



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

HELOÍSA HELENA FONSECA DE LIMA SARAIVA

INFLUÊNCIA DO TEMPO NA DOSAGEM DE GLICEMIA NO PLASMA FLUORETO
E PLASMA EDTA

BRASÍLIA, 2012

HELOÍSA HELENA FONSECA DE LIMA SARAIVA

INFLUÊNCIA DO TEMPO NA DOSAGEM DE GLICEMIA NO PLASMA FLUORETO
E PLASMA EDTA

Trabalho de conclusão de curso,
apresentado no formato de artigo
científico ao UNICEUB como requisito
parcial para a conclusão do Curso de
Bacharelado em Biomedicina.

Orientadora: Tania Cristina Santos Andrade

BRASÍLIA, 2012

Influência do tempo na dosagem de glicemia no plasma Fluoreto e plasma EDTA

HELOÍSA H F DE LIMA SARAIVA*; TANIA CRISTINA SANTOS ANDRADE**

Resumo

A dosagem da glicemia é empregada para estudo do metabolismo da glicose tanto no controle de produção, consumo e também no armazenamento, assim podem ser diagnosticados os diversos estados de hiperglicemia e hipoglicemia, podendo ser medidos por exames laboratoriais utilizando sangue venoso. É visto que após a coleta do sangue, as células sanguíneas continuam a degradar a glicose gerando um decréscimo de aproximadamente 10mg/dL por hora à temperatura ambiente a não ser que se adicione um preservativo, sendo o fluoreto o mais indicado por ser inibidor da glicólise. Este estudo teve por objetivo comparar o uso de dois anticoagulantes diferentes (fluoreto e EDTA) para avaliar a estabilidade da glicemia em temperatura ambiente e ainda correlacionar as glicemias obtidas para os dois tipos de anticoagulantes determinando a diferença entre elas devido ao fator de tempo. Para a realização do trabalho foram coletadas 30 amostras de sangue total por punção venosa de voluntários de ambos os sexos sem restrição de idade e sem necessidade de jejum. Os resultados obtidos confirmaram que na primeira hora houve a queda de aproximadamente 10mg/dL para os dois anticoagulantes utilizados, seguido de estabilização com o anticoagulante fluoreto e um decréscimo progressivo com o uso do anticoagulante EDTA. Isto concorda com o fato de que o tempo é um fator determinante na dosagem da glicemia influenciando na estabilidade da amostra e na confiabilidade dos resultados podendo gerar resultados não verdadeiros.

Palavras Chave: Glicose. Glicemia. Dosagem. Influência. Tempo. Fluoreto. EDTA. Plasma.

* Graduada do curso de Biomedicina do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB

** Bióloga. Especialista em Análises Clínicas. Mestre em Biologia Molecular. Professora do UniCEUB, FACES

Influence of time in blood glucose determination of fluoride plasma and EDTA plasma

Abstract

The blood glucose level is used to study glucose metabolism in production control, consumption and also on storage, and may be diagnosed various states of hyperglycemia and hypoglycemia, and can also be measured by laboratory tests using venous blood. It seems that after blood collection, blood cells continue to degrade glucose generating a decrease of about 10mg/dL hour at room temperature unless a preservative is added, and Fluoride is the most suitable for inhibiting glycolysis. This study aimed to compare the use of two different anticoagulants (EDTA and fluoride) to evaluate the stability of blood glucose at room temperature and correlate the glucose levels obtained for both types of anticoagulants determining the difference between them due to the time factor. To conduct the study were collected blood of 30 volunteers by venipuncture of both sexes without age restriction and no need for fasting. The results confirmed that in the first hour there was a decrease of about 10mg/dL to both anticoagulant used followed by stabilization with the anticoagulant fluoride and a progressive decrease with use of EDTA. This agrees with the fact that time is a factor in influencing blood glucose levels in the sample stability and reliability of the results and may cause false results.

