Determinação de metemoglobina em voluntários fumantes e não fumantes

Determination of methemoglobin in smokers and non-smokers volunteers

João Vitor da Silva[1], Patrícia Moriguchi[1,2], Beatriz Guli Bidoia[1,2], Danilo Harudy Kamonseki[3], Sandro Rostelato-Ferreira[1,2,3]

[1]Curso de Farmácia da Universidade Paulista, Sorocaba-SP, Brasil; [2]Curso de Biomedicina da Universidade Paulista, Sorocaba-SP, Brasil; [3]Curso de Fisioterapia da Universidade Paulista, Sorocaba-SP, Brasil.

Resumo

Objetivo – Determinar a concentração de metemoglobina (MetHb) em voluntários fumantes e não fumantes, e comparar com as possíveis alterações bioquímicas. **Métodos** – Os sujeitos do estudo foram voluntários do município de Sorocaba/SP (n=30), sendo metade para o grupo de fumantes (n=15) e outra metade para o grupo de não fumantes (n=15). Foi realizada a extração de saponina utilizando a droga vegetal *Quilaia sp.*, para a realização de hemólise nas amostras de sangue e, então, dosar a metemoglobina dos voluntários. Amostras de sangue foram coletadas diretamente em tubos comerciais à vácuo e a metemoglobina foi determinada através da técnica que dispensa o uso do cianeto, evitando risco tóxico. **Resultados** – Os resultados estão apresentados em Média ± Desvio Padrão da porcentagem de MetHb: Grupo Fumantes foi de 3,4 ± 0,82% e o Grupo Não Fumantes foi de 8,3 ± 4,9% (valor normal: 1,9 a 3,8%), sendo diferentes significativamente. Os valores para a dosagem de glicemia e colesterol total não apresentaram diferença significativa, quando comparado o grupo de Fumantes com o Não Fumantes. **Conclusões** – Conclui-se que os valores de MetHb se apresentaram alterados em indivíduos fumantes, porém serão necessários maiores estudos acerca da comparação da alteração de MetHb com glicemia e/ou colesterol total.

Descritores: Metemoglobina; Hemoglobina; Hábito de fumar

Abstract

Objective – To determine the concentration of methemoglobin (MetHb) in smoker and non-smoker volunteers comparing with possible biochemical alteration. **Methods** – The study were performed with volunteers of city Sorocaba/SP (n=30), separated in two groups: smokers group (n=15) and non-smokers group (n=15). The extraction of saponin was performed using the plant *Quilaia sp.*, for hemolysis in the blood samples and, so, measure mehtemoglobin levels in the volunteers. Blood samples were collected directly in commercial tubes of vacuum and the methemoglobin was determined through of method described that dispenses the use of cyanide, avoiding the toxic risk. **Results** – The results are express in mean ± standard deviation of percentage MetHb: Non-smokers Group 3.4 ± 0.82%; Smokers Group 8.3 ± 4.9% (normal values 1.9%-3.8%), being different significantly. The glycemic and total cholesterol results, do not present significant difference when compared the smokers group with non-smokers group. **Conclusions** – The MetHb results presented are altered in smoker volunteers, however larger studies are needed on the comparison of the change of MetHb with glycaemia and/or total cholesterol.

Descriptors: Methemoglobin; Hemoglobin; Smoking

Introdução

A molécula de hemoglobina (Hb) corresponde a um tetrâmero, formado por cadeias alfa, beta, gama ou delta. A forma de Hb mais comum nos adultos (HbA) é composto de duas cadeias α e de duas cadeias β. Cada cadeia da Hb é constituída de um polipetídeo globina ligada a um grupo prostético heme, o qual consiste em um anel de protoporfirina IX complexado com um único átomo de ferro no estado ferroso (Fe^{2+}). Assim, há quatro átomos de ferro em cada molécula de Hb. Cada átomo de ferro no estado ferroso pode se ligar reversivelmente a uma molécula de O_2 somando um total de quatro moléculas de O_2 transportadas por cada molécula de Hb[1]. Quando o Fe^{2+} é oxidado a Fe^{3+} (estado férrico), a hemoglobina torna-se incapaz de transportar o O_2 aos tecidos causando, então, hipóxia. Nesta condição, a hemoglobina passa a ser chamada de metemoglobina (MetHb)[2].

