

A Diabetes e a Evolução do Mecanismo de Funcionamento das Tiras para Determinação da Glicemia

F. Rodrigues¹, B. Sarmiento^{1,2}

1- Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto

2- Instituto Superior de Ciências da Saúde-Norte, Gandra

Resumo

A diabetes é uma das principais causas de morbilidade crónica e de perda de qualidade de vida no nosso país. Prevê-se um aumento desta doença nas próximas décadas, com consequente aumento da frequência de consultas e de serviços de urgência, assim como um significativo número de internamentos hospitalares. Tais factos colocam a diabetes como um problema de Saúde Pública de elevada magnitude, sendo previsível que constitua uma das principais causas de morbilidade e incapacidade total ou parcial durante o século XXI.

No final de 1970 foram introduzidas no mercado tiras de teste semelhantes às de determinação da glicose na urina, mas de determinação da glicose sanguínea. Tal como as tiras anteriormente usadas para despiste de glicose na urina, as tiras de teste de sangue recorriam a um reagente impregnado na tira de plástico para, enzimaticamente, converter a glicose num produto corado. A utilização adequada deste equipamento exigia a remoção do excesso de amostra e a estimativa visual da concentração sanguínea.

Desde a década de 1980, as medições com tiras ficaram mais fáceis e mais rápidas, e actualmente o tempo necessário é de apenas 3 segundos. Paralelamente, o volume de amostra requerida diminuiu consideravelmente (~0,3 µL).

A tecnologia em que se baseiam estes que se encontra por trás destes equipamentos é formada por tiras de teste, as quais contêm enzimas, coenzimas, mediadores e os indicadores, sob a forma de uma camada seca, convertendo a concentração de glicose no sangue num sinal que é lido pelo contador. A determinação da glicose rapidamente e com especificidade, exactidão e precisão é dominada pelas características químicas e de *design* da tira. Durante as últimas décadas têm sido desenvolvidos equipamentos para executar a medição num tempo de 5 segundos, com menos de 1 µL de sangue⁽¹⁻⁴⁾.

O objectivo desta revisão é avaliar o mecanismo químico de funcionamento das tiras diabéticas, bem como rever toda a evolução das mesmas desde a sua geração.

Abstract

Diabetes is a major cause of chronic morbidity and loss of quality of life in our country.

It is expected an increase of this disease in the coming decades, with consequent increase in the frequency of visits and emergency services, as well as a significant number of hospital admissions.

These facts pose diabetes as a public health problem of great magnitude and are projected to constitute a major cause of morbidity and total or partial incapacity during this century.

At the end of 1970 were marketed test strips similar to the determination of glucose in urine, but the determination of blood glucose. As the strips previously used to screen for glucose in urine test strips for blood resorted to a reagent impregnated in the plastic strip to enzymatically convert glucose into a colored product. Proper use of this equipment required the removal of excess sample and visual estimation of blood concentration.

Since the 1980s, measurements of strips are easier and faster, and now the time is only 3 seconds. In parallel, the required sample volume decreased significantly (~0.3 µL).

The technology underpinning these that lies behind these devices is composed of test strips, which contain enzymes, coenzymes, mediators and indicators in the form of a dry layer, converting the concentration of glucose in the blood in a sign that is read by the counter. The determination of glucose quickly and with specificity, accuracy and precision is dominated by the chemical characteristics and the design of the strip. During the last decades equipments have been developed to perform the measurement in a time of 5 seconds, with less than 1 µL of blood⁽¹⁻⁴⁾.

The purpose of this review is to evaluate the chemical mechanism of operation of diabetic strips, as well as to review all their evolution since its generation.

INTRODUÇÃO

A diabetes é uma das principais causas de morbilidade crónica e de perda de qualidade de vida no nosso país. Prevê-se um aumento desta doença nas próximas décadas, com consequente aumento da frequência de consultas e de serviços

de urgência, assim como um significativo aumento no número de internamentos hospitalares. Tais factos colocam a diabetes como um problema de Saúde Pública de elevada magnitude, sendo previsível que constitua uma das principais causas de morbilidade e incapacidade total ou parcial durante o século XXI. Perante o exposto, torna-se imperiosa uma intervenção de âmbito nacional planeada e especificamente dirigida ao combate à Diabetes, representando a farmácia o meio de contacto privilegiado para alertar a população⁽⁵⁾.

