

Desenvolvimento de dispositivo de papel para dosagem de ferro em plasma

Autor: Fernando Henrique Rincão

Orientador: Emanuel Carrilho

Universidade de São Paulo

Fernando019@usp.br

Objetivos

A anemia, normalmente associada à deficiências nutricionais, quando causada pela deficiência em ferro, é chamada de “anemia ferropriva”, sendo esta uma das formas mais comuns da doença. O diagnóstico mais confiável da anemia ferropriva é baseado na quantificação do conteúdo de hemoglobina no sangue, através da reação com o reagente de Drabkin e posterior leitura dos resultados utilizando a espectrofotometria UV-Vis e, uma vez que o reagente de Drabkin é rico em espécies de cianeto, este teste não pode ser realizado sem os devidos cuidados. Desse modo, a proposta deste trabalho foi o desenvolvimento e otimização de um dispositivo microfluídico baseado em papel (μ PAD) para quantificação da concentração de hemoglobina no sangue. O objetivo deste dispositivo foi possibilitar o diagnóstico “point-of-care” (POC), que consiste em um método de diagnóstico sem necessidade de pessoal ou equipamento especializado, podendo ser realizado mesmo em regiões pobres do país.

Métodos e Procedimentos

Inicialmente, foram cortados pequenos pedaços de papel filtro Whatman nº 1, de dimensões (30x40) mm, que foram posteriormente funcionalizados através da deposição de 200 μ L de reagente de Drabkin. Após a secagem do papel, em temperatura ambiente, pipetou-se sobre o papel um

pequeno volume de sangue (entre 10 μ L e 20 μ L), levando à formação de uma mancha. Utilizando um smartphone, capturou-se a imagem da mancha obtida, que foi processada por um software de leitura de imagem (imageJ), fornecendo dados sobre a área da mancha e o valor de vermelho lido na escala RGB. Os testes realizados objetivaram a otimização dos parâmetros experimentais, de modo que variou-se o volume de sangue utilizado e a concentração do reagente de Drabkin, além de ter sido avaliado o efeito da deposição de tensoativos sobre o papel e a estabilidade do reagente de Drabkin ao longo do tempo.

Os volumes de sangue testados foram de 10 μ L, 15 μ L e 20 μ L, enquanto que as concentrações testadas do reagente de Drabkin foram a concentração padrão e uma concentração obtida a partir da diluição do reagente em 100x. Os testes envolvendo a variação na concentração do reagente de Drabkin foram realizados concomitantemente com os testes de estabilidade ao longo do tempo, de modo que foram preparados 20 papéis funcionalizados com Drabkin, 10 papéis com concentração padrão, e 10 papéis com solução diluída 100x; foram realizadas duplicatas semanalmente, para cada concentração, totalizando cinco semanas.

Os compostos tensoativos testados foram o glicerol, o Triton-X100, o Tween-20 e o Tween-80, em diferentes concentrações. Para o glicerol, adotou-se as diluições de 5x, 10x e 100x, enquanto que para o Tween-20 e o Tween-80, utilizou-se diluições de 10x, 50x e

100x; por fim, para o Triton-X100, utilizou-se as concentrações de 0,1% a 0,5%.

O padrão utilizado para os testes com substâncias tensoativas foi o papel funcionalizado apenas com o reagente de Drabkin.

Resultados

Os testes envolvendo a deposição de tensoativos indicaram que a presença dos compostos tensoativos testados aumenta o erro associado às medidas, em principal os valores de vermelho, de modo que foi preferível prosseguir os testes utilizando o apenas o papel funcionalizado com o reagente de Drabkin.

Quanto ao testes envolvendo a variação no volume da amostra, percebeu-se um aumento do valor de área obtido, em função do aumento do volume, conforme esperado; entretanto, não houve variação significativa no valor de vermelho obtido, sendo este um ponto favorável para o dispositivo, pois uma vez que o valor de vermelho realmente seja independente do volume de sangue, seria possível realizar a deposição do sangue sobre o papel sem o uso de micropipetas, sendo necessário apenas furar o dedo do paciente e pressionar o dedo com sangue sobre o papel, para obtenção da mancha.

Os testes envolvendo a variação na concentração do reagente de Drabkin demonstraram alta variabilidade, ao longo do tempo, no que diz respeito ao valor de área obtido, conforme mostra o Gráfico 1.

Os resultados obtidos para o valor de vermelho, entretanto, apresentaram uma variação menor, ao longo das semanas, bem como uma diferença menor entre os valores obtidos para 1x e para 100x, para cada semana respectiva, conforme é possível visualizar no Gráfico 2.

Mesmo assim, os resultados obtidos pelos papéis com solução diluída 100x foram significativamente piores do que os obtidos com a solução padrão, principalmente ao considerar os resultados da **semana 1**, uma vez que, embora não tenha havido tempo para que o reagente se deteriorasse, é possível

perceber que os resultados de vermelho obtidos para os papéis com diluição de 100x são menores do que os valores obtidos para os papéis com concentração padrão, embora a amostra de sangue utilizada em ambos os casos tenha sido retirada da mesma pessoa, em instantes de tempo muito próximos entre si.

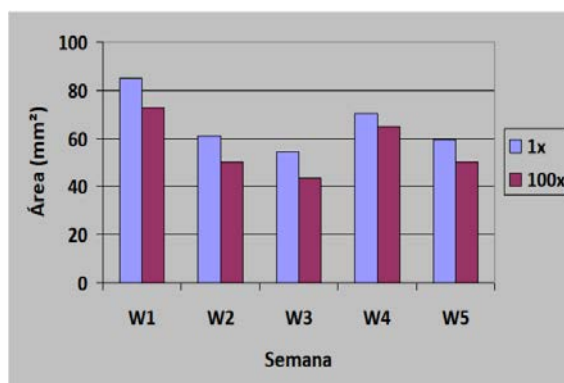


Gráfico 1. Comparação entre áreas de mancha (mm²) ao longo do tempo para Drabkin 1x (em azul) e 100x (em roxo).

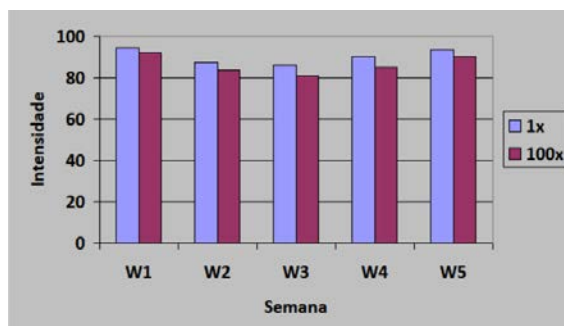


Gráfico 2. Comparação entre valores de vermelho para Drabkin 1x (em azul) e 100x (em roxo).

É importante ressaltar, todavia, que uma vez que os testes apresentados foram realizados utilizando, como amostra, o sangue do próprio autor do trabalho, ao invés de uma solução padrão de hemoglobina, a variação que se vê ao longo das semanas pode ter sido causado por variações no conteúdo do sangue do próprio voluntário, de modo que ainda se faz necessário testes adicionais para averiguar a real estabilidade do reagente de Drabkin ao longo do tempo. Ainda assim, não parece haver qualquer vantagem na utilização da solução

diluída 100x, uma vez que os resultados parecem ligeiramente discrepantes, quando comparados com os resultados obtidos através da concentração padrão.

Para além disso, os próximos passos consistem na validação do método, fazendo testes comparativos entre o método proposto e o método de Drabkin por espectrofotometria UV-Vis, que é considerado padrão-ouro para quantificação de hemoglobina no plasma.

Conclusões

Os resultados mostram que a presença de compostos tensoativos na superfície do papel dificultam a dispersão da amostra, gerando resultados pouco confiáveis, de modo que o dispositivo sem a presença de tensoativos parece ser a melhor escolha. Para além disso, os testes envolvendo a variação de volume de amostra indicaram que os valores de vermelho obtidos parecem independem do volume de amostra utilizado. Por fim, os testes quanto a estabilidade do reagente ao longo do tempo foram inconclusivos, muito embora o reagente diluído 100x tenha se mostrado menos efetivo.

O próximo passo, agora, consiste na validação do método, comparando os resultados obtidos com os resultados do método considerado padrão-ouro para quantificação de hemoglobina no plasma, o método de Drabkin.

Agradecimentos

Agradeço a todos que se dispuseram a me orientar e a me ensinar o método científico que deve ser aplicado nas pesquisas.

Referências

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. *Relatório técnico – Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas de Anemia por Deficiência de Ferro*. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2023. Disponível em: [\[https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/consultas/relatorios/2023/relatorio-tecnico-pcdt-anemia-por-deficiencia-de-ferro\]](https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/consultas/relatorios/2023/relatorio-tecnico-pcdt-anemia-por-deficiencia-de-ferro). Acesso em: 09 set. 2024.