A MetHb é um pigmento hemoglobínico que pode ser de origem congênita ou adquirida, sendo esta a causa mais frequente e podendo ser provocada por medicamentos, alimentos e vários outros agentes químicos. As consequências decorrentes da MetHb elevada podem ser várias, sendo a principal a cianose refratária à oxigenioterapia[3], determinando um quadro de metemoglobinemia.

A metemoglobinemia é uma situação clínica caracterizada pela elevação da concentração de metemoglobina no sangue, acima do nível padrão estabelecido por dosagens químicas ou enzimáticas. As três principais causas que determinam o aumento de metemoglobina têm origens diferentes e se devem à: 1) deficiência de enzimas eritrocitárias específicas para as atividades redutoras da oxidação do ferro do grupo heme; 2) à indução tóxico-oxidativa da hemoglobina causada por compostos químicos oxidantes; 3) ao defeitos molecular da hemoglobina que causa contínua auto oxidação[4].

Agentes químicos capazes de determinar a metemoglobinemia estão presentes no cigarro, portanto, consi-

dera-se que o hábito de fumar é responsável pela elevação dos teores dos pigmentos hemoglobínicos, que alteram o transporte e/ou o aproveitamento de O_2 pelas células, dentre esses a metemoglobina (MetHb)[5].

O objetivo do presente trabalho foi determinar a concentração de metemoglobina (MetHb) em voluntários fumantes e não fumantes no município de Sorocaba/SP, e comparar com as possíveis alterações bioquímicas.

Métodos

Seleção dos voluntários

Fizeram parte deste estudo 30 voluntários, sendo 15 não fumantes (Grupo A) e 15 fumantes (Grupo B), de diferentes faixas etárias. Os voluntários foram pessoas residentes no município de Sorocaba, e que se propuseram a participar por livre e espontânea vontade da pesquisa, além disso, foi elaborado um termo de consentimento livre e esclarecido para ser assinado caso concordassem com o princípio do estudo. O estudo foi conduzido no período de agosto de 2014 a fevereiro de 2015.

Por se tratar de uma pesquisa incluindo voluntários para a doação de sangue, não foi possível limitar a participação dos diferentes perfis entre os fumantes e não fumantes, não havendo exclusão de dados obtidos.

Para a realização da pesquisa como os voluntários, foi necessaria a submissão do projeto ao Comitê de Ética em Pesquisa da UNIP, sendo avaliado e aprovado sob o número de 789.459.

A identificação dos sujeitos do estudo foi de acordo com o grupo. Os não fumantes foram identificados pela letra A e diferenciados entre si por numeração contínua (ex.: A1, A2, A3). Já os fumantes formaram o grupo B e diferenciados entre si, por numeração contínua (ex.: B1, B2, B3).

Escolha do método e reagentes

Para a dosagem de metemoglobina foi utilizado o método espectrofotométrico pela técnica proposta por Naoum, Radispiel e Moraes[6] (2004), pois este método não possui como reagente o cianeto, uma vez que é moderadamente tóxico para vida aquática, sendo então de difícil descarte. Os reagentes utilizados foram: a) Saponina 1%; b) solução estoque de tampão fosfato M/15; e c) solução estoque de tampão fosfato M/60.

a) Processo de Extração Saponina 1%

A escolha pela extração de saponina de uma planta foi devido à ausência do reagente industrializado no laboratório. O método de extração empregado está descrito na Farmacopeia Brasileira[7].

A droga vegetal escolhida dentre as disponíveis que apresentava maior concentração de saponinas foi a *Quilaia sp*, que contém de 9% a 10% de saponinas[8].

Para o processo de extração foi necessário que a droga estivesse pulverizada, sendo utilizados 0,5g. Em um béquer foi adicionada a droga e 40 mL de água destilada, que foi aquecido em manta térmica para que atingisse à fervura durante cinco minutos. Após esse período, o extrato aquoso foi resfriado e filtrado com algodão para um balão volumétrico de 50mL, sem que se perdesse o resíduo do béquer, pois este novamente foi levado para o processo de extração com 15mL de água destilada, somente até início da fervura. Após o resfriamento e a filtração do extrato aquoso, foi completado até o menisco o balão de 50 mL anteriormente com o primeiro extrato obtido.