Key words: Glucose. Glycemia. Dosage. Influence. Time. Fluoride. EDTA. Plasma.

1 Introdução

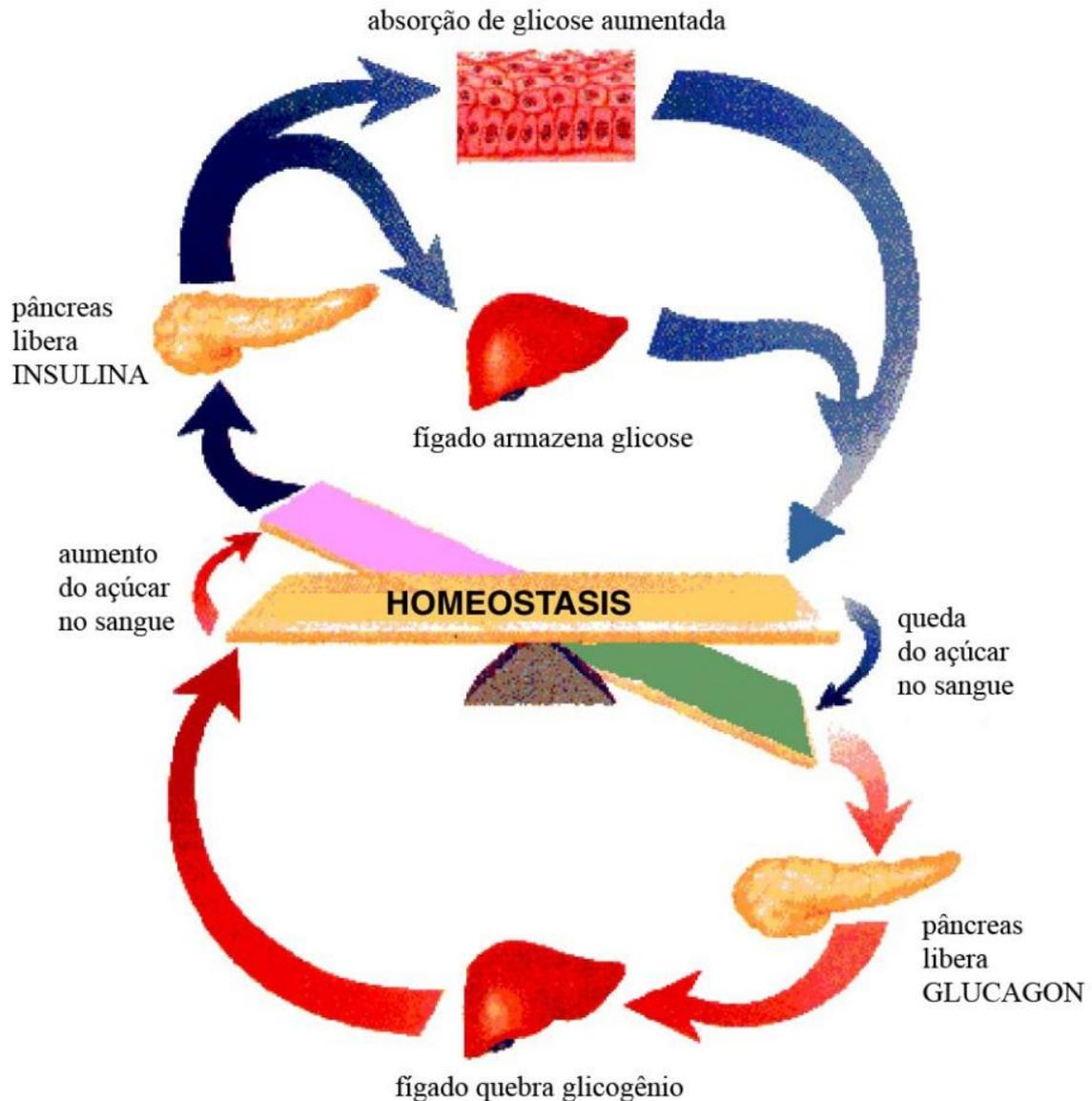
A glicose é a principal fonte de energia para o organismo humano. É derivado da degradação dos carboidratos provenientes da alimentação e das reservas corporais (glicogênio) (BURTIS; ASHWOOD, 1998).

