

Desenvolvimento de *kits* para análise de níveis de glicemia em pacientes com suspeita de diabetes *mellitus*

Joana Paula Menezes Biazus

São Cristóvão – SE [Brasil]
joana_biazus@yahoo.com.br
biazzusjp@gmail.com

Roberto Rodrigues de Souza

São Cristóvão – SE [Brasil]
rrsouza@ufs.br

José Carlos Curvelo Santana

Campinas – SP [Brasil]
jccurvelo@yahoo.com.br

Neste trabalho, reúnem-se os métodos do DNS e de Molish na determinação do conteúdo de glicose no sangue, para obter dois *kits* de análise sanguínea de baixo custo e boa precisão que possam substituir os métodos atuais de diagnóstico de hiperglicemia. Pelos resultados, constatou-se que o método do DNS apresentou erros inferiores a 5% em suas análises, sendo, portanto, um método confiável de análise de glicose. O método de Molish, de fácil manuseio, usa reagentes de baixo custo, com resposta rápida, e pode ser facilmente manuseado pelos médicos em seus consultórios, possibilitando um diagnóstico rápido da hiperglicemia. Verificou-se a viabilidade desses métodos, por apresentarem precisão, exatidão e baixo custo em relação aos sugeridos pela OMS e ADA.

Palavras-chave: Diabetes *mellitus*. Glicose. Método do DNS. Método de Molish. Sangue.



1 Introdução

O diabetes *mellitus* representa um grupo das doenças de origem heterogêneas, caracterizadas pela hiperglicemia crônica e por outras anormalidades metabólicas em razão da deficiência de insulina. Esse distúrbio envolve o metabolismo da glicose, das gorduras e das proteínas e acarreta graves conseqüências. É considerado, atualmente, um importante problema de saúde pública em razão de sua crescente prevalência e pelas complicações crônicas micro e macrovasculares, que geram elevados custos, diretos e indiretos, o que compromete a produtividade e a qualidade de vida de seus portadores, além de provocar o aumento da taxa de morbimortalidade (GROSS et al., 2002; KUZUYA et al., 2002; MOTTA e BENNATI, 2005; PAIVA, 2001).

O diagnóstico correto e precoce do diabetes *mellitus* e das alterações da tolerância à glicose é extremamente importante, porque permite a adoção de medidas terapêuticas que possam evitar o aparecimento de diabetes nos indivíduos com tolerância diminuída, além de retardar o surgimento de complicações crônicas nos pacientes diagnosticados como portadores desse distúrbio (AFFONSO et al., 2003; GROSS et al., 2002; PASSOS et al., 2005; KATZ et al., 2002).

Diversos estudos de diagnósticos são realizados tendo como base os métodos da glicose plasmática de jejum e pós-TOTG (Teste Oral de Tolerância à Glicose); entretanto, ainda há controvérsias com relação à sua precisão e eficiência. Isso porque, dependendo do tipo e do grau de risco que a análise requeira, pode-se preferir um método a outro, em razão de critérios como sensibilidade, dispêndio e morosidade (GABBAY et al., 2003; KATZ et al., 2002; KUZUAYA et al., 2002; MOTTA; BENNATI, 2005; PASSOS et al., 2005).

Esses são métodos-padrão, e a maioria de seus reagentes é importada e tem preço elevado (GABBAY et al., 2003; KUZUAYA et al., 2002; PAIVA, 2001); por isso, encontrar um método que seja eficiente, de fácil manipulação, e apresente resultados rápidos e com baixo custo seria um grande avanço em análises clínicas, pois reduziria o tempo de descoberta e os gastos com o diabetes. Além disso, se o diagnóstico for feito com antecedência, mais eficiente e rápido será o tratamento.

Um dos métodos de determinação de glicose em amostras líquidas mais utilizados no mundo é o do ácido di-nitro salicílico (DNS), descoberto no fim da década de 1950 (MILLER, 1959). Ele tem como base a leitura da absorbância a 540 nm do complexo formado a quente pela glicose com o DNS. Esse complexo dá à solução um tom tão vermelho quanto maior a quantidade de glicose aplicada (MILLER, 1959; NIRMALA e MURALIKRISHNA, 2003; REGULY, 1996; WANDERLEY et al., 2004). Outro método de determinação de glicose em amostras líquidas é o de Molish, que consiste na ação desidratante do ácido sulfúrico concentrado sobre os hidratos de carbonos que, reagindo com o α -naftol, produzem compostos coloridos (HIRANO et al., 2001), que, por sua vez, apresentam tonalidades diferentes, dependendo da concentração desses hidratos. Ambos os métodos demonstram rapidez na apresentação das respostas e seus reagentes são de preço baixo e facilmente encontrados no país.