Considerando que se obteve um extrato aquoso a 10%, foi retirada uma alíquota com auxílio de pipeta volumétrica de 5mL e transferido para outro balão de 50 mL completando-o com água destilada até o menisco, obtendo assim, a concentração de 1% de saponina.

b) Solução estoque de tampão fosfato M/15

Em balança analítica e com auxílio de papel para pesagem, foram pesados 9g de $Na_2HPO_4 12H_2O$ e 5,7g de KH_2PO_4 e transferidos para balão volumétrico de 1000mL e completado com água destilada até o menisco e, posteriormente agitado para que ocorrer total dissolução.

c) Solução trabalho tampão fosfato M/60

Foi retirada uma alíquota de 250mL com auxílio de uma proveta de 500 mL e transferido para um balão volumétrico de 1000 mL, que foi completado com água destilada até o menisco e, posteriormente agitado para total homogeneização.

Procedimento

Para a coleta de sangue de cada voluntário foram utilizados dois tubos, um com anticoagulante EDTA (para a determinação de metemoglobina) e um tubo gel com ativador de coágulo (para as análises de glicose e colesterol total), foram coletados 5mL de sangue em cada um dos tubos e, em seguida, realizadas as análises. As dosagens foram realizadas no dia coleta não havendo a necessidade de armazenamento das amostras.

As análises bioquímicas foram realizadas através de sistema enzimático, por reação de ponto final com reagentes em kits prontos de Labtest, no equipamento Bioplus® de acordo com a referência recomendada em bula de cada teste. Para a análise de glicose, foi utilizado o kit GLICOSE Liquiform e para a análise de colesterol total, foi utilizado o kit COLESTEROL Liquiform.

Determinação de Metemoglobina

Para cada voluntário foram identificados dois tubos em A e B e foram realizados em duplicata.

No tubo A, com auxílio de pipeta automática, foi adicionado 100uL de sangue total coletado com anticoagulantes (EDTA) e 100uL de saponina a 1% sob agitação para que ocorresse hemólise, em seguida, foi adicionado 6mL do tampão fosfato M/60 homogeneizando a mistura. A mistura obtida do tubo A foi transferida para cubeta para que fosse realizada a leitura no espectrofotômetro em 630nm, tendo como branco o tampão fosfato M/60.

No tubo B, foi adicionado com pipeta automática 300uL da mistura do tubo A e com auxílio de pipeta de

5mL, foi adicionado 3mL do tampão fosfato M/60 homogeneizando a mistura. A mistura do tubo B foi transferida para cubeta para que fosse realizada a leitura no espectrofotômetro em 540nm, tendo como branco o tampão fosfato M/60.

$$\text{Cálculo: \% MetHb} = \frac{[A]\ \text{Tubo A} \times 100}{[A]\ \text{Tubo A} + ([A]\ \text{Tubo B} \times 10)}$$

Valores normais de metemoglobina variam de 1,9 a 3,8%, sendo que acima de 4% são considerados elevados[6].

A extração da saponina e as dosagens de MetHb foram realizadas no Laboratório Multidisciplinar 1, as dosagens de glicemia e colesterol foram realizadas no Laboratório Escola de Biomedicina, na Unip, Campus Sorocaba.

Análise estatística

Os valores estão apresentados como Média ± Desvio Padrão, utilizando o teste t-Student (Software Statística 12), considerando significativo $p<0,05$.

Resultados e Discussão

Determinação de metemoglobina

Os resultados obtidos de MetHb na Tabela 1 se mostraram coerentes, uma vez que os voluntários fizeram parte do grupo de não-fumantes.

Apesar dos voluntários A7, A13 e A14 apresentarem resultados acima dos 4% que é considerado elevado, deve ser levado em consideração que há diversos agentes metemoglobinizantes, tais como, fármacos[9-10], alimentos[11], CO_2[12], e outros.

Na Tabela 2 estão expressos os resultados dos voluntários fumantes, apresentando alterações significativas na maioria das dosagens.