A diabetes apresenta variações de incidência e prevalência nas várias regiões do mundo, verificando-se um crescimento progressivo em todas as regiões. A sua maior prevalência situa-se no grupo etário acima dos 45 anos. De facto, esta

Correspondência:

Francisca Pinto Rodrigues
Rua Aníbal Cunha, 164
4099-030 Porto, Portugal
Tel.: 222 078 900
Fax: 222 003 977
E-mail: franciscapintolisboa@gmail.com

doença afecta quase 250 milhões de pessoas no mundo inteiro, tendo surgido 50 milhões de novos casos nos últimos 4 anos ⁽⁶⁾. A incidência tem vindo a aumentar nos seus principais subtipos 1 e 2, tendo concorrido para isso nestas últimas décadas factores genéticos e ambientais, como a obesidade e o sedentarismo, apesar da maior atenção no diagnóstico precoce e dos avanços terapêuticos farmacológicos entretanto alcançados. Na realidade, a diabetes tipo 2 representa 85-95% de todos os casos. A prevalência está em crescimento mais rápido nos países ocidentais desenvolvidos. Na América do Norte 9,2 % da população tem diabetes enquanto que na Europa a prevalência de diabetes é ligeiramente inferior rondando os 8,4%. As estimativas apontam para que em 2030 existam 380 milhões de diabéticos. A nível mundial, a maioria das pessoas com diabetes não consegue um controlo glicémico adequado. Mesmo em sociedades altamente desenvolvidas uma grande percentagem das pessoas não atinge as metas recomendadas para o controlo glicémico o que enfatiza a necessidade de maior atenção ao controlo e tratamento dos diabéticos ^(2,5,7).

EVOLUÇÃO DOS APARELHOS DE DETERMINAÇÃO DA GLICOSE SANGUÍNEA ATRAVÉS DO TEMPO

Os testes químicos para determinação de glicose surgiram, inicialmente, com a introdução da polarimetria, em 1833, por Baptise. Em 1841, recorrendo ao sulfato de cobre no seu ensaio, Bateria identificou a glicose, sendo o seu método posteriormente modificado por Fehling. Este teste é habitualmente designado como Teste de Fehling. Estas tecnologias emergentes estiveram na base do estudo pioneiro desenvolvido por Claude Bernard e da importante observação, em 1890, por von Mering e Minkowski. Estes investigadores reconheceram que a pancreatocomia, realizada no cão, resultava numa poliúria associada com a secreção de grandes quantidades de açúcar, ou seja, a Diabetes *mellitus* ^(2,7). Inicialmente, os testes para determinação da glicose exigiam grandes volumes de sangue, mas o trabalho de Bang, rapidamente seguido por Lewis e Benedict em 1915, e em 1918 por Hagedorn e Jensen, conduziu ao aparecimento de micrométodos, em meados de 1913. Estes desenvolvimentos seguiram-se ao extenso trabalho, em clínica, de Lauritzen que envolveu estimativas de glicose na urina e avaliou o açúcar no sangue de indivíduos normais e com diabetes (notado por Jacobsen Hagedorn, em 1917 e em 1921). O primeiro teste de glicose na urina semi-quantitativo foi concebido em 1911 por Bento e tem o seu nome. Mais tarde, em 1915, o método de Benedict, após as alterações introduzidas por Lewis e Benedict, foi introduzido na medição da glicemia em jejum. A Figura 1 mostra uma versão mais recente (através de um método colorimétrico) do método de análise de glicose na urina.

Os progressos obtidos desde o teste de Benedict conduziram ao ensaio em que há mistura de urina com reagentes (Clinditest ou Gelatest) e, finalmente, em 1960 a uma variedade de tiras de análise de glicose na urina, como por ex-



Figura 1 - Ilustração de um método de análise da glicose na urina (adaptado da referência 1).

xemplo Glikotest, Clindistix, Drey-pack e o conhecido Combur-Test. Este teste permite a determinação de glicose, proteínas e pH.

As tiras para determinação da glicose sanguínea surgiram no final dos anos 60, nomeadamente com o Dextrostix[®] e o Reflostest[®], para usar em métodos reflectores, e

o Haemo-Glukotest[®] para determinação visual.

A auto-monitorização da glicose sanguínea foi introduzida em 1962 por Keen e Knight, os quais desenvolveram um método que permitia ao doente, no conforto de sua casa, colocar uma pequena gota de sangue numa tira de papel. Esta, depois de seca, era analisada no laboratório do hospital, tendo em conta o histórico clínico do doente, a data e o tempo da amostra. O método para determinação da glicose era colorimétrico e considerado adequado desde que com uma semana de amostras. Este método revelou-se de extrema importância no caso de pacientes que tinham problemas renais bem como daqueles que sofriam de episódios espontâneos de hipoglicémia. Tratava-se de um método semi-quantitativo que permitia ter uma estimativa dos níveis de glicose sanguínea capilar. A comparação com os valores obtidos usando um AutoAnalisador (Technicon Corp, NY), permitiu concluir que as tiras enzimáticas faziam estimativas da glicose sanguínea superiores aos valores reais. Mais tarde, em meados de 1970, para eliminar os erros inerentes à avaliação visual da cor que a tira adquiria em contacto com o sangue, surgiu um equipamento leve, portátil e que operava com base na reflectância (Eye-tone[®], Ames). Contudo, persistiam pequenos erros ^(2,7) (Figura 2).