Dessa forma, neste trabalho propõe-se testar dois métodos de análise de glicose em sangue, sendo um espectrofotométrico e outro colorimétrico, para obter *kits* de baixo custo, com boa precisão, que possam substituir os métodos atuais e padronizar seus procedimentos na análise da glicose no sangue. O primeiro poderá ser empregado em laboratórios, e o segundo, utilizado em consultórios médicos, por serem rápidos e de fácil manuseio, o que auxilia no diagnóstico preventivo de hiperglicemia.

2 Metodologia

2.1 Método do ácido di-nitro salicílico (DNS)

No preparo do reagente DNS, pesaram-se 10 g de ácido 3,5 - dinitrosalicílico e 300g de tartarato duplo de sódio e potássio. Em seguida, dissolveu-se o potássio no béquer, com aproximadamente 500 mL de água deionizada, e em outro separado foi decomposto, a quente, o ácido 3,5-dinitrosalicílico em 200 mL de solução 2 M de NaOH. Depois, misturaram-se as duas soluções em um balão de 1,0 L, com agitação constante, completando-se o volume com água deionizada (NIRMALA; MURALIKRISHNA, 2003; REGULY, 1996; WANDERLEY et al., 2004).

Quanto à curva de calibração, os padrões de glicose foram preparados tendo como base a solução-estoque de 2,5 g/dL de glicose, para a obtenção da curva de calibração (Figura 1); 1 mL de amostras-padrão, contendo entre 0 e 120 mg/dL de glicose, foram postas em tubos fotométricos. Em seguida, adicionou-se 1 mL de água destilada e 3 mL do reagente DNS, levando-se a mistura ao aquecimento até a água ficar em ebulição por cinco minutos, tempo necessário para o desenvolvimento da cor. Na seqüência, esfriaram-se as amostras que foram analisadas a 540 nm por meio de espectrofotômetro. Montou-se o gráfico da concentração *versus* absorbância para encontrar a equação da curva de calibração de glicose pelo método do DNS (MILLER, 1959; REGULY, 1996).

2.2 Determinação do teor de glicose no soro

A 100 µL de amostras de soro sanguíneo, foram adicionados 1,9 mL de água destilada e 3 mL de DNS. Em seguida, levou-se a mistura ao aquecimento, até a água ficar em ebulição por cinco minutos, e, depois, foi feito o esfriamento das amostras e sua análise a 540 nm, em espec-

trofotômetro. Foi feito ensaio em branco, contendo exclusivamente água destilada na amostra. Levaram-se os tubos ao aquecimento por cinco minutos, até a água atingir o estado de ebulição. A concentração de glicose aparente no sangue foi determinada pelo uso da curva de calibração (seus resultados estão apresentados na Tabela 1 (NIRMALA; MURALIKRISHNA, 2003; REGULY, 1996; WANDERLEY et al., 2004)).

Um ensaio padrão foi feito para observar o efeito da adição do soro sanguíneo nas análises de glicose pelo método do DNS, cujos resultados são apresentados na Tabela 2. O padrão foi preparado com 500 µL de uma solução contendo 100 mg/dL de glicose, o que resulta em 50 mg/dL na mistura de sangue com glicose (com exceção do valor da glicose sanguínea). Adicionaram-se 1,5 mL de água destilada e 3 mL do reagente DNS (NIRMALA; MURALIKRISHNA, 2003; REGULY, 1996; WANDERLEY et al., 2004).