O voluntário B8 foi o único que apresentou resultado normal, porém, foi considerado que é um indivíduo etilista, com uso frequente de bebida alcoólica, e segundo Leeuwn, Tromp e Nauta[13], a hidroxila (OH) e radicais do álcool (metanol e etanol) tem capacidade de reduzir os níveis de metemoglobina *in vitro*. Sendo então necessários mais resultados de voluntários etilistas e tabagistas para avaliar a possibilidade de diminuição da metemoblogina *in vivo* pelo uso do álcool.

Tabela 1. Determinação de metemoglobina em voluntários não fumantes

Voluntário	Absorbância em 630 nm	Absorbância em 540 nm	Valor calculado em %	Valor referência
A1	0,051	0,145	3,398	1,9 a 3,8% normal Acima de 4% elevado (Naum, Radispiel e Moraes[6])
A2	0,058	0,184	3,056	
A3	0,052	0,165	3,055	
A4	0,048	0,177	2,640	
A5	0,074	0,239	3,003	
A6	0,106	0,248	4,099	
A7	0,055	0,123	4,280	
A8	0,042	0,1	4,031	
A9	0,048	0,217	2,164	
A10	0,05	0,242	2,024	
A11	0,033	0,089	3,575	
A12	0,033	0,099	3,226	
A13	0,034	0,068	4,762	
A14	0,032	0,068	4,494	
A15	0,046	0,11	4,014	

Tabela 2. Determinação de metemoglobina em voluntários fumantes

Voluntário	Absorbância em 630 nm	Absorbância em 540 nm	Valor calculado em %	Valor referência
B1	0,066	0,125	5,015	1,9 a 3,8% normal Acima de 4% elevado (Naum, Radispiel e Moraes[6])
B2	0,113	0,172	6,165	
B3	0,104	0,189	5,216	
B4	0,041	0,097	4,055	
B5	0,116	0,169	6,423	
B6	0,083	0,16	4,932	
B7	0,086	0,134	6,031	
B8	0,055	0,142	3,729	
B9	0,118	0,179	6,184	
B10	0,223	0,194	10,310	
B11	0,344	0,201	14,613	
B12	0,143	0,165	7,975	
B13	0,123	0,139	8,130	
B14	0,549	0,219	20,044	
B15	0,338	0,169	16,667	

Determinação da glicemia e colesterol total

As dosagens para glicemia e colesterol total dos voluntários não fumantes estão expressas na Tabela 3.

Em relação aos resultados de glicose, houve alguns voluntários que tiveram alterações. Os voluntários A2, A3, A13 e A14, apresentaram hiperglicemia. Sendo que nos dois primeiros (A2 e A3) não sugeriu ligação com o resultado de metemoglobina; os resultados dos voluntários A13 e A14, sugeriu ligação com os resultados de metemoglobina, uma vez que, estes estão acima do normal (elevado) para metemoglobina (A13 = 4,762% e A14 = 4,494%) e os pacientes não são fumantes.

Alguns voluntários apresentaram hipoglicemia, A9, A10 e A12 e não foi possível estabelecer ligação com os resultados de metemoglobina, pois não houve alterações.

Em relação ao colesterol total, houve apenas um indivíduo com resultado elevado para colesterol (A6) e, analisando suas informações, essa alteração não deve ser considerada pelo fato do voluntário ser um indivíduo hipercolesterolêmico. Quando comparado ao resultado de metemoglobina, observou-se que houve alteração, sugerindo ligação com o colesterol total.

Abaixo, na Tabela 4, estão apresentados os resultados de glicemia e colesterol total dos voluntários fumantes.

Para os resultados de glicemia, houve três alterações, os pacientes B6, B9 e B15 apresentaram hiperglicemia. O voluntário B6 se apresentou como usuário de medicamentos para tratamento de nódulo, por isso então, tal resultado não pode ser considerado, além de ter possíveis interferentes. Os pacientes B9 e B15 declara-

Tabela 3. Determinação de glicose e colesterol em voluntários não fumantes

Voluntário	Glicose mg/dL	Valor referência	Colesterol total mg/dL	Valor referência
A1	100,5		147	
A2	111,2		124	
A3	120,2		114	
A4	79,7		150	
A5	71		108	
A6	88		226	
A7	76	Normal de 65 a 99 mg/dL*	92	Desejável <170 mg/dL
A8	100		105	Limítrofe 170 a 199 mg/dL
A9	61		186	Elevado ≥ 200 mg/dL
A10	63		136	
A11	66		116,4	
A12	64		85	
A13	111		86	
A14	112		140,7	
A15	77		100,5	

