

DISPOSITIVO DE PAPEL PARA TRIAGEM NEONATAL UTILIZANDO PAPER SPRAY EM ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Mariana Oliveira Duarte Corrêa

Dr. Eduardo Luiz Rossini

Universidade de São Paulo - USP

mariana_duarte@usp.br

Objetivos

Empregar um dispositivo analítico microfluídico em papel (μ PAD) para coleta de amostras de plasma e detecção de doença neonatal através de paper spray ionization e espectrometria de massas (PS-MS). Além do potencial do μ PAD como plataforma de coleta de amostras biológicas, também avaliar o potencial para a detecção e determinação da fenilalanina via PS-MS como ferramenta para triagem da fenilcetonúria.

Métodos e Procedimentos

O μ PAD possui barreiras hidrofóbicas capazes de confinar a amostra em uma área específica. Para a fabricação das barreiras hidrofóbicas, os dispositivos foram desenhados em o software e impressos duas vezes em papel qualitativo n°1, utilizando a impressora HP Color LaserJet CP1215. Em seguida, foram aquecidos em estufa por 40 min a 150°C para que o toner permeasse as fibras do papel formando as barreiras hidrofóbicas.

Para a amostragem, uma alíquota de 6 μ L da amostra ou padrão de fenilalanina foi aplicada no μ PAD e seca, formando o *dried plasma spot* (DPS).

Para as análises, o μ PAD contendo o analito/amostra foi dobrado e posicionado com sua ponta paralela a entrada do espectrômetro de massas utilizando uma garra de cobre. Uma alíquota de 15 μ L da mistura de solventes com

o reagente derivatizante foi adicionada ao papel e um alto potencial (5 kV) foi aplicado para gerar o spray, permitindo a análise via PS-MS.

A análise foi realizada no espectrômetro de massas TSQ Quantum Acess Thermo Scientific, triplo-quadrupolo. Os dados obtidos foram tratados através do programa Xcalibur.

As amostras de plasma utilizadas no desenvolvimento do projeto foram adquiridas da BIOVT e são amostras de um pool de plasma humano em K₂EDTA.

Resultados

Nas primeiras análises de plasma sanguíneo, empregou-se como solvente uma solução de metanol, água e ácido fórmico e obteve-se um espectro ruidoso e um sinal pouco intenso. Em alternativa a análise direta, foi utilizado o p-dimetilaminobenzaldeído (p-DMAB), um agente derivatizante, e fez-se uma reação online com a fenilalanina, no qual o reagente é solubilizado diretamente na mistura de solvente que é adicionado ao papel no momento da análise. Essa estratégia levou a formação de íons de maior massa/carga em zonas de menor interferência. Como demonstrado na Figura 1.

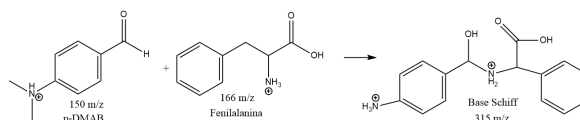


Figura 1: Reação online entre fenilalanina e p-DMAB.

Ao realizar a fragmentação do produto da reação online, observou-se a quebra da ligação formada entre as moléculas da fenilalanina e de p-DMAB, caracterizadas pelos picos de m/z 166, característico da fenilalanina protonada e m/z 150, característico do p-DMAB protonado. As perdas de massa a partir do íon precursor são condizentes com essa quebra, pois a sua diferença em relação ao íon precursor são a massa da fenilalanina e do p-DMAB. Houve também a fragmentação da fenilalanina, formando o íon produto em m/z 120, uma fragmentação característica desse aminoácido, sendo a perda de água e monóxido de carbono.

Na segunda etapa da pesquisa, visou-se a otimização das condições experimentais que gerou as condições descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Condições experimentais obtidas após a otimização experimental.

Parâmetro	Valor
Temperatura do capilar	175°C
Distância do papel	6 mm
Voltagem da fonte	5 kV
Voltagem das lentes	75 V

Após a otimização, construiu-se uma curva de calibração (Figura 2) variando a concentração de fenilalanina de 5 a 100 mg L⁻¹ e utilizando uma concentração constante de um padrão interno (¹³C₆-Fenilalanina).

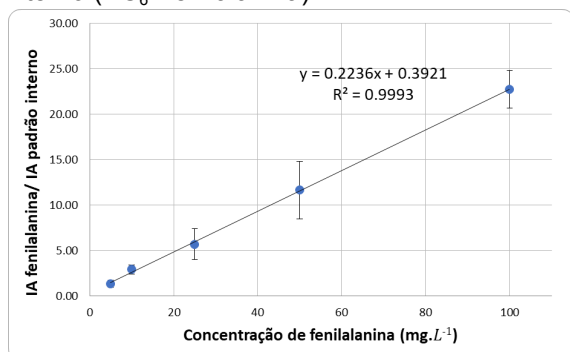


Figura 2: Curva de calibração da concentração de fenilalanina em mg L⁻¹ pela razão intensidade do

analito pela intensidade do padrão interno no espectrômetro de massas.

Conclusões

A pesquisa demonstrou que a utilização do μ PAD como dispositivo analítico é viável, minimizando o custo e a complexidade da análise, evitando etapas de preparo de amostra e podendo ser uma alternativa ao uso da cromatografia líquida para a análise de fenilalanina.

A detecção e determinação da fenilalanina via PS-MS mostrou-se efetiva através da reação online entre a fenilalanina e p-DMAB gerando um bom sinal com menor ruído.

Com a construção da curva de calibração foi possível observar que o espectrômetro de massas apresentou um sinal crescente com o aumento da concentração de fenilalanina como esperado.

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador Eduardo por todo apoio, correções e incentivos durante a pesquisa e processo de aprendizagem.

Referências

- Verplaetse, R. & Henion, J. Hematocrit-independent quantitation of stimulants in dried blood spots: Pipet versus microfluidic-based volumetric sampling coupled with automated flow-through desorption
- Liu, J. *et al.* Development, characterization, and application of paper spray ionization. *Anal. Chem.* **82**, 2463–2471 (2010).
- Demirev, P. A. Dried blood spots: Analysis and applications. *Anal. Chem.* **85**, 779–789 (2013).
- Demirev, P. A. Dried blood spots: Analysis and applications. *Anal. Chem.* **85**, 779–789 (2013).