As amostragens sanguíneas foram preparadas da seguinte forma: misturaram-se 100 µL do sangue a 500 µL de uma solução contendo 100 mg/dL de glicose, o que gerou 50 mg/dL, em decorrência da mistura do sangue com a glicose (com exceção do valor da glicose sanguínea). Em seguida, acrescentaram-se 1,4 mL de água destilada e 3 mL do reagente DNS. Um ensaio em branco foi feito para calibração do espectrofotômetro. Após resfriamento das cubetas, a absorbância foi lida a 540 nm por meio de espectrofotômetro (NIRMALA; MURALIKRISHNA, 2003; REGULY, 1996; WANDERLEY et al., 2004).

A absorbância do padrão foi subtraída das medidas de absorção das amostras e calculada a concentração de glicose pelo uso da curva de calibração, para verificar o efeito desviador do sangue sobre o valor real de concentração de glicose (MILLER, 1959; NIRMALA E MURALIKRISHNA, 2003; REGULY, 1996; WANDERLEY et al., 2004).



2.3 Método colorimétrico de determinação de glicose

Seguiram-se os passos do método de Molish, apresentado em Hirano e colaboradores (2001), para a obtenção das colorações dos padrões, e nas amostras:

Para o padrão: a um total de 100 μL de soluções de glicose de concentrações entre 50-250 mg/dL, foram adicionados, vagarosamente, 100 μL de α -naftol com 5% de álcool (reagente A) e 200 μL de ácido sulfúrico concentrado (reagente B), na capela, deixando-os escorrer pelas paredes do tubo. Uma escala colorimétrica, com padrão de glicose que varia entre 25 e 25 mg/dL, está presente na Figura 2, servindo de padrão analítico de comparação (HIRANO et al., 2001).

Para as amostras: após determinar a concentração de glicose no sangue pelo método do DNS, adicionou-se glicose para que se obtivessem as concentrações semelhantes aos padrões (50, 75, 100, 125, 150 e 200 mg/dL, aproximadamente). Depois de preparadas as amostras com sangue glicosado artificialmente, coletaram-se 100 μL dessas amostras, adicionaram-se, vagarosamente, 100 μL de α -naftol a 5% e 200 μL de ácido sulfúrico concentrado, deixando escorrer essa substância pelas paredes do tubo. Na seqüência, compararam-se as amostras com sangue às da escala de padrões. Repetiu-se o ensaio para aumentar a credibilidade das análises, pela observação da repetência dos resultados comparativos (HIRANO et al., 2001).

3 Resultados e discussão

A seguir, tem-se a Figura 1 que mostra a curva de calibração de glicose pelo método do DNS. Esse método, muito utilizado para determinação de açúcar redutor, é bastante citado pela literatura atual. Percebe-se que o ajuste dos dados à

curva foi muito bom, pois a múltipla correlação esteve próxima do seu valor máximo (1,0), o que reduz a quantidade de erros pelo uso dessa curva (GONÇALVES, 1996; HARRIS, 2001).

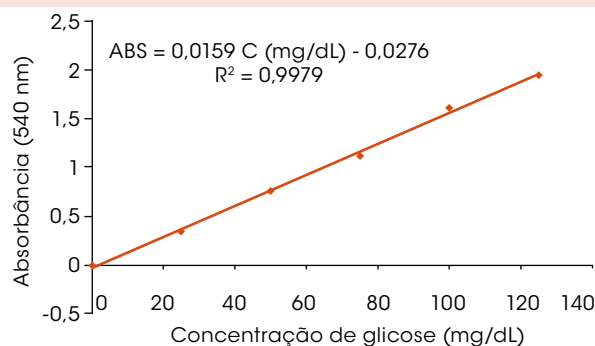


Figura 1: Curva de calibração de glicose pelo método do DNS

Fonte: Os autores.

Na Tabela 1, encontram-se valores das análises realizadas no soro do sangue utilizado. Todas essas averiguações foram feitas em triplicata. Nessa tabela, percebe-se que houve uma reprodução dos resultados em ambas as análises, pois os valores estiveram muito próximos da média e seus desvios padrões foram baixos (cerca de 0,11 %), o que mostra a precisão das análises.

Tabela 1: Análise da composição de glicose no sangue utilizado

Análise	V _{Sangue} (mL)	V _{água} (mL)	V _{DNS} (mL)	ABS	Glicose (mg/dL)	Média (mg/dL)	Desvio (±)
1	0,1	1,9	3,0	0,800	51,998	51,959	0,058
2	0,1	1,9	3,0	0,799	51,987		
3	0,1	1,9	3,0	0,798	51,893		

Em que V_{Sangue}, V_{água} e V_{DNS} são os volumes de sangue, de água e do reagente do DNS, respectivamente. ABS é a absorbância da amostra.