A glicemia é o nível de glicose que está presente no sangue. Para ser considerada normal, deve estar na faixa entre 70mg/dL e 99mg/dL em jejum (SBD, 2012).

No metabolismo celular, a interação dos hormônios insulina e glucagon fazem com que ocorra o inteiro aproveitamento da glicose para que esta seja absorvida e transformada em energia (SERÔDIO; CARVALHO; MACHADO, 2008). As medições deste parâmetro são importantes na detecção e prevenção da hiperglicemia e da hipoglicemia.

O nível de glicemia depende primariamente do fígado, que exerce seus efeitos sobre a homeostasia da glicose sanguínea através da glicogênese e da glicogenólise (Figura 1). Na hiperglicemia, a insulina é secretada pelo pâncreas, aumentando o transporte de glicose para o interior das células musculares e tecido adiposo produzindo energia. E também age no fígado, promovendo a armazenagem de glicose em forma glicogênio (glicogênese). Na hipoglicemia, o glucagon, outro hormônio secretado pelo pâncreas, age quebrando o glicogênio armazenado no fígado havendo a liberação de glicose no sangue (glicogenólise) (RAVEL, 1997).

Figura 1: Esquema básico da homeostasia da glicose sanguínea.



Fonte: FARIA; SILVA; OLIVEIRA, 2004.

A avaliação da glicemia é empregada para estudo do metabolismo da glicose tanto no controle de produção, no consumo e também no armazenamento, assim podem ser diagnosticados os diversos estados de hiperglicemia e hipoglicemias. (SERÔDIO; CARVALHO; MACHADO, 2008). É medida através de exames realizados em laboratório utilizando sangue venoso ou através de exame realizado em um glicosímetro, com sangue capilar (BORGES; ANDRADE, 2009).

Os métodos de análise preferidos são os enzimáticos por serem exatos, precisos, baratos e podem ser facilmente automatizados. A glicose oxidase é a mais

usada, mas enzimas como a hexoquinase e a glicose desidrogenase também podem ser utilizadas (GROSS et al., 2002).

Após a coleta do sangue, as células presentes como eritrócitos, leucócitos e plaquetas continuam a degradar a glicose para que possam atender suas necessidades energéticas, explicando assim a importância do tempo entre a coleta de sangue e a determinação da glicemia, considerando que, a cada hora de permanência da amostra em temperatura ambiente, os valores da glicemia diminuem cerca de 10mg/dL, a não ser que se adicione um preservativo, sendo o fluoreto o mais indicado por ser um inibidor da glicólise (RAVEL, 1997).

O fluoreto é considerado como um conservador para a glicose, pois inibe a enzima enolase impedindo assim a glicólise e por consequência previne a degradação da glicose (LABTEST, 2011). A inibição deve-se a formação de um complexo iônico constituído de Mg^{+2} , fosfato inorgânico e íons fluoreto. O fluoreto também é considerado um anticoagulante fraco, pois se liga ao cálcio, fazendo com que a coagulação ocorra depois de várias horas, por isso é aconselhado a associação do fluoreto com o oxalato de potássio ou EDTA na concentração de aproximadamente 2mg/mL de sangue para impedir a coagulação tardia (BURTIS; ASHWOOD, 1998). E se for utilizado o fluoreto isoladamente são necessários concentrações três a cinco vezes maiores (RAVEL, 1997).

