	0,428	0,414	0,588	0,495	0,356	0,381	0,475	0,46	0,08
N3551	0,559	0,573	0,498	0,598	0,433	0,502	0,396	0,612	0,394	0,604	0,52	0,09
N3552	0,59	0,52	0,411	0,515	0,473	0,497	0,494	0,648	0,551	0,592	0,53	0,07
N80g	0,64	0,712	0,671	0,585	0,668	0,556	0,637	0,555	0,592	0,565	0,62	0,06
Whatman 1	0,349	0,369	0,468	0,467	0,412	0,492	0,514	0,482	0,555	0,484	0,46	0,06

Tabela 3. Agrupamento por similaridade de absorção e distribuição dos diferentes papéis-filtro em função da comparação das médias das absorbâncias.

Especificações	Média das absorbâncias	Grupo
Whatman 1	0,461	1
Nalgon 3550	0,460	
Mellita	0,428	2
MN 640d	0,404	
Nalgon 3551	0,517	
Nalgon 3552	0,529	3
MN 640m	0,522	
Nalgon 80g	0,618	4
MN 640w	0,618	
Jovita	0,487	5
Extra	0,242	6
JP 42	0,376	7
MN 640we	0,687	8

Os papéis-filtro Nalgon 3550 e Whatman nº1, os papéis-filtro Melitta e MN 640d, os papéis-filtro MN 640w e Nalgon 80g, os papéis-filtro Nalgon 3551, Nalgon 3552 e MN 640m, foram os papéis que apresentaram áreas mais homogêneas quanto a absorção.

Tabela 4. Volume geometricamente calculado e volume real calculado por meio da média das absorbâncias dos 10 picotes dos papéis-filtro de diferentes especificações e das respectivas equações da reta para os diferentes papéis-filtro.

Papel-filtro	Volume geométrico(µL)	Média das Absorbâncias	Volume obtido pela curva padrão (µL)
Extra	3,95	0,242	1,59
Jovita	3,39	0,481	4,26
JP 42	3,67	0,376	2,97
MN 640we	6,22	0,687	5,82
Melitta	4,24	0,428	3,24
MN 640d	4,80	0,404	3,33
MN 640m	5,65	0,522	4,46
Nalgon 3551	5,37	0,517	4,98
Nalgon 3552	4,52	0,529	5,10
Nalgon 3550	5,10	0,460	4,31
Whatman nº1	4,52	0,461	4,41
MN 640w	5,65	0,618	4,92
Nalgon 80g	5,65	0,618	5,77

Tabela 5. Proporção em número de confetes dos diferentes papéis-filtro entre a similaridade das absorbências para realizar diluição de 1:40 em solução PBS.

Grupos	2		3			4		5	6	7	8
	Melitta	MN 640d	Nalgon 3551	MN 640m	Nalgon 3552	MN 640w	Nalgon 80g	Jovita	Extra	JP 42	MN 640we
1	Whatman 1 1 / 1,07	1 / 1,15	1,12 / 1	1,13 / 1	1,15 / 1	1,35 / 1	1,35 / 1	1,04 / 1	1 / 1,90	1 / 1,22	1,49 / 1
	Nalgon 3550 1 / 1,07	1 / 1,15	1,12 / 1	1,13 / 1	1,15 / 1	1,35 / 1	1,35 / 1	1,04 / 1	1 / 1,90	1 / 1,22	1,49 / 1
2	Melitta		1,20 / 1	1,22 / 1	1,25 / 1	1,45 / 1	1,45 / 1	1,12 / 1	1 / 1,77	1 / 1,14	1,60 / 1
	MN 640d		1,30 / 1	1,30 / 1	1,31 / 1	1,55 / 1	1,55 / 1	1,20 / 1	1 / 1,67	1 / 1,07	1,70 / 1
	Nalgon 3551	1 / 1,20	1 / 1,30			1,19 / 1	1,19 / 1	1 / 1,07	1 / 2,15	1 / 1,37	1,33 / 1
3	MN 640m	1 / 1,22	1 / 1,30			1,18 / 1	1,18 / 1	1 / 1,08	1 / 2,15	1 / 1,39	1,32 / 1
	Nalgon 3552	1 / 1,25	1 / 1,31			1,17 / 1	1,17 / 1	1 / 1,10	1 / 2,20	1 / 1,41	1,30 / 1
4	MN 640w	1 / 1,45	1 / 1,55	1 / 1,19	1 / 1,18	1 / 1,17		1 / 1,28	1 / 2,55	1 / 1,64	1,11 / 1
	Nalgon 80g	1 / 1,45	1 / 1,55	1 / 1,19	1 / 1,18	1 / 1,17		1 / 1,28	1 / 2,55	1 / 1,64	1,11 / 1
5	Jovita	1 / 1,12	1 / 1,20	1,07 / 1	1,08 / 1	1,10 / 1	1,28 / 1		1 / 2,00	1,28 / 1	1,43 / 1
6	Extra	1,77 / 1	1,67 / 1	2,14 / 1	2,16 / 1	2,20 / 1	2,55 / 1	2,00 / 1		1,55 / 1	2,84 / 1
7	JP 42	1,14 / 1	1,07 / 1	1,38 / 1	1,39 / 1	1,41 / 1	1,64 / 1	1 / 1,28	1 / 1,55		1,83 / 1
8	MN 640we	1 / 1,60	1 / 1,70	1 / 1,33	1 / 1,32	1 / 1,30	1 / 1,11	1 / 1,43	1 / 2,84	1 / 1,83	

