

Métodos alternativos para avaliar a concentração de Hemoglobina livre no plasma

Jéssica Abatzoglou MAGNO¹, Karen MIGUITA¹, Marilena OSHIRO¹

¹Centro de Patologia-Núcleo de Hematologia e Bioquímica - Instituto Adolfo Lutz

A hemoglobina (Hb) é uma proteína globular presente nas hemácias cuja principal função é absorver, transportar e liberar oxigênio aos tecidos¹. A concentração de hemoglobina é um dos principais parâmetros para definir se um indivíduo é portador de anemia. Porém, quando esta proteína se encontra livre em amostras de soro ou plasma pode ser um fator interferente nas dosagens bioquímicas.

Avaliar a concentração de Hb presente numa amostra de soro ou plasma através, apenas, da inspeção visual é difícil, principalmente nas concentrações próximas de 0,6g/L, consideradas o limite máximo de aceitabilidade para alguns analitos bioquímicos. Por isso, em alguns casos são necessários dosar a sua concentração para decidir na rejeição ou não da amostra.

A dosagem de hemoglobina pode ser realizada por métodos manuais utilizando espectrofotômetro ou por automação em contadores hematológicos. O método mais comumente utilizado para a dosagem de hemoglobina é o cianometemoglobina, que tem como princípio, a oxidação do íon ferroso da hemoglobina, oxihemoglobina e carboxihemoglobina pelo ferrocianeto, formando a metemoglobina. Esta Hb oxidada combina-se com o cianeto de potássio e produz a cianometemoglobina que é medida colorimetricamente².

Apesar de fácil execução, este utiliza o cianeto de potássio, altamente tóxico, que por si só, justifica na busca de metodologias menos tóxicas e menos agressivas ao meio ambiente. Desta forma, testamos outros métodos para dosar a hemoglobina como

uma alternativa ao método da cianometemoglobina, porém ajustada para ser utilizada em amostras de plasma contendo hemólise.

Foram avaliadas 22 amostras de plasma com concentrações diferentes de hemoglobina que foram analisadas por 4 diferentes métodos para a dosagem da concentração de hemoglobina: Diluição em NaCl, por cianometemoglobina, Diluição em água bi-destillada e dosagem em contador hematológico. Em todos foram realizados ensaios em triplicata, para aumentar a confiança no resultado.

Diluição em NaCl 0,9 %

Cada amostra foi diluída na solução de NaCl 0,9 % na seguinte proporção: 25 µL da amostra para 1 mL de solução. Foram homogeneizados por inversão. Em seguida, foram obtidos os valores das absorbâncias no comprimento de onda em 540 nm, utilizando NaCl 0,9 % como branco. Os valores obtidos nas leituras foram multiplicados pelo fator 3,9 para obtenção do resultado final.

Diluição em Drabkin (método da cianometemoglobina)

Foram pipetados 50 µL de amostra em tubos de ensaio contendo 2,5 mL de solução de Drabkin (ferricianteto de potássio, cianeto de potássio e água destilada). O conteúdo foi homogeneizado com o uso da pipeta. Aguardou-se por 5 minutos antes da leitura das amostras no espectrofotômetro, em comprimento de onda de 540 nm, utilizando Drabkin como branco. Os valores obtidos nas leituras foram multiplicados pelo fator 35 para obtenção do resultado final.

Diluição em água bi-destilada

Cada amostra foi diluída na água na seguinte proporção: 50 µL da amostra para 950 µL de água bi-destilada. Foram homogeneizados por inversão. Em seguida, foram obtidos os valores das absorbâncias nos seguintes comprimentos de onda: 370, 415, 510, 577 e 600 nm, utilizando água como branco.

Cálculo:

Se a Abs em 415 for < 1,5:

$$A = \text{Abs } 510 + (\text{Abs } 370 - \text{Abs } 510) \times 0,68$$

$$B = \text{Abs } 415 - A$$

$$Hb = (B / 113,22 \times 16125 \times 20 / 10000)$$

Se a Abs em 415 for > 1,5 :

$$A = \text{Abs } 600 + (\text{Abs } 510 - \text{Abs } 600) \times 0,26$$

$$B = \text{Abs } 577 - A$$

$$Hb = (B / 13,64 \times 16125 \times 20 / 10000)$$

Dosagem em contador hematológico automático:

A dosagem das amostras foi realizada em triplicata no contador hematológico KX-21N da Sysmex. As médias dos resultados das triplicatas obtidas nos quatro métodos estão dispostas na **Tabela 1** e análise do Teste de Tukey na **Tabela 2**.