Se o plasma for separado dentro de 60 minutos após a coleta, não se torna necessário o uso do fluoreto nas análises de rotina, enfatizando que quantidades marcadamente elevadas de leucócitos podem produzir diferenças de até 65mg/dL após 1 a 2 horas na amostra não estabilizada (BURTIS; ASHWOOD, 1998).

A glicose também pode ser avaliada em amostras de plasma coletadas com EDTA. O EDTA funciona como anticoagulante bloqueando o cálcio ionizado através de reação química com formação de complexo insolúvel EDTA-Ca (DOLES, 2007) muito utilizado em exames hematológicos. Esse complexo tem por objetivo preservar as células sanguíneas mantendo assim o consumo de glicose por elas e proporcionando um decréscimo conforme o tempo. Na sua composição não há nenhum inibidor da glicólise então, para que possa ser feito a dosagem de glicose, o intervalo entre a coleta e a determinação da glicemia deve ser o menor possível para

que não haja interferência no resultado, podendo indicar que o paciente não precisa de uma medicação imediata que é de extrema importância em casos de hiperglicemias (MOTTA, 2003).

Além das dosagens plasmáticas há também a opção da dosagem sérica, muito utilizada na rotina laboratorial. Porém, também é relatado a diminuição da glicose em 5 a 7% em 1h equivalente a 5 a 10mg/dL no sangue coagulado e não-centrifugado à temperatura ambiente (BURTIS; ASHWOOD, 1998). No soro, quando separado as células antes de 2h, os valores da glicose sérica permanecem estáveis por um período de até 24h em temperatura ambiente (RAVEL, 1997).

A partir destes dados de interferência do tempo, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a estabilidade de material para a dosagem de glicemia em amostras de plasma com uso de dois anticoagulantes diferentes, fluoreto e EDTA. E ainda correlacionar as glicemias obtidas para os dois tipos de anticoagulantes e determinar a diferença de glicemia entre eles devido ao fator de tempo.

2 Metodologia

2.1 Comitê de Ética em Pesquisa

Este estudo foi submetido e homologado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do UniCEUB sendo registrado com o protocolo CAAE 02762212.7.0000.0023.

Todos os voluntários leram, concordaram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participação neste projeto.

2.2 Coleta e Dosagem

Foram coletadas 30 amostras de sangue total de voluntários de ambos os sexos sem restrição de idade e sem necessidade de jejum.

As amostras foram coletadas por punção venosa com seringa descartável de 10mL. O sangue foi distribuído em tubos contendo o EDTA como anticoagulante e o restante em tubos de fluoreto como anticoagulante. Os tubos de coleta são comercializados pela Vacutainer® e já possuem os anticoagulantes na quantidade e concentração adequadas para 5mL de sangue.

Antes de processar as amostras, os tubos foram centrifugados para a obtenção do plasma sanguíneo e a partir daí foram feitas dosagens de glicemia logo após a coleta e em intervalos de tempo de uma hora para analisar a estabilidade da glicose na temperatura ambiente. Depois de cada dosagem o sangue foi novamente homogeneizado e centrifugado antes do próximo tempo.

A dosagem de glicemia plasmática foi realizada pelo método enzimático colorimétrico, com utilização das enzimas Glicose Oxidase (GOD) e Peroxidase (POD), disponível no kit DOLES e foi feita a leitura de absorvância das amostras em 510nm com a utilização do espectrofotômetro que tem por função passar um feixe de luz através da amostra e fazer a medição da intensidade da luz que atinge o detector. O espectrofotômetro compara quantitativamente a fração de luz que passa através de uma solução de referência e uma solução de teste.

Após os resultados, as amostras foram descartadas de acordo com as regras do Labocien para descarte de material biológico.

2.3 Análise Estatística

Para a organização dos dados foi utilizada uma Planilha do programa Microsoft® Office Excel 2010 para os cálculos de médias, percentuais e geração de gráficos.

A análise estatística foi realizada pelo programa GraphPad Prism® (versão 6). Foi utilizado o teste t-Student, não-pareado, considerando o índice de $p < 0,05$ para significância estatística.