→ Cruzamento de dados

Especificações Papel-filtro	Curva Padrão
Extra®	$y = 0,0888x + 0,1009$
Jovita®	$y = 0,1114x + 0,0059$
JP 42®	$y = 0,1221x + 0,0129$
Melitta®	$y = 0,098x + 0,11$
MN 640d®	$y = 0,1062x + 0,0505$
MN 640m®	$y = 0,1168x + 0,0005$
MN 640w®	$y = 0,1308x + 0,0261$
MN 640we®	$y = 0,1142x + 0,0217$
N 3550®	$Y = 0,099x + 0,0327$
N 3551®	$y = 0,0967x + 0,0355$
N 3552®	$y = 0,0957x + 0,0403$
N 80g®	$y = 0,1049x + 0,0125$
Whatman 1®	$Y = 0,102x + 0,0106$

As diferentes absorções observadas a partir de eluatos de um mesmo papel-filtro utilizado neste estudo demonstraram que pode haver interferência, justificando a tendência de títulos de anticorpos em ensaios imunológicos mais baixos, principalmente quando próximos do limite de positividade em relação à utilização de soro²⁰.

Através do cálculo das médias de absorção pode-se agrupá-los segundo a equivalência de absorbância (Tabela 3) dos diferentes papéis-filtro. Observando a Tabela 4, verificamos uma variação da capacidade de absorção entre o volume teórico, calculado geometricamente e o volume real absorvido e na Tabela 5 observa-se a proporcionalidade entre os vários papéis-filtro.

Para utilização do papel-filtro (eluato) como meio alternativo de conservação e transporte de amostras de sangue para realização de ensaios imunológicos são necessários alguns critérios: ensaios quantitativos requerem papel-filtro com especificações adequadas para garantir a confiabilidade das diluições, o volume de sangue absorvido no papel e o volume de diluente a ser utilizado.

Este estudo demonstrou que os papéis-filtro Nalgon 3550 e Whatman nº1, MN 640w e Nalgon 80g; MN 640m, Nalgon 3551 e Nalgon 3552 apresentaram certa equivalência entre si, considerando a capacidade de absorção de sangue total. Foi observado que alguns papéis não apresentaram nenhuma similaridade de absorção entre si. Entretanto, o volume de sangue observado nos confetes de um mesmo papel-filtro demonstrou que não há homogeneidade na distribuição do sangue sobre a superfície do papel-filtro.

Fatores como tipo e disposição das fibras de celulose, tratamento químico utilizado na fabricação do papel e existência de resíduos podem interferir nas análises imunológicas, sugerindo a necessidade de maiores estudos para avaliar a qualidade dos resultados obtidos em tais análises, considerando os níveis de anticorpos ou de antígenos.

A técnica da coleta de sangue total em papel-filtro, utilizada para diagnóstico de várias doenças, apresenta algumas vantagens em relação ao uso de tubos de vidro convencional, pois são fáceis de armazenar, transportar e são inquebráveis.

Tomimori-Yamashita et al.¹⁵, em 1999, mostraram que as análises dos eluatos do sangue total coletado em papel-filtro poderiam substituir a tradicional sorologia, sendo útil na investigação de campo, principalmente nos países em desenvolvimento, onde há muitas regiões de difícil acesso e condições precárias de armazenamento das amostras, inviabilizando, assim, a adoção de método tradicional de coleta de sangue por punção venosa.

Apesar de alguns papéis apresentarem similaridade de absorção, maiores estudos serão necessários para avaliar a qualidade dos resultados obtidos por diferentes técnicas imunológicas, sejam quantitativas ou qualitativas, considerando as especificações do papel, para poder realizar diluições corretas, verificar a existência ou não de interferência de medicamentos que o indivíduo esteja tomando na ocasião, e de alguns compostos químicos utilizados na composição do papel, além da disponibilidade no mercado, facilitando sua aquisição e diminuindo custos provenientes de importações.

