

DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVO DE PAPEL PARA DOSAGEM DE FERRO POR ANÁLISE COLORIMÉTRICA

Mariana Oliveira Duarte Corrêa

Dra. Desiree T. Scheidt

Prof. Dra. Laís C. Brazaca

Universidade de São Paulo

mariana_duarte@usp.br

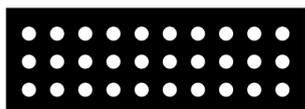
Objetivos

Desenvolver um dispositivo analítico microfluídico baseado em papel (μ PAD) para a determinação de ferro em amostras de urina através do método colorimétrico acoplado a detecção por imagem digital. O dispositivo pode ser utilizado para auxílio do diagnóstico da hemocromatose e da anemia hemolítica.

Métodos e Procedimentos

O dispositivo analítico microfluídico baseado em papel (μ PAD) construído permite a execução de dez triplicatas (Figura 1). Primeiramente desenhou-se o layout no software CorelDraw X5®, imprimiu-se em papel de filtro qualitativo n°1 e aqueceu-se o dispositivo em estufa por 35 minutos à 150°C para criação das barreiras hidrofóbicas. Com o aquecimento, o polímero do toner permeia as fibras do papel, criando as barreiras desejadas. Após recortado, foi depositada fita adesiva na parte traseira dos dispositivos analíticos para evitar vazamentos por capilaridade.

Figura 1: Dispositivo analítico de papel



Testou-se também a construção do dispositivo analítico utilizando celulose bacteriana como

substrato seguindo o mesmo protocolo através da colagem desta em uma folha A4.

Para o desenvolvimento da análise colorimétrica, adicionou-se com auxílio de uma micropipeta 2 μ L do reagente cromogênico ferricianeto de potássio (40 mg/L)¹ seguido de 2 μ L de cloridrato de hidroxilamina (1,5 mol/L), que atua na reação como um antioxidante esperou-se 15 minutos para secagem e adicionou-se 5 μ L do cloreto de ferro (II) tetra hidratado (amostra). Fez-se o mesmo ensaio com outro agente cromogênico, a ortofenantrolina (5 mg/L). Aguardou-se 35 minutos para secagem completa do dispositivo analítico e, em seguida, capturou-se uma fotografia do dispositivo analítico. A imagem obtida foi analisada pelo software ImageJ, que forneceu as médias aritméticas dos pixels capturados no espaço de cores RGB. Para obter o sinal analítico, subtraiu-se a média dos pixels das zonas nos quais se desenvolveu a coloração da média das zonas na qual construiu-se o branco utilizando 5 μ L de água ultrapura.

Para construção da curva analítica na matriz biológica artificial, preparou-se previamente a urina artificial² com as seguintes concentrações: 10 g/L ureia, 0,07 g/L ácido úrico, 0,8 g/L creatinina, 5,2 g/L cloreto de sódio, 0,1 g/L ácido láctico, 0,4 g/L ácido cítrico, 0,37 g/L cloreto de cálcio dihidratado, 0,49 g/L sulfato de magnésio heptahidratado, 1,41 g/L

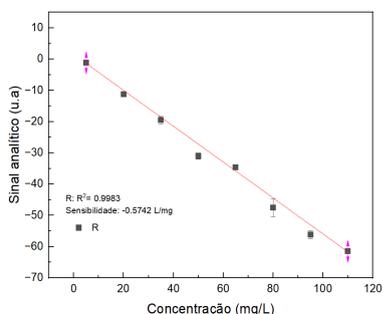
sulfato de sódio, 0,95 g/L fosfato de potássio monobásico, 1,2 g/L fosfato de potássio dibásico e 0,49 g/L de glicose. As soluções contendo o analito foram preparadas com urina artificial como solvente, assim como o branco.

Resultados

Para avaliação da performance do dispositivo nas diferentes condições, foram construídas curvas analíticas, permitindo a avaliação da faixa linear e da sensibilidade de cada método. O papel de filtro mostrou-se mais promissor como substrato por aliar concomitantemente boa linearidade e sensibilidade nos ensaios analíticos com ambos os reagentes cromogênicos, enquanto a celulose bacteriana apresentou desempenho analítico inferior, além de ser um substrato mais desafiador de ser trabalhado por sua rugosidade, afetando impressão e deposição da barreira hidrofóbica. Optou-se pelo ferricianeto de potássio como reagente cromogênico, que apresentou sensibilidade de 0,609 L/mg e R^2 de 0,989 no canal 'R' no espaço de cores RGB, enquanto a ortofenantrolina apresentou sensibilidade de 0,120 L/mg e linearidade de R^2 de 0,999 no canal 'B' no espaço de cores L^*a^*b . A conversão do espaço de cores de RGB para L^*a^*b na ortofenantrolina foi realizada por um conversor online.

Construiu-se a curva analítica na urina artificial utilizando ferricianeto como agente cromogênico no espaço de cores RGB e obteve-se a Figura 2.

Figura 2: Curva analítica em urina artificial utilizando ferricianeto de potássio no canal R



Pode observar-se uma linearidade satisfatória

com um R^2 de 0,998 e uma sensibilidade de 0,574 L/mg, um valor menor se comparado ao ensaio realizado em água ultrapura, porém esperado por tratar-se de uma amostra com outros íons dissolvidos que podem suprimir o sinal analítico.

Na validação do método obteve-se um coeficiente de variação de 3,0% para repetibilidade em 5 triplicatas em um dispositivo e 12,8% de reprodutibilidade em 5 dispositivos distintos. Obteve-se um limite de detecção de 3,3 mg/L e de quantificação de 9,9 mg/L, mostrando-se um método sensível para auxiliar o diagnóstico de hemocromatose (10 mg/L a 20 mg/L¹ de ferro na urina) e de anemia hemolítica (5 mg/L a 10 mg/L de ferro na urina).

Conclusões

O μ PAD mostra-se promissor como dispositivo analítico pelo baixo custo e por diminuir a complexidade da análise. O papel de filtro mostrou-se mais eficiente que a celulose bacteriana como substrato. Quanto ao agente cromogênico, o ferricianeto de potássio mostrou-se mais sensível que a ortofenantrolina. Através da validação do método é possível que este método possa ser aplicado para o auxílio do diagnóstico de hemocromatose e de anemia hemolítica.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer às minhas orientadoras Laís Brazaca e Desiree Scheidt pelo acompanhamento e ao programa unificado de bolsas (PUB) da Universidade de São Paulo e à FAPESP (2023/10141-2) pelo fomento.

Referências

- 1 Gitz, Jonas C et al. "A Colorimetric Method for Measuring Iron Content in Plants." *Journal of visualized experiments : JoVE*, 139 57408. 7 Sep. 2018, doi:10.3791/57408
- 2 Ferreira, Francisca T et al. "New microfluidic paper-based analytical device for iron determination in urine samples." *Analytical and bioanalytical chemistry* vol. 413,30 (2021) doi:10.1007/s00216-021-03706-9