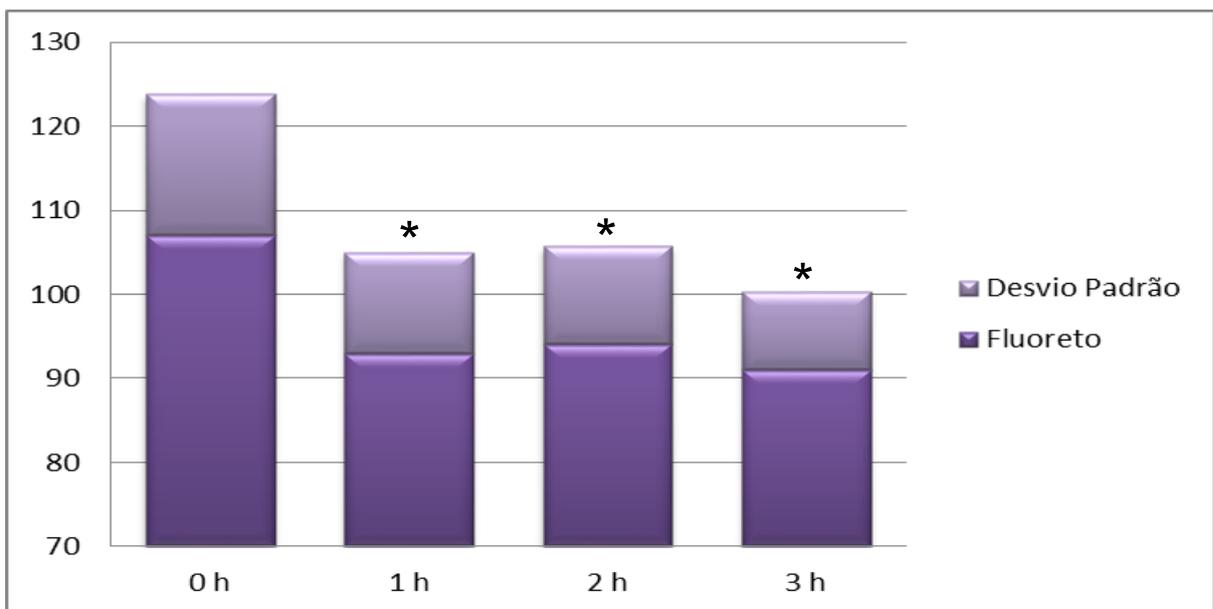
3 Resultados e Discussão

Os resultados obtidos dos 30 voluntários mostrou que realmente houve uma diminuição progressiva da glicemia quando feita em tubos contendo EDTA como anticoagulante, conforme mostrado na tabela 2. Enquanto em tubo contendo fluoreto como anticoagulante houve uma pequena queda na primeira hora que se manteve até o final (Tabela 1).

Tabela 1: Resultados de glicemia obtidos com plasma Fluoreto

	Média da Glicemia (mg/dL)	Desvio Padrão	Diferença para o tempo 0h (%)
Controle (0h)	107	±16,8	---
1h	93	±12,0	13
2h	94	±11,7	12
3h	91	±9,3	15

A tabela 1 mostra que na primeira hora houve uma queda de 13% mas que se estabilizou nas próximas dosagens. Resultando então uma maior confiança de se liberar um resultado verdadeiro mesmo após três horas da coleta do sangue e não ter feito a separação do plasma das células sanguíneas. Esse resultado já era esperado, pois o anticoagulante utilizado foi o fluoreto que é o indicado para esse tipo de exame por funcionar como inibidor da glicólise. Esta análise foi usada como controle do máximo aceitável de queda glicêmica que podemos ter em uma avaliação laboratorial.