Figura 2 - Dispositivo para determinação da glicose sanguínea com base na reflectância - Ames Eye-tone (adaptado da referência 1).

O Haemo-Glukotest[®] (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), foi desenvolvido em 1968 e comercializado a partir de 1979 sendo ainda um produto estrela na determinação com precisão da glicose sanguínea (Figura 3).

No final dos anos 70 foram publicados, simultaneamente, dois artigos na Lancet, demonstrando que os métodos rápidos de auto-monitorização da glicose sanguínea, principalmente em pacientes com diabetes tipo I, permitiam



Figura 3 - Haemo-Glukotest, desenvolvido em 1968 e comercializado em 1979 (adaptado da referência 1).

resultados extraordinários no controlo da doença. O estudo, de Sönksen *et al.*, envolveu 64 pacientes e utilizou as tiras de Dextrostix e de Eytone. Os resultados foram surpreendentes: 83% dos pacientes conseguiram controlar a glicemia e dois terços conseguiram manter a concentração de glicose sanguínea abaixo dos 10mmol/L (180 mg/dL) ao longo tempo. Verificou-se igualmente que o ajuste da dose e do tipo de insulina se tornou mais fácil, comparativamente à análise à urina e que os episódios de hipoglicémia eram menos frequentes. No final do estudo, a maioria dos pacientes (~70%) preferiu continuar com a análise sanguínea e apenas uma pequena parte (~20%) voltou à análise à urina. Resultados similares viriam a ser demonstrados num outro estudo que recorreu a tiras Reflotest® e ao Reflomat® (Boehringer Ingelheim, Mannheim) (8-9) (Figura 4).



Figura 4 - Reflomat meter (adaptado da referência 1).

O auto-controlo dos níveis de glicose sanguínea teve origem em meados de 1970, com as tiras de teste de avaliação visual. No final de 1970 foram introduzidas no mercado tiras de teste semelhantes às de determinação da glicose na urina, mas de determinação da glicose sanguínea. Tal como as tiras anteriormente usadas para despiste de glicose na urina, as tiras de teste de sangue recorriam a um reagente impregnado na tira de plástico para enzimaticamente converter a glicose num produto corado. A utilização adequada deste equipamento exigia a remoção do excesso de amostra e a estimativa visual da concentração sanguínea. A qualidade do resultado estimado era fortemente dependente do operador. Pouco tempo após a introdução das tiras de teste de leitura visual, a primeira geração de equipamento de determinação de glicose portátil chegava ao mercado. Com efeito, ao incorporar um pequeno sistema óptico (um fotómetro de reflectância), estes contadores permitiam ao utilizador usuário ler, electronicamente, a intensidade da coloração desenvolvida na tira. As leituras ópticas foram convertidas para um sistema digital de concentração de glicose no sangue. Embora tais equipamentos ainda necessitassem de ser melhorados, o seu melhor desempenho permitiu que os diabéticos auto-controlassem, com precisão, os seus níveis de glicose no sangue (2,6-7,10). Os aparelhos HGT 20-800 ou Chemstrip BG®, da Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemanha) e Dextrostix®, da

Ames (Elkhart, IN) foram considerados produtos típicos, em 1975. Com Chemstrip BG® o paciente tinha de colocar uma grande gota de sangue (com cerca de 25 µL) no revestimento químico. Após um minuto medido com precisão, o sangue era eliminado manualmente e cerca de um minuto depois a cor da tira química era comparada com uma escala colorimétrica. Nesta escala cada cor correspondia a um valor de concentração de glicose no sangue. De facto, verificou-se que pacientes com grande prática eram capazes de ler a sua glicémia com suficiente precisão para controlarem os seus valores.

A revolução seguinte surgiu em 1987 quando a LifeScan (Milpitas, CA) introduziu o sistema One Touch®. A tira de teste apresentava-se como uma peça de plástico com um buraco coberto por uma membrana. Era sobre esta membrana que se colocava a gota de sangue. Uma vez que a membrana não separava os glóbulos vermelhos, o resultado era uma mistura da cor vermelha da hemoglobina e da cor azul resultante da reacção da glicose. Concluiu-se, portanto, que a avaliação visual imediata não seria possível. Após 45 segundos era possível a leitura visual, recorrendo a dois comprimentos de onda, de modo a compensar a cor do sangue.