Tabela 1. Média dos resultados das 22 amostras nos quatro métodos utilizados para dosagem da concentração de hemoglobina (g/dL) em plasma

Amostras	Analizador Hematológico	Drabkin	NaCl	H2O
1	2,3	2,28	2,34	2,31
2	2,2	2,21	2,22	2,26
3	1,9	1,93	1,99	1,98
4	1,8	1,88	1,88	1,84
5	1,7	1,68	1,59	1,76
6	1,5	1,55	1,52	1,63
7	1,5	1,46	1,44	1,59
8	1,4	1,40	1,34	1,47
9	1,3	1,36	1,29	1,57
10	1,2	1,23	1,28	1,23
11	1,2	1,23	1,16	1,26
12	1,0	1,13	1,13	1,05
13	1,0	1,00	1,04	1,03
14	0,9	0,93	0,93	0,91
15	0,8	0,85	0,91	0,88
16	0,7	0,74	0,79	0,76
17	0,6	0,59	0,63	0,59
18	0,4	0,47	0,49	0,45
19	0,3	0,34	0,32	0,29
20	0,2	0,24	0,25	0,25
21	0,0	0,07	0,09	0,05
22	0,0	0,08	0,09	0,05

Tabela 2. Resumo estatístico do Teste de Tukey

Teste de Tukey (IC 95%)	Centro	Limite Inferior	Limite Superior	P-valor
Contador Hematológico- Drabkin	0,09864	-0,42756	0,62483	0,96082
H2O- Drabkin	0,00273	-0,52346	0,52892	1,00000
NaCl- Drabkin	0,10532	-0,42087	0,63151	0,95291
H2O- Contador Hematológico	-0,09591	-0,62210	0,43028	0,96380
NaCl- Contador Hematológico	0,00668	-0,51951	0,53287	0,99999
NaCl-H ₂ O	0,10259	-0,42360	0,62878	0,95624

Ao considerarmos um nível de confiança de 5%, podemos concluir que não há diferença significativa entre as médias dos quatro métodos, demonstrado tanto pela análise de variância ANOVA ($p= 0,92$) quanto pelo teste de Tukey. Neste último, pode-se ver a comparação par a par de todos os métodos utilizados.

A dosagem da concentração de hemoglobina em contador hematológico é feita por fotometria e os reagentes utilizados são livres de substâncias tóxicas, porém é preciso conhecer o seu limite inferior de quantificação. Pois, nem todos os contadores possuem a capacidade de quantificar concentrações micromolares de hemoglobina. O método de diluição em água, apesar de ser de fácil preparo, foi o mais trabalhoso, pois foram necessárias leituras em 5 comprimentos de onda diferentes. Já, os de diluição em NaCl e da cianometemoglobina foram de execução mais simples com leitura em apenas um comprimento de

onda. O único inconveniente é o uso de substância tóxica no método da cianometemoglobina. Os dados apresentados mostram que os métodos testados neste ensaio funcionam de forma efetiva e confiável para avaliar a concentração de Hb no plasma. Entretanto, pela praticidade e pela utilização de reagentes simples, o método de NaCl seria o escolhido para ser utilizado numa avaliação rápida nas amostra de plasma contendo hemólise, tirando a dúvida da utilização ou não dessas amostras contaminadas nos ensaios bioquímicos.

REFERÊNCIAS

1. Therenzinha F. Lorenzi. Manual de Hematologia – Propedêutica e Clínica. 1992. Ed. Medsi.
2. Raimundo Antônio Gomes Oliveira, Adelino Poli Neto. Anemias e Leucemias – Conceitos Básicos e Diagnóstico por Técnicas Laboratoriais. Ed. Roca, 2004.