Figura 2: Gráfico comparativo das médias das glicemias obtidas nas amostras com Fluoreto

* $p < 0,05$ (comparado ao tempo 0h)

Na figura 2, observamos uma queda na avaliação glicêmica nos tempos 1h, 2h e 3h quando comparados ao resultado obtido na avaliação imediata (0h). Esta diferença foi estatisticamente significativa no teste usado, apresentando os valores de $p=0,0017$, $p=0,0033$ e $p=0,0002$ respectivamente. Porém, não houve queda entre os tempos 1h e 2h, mostrando estabilidade desta amostra se for usada neste intervalo, mesmo sendo mantida à temperatura ambiente. Esta estabilidade foi mostrada pela análise estatística, onde os valores foram considerados iguais ($p=0,9365$). No intervalo de 2h para 3h, houve novamente uma pequena queda na avaliação glicêmica, mas que, pelo teste estatístico, esta variação não foi considerada significativa ($p=0,4483$). Assim como no intervalo de 1h para 3h também não foi visto diferença significativa pelo teste estatístico ($p=0,4734$).

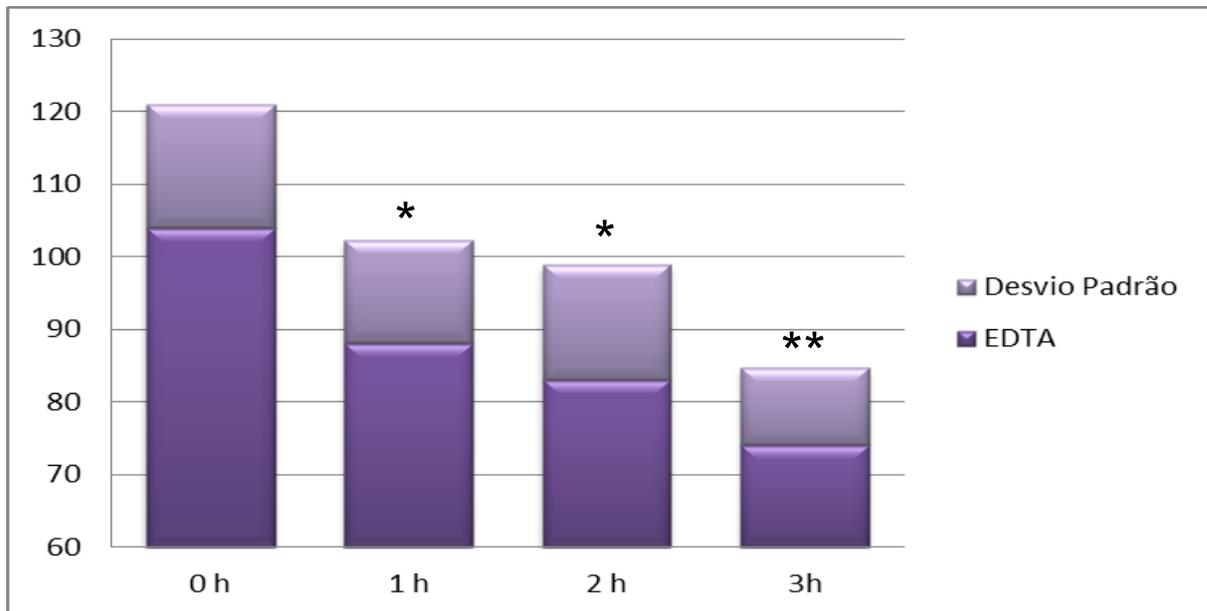
Como a avaliação glicêmica tem valores diagnósticos bem definidos, esta variação pode ser importante e, portanto seria melhor que as amostras com fluoreto fossem usadas até a primeira hora após a coleta, mas o estudo mostra que após esses 60 minutos há uma queda glicêmica importante, porém se mantém estável após as outras horas. Talvez esta estabilidade aumente com a amostra sendo refrigerada, mas isto não foi testado neste trabalho.