Em 1987 foi utilizada a primeira tira de medição electroquímica, introduzida pela ExacTech® Pen metros (Medisense, Waltham, MA; agora Abbott Diabetes Care, Alameda, CA). A limpeza da tira era desnecessária e, evidentemente, a avaliação visual não era aplicável. De imediato todas as outras companhias reagiram, desenvolvendo novos sistemas. Actualmente sistemas de avaliação visual estão completamente ultrapassados. Desde a década de 1980, as medições com tiras ficaram mais fáceis e mais rápidas, e actualmente o tempo necessário é de apenas 3 segundos. Paralelamente, o volume de amostra requerida diminuiu consideravelmente (~0,3 µL) (Figura 5).

A segunda geração de tiras chegou ao mercado no final dos anos 80. Uma nova tecnologia recentemente desenvolvida – a electroquímica – tal como mencionado anteriormente, unia-se à fotometria de reflectância para permitir a determinação da glicose sanguínea. Ambas as tecnologias recorriam a uma enzima para converter a glicose num produto mensu-

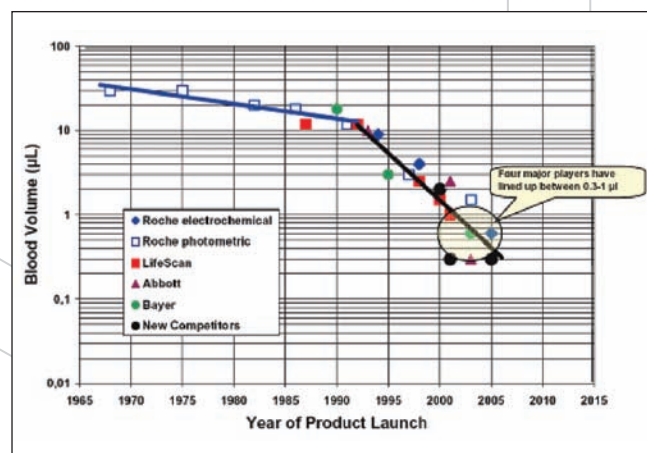


Figura 5 - Volume de sangue em função do tempo nas tiras de glicemia (adaptado da referência 2).



Figura 6 - Diferentes equipamentos disponíveis no mercado.

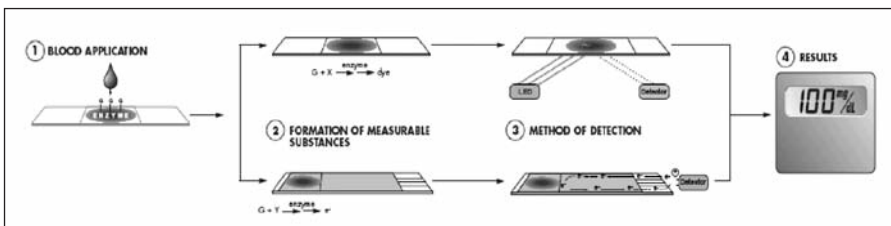


Figura 7 - Esquema de funcionamento das diferentes tiras diabéticas (adaptado Lifescan®)

rável. Contudo, em vez de avaliarem a intensidade de coloração do produto formado, recorriam a métodos electroquímicos para quantificar o número de electrões formados na reacção enzimática, e convertiam-nos numa concentração sanguínea de glicose.

A medição precisa da glicose no sangue é o resultado da conversão da concentração de glicose num sinal específico, a partir de uma pequena quantidade de sangue (normalmente em torno de 1 µL).

Os contínuos desenvolvimentos da ciência permitiram melhorias de tecnologia e deste modo desenvolver tiras para fazer esta difícil tarefa em apenas 3 segundos.

Actualmente, os equipamentos de determinação da glicose são pequenos dispositivos, do tamanho da palma da mão, com cerca de 5cm x 9 cm e 1,5 cm de espessura, apresentando um ecrã de projecção de cerca de 3 cm x 4cm. A Figura 6 representa dispositivos disponíveis no mercado português.

As tiras de teste são inseridas numa pequena abertura na parte superior ou na borda inferior do dispositivo. A forma das tiras foi especialmente concebida para que não possam ser inseridas incorrectamente. A tecnologia por trás destes equipamentos é formada por tiras de teste, as quais contêm enzimas, coenzimas, mediadores e os indicadores, sob a forma de uma camada seca, convertendo a concentração de glicose no sangue num sinal que é lido pelo contador. A determinação da glicose rapidamente e com especificidade, exactidão e precisão são dominadas pelas características químicas e de *design* da tira. Durante as últimas décadas têm sido desenvolvidos equipamentos para executar a medição num tempo de 5 segundos, com menos de 1 µL de sangue (1-4).