* **Retirado de Instruções de Uso, Labtest – GLICOSE Liquiform**
** **Retirado de Instruções de Uso, Labtest – COLESTEROL Liquiform**

Tabela 4. Determinação de glicose e colesterol em voluntários fumantes

Voluntário	Glicose mg/dL	Valor referência	Colesterol total mg/dL	Valor referência
B1	73		237	
B2	82		124,3	
B3	65		143,5	
B4	94		126,6	
B5	100		156,5	
B6	264		176,2	
B7	88	Normal de 65 a 99 mg/dL*	110,3	Desejável <170 mg/dL
B8	65		165,4	Limítrofe 170 a 199 mg/dL
B9	228		144,9	Elevado ≥ 200 mg/dL**
B10	95		147	
B11	67		123	
B12	71		126	
B13	93		175	
B14	85		222	
B15	133		108	

Tabela 5. Análise descritiva e inferencial

Variáveis	Não fumantes (n=15)	Fumantes (n=15)	*p*
MetHb (%)	3,4±0,82	8,3±4,9	0,001
Glicose (mg/dL)	86,6±20,64	106,8±59,50	0,22
Colesterol total (mg/dL)	127,6±38,71	152,13±38,04	0,09

Dados expressos por meio de média ± desvio padrão.

ram que alterações glicêmicas eram comuns em seus exames de rotina.

Para os resultados de colesterol total houve apenas duas alterações, nos voluntários B1 e B14, que segundo informações fornecidas pelo voluntário B1, seria sedentário e com hábitos de má alimentação; o voluntário B14 relatou histórico anterior de alterações lipídicas em seus exames de rotina.

Na Tabela 5 observou-se a análise estatística dos resultados obtidos, sendo diferente significativamente para os valores de MetHb, quando comparado os grupos de fumantes e não fumantes. Essa diferença significativa não foi observada para as dosagens de glicose e colesterol total.

Baseado nos métodos utilizados para análise, não houve possibilidade de inferir qualquer relação entre a alteração de MetHb com alterações obtidas nos valores de glicose e colesterol total. Outras análises incluindo peso, idade, estilo de vida devem ser considerados para tal procedimento.

Quando comparadas as médias dos não fumantes em relação às dos fumantes, pode-se observar, que houve um aumento expressivo da porcentagem de MetHb nos fumantes (sendo significativamente maior), diferentemente do que é expresso na literatura, como o estudo publicado por Borland *et al.*[14], revelando que o nível de metemoglobina em não fumantes foi maior, do que nos fumantes. Porém, os resultados obtidos pela presente pesquisa, corroboraram com os dados observados por Imbriani, Melotti e Ghittori[15], apresentando porcentagem de MetHb maior em fumantes, quando comparados aos não fumantes.

Entretanto, é correto salientar que o uso de cigarro provoca alterações no organismo, como por exemplo, a resistência à insulina, acarretando em aumento de glicose na corrente sanguínea, além disso, sabe-se que a nicotina pode estimular a produção de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), aumentando o colesterol total[16]. Esses acontecimentos podem provocar as alterações aqui presenciadas nos voluntários tabagistas.

A dosagem de metemoglobina não é um exame comumente solicitado pela equipe médica, porém deveria ser levado em consideração no momento da anamnese do paciente, já que elevada porcentagem de MetHb no sangue pode causar alterações sintomáticas. Vieira, Magalhães e Pardal[17] sugerem a determinação de MetHb como rotina laboratorial, especialmente para pacientes que fazem uso de medicamentos oxidantes ou que são expostos a compostos químicos oxidantes de forma ocupacional.

Para os pacientes fumantes, por apresentarem maior susceptibilidade de desenvolverem o quadro de metemoglobinemia, devido ao uso excessivo do cigarro, a solicitação deveria ser adotada, pois, quadros leves de fadiga, cansaço e mal estar poderiam estar relacionados a essa elevação e passar desapercebido pelo médico.

O estudo realizado apresentou limitações importantes no que se diz respeito à ausência de informações dos voluntários, para poder comparar idade, peso, sexo, estilo de vida, entre outros, que dificultou maior conclusão e comparação entre os dados obtidos.

Conclusão

Através dos resultados obtidos para a dosagem de MetHb, pode-se observar que os voluntários fumantes apresentaram concentração significativamente maior de MetHb circulante, em relação aos voluntários não fumantes, sem apresentar alterações bioquímicas relevantes.

Agradecimentos

Os autores agradecem à farmacêutica Renata Melo e à biomédica Gisele Soares pelo apoio técnico. Os resultados são oriundos da Iniciação Científica do discente João Vitor da Silva, aprovada pelo Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Paulista (UNIP).

Referências

1. Kern K, Langevin PB. Methemoglobinemia after topical anesthesia with lidocaine and benzocaine for a difficult intubation. J Clin Anesth, 2000;12:167-72.

2. Rodwell VW. Proteínas: Estrutura e função. *In*: Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rowell VW. Harper: Bioquímica. 8ª ed. São Paulo; Atheneu, 1998. p. 41-62.

3. Lepera JS. Agentes metemoglobinizantes. *In*: Oga S. Fundamentos da toxicologia. 2ª ed. São Paulo: Atheneu; 2003. p. 163-74.

4. Dacie JV, Lewis SM. Practical Haematology. Oxford: Butterworth; 1995.

5. Silvério ACP, Souza FAP, Martins I. Determinação dos teores de carboxiemoglobina e metemoglobina em bolsas de sangue (Acesso 8 fev 2014). Disponível em http://www.cbtox2013.com.br/docs/trab-7975-208.pdf.

6. Naoum PC. Radiespiel J, Moraes MS. Dosagem espectrométrica de metemoglobina sem interferentes químicos ou enzimáticos. Rev Bras Hematol. Hemoter. 2004;26(1):19-22.

7. Farmacopeia Brasileira, 5. ed. Brasilia: Fiocruz; 2010. v. 1.

8. Costa LOO. Purificação de saponinas de extratos de *quilaia* usando fracionamento em coluna de espuma [dissertação de mestrado]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química; 1999.

9. Udeh C, Bittikofer J, Sum-Ping STJ. Severe methemoglobinemia on reeposure to benzocaine. J Clin Anesth. 2001;13:128-30.

10. Chui JSW, Poon WT, Chan KC, Chan AYW, Buckley TA. Nitrite-induced methaemoglobinaemia aetiology, diagnosis and treatment. Anaesthesia. 2005;60:496-500.

11. Yang JJ, Lin N, Lv R, Sun J, Zhao F, Zhang J, *et al*. Methemoglobinemia misdiagnosed as ruptured ectopic pregnancy. Acta Anaesthesiol Scand. 2005;49:586-8.

12. Barker SJ, Curry J, Redford D, Morgan S. Measurement of carboxyhemoglobin and methemoglobin by pulse oximetry. A human volunteer study. Anesthesiology. 2006;105:892-7.

13. Leeuwen JWV, Tromp J, Nauta H. Reduction of ferricytochrome c, methemoglobin and metmyoglobin by hydroxyl and alcohol radicals. Biochim Biophys Acta. 1979;577(2):394-9.

14. Borland C, Harmes K, Cracknell N, Mack D, Higenbottam T. Methemoglobin levels in smokers and non-smokers. Arch Environ Health. 1985;40(6):330-3.

15. Imbriani M, Melotti A, Ghittori S. Methemoglobin and carboxyhemoglobin levels in smokers and non smokers. G Ital Med Lav. 1987;9(1):11-4.

16. Pringol M, Marmentini NAG, Macedo SMD. Efeito do tabagismo sobre o perfil lipídico e suas implicações em detentos internos do Presídio Estadual de Erechim-RS. Rev Bras Anal Clin. 2007;39(1):p3-8.

17. Vieira JLF, Magalhães AFA, Pardal PPO. Valores de metemoglobina em um grupo de voluntários sadios. Rev Para Med. 2001. 15(3):37-40.

Endereço para correspondência:

Prof. Dr. Sandro Rostelato-Ferreira
Av. Independência, 210 – Éden
Sorocaba-SP, CEP 18087-101

E-mail: sandrorostelato@yahoo.com.br

Recebido em 27 de dezembro de 2015
Aceito em 20 de janeiro de 2016