Tabela 2: Resultados de glicemia obtidos com plasma EDTA

	Média da Glicemia (mg/dL)	Desvio Padrão	Diferença para o tempo 0h (%)
Controle (0h)	104	$\pm 17,0$	---
1h	88	$\pm 14,2$	15
2h	83	$\pm 15,9$	20
3h	74	$\pm 10,7$	28

Conforme observamos na tabela 2, a diminuição dos resultados da glicemia nas amostras com EDTA foram progressivos, a cada hora houve uma diferença no resultado conferindo um resultado não-verdadeiro. O que era para ser um resultado 104mg/dL passou a ser 74mg/dL após três horas havendo uma diferença de 28% do resultado inicial. Essa diferença se torna importante na clínica, quando há um paciente pré-diabético, por exemplo, e que acaba sendo considerado na faixa de normalidade por um resultado falsamente diminuído.

Figura 3: Gráfico comparativo das médias das glicemias obtidas nas amostras com EDTA



* $p < 0,05$ (comparado ao tempo 0h).

** $p < 0,05$ (comparado ao tempo 0h, 1h e 2h).

Na figura 3, observamos uma queda na avaliação glicêmica nos tempos 1h, 2h e 3h quando comparados ao resultado obtido na avaliação imediata (0h). Esta diferença foi estatisticamente significativa no teste usado. Apresentando resultados de $p=0,0009$, $p<0,0001$ e $p<0,0001$ respectivamente. Ao contrário das amostras com fluoreto, nesta avaliação a queda glicêmica continuou após a primeira hora, dado confirmado pela análise estatística que mostrou diferenças significativas entre os tempos 1hx3h ($p=0,0029$) e 2hx3h ($p=0,0374$). Somente na análise 1hx2h foi mostrada uma semelhança nos dados ($p=0,4208$).

Isto concorda com o fato que, tanto estatisticamente quanto clinicamente, a diferença é significativa, sendo importante quando esses valores são aplicados à clínica. Principalmente quando se trata de avaliação glicêmica, onde os valores diagnósticos para pré-diabéticos e diabéticos são bem definidos. Assim, uma diferença de 28%, como encontrada na amostra com EDTA, pode levar a laudos incorretos.

Como descrito na literatura por Ravel (1997), na primeira hora é visto que há uma queda do valor da glicemia em torno de 10mg/dL, e essa diferença também foi vista utilizando o anticoagulante indicado com o inibidor da glicólise em sua composição. Observamos, porém, que com o uso do anticoagulante fluoreto, houve a queda no resultado na primeira hora, mas se manteve estável nas próximas dosagens. Já no anticoagulante EDTA houve essa queda inicial de 16mg/dL e não houve estabilização, com aumentos progressivos nas dosagens seguintes.

Picheth e seus colaboradores (2001) relataram em sua pesquisa que o íon fluoreto inibe a enzima enolase, a oitava enzima da via glicolítica. Por não atuar no início da via glicolítica, a estabilização dos níveis de glicose é retardada em cerca de 3 horas após o início da ação deste agente e mantidos estáveis por até 24 horas. Isto concorda com os resultados, onde houve uma queda glicêmica inicial e estabilização dos valores seguintes. Porém, a estabilização já aconteceu a partir da primeira hora e não depois de três horas, como cita Picheth e colaboradores.

Em um estudo também comparativo entre a utilização de plasma fluoreto e plasma EDTA (ALENCAR, 2008) também foram encontrados valores que mostram que o plasma EDTA apresenta uma queda glicêmica considerável (1-4h: 41%), mostrando a semelhança com o presente estudo (0-3h: 28%), concordando com o fato de que a queda é continuamente progressiva, pois no estudo de Alencar foi feita uma dosagem em uma hora a mais (4 horas). Conferindo também os resultados do plasma fluoreto que mostrou (1-4h: 20%) estando próximo ao valor obtido em nosso estudo (0-3h: 15%), confirmando a maior estabilidade da amostra em mais uma hora à temperatura ambiente.