Pelos dados preliminares obtidos os papéis dos grupos 1, 2, 3 e 4 da Tabela 4 poderão ser substituídos entre si, desde que observando a proporcionalidade da Tabela 5.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos as funcionárias da Seção da Parasitologia Ana Luiza Vitori, Sueli Zafalon Menon pela colaboração e pelo apoio técnico e à CARVALHAES Produtos para Laboratório pela doação dos papéis filtro Nalgon 3550, Nalgon 3551, Nalgon 3552, Schuleicher & Schuell, Macherey Nagel 640 W.

REFERÊNCIAS

1. Braga, M.D.M. et al. Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imuno-enzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel filtro. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 31(5): 1998.
2. Cassol, S.A. et al. Dried blood spots collected on filter paper: an international resource for the diagnosis and genetic characterization of human immunodeficiency virus type-1. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 91(3): 351-8, 1996.
3. Cervo, A.L.; Bervian, P.A. Metodologia Científica. **McGraw-Hill**, 3ª. ed. São Paulo, 249 p. 1983.
4. Ferreira, C.S.; Carvalho, M.E. Padronização de uso de papel-filtro como suporte de material para reações sorológicas. *Rev Bras. Malariol. D. Trop.* 34: 82-6, 1982.
5. Garrick, M.D.; Dembure, P.; Guthrie, R. Sickle-cell anemia and other hemoglobinopathies: procedures and strategy for screening employing spots of blood on filter paper as specimens. *N. Engl. J. Med.* 288(24): 1265-8, 1973.
6. Guimarães, M.C.S. et al. Almacenamiento a largo plazo de IgG e IgM en papel filtro para su uso en encuestas seroepidemiológicas de enfermedades parasitarias. *Bol. Sanit. Panam.* 100(2): 129-44, 1996.
7. Hill, J.B.; Palmer, P. Filter paper blood collection and punching as a means of quantification. *Clin. Chem.* 15(5): 381-9, 1996.

8. Lin-Wang, H.T.; Manrique, R. Dosagem de ciclosporina em amostras transportadas de sangue absorvido em papel de filtro. **Laes & Haes** 118: 120-32, 1999.
9. Lin-Wang, H.T.; Manrique, R. Aplicação da técnica de imunoensaio enzimático de multiplicação (EMIT) para dosagem de ciclosporina na amostra de sangue absorvido em papel-filtro. **J. Bras. Patol. Lab.** 38(1), 2002.
10. Marinkelle, C.J. et al. Recomendaciones para el almacenamiento de sueros absorbidos en papel de filtro bajo condiciones rurales, para el diagnóstico de infección chagásica con la prueba de inmunofluorescencia. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 20(2): 112-4, 1978.
11. Mello, G.V.P. et al. **Bras. Medicina.** 3(6), 30 p, 1987.
12. Moura, R.A. et al. Técnicas de Laboratório, 3ª ed. São Paulo: Livraria Atheneu, 511p., 1987.
13. Ohlweiler, O.A. Fundamentos de Análise Instrumental. **Livros Técnicos e Científicos.** Ed. S.A. 63-105, 1981.
14. Palacios, X.; Belli, A.; Espino, A.M. Detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en Somoto, Nicaragua, mediante ELISA indirecto e IFI en muestras de sangre en papel de filtro. **Rev. Panam. Salud Publica/Pan. Am. J. Public Health** 8(6): 411-7, 2000.
15. Tomimori-Yamashita, J. et al. Anti-phenolic glycolipid-1 (PGL-1) determination using blood collection on filter paper in leprosy patients. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 41(4), 1999.
16. Vázquez, S. et al. Detección de IgM contra el virus del dengue en sangre entera absorbida en papel de filtro. **Rev. Panam. Salud Publica/Pan. Am. J. Public Health** 3(3): 174-8, 1998.
17. Verrastro, T.; Lorenzi, T.F.; Neto, S.W. Hematologia e Hemoterapia: Fundamentos de Morfologia, Fisiologia, Patologia e Clínica. São Paulo.ed. Atheneu, 303p, 1998.
18. Vogel, A. Análise Química Quantitativa. 5ª. ed. **Livros Técnicos e Científicos S/A**, 522-41; 1992.
19. Walton, B.C.; Arjona, I. Utilization of whole blood specimens on filter paper for the indirect fluorescent antibody tests for toxoplasmosis. **J. Parasitol.** 57(3): 678-80, 1971.
20. Wanderley, D.M.V. et al. Confronto de resultados de reações de imunofluorescência indireta (RIFI) realizadas para diagnósticos de malária utilizando-se amostras de sangue coletadas em papel de filtro e em tubos capilares. **Rev. Bras. Malariol. D. Trop.** 34: 87-92, 1982.
21. Ward, L.S. et al. Determination of glucose levels using dried filter paper blood spots: new perspective in home monitoring. **São Paulo Med J/RPM** 114(1): 1100-3, 1996.