Fonte: Os autores.

Na Tabela 2, estão registrados os resultados e seus respectivos desvios da aplicação do método do DNS, que teve como origem a adição de sangue no ambiente do experimento. Um volume de 100 μL de sangue foi usado em

ambas as amostras (exceção para o padrão, que não usou sangue). O desvio foi dado pela diferença entre o valor médio de glicose no sangue obtido anteriormente (na Tabela 1) e os valores de glicose sanguínea encontrados na Tabela 2 (Glic. Sang.).

Ao se compararem as duas médias (da Tabela 1 e 2), observa-se um erro próximo de 5%, o que demonstra que as análises são seguras. Mesmo no trabalho com maior margem de erro, ele não ultrapassou os 10%. Assim, esse método é bastante seguro para a análise de soro sanguíneo, e seu emprego em análises clínicas, muito viável por apresentar precisão e exatidão, além de ser relativamente mais barato que os métodos apresentados pela OMS e ADA (KUZUYA et al., 2002; MOTTA; BENNATI, 2005). Pode-se dizer que a concentração de glicose no sangue, apresentada neste trabalho, ficou próxima de 50 mg/dL (GONÇALVES, 1996; HARRIS, 2001). Essa concentração servirá de base para os cálculos de glicose a ser adicionada para obtenção dos valores próximos aos padrões colorimétricos.

Tabela 2: Verificação do desvio das respostas obtidas do método do DNS provocado pela adição de sangue

Análise	Adição de Glicose (mg/dL)	ABS (540 nm)	Glicose (mg/dL)	Glic. Sang. (mg/dL)	Desvios (mg/dL)	Média (mg/dL)
Padrão	50	0,765	50	0		
1	50	1,486	95,195	47,082	4,877	49,639
2	50	1,558	99,702	51,610	0,349	
3	50	1,536	98,308	50,226	1,733	

Fonte: Os autores.

A Figura 2 apresenta a escala com as cores correspondentes a cada concentração de padrão de glicose que será usada como padrão comparativo de análise pelo método colorimétrico de Molish. Percebe-se que existe variação de tonalidade de cor gradual, em razão do efeito da concentração da glicose, como está

citado na literatura (HIRANO et al., 2001), que vai do amarelo (branco), passando pelo laranja (faixa entre 50 e 100), vermelho claro (125), vermelho (150), até chegar ao vermelho escuro (175 a 200). Isso facilita a análise por meio da comparação, além de deixar um erro relativo de 25/2 (12,5) (GONÇALVES, 1996; HARRIS, 2001).

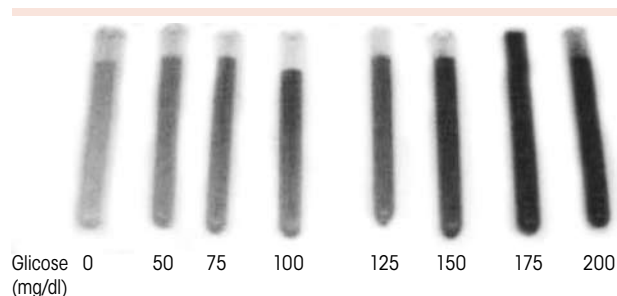


Figura 2: Coloração das amostras padrão de glicose

Fonte: Os autores.

Na Figura 3, encontram-se os resultados de uma análise comparativa do soro sanguíneo utilizado nesta pesquisa, que teve seu teor de glicose determinado pelo método do DNS (aproximadamente 50 mg/dL) e simulações de teores de glicose nesse mesmo soro (75 a 200 mg/dL). O soro sanguíneo natural corresponde ao segundo tubo das amostras; os demais são as simulações obtidas da adição de glicose a esse soro. É perceptível que existe semelhança entre as cores das amostras e as dos padrões, o que dá confiabilidade ao emprego desse método (HARRIS, 2001).

Nota-se, nesta análise, que o teor de glicose no soro foi semelhante ao encontrado pelo método do DNS (~50 mg/dL). Em relação aos demais valores, observam-se leves desvios de tonalidade que podem ser representados como VALOR APROXIMADO \pm ERRO. Exemplo: a quarta amostra (com exceção do branco) pode equivaler a $125 \pm 12,5$ mg/dL.

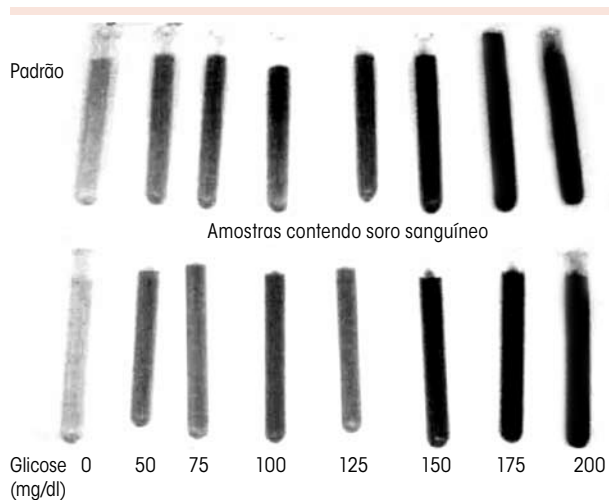


Figura 3: Análise de amostras, contendo plasmas sanguíneos, comparadas ao padrão

Fonte: Os autores.

Uma segunda comparação foi feita para mostrar a reprodutibilidade dos resultados (Figura 4). Para isso, o padrão (P) foi posto entre as amostras (A1 e A2). Percebe-se uma boa reprodutibilidade dos resultados para as faixas de glicose estudadas neste trabalho, o que eleva a confiança no emprego desse método em análises clínicas (GONÇALVES, 1996; HARRIS, 2001).

O método é de fácil manuseio, tem baixo gasto de reagentes e gera respostas rápidas. Em razão disso, pode ser utilizado em consultórios, o que possibilita um diagnóstico prévio de hiperglicemia. Para isso, basta que se tenha uma pequena centrífuga.

Cabe salientar que no *kit* colorimétrico devem ser especificados os cuidados necessários para o manuseio do reagente B (ácido sulfúrico concentrado), tais como uso de máscara e luvas para evitar a respiração de vapores ácidos e o contato com os reagentes.

Esses fatores podem impulsionar a produção de *kits* em escala industrial, com base no método colorimétrico (de Molish) ou no espectrofotométrico (método do DNS), a custos menores, quando comparado a outros métodos utilizados atualmente.

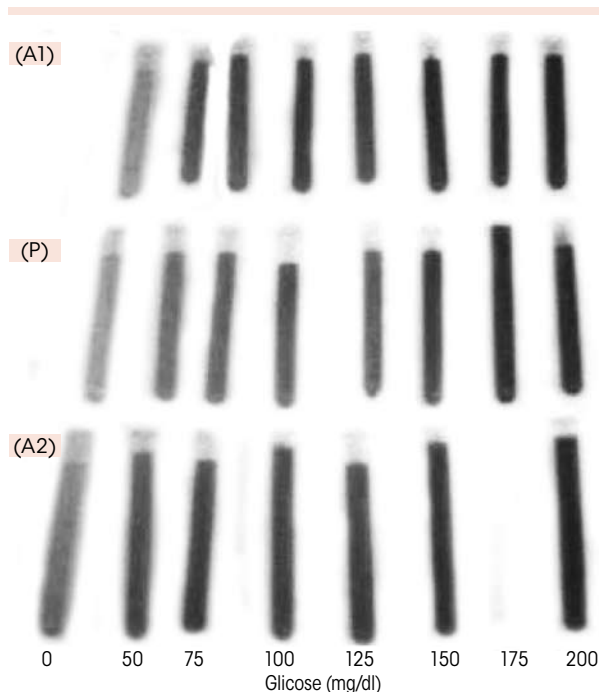


Figura 4: Reprodutibilidade da análise de glicose em soro sanguíneo.

P = Padrão colorimétrico de glicose; A1 = primeira análise de soro sanguíneo, e A2 = segunda análise de soro sanguíneo.

Fonte: Os autores.

5 Considerações finais

O método do DNS mostrou-se bastante seguro para a análise de soro sanguíneo, e seu emprego em análises clínicas é muito viável, pois apresenta precisão e exatidão e é relativamente mais barato que os métodos apresentados pela OMS e ADA.

O método colorimétrico (de Molish), de fácil manuseio, possui baixo gasto de reagentes e gera respostas rápidas, o que possibilita seu uso em consultórios, permitindo diagnósticos prévios de hiperglicemia.

Por meio deste trabalho, identificaram-se as condições adequadas de análise de glicose em soro sanguíneo por dois métodos não empregados pelos laboratórios de análises clínicas, o que mostrou como é possível e viável obter *kits* com base nesses métodos. Constatou-se que a produção desses *kits*

em escala industrial geraria empregos e reduziria os gastos com análises clínicas, tanto nos órgãos estatais quanto nos privados.

Development of kits for glicemia levels analysis in patients with suspicion of diabetes mellitus

In this work, it is aimed to test the DNS and Molish methods in the determination of glucose content into blood, for obtaining two kits of low costs and with good precision, which can substitute the current methods of diagnosis of the hyperglycemia. The results showed that the analysis for method DNS had an inferior error at 5%, showing that its analysis are confidants. The Molish method showed to be of easy handling, of low reagents expense, of fast response, and they may be possible an easy handling in doctor's offices, thus, it is possible to obtain previous diagnostic of hyperglycemia. Because of the precision, accuracy and of lower cost than the methods presented for OMS and ADA, the clinical application of the DNS and Molish methods is very viable.

Key words: Blood. Diabetes *mellitus*. DNS method. Glucose. Molish method.

Referências

AFFONSO, F. S. et. al. Níveis glicêmicos usados para o diagnóstico do diabetes mellitus alteram a função endotelial? Estudo em rim isolado de coelhos normais. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*. São Paulo, v. 47, n. 6, p.716-720, dez. 2003.

GABBAY, M. et. al. Diabetes melito do tipo 2 na infância e adolescência: revisão da literatura. *Jornal de Pediatria*, v.79, n. 3, p. 201-208, maio/jun. 2003.

GONÇALVES, M. L. S. S.; *Métodos instrumentais para análises de soluções*: análise quantitativa. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1996.

GROSS, J. L. et al. Diabetes melito: diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*. São Paulo, v. 46, n.1, p.16-26, fev. 2002.

HARRIS, D. C.; *Análise química quantitativa*. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001.

HIRANO, Z. M. B. et al *Bioquímica*: manual prático. 1. ed., Blumenal, SC: Edifurb 2001.

KATZ, L. et al. Comparison of diagnostic tests for gestational diabetes. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 24, n. 8, p. 527-533, 2002.

KUZUYA, T. et. al. Report of the committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes *mellitus*. *Diab. Research and Clin. Pract.*, v. 55, n. 1., p. 65-85, jan. 2002.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, v. 31, p. 426-428, 1959.

MOTTA, N.; BENNATI, E. Diabetes mellitus in the elderly: diagnostic features. *Archiv. of Geront. and Geriat.*, v. 1, 2005.

NIRMALA, M.; MURALIKRISHNA, G. Three α -amylase from malted finger millet (Ragi, *Eleusine coracana*, Indaf-15) – Purification and partial characterization. *Phytoch.*, v. 62, p. 21, 2003.

PAIVA, C. *Medic. Interna*, v. 7, p. 234, 2001.

PASSOS, V. M. A. et al. Type 2 diabetes: prevalence and associated factors in a Brazilian community. The Bambui Health and Aging Study. *SP Medic. Journal*, v. 123, n. 2, p. 66, 2005.

REGULY, J. C. *Biotecnologia dos processos fermentativos*. Pelotas-RS: Editora Ufpel 1996.

WANDERLEY, K. et al. Biochemical characterizing of α -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. *FEMS Microbiology letters*, 231, 165-169, 2004.

Recebido em 29 ago. 2007 / aprovado em 29 out. 2007

Para referenciar este texto

BIAZUS, J. P. M.; SOUZA, R. R. de; SANTANA, J. C. C. Desenvolvimento de kits para análise de níveis de glicemia em pacientes com suspeita de diabetes *mellitus*. *Exacta*, São Paulo, v. 5, n. 1, p. 155-161, jan./jun. 2007.

