

Triagem Neonatal: Otimização da Análise de Aminoácidos em Amostras de Sangue em Papel de Filtro por CG-DIC

Helena José Costa Bezerra Netto^{*1,2} (PG) helenocosta@ig.ufrrj.br, Thaís Pinho Pereira^{1,2} (IC), Gabriela Allegri Machado^{1,2} (PG), Suelene Francisca da Silva^{1,2} (TC), Ruth Ellen Simoni^{1,2} (PQ), Fernanda Bertão Scalco^{1,2} (PQ), Maria Lúcia Costa de Oliveira^{1,2} (PQ) e Francisco Radler de Aquino Neto^{1,2} (PQ).

¹Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo (LBEIM) – Departamento de Bioquímica – Instituto de Química – UFRJ. ²Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico (LADETEC) – Departamento de Química Orgânica – Instituto de Química – UFRJ.

Palavras Chave: Aminoácidos, Quimiometria, Sangue, Papel de Filtro, Triagem Neonatal.

Introdução

A Triagem Neonatal é um procedimento para avaliação e diagnóstico precoce de anormalidades metabólicas e.g. aminoacidopatias. A coleta de amostras de sangue, utilizadas neste procedimento, é realizada em papel de filtro. As vantagens do uso de papel de filtro são: facilidade de manuseio, armazenamento e transporte, aliadas à estabilidade da amostra no estado seco.

O objetivo deste trabalho foi adaptar e otimizar a análise de aminoácidos por cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama (CG-DIC), em amostras de sangue coletadas em papel de filtro.

Resultados e Discussão

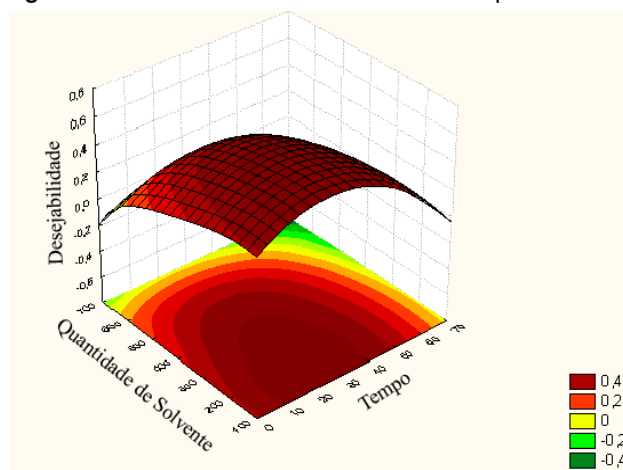
5 picotes de Ø 5 mm, retirados de manchas de sangue de Ø 13 mm formadas pela aspersão de 100 µL de sangue de 55% de hematócrito (branco ou enriquecido – 150 nmol/mL de aminoácidos), foram analisadas através do conjunto EZ:Faast® (Phenomenex, EUA). Os efeitos observados corresponderam à razão das áreas do analito e do padrão interno norvalina (Aa/Api) encontradas nas amostras enriquecidas, às quais se subtraíram os valores encontrados da razão Aa/Api dos seus correspondentes brancos (aminoácidos endógenos).

Utilizando-se o planejamento de Plackett-Burman foram avaliadas as principais variáveis envolvidas, a saber: tipo de agitação (mecânica ou banho de ultrassom) no qual se observou efeito positivo quando se utilizou agitação mecânica; tempo de extração (10 min ou 60 min) no qual, o aumento de tempo teve efeito negativo; composição do solvente (metanol e metanol-HCl 0,1 M) no qual se observou efeito negativo quando se adicionou HCl ao solvente; controle de composição plasmática (plasma ou solução de albumina 65 mg/mL) tendo o uso de solução de albumina efeito positivo; lise de hemácias (sangue lisado e não lisado), observando-se efeito negativo no primeiro caso; local de retirada do picote (central ou borda) no qual se observou que o uso da borda do papel tem efeito positivo e; umidade do papel (dessecado e não dessecado) no qual se

observou efeito deletério quando se usou papel não dessecado previamente.

Com esses resultados, as variáveis: solvente (metanol, água e HCl 0,1 M), tempo (10, 30 e 60 min) e quantidade de solvente (150, 400 e 650 µL) foram avaliadas por planejamento fatorial completo a dois níveis, sem e com ponto central. O planejamento fatorial apontou como melhor solvente para a extração a água. O resultado do segundo planejamento (com ponto central) foi descrito através da função de desejabilidade de Derringer e Suich (Figura 1).

Figura 1. Gráfico tridimensional de superfície de



desejabilidade para a extração de aminoácidos.

Conclusões

Os resultados mostram que as melhores condições de extração são: agitação mecânica, utilização das bordas das manchas de sangue, utilização de papel previamente dessecado, faixa de tempo de extração entre 10 e 40 minutos, volume de solvente de 100 a 300 µL e utilização do solvente água. Além disso, variáveis, como composição plasmática e lise, devem ser observadas e, na medida do possível, controladas, de modo a evitar interpretações errôneas, devido à alteração do volume de sangue absorvido.

Agradecimentos

Ao CNPq, Capes e Faperj.