4 Conclusões

Foi proposto um estudo comparativo entre dois anticoagulantes (Fluoreto e EDTA) com a finalidade de verificar a estabilidade da amostra sanguínea em temperatura ambiente frente ao tempo de análise após a coleta.

O presente trabalho constatou que o tempo é um fator determinante quando se refere à dosagem glicêmica, podendo influenciar na estabilidade da amostra e na confiabilidade dos resultados. Foi possível comparar que para os dois

anticoagulantes utilizados houve uma diminuição da glicemia em relação ao tempo devido à glicólise.

Analisando os dados obtidos, pode ser concluído que as amostras que forem analisadas em um curto período de tempo, até 60 minutos, podem ser utilizadas tanto o tubo contendo anticoagulante fluoreto quanto o tubo contendo anticoagulante EDTA, pois a diferença percentual foi consideravelmente pequena.

Já amostras que requerem um tempo maior para análise após a coleta, ou necessite de transporte, o uso do anticoagulante fluoreto se torna importante, pois ele se mantém estável após o decréscimo da primeira hora, conferindo um resultado confiável após os 60 minutos, reduzindo a liberação de resultados falsamente diminuídos.

Em laboratório de rotina clínica, ocorre com frequência a necessidade do uso de amostras com EDTA para avaliações bioquímicas, quando não há amostra suficiente coletada como soro. Porém em especial, a dosagem glicêmica necessita do cuidado de não ultrapassar esses 60 minutos para que a perda da glicemia seja a menor possível.

Referências Bibliográficas

ALENCAR, C. S. **Estudo comparativo de fluoreto de potássio, EDTA e ausência de anticoagulante relacionado ao tempo em exames de glicemia**. 2008. 46 f. Monografia (Graduação), Centro Universitário de Brasília, Brasília.

BORGES, B. C.; ANDRADE, T. C. Estudo comparativo entre os níveis de glicemia venosa e capilar. **Universitas: Ciências da Saúde**, Brasília, v. 7, n. 2, p. 29-37, 2009.

BURTIS, C. A.; ASHWOOD E. R. **Tietz Fundamento de Química Clínica**, 4^a Ed, Editora Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1998.

DOLES. Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratório, **Anticoagulante Glicose**, 2007.

FARIA, A. G. A.; SILVA, C. B. R.; OLIVEIRA, M. P. **Diabetes Mellitus: um guia básico para os leigos**. Universidade Federal de São Paulo – Escola de Medicina Paulista, 2004. Disponível em: < <http://www.virtual.epm.br/material/tis/curr-bio/trab2004/2ano/diabetes/metabolismo.htm>> Acesso em: 26/7/2012.

GROSS, J. L. et al. Diabetes Melito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. vol. 46, n. 1, p. 16-26, 2002.

LABTEST. **Amostras e critérios de uso: Anticoagulantes**, 2011.

MOTTA, V. T. **Bioquímica Clínica para Laboratório: princípios e interpretações**, 4^a Ed, Editora Médica Missau: Porto Alegre, 2003.

PICHETH, G. et al. Plasma-fluoretado comparado ao soro na determinação da glicose sanguínea. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 33, n. 4, p. 167-170, 2001.

RAVEL, R. **Laboratório Clínico: Aplicações Clínicas dos Dados Laboratoriais**. 6ª Ed, Editora Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1997.

SBD – Sociedade Brasileira de Diabetes. **Valores de glicemia para o diagnóstico de diabetes**. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/exames/525>> Acesso em: 15/04/2012.

SERÔDIO, A. T.; CARVALHO, C. B.; MACHADO, J. A. Glicemia em cães (*Canis familiaris*) com glucômetro digital portátil e teste laboratorial convencional. **Jornal Brasileiro de Ciência Animal**, v. 1, n. 1, p. 25-34, 2008.