A determinação directa da concentração de glicose no sangue é difícil e inconveniente, recorrendo-se a métodos indi-

rectos para o fazer. O conceito de determinação indirecta é simples: converte-se a glicose numa substância facilmente quantificável. Os sistemas actualmente disponíveis no mercado recorrem a dois tipos de tecnologias: a fotometria de reflectância (mede a intensidade de coloração de um produto formado) e a electroquímica (quantifica uma corrente eléctrica). A Figura 6 resume de modo esquemático as duas tecnologias (Figura 7).

Cada tira tem cerca de dez camadas, incluindo uma camada plástica, camadas com reagentes químicos e espaço entre camadas. Existe por exemplo, uma camada com dois eléctrodos, de prata ou de um material equivalente, bem como outra camada com enzima imobilizada, glicose oxidase, e uma camada contendo microcristais de ferrocianeto de potássio, (K₃Fe(CN)₆).

Estas camadas estão devidamente distanciadas de modo a permitir que entre apenas uma pequena quantidade de sangue (2). As reacções químicas que ocorrem no sensor encontram-se esquematizadas na Figura 8.

De modo resumido pode-se afirmar que a glicose sanguínea reage com uma enzima específica, a glicose oxidase,

originando ácido glucorónico, o qual, por sua vez, reage com o ferrocianato originando ferrocianito. O eléctrodo oxida o ferrocianito, gerando uma corrente que é directamente proporcional à concentração de glicose no sangue (2).

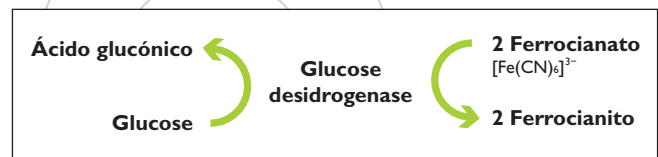


Figura 8 - Reacções químicas que ocorrem no sensor.

Actualmente, o sistema de teste que requer menor volume de sangue é o Precision Xtra® (agora Abbott Diabetes Care's) Freestyle™ com 0,3 µL de sangue e foi introduzido em 1999. Desenvolveram-se igualmente lancetas que efectuem a picada a menor profundidade, o que permite picadas com menos dor. O objectivo é obter com menos dor uma gota de sangue que ronde o volume de 1 µL. A Figura 5 representa a evolução no volume de sangue necessário para a determinação. Quanto menor o volume de sangue obtido mais difícil é a determinação e, portanto, mais complexo tem de ser o equipamento utilizado. Uma nova redução do volume de líquido exigido não seria vantajoso para o paciente se fosse acompanhado por uma maior complexidade de funcionamento das tiras usadas na determinação da glicose sanguínea.

CARACTERÍSTICAS BÁSICAS E DE FUNCIONAMENTO DOS EQUIPAMENTOS

Os fundamentos principais das reacções bioquímicas que ocorrem nos equipamentos actualmente disponíveis para a

Quadro I - Enzimas utilizadas nos equipamentos actualmente disponíveis no mercado (adaptado da referência 2).

Enzimas	Coenzima	Enzima Adicional	Sistema Mediador	Indicador	Exemplo de Produtos
GOD	FAD	POD	Oxigénio Ar / Peróxido de Hidrogénio	Leucócitos	Chemstrip bG; One Touch
GOD	FAD	Nenhuma	Hexacianoferrato III /Hexacianoferrato II	Electrodo de Paládio	Accu-Chek Advantage
GOD	FAD	Nenhuma	Hexacianoferrato III /Hexacianoferrato II	Electrodo de Carbono	One Touch Ultra
GDH	PQQ	Nenhuma	Hexacianoferrato III /Hexacianoferrato II	Electrodo de Paládio	Accu-Chek Advantage
GDH	PQQ	Nenhuma	Quinoneimina / Fenilenediamina	Ácido Fosfomolibdico	Accu-Chek Active, Accu-Chek Compact, Accu-Chek Go
GDH	PQQ	Nenhuma	Quinoneimina / Fenilenediamina	Electrodo de Ouro	Accu-Chek Aviva
GDH	PQQ	Nenhuma	Ósmio	Electrodo	Freestyle
GDH	NAD	Nenhuma	Fenantrolina	Electrodo	Precision Xtra
GDH	FAD	Nenhuma	Hexacianoferrato III /Hexacianoferrato II	Electrodo de Paládio	Ascensia, Microfill

determinação da glicose sanguínea têm por base diferentes mecanismos descritos em seguida.

