

# Avaliação do ensaio quantitativo para metahemoglobina

---

**Simone Francisca Coelho DIONÍSIO, Marilena OSHIRO**  
*Núcleo de Hematologia e Bioquímica, Centro de Patologia,  
Instituto Adolfo Lutz*

---

A hemoglobina (Hb) é um tetrâmero formado por cadeias  $\alpha$  (alfa),  $\beta$  (beta),  $\gamma$  (gama) e  $\delta$  (delta). Cada cadeia da Hb é formada por um polipeptídeo globina ligado a um grupo prostético heme, anel de protoporfirina IX complexado com um único átomo de ferro (Fe) no estado ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ )<sup>1</sup>. A metahemoglobina (metaHb) é uma forma de Hb oxidada, cujo Fe está na forma férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ), incapaz de se ligar ao  $\text{O}_2$ . Essa impossibilidade de fixar o oxigênio e de transportá-lo promove a mudança na cor vermelha do sangue para uma tonalidade marrom (cor de chocolate)<sup>2</sup>.

Diariamente, nos indivíduos normais, pequena parte da hemoglobina contida nos eritrócitos sofre auto-oxidação e é transformada em metahemoglobina. Porém, o organismo dispõe de sistemas enzimáticos redutores que mantêm a concentração da metahemoglobina dentro dos valores aceitáveis, entre 1 e 2%. Mas, quando há um desequilíbrio neste sistema redox, tanto de oxidação excessiva da hemoglobina quanto

das deficiências enzimáticas redutoras, pode-se desenvolver uma condição clínica conhecida como metemoglobinemia<sup>3</sup>.

A metamoglobinemia pode ser de origem congênita devido à deficiência enzimática como, por exemplo, o citocromo b5 redutase ou por alteração na estrutura da hemoglobina como a hemoglobina M, ou adquirida, a forma a mais frequente, provocada por indução tóxica-oxidativa por fármacos ou compostos químicos.

A avaliação da concentração de metahemoglobina é um exame utilizado mais como um marcador biológico de processos oxidativos, principalmente na Toxicologia Ocupacional. A Norma Regulamentadora nº 7 (NR-7), da Portaria nº 24/94 do Ministério do Trabalho, cita a obrigatoriedade da realização desse exame, periodicamente, nos trabalhadores expostos à anilina e ao nitrobenzeno.

A técnica pioneira na determinação da metaHb foi descrita por Evely e Malloy em 1938. Posteriormente, surgiram outras, com adaptações que buscavam a melhoria analítica

e até minimizar ou inutilizar substância de alta toxicidade como os derivados de cianeto, utilizadas na técnica original.

O presente trabalho avaliou a precisão intra-ensaio e intermediária da técnica de Evely e Malloy, porém modificada por Beutler et al (1995). Foi avaliada a estabilidade da amostra, variando o tempo e temperatura do armazenamento e, também, a influência da homogeneização da amostra na dosagem da metahemoglobina.

Os resultados obtidos estão consignados nas Tabelas 1, 2, 3 e 4.

**Tabela 1.** Resultado do teste da precisão intra-ensaio do método modificado por Beutler et al. para a dosagem de metahemoglobina, expresso em porcentagem (%)

| Ensaio (n) | Amostra 1 | Amostra 2 | Amostra 3 | Amostra 4 |
|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1          | 0,37      | 0,38      | 0,34      | 0,35      |
| 2          | 0,35      | 0,35      | 0,35      | 0,35      |
| 3          | 0,34      | 0,35      | 0,33      | 0,35      |
| 4          | 0,34      | 0,34      | 0,34      | 0,35      |
| 5          | 0,34      | 0,37      | 0,35      | 0,36      |
| 6          | 0,37      | 0,37      | 0,34      | 0,35      |
| 7          | 0,36      | 0,35      | 0,33      | 0,35      |
| 8          | 0,36      | 0,35      | 0,33      | 0,35      |
| 9          | 0,36      | 0,36      | 0,34      | 0,35      |
| 10         | 0,37      | 0,35      | -         | 0,35      |
| Média      | 0,356     | 0,357     | 0,34      | 0,351     |
| Dp         | 0,013     | 0,013     | 0,01      | 0,003     |
| CV         | 3,553     | 3,506     | 2,31      | 0,90      |

A avaliação da precisão analítica indicou uma boa reprodutibilidade do método. A média

do coeficiente de variação (CV) da precisão intra-ensaio, Tabela 1, foi de 2,57% e da precisão intermediária foi de 2,46%.

**Tabela 2.** Valores da metaHb (%) obtidos das amostras armazenadas em temperatura entre 6 e 8°C de acordo com o tempo de coleta

| Ensaio | Logo após a coleta (Fresca) | Após 24h | Após 48h | Após 72h |
|--------|-----------------------------|----------|----------|----------|
| 1      | 0,37                        | 0,38     | 0,36     | 0,32     |
| 2      | 0,35                        | 0,35     | 0,34     | 0,33     |
| 3      | 0,34                        | 0,35     | 0,34     | 0,33     |
| 4      | 0,34                        | 0,34     | 0,34     | 0,35     |
| 5      | 0,34                        | 0,37     | 0,34     | 0,69     |
| 6      | 0,37                        | 0,37     | 0,36     | 0,34     |
| 7      | 0,36                        | 0,35     | 0,35     | 0,69     |
| 8      | 0,36                        | 0,35     | 0,35     | 0,35     |
| 9      | 0,36                        | 0,36     | 0,35     | 0,36     |
| 10     | 0,37                        | 0,35     | 0,36     | 0,34     |
| Média  | 0,356                       | 0,357    | 0,349    | 0,41     |
| Dp     | 0,013                       | 0,013    | 0,009    | 0,148    |
| CV     | 3,553                       | 3,506    | 2,509    | 36,103   |

**Tabela 3.** Comparação dos valores da metaHb (%) nas amostras que permaneceram em repouso e naquelas submetidas à homogeneização

|       | Sem homogeneização | Com homogeneização (24hs) |
|-------|--------------------|---------------------------|
| n     | 10                 | 10                        |
| Média | 0,693              | 2,529                     |
| Dp    | 0,007              | 0,036                     |
| CV    | 0,974              | 1,412                     |

p<0,0001

**Tabela 4.** Comparação dos valores da metaHb (%) nas amostras armazenadas em temperatura entre 4 e 8°C e temperatura ambiente (TA), por 24 horas após a coleta

|       | Entre 4° e 8°C | TA (média de 22°C) |
|-------|----------------|--------------------|
| n     | 6              | 6                  |
| Média | 0,349          | 0,552              |
| Dp    | 0,0087         | 0,2065             |
| CV    | 2,51           | 37,44              |

$p < 0,0068$

Os dados apresentados nas tabelas 2, 3 e 4 demonstram que os fatores: tempo de coleta, temperatura de armazenamento e manuseio das amostras podem influenciar na dosagem da metahemoglobina. Após 72 horas da coleta, mesmo sendo armazenadas em temperatura entre 4 e 8 °C, ocorreu uma variabilidade alta (CV de 36%) nas análises. A mesma observação foi verificada nas amostras que ficaram armazenadas em temperatura ambiente (CV de 37,4%) por 24 horas (Tabela 4).

É possível que fatores como tempo, temperatura e manuseio favoreçam a formação de radicais livres e danos oxidativos aos eritrócitos. As enzimas eritrocitárias que atuam nas defesas oxidativas, bem como aquelas que atuam na conversão da metaHb, poderiam sofrer danos por conta desses fatores, contribuindo no aumento da metHb e na instabilidade das amostras.

Através dos dados apresentados neste trabalho, podemos concluir que a técnica de Evelyn e Malloy modificada por Beutler et al (1995)<sup>4</sup> apresenta uma precisão adequada, desde que as amostras fiquem armazenadas em temperatura entre 4 e 8°C e sejam pouco manuseadas. Foi possível também, definir a

temporalidade das amostras, viáveis por até 48 horas após a coleta.

A avaliação laboratorial da metahemoglobina tem grande relevância não só para cumprir a legislação trabalhista, mas também porque existem inúmeras substâncias químicas e farmacológicas que são metemoglobinizantes<sup>5</sup>. Assim, o laboratório clínico tem o compromisso de produzir resultados de exames que sejam úteis para se fazer corretamente um diagnóstico, prognóstico, acompanhamento de terapia, da evolução e prevenção das enfermidades<sup>6</sup>, daí a importância de se avaliar as técnicas laboratoriais utilizadas, e definir melhor as condições de armazenamento e temporalidade das amostras.

## REFERÊNCIAS

1. Nascimento TS, Pereira RO, Mello HLD, Costa J. Metahemoglobinemia: do diagnóstico ao tratamento. Rev Bras Anesthesiol. 2008; 58(6):651-64.
2. Naoum PC. Metahemoglobinas. [Acesso em 29 de outubro de 2009.]. Disponível em: [http://www.hemoglobinopatias.com.br/metahb/metahb-index.htm]
3. Naoum PC, Radispiel J, Moraes MS. Dosagem espectrométrica de metahemoglobina sem interferentes químicos ou enzimáticos. Rev Bras Hematol Hemoter. 2004; 26(1):19-22.
4. Willians JK, Beutler E, Erslev AL, Rundles, RW. Hematologia. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 1976. p.1179.
5. Camargo TM, Alves MIF, Oliveira, SJO, Shitara ES, Oshima-Franco Y. Estudo comparativo entre duas técnicas de dosagem de metahemoglobina (MHb). Rev Bras Anal Clin. 2007; 39(2): 95-8.
6. Lopes HJJ. Garantia e Controle de Qualidade no Laboratório Clínico. Gold Analisa Diagnóstica Ltda. Belo Horizonte, MG: 2003. [Acesso em: 01 de novembro de 2009]. Disponível em: [www.goldanalisa.com.br].