Enzimas

Todas as tiras usam enzimas específicas para a glicose. As enzimas são usadas para catalisar as reacções que convertem a glicose numa substância mensurável. As enzimas utilizadas nos sistemas de monitorização de glicose no sangue são específicas para a glicose e produzem substâncias que são facilmente medidas quer por reflectância fotométrica quer por métodos electroquímicos. Como resultado, a quantificação de glicose no sangue tornar-se rápida, precisa e sensível. As enzimas mais comumente utilizadas são a glicose oxidase, glicose desidrogenase e hexoquinase.

As enzimas são classificadas como oxido-redutases, uma vez que oxidam a glicose a ácido glucoronónico. Os electrões da glicose são geralmente transferidos para a forma oxidada de uma molécula intermediária, convertendo-a na forma reduzida (a molécula intermediária, designada por mediador, é geralmente uma molécula química orgânica ou inorgânica de dimensões reduzidas, capaz de existir quer na forma oxidada quer na forma reduzida e que geralmente reage rapidamente quer para doar quer para receber electrões). O mediador, por sua vez, cede os electrões a um eléctrodo, para quantificação electroquímica, ou a uma molécula indicadora que, por sua vez, origina coloração.

Todas as enzimas usam coenzimas (ou cofactores) e podem ser necessárias enzimas adicionais quando a reacção global envolve passos intermediários. O Quadro I representa, de modo sucinto e esquemático, as enzimas utilizadas nos equipamentos actualmente disponíveis no mercado.

A glicose oxidase é obtida a partir de um fungo, o *Aspergillus niger*. Trata-se de uma proteína dimérica, com um peso molecular de cerca de 160 kD, altamente específica para a β-D-glicose (o tipo de glicose presente no sangue), apesar de 2-deoxi-D-glicose, D-manose e D-frutose poderem igualmente

te ser oxidadas, mas a um ritmo muito mais lento. A reacção habitual da glicose oxidase pode ser resumida na Figura 9. A combinação da hexoquinase com a glicose 6 fosfato desidrogenase, o qual é o método de referência em muitos laboratórios, não é usado nas tiras reactivas. A enzima é responsável pela especificidade para o açúcar na tira reactiva, mas nem todas as enzimas são completamente específicas para a glicose.

A glicose oxidase (GOD) é descrita como sendo altamente específica mas, por exemplo, a manose, é um interferente, apesar de o ser em pequena percentagem ^(1,4,7,9).

Com efeito, uma elevada especificidade da actividade enzimática é um excelente pré-requisito para o uso de enzimas nas tiras reactivas. Contudo, concentrações elevadas de enzimas nas formulações podem conduzir a interferências por pequenas actividades paralelas. Os sistemas de controlo da glicose que utilizam a GDH-PQQ não permitem distinguir os açúcares glicose, maltose, galactose ou xilose, podendo fornecer leituras mais elevadas na presença de quaisquer destes açúcares.

Os sistemas de vigilância que utilizam GDH-NAD, glicose oxidase ou glicose hexoquinase são métodos que não são afectados pela presença destes açúcares na corrente sanguínea, sendo portanto sistemas muito mais específicos e seguros. Em geral, a maltose, a xilose ou a galactose não estão presentes no sangue de pessoas saudáveis ou de pessoas com diabetes. Contudo, no caso de o doente tomar determinada medicação ou em situações de doenças raras, podem estar presentes, conduzindo a falsos positivos ^(2,8-11). Revela-se igualmente essencial para a indústria farmacêutica aumentar a especificidade das enzimas presentes nas tiras reactivas,

Actualmente, desenvolvem-se trabalhos para aumentar a especificidade da PQQ – dependente GDH, recorrendo-se a mutações para reduzir a reacção da maltose a menos de 2% do valor normal. A Bayer Healthcare, inclusivamente, mudou a enzima do Ascensia Microfill strip de PQQ-dependente GDH para o FAD – dependente GDH. A GOD parece igualmente ter vantagens em termos de especificidade de açúcares, uma vez que a manose não é usada na medicação actual, mas o segundo substrato natural desta enzima é o oxigénio. A forma reduzida deste substrato é o oxidante activo peróxido de hidrogénio. Consequentemente, a oxidação não

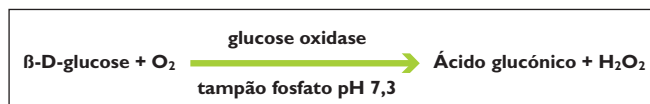


Figura 9 - Reacção habitual da glicose oxidase.

específica de metabolitos e drogas pelo peróxido de hidrogénio pode conduzir a interferências como, por exemplo, do ácido úrico ou da bilirrubina. A alternativa para o uso da GOD é a utilização de um mediador não natural, em vez do oxigénio, mediador esse que necessita de competir com o oxigénio para os electrões da glicose. Variações na quantidade de oxigénio da amostra, como por exemplo no caso de se tratar de sangue venoso, capilar ou arterial, levam a diferentes valores de concentração de glicose obtidos ⁽¹²⁾.

Verifica-se igualmente que a altitude é, frequentemente, uma interferência nas tiras reactivas que usam a GODs, de modo a garantir a sua eficácia e segurança ⁽¹²⁾.

Mediadores

Infelizmente, as enzimas raramente trocam directamente os electrões com os eléctrodos. O mesmo é verdade para muitas moléculas biológicas, tais como a glicose. Assim, é necessária uma substância que facilite ou medeie esta transferência. Estes reagentes presentes nas tiras são denominados mediadores. Com efeito, as enzimas transferem os electrões da glicose para o mediador oxidado. O mediador, agora reduzido, que se forma transfere, por sua vez, os electrões para um eléctrodo, produzindo corrente, ou para um indicador, originando a formação de coloração.

Os derivados férricos e hexacianoferrosos, como o ferrocianeto de potássio, são exemplos de mediadores de um electrão usados nas tiras reactivas, tal como a Figura 10 representa esquematicamente.

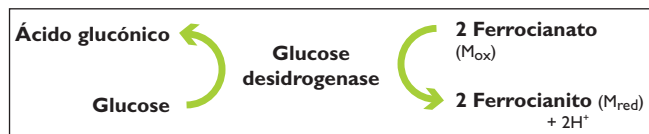


Figura 10 - Ferrocianeto de Potássio - mediador de electrão utilizado na reacção química que ocorre no sensor.

Mediadores de dois electrões, como as quinonas, são igualmente usados. Por exemplo, a fenatrolina-quinona é o mediador utilizado no Abbott Diabetes Care's Precision Xtra[®]. O mesmo sistema enzima/mediador pode ser utilizado para

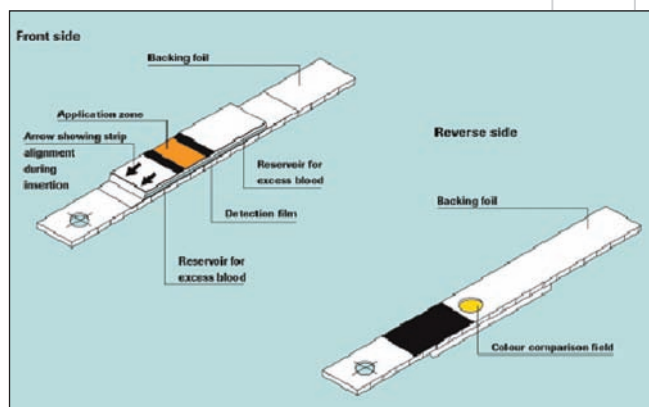


Figura 11 - Representação de uma tira fotométrica Accu-Chek ⁽²⁾.

medições fotométricas e electroquímicas, como é o caso do hexacianoferrato, o qual é usado como mediador electroquímico em muitos produtos e como parte do sistema fotométrico, agora retirado, Accu-Chek Easy[®] (Figura 11).

Contudo, alguns sistemas mediadores são mais complicados do que os acima descritos. A Figura 12 da GOD/peroxidase (POD) trabalha, por exemplo, com oxigénio atmosférico.

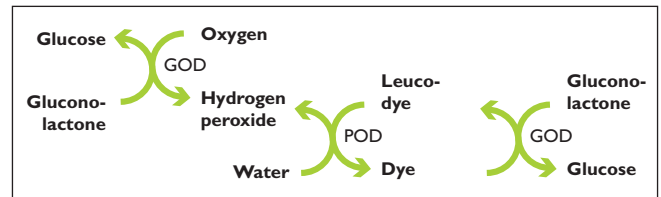


Figura 12 - Reacções na tira reactiva tendo como mediador o oxigénio atmosférico e as enzimas GOD/POD. Trata-se de um sistema mediador atípico uma vez que o peróxido de hidrogénio/oxigénio não são reciclados ⁽²⁾.

Trata-se de um sistema mediador atípico, uma vez que o oxigénio e o peróxido de oxigénio não são reciclados. Com efeito, o poder oxidativo do oxigénio é usado em dois passos: o primeiro passo é dependente da glicose e o segundo utiliza o intermediário formado para oxidar o corante. Contudo, muitos corantes são também substratos para a GOD, incluindo o tetrametilbenzidino. A presença de glicose pode conduzir a que sejam novamente reduzidos à forma anterior.

Um excesso de glicose sobre o oxigénio pode conduzir a que não ocorra formação de cor. Esta é a explicação para que as tiras ópticas, ChemstripG[®], não adquiram quantidades significativas de cor no primeiro minuto, quando a tira é coberta com amostra. Apenas uma pequena linha no topo da amostra indica que a reacção está a decorrer numa primeira fase. A formação completa de cor apenas é visível quando a tira absorve por completo a amostra e o oxigénio se difunde para a película e compete com o corante para os electrões da glicose. Uma outra observação, nestas tiras o peróxido de hidrogénio forma muito mais cor do que uma quantidade equivalente de glicose. Além da competição pelo oxigénio, há outras reacções que conduziram à descoberta de novos mediadores. As nitrosoanilinas são um exemplo de um constituinte atípico das tiras reactivas em que não funcionam propriamente como mediador, mas proporcionam as vantagens atrás mencionadas. Elas reagem *in situ* na tira reactiva com a glicose e a enzima para formar uma espécie reactiva que irá actuar como mediador. Ao contrário das N-nitrosoanilinas, as quais são conhecidas pelo seu poder mutagénico e carcinogénico, o composto formado nesta reacção passou em todos os testes de mutagenicidade e carcinogenicidade com resultados satisfatórios. Os electrões são, posteriormente, transferidos para um eléctrodo numa tira electroquímica. A redução de mediadores é uma fonte potencial de interferência por redução de outras substâncias. Por exemplo, o ácido úrico e a bilirrubina são interferentes endógenos. Acetaminofeno, dopamina, ácido ascórbico e outros princípios activos de medicamentos introduzem equi-

valentes de redução externos. Com efeito, as interferências químicas diminuem com o uso de químicos mais complexos. Um mediador de elevada selectividade química, como uma enzima específica, é uma escolha vantajosa.

Cinética Química

A interacção da enzima com a glicose e o mediador não é uma simples curva de saturação de Michaelis-Menten. Quer a GOD quer a PQQ e a FAD – dependente GDH são enzimas que têm apenas um centro activo. É necessária uma sequência de reacções para transferir os electrões da glicose para o mediador.

PELÍCULAS QUÍMICAS SECAS

As tiras reactivas contêm enzimas, mediador, indicador e outros compostos adicionais na forma de camadas secas. Uma aproximação simples a este processo de produção consiste na impregnação de uma membrana pré formada com uma solução tampão de enzimas e indicadores. Pode igualmente recorrer-se à impressão de uma película.

A aplicação de um revestimento laminar é o método utilizada para as tiras fotométricas da Roche, sendo a aplicação seguida de secagem. A etapa de secagem, curta e intensa, é vantajosa para evitar a desnaturação das proteínas enzimáticas e/ou pré-reacções do indicador e mediador. Muitas enzimas não desnaturam mesmo com temperaturas que rondam os 70 – 80°C. A secagem da película termina com uma secagem a quente, onde as enzimas sobrevivem durante minutos desde que na ausência do líquido envolvente que produz desnaturação. A fase crítica ocorre quando a temperatura atinge a fase final de secagem e uma quantidade ínfima de água esta presente. Esta fase pode durar apenas alguns segundos, resultando como produto final uma película seca que, posteriormente, é processada nas tiras reactivas. Um outro processo, designado “slot die coating” é usado pela Roche® nas tiras electroquímicas lançadas mais recentemente. Neste processo, uma parte de uma tira reactiva pré-formada é revestida com uma película química, através de uma injeção por uma pequena fenda. A secagem processa-se de modo semelhante ao processo anterior.

A mistura está ausente na secagem das tiras químicas, fazendo com que a distribuição do produto através da parte inferior da membrana seja heterogénea. A película absorve continuamente água e glicose da amostra, permitindo a difusão para o exterior de ingredientes solúveis como mediadores oxidados e reduzidos, produtos e mesmo enzima. A conversão da glicose da amostra é usualmente incompleta. A velocidade de conversão das enzimas é afectada pela temperatura. Para evitar essa influência e não surgir a alteração dos resultados obtidos, optou-se por transferir o controlo da velocidade para o processo de difusão da amostra e não para o processo de reacção enzima/mediador. Isto é conseguido recorrendo-se a uma sobredosagem da enzima na película química. Logo que a difusão da glicose é mais lenta do que a sua conversão enzimática, mesmo a baixas tempe-

raturas, a dependência da temperatura é eliminada. De igual modo, a maioria das tiras reactivas exclui os glóbulos vermelhos da película de reacção, funcionando para isso a superfície de reacção como um filtro. Este processo ocorre mesmo em tiras reactivas feitas exclusivamente de compostos solúveis. Nos poucos segundos que decorrem até à medição, não ocorre a completa dissolução e homogeneização com a amostra. O entupimento do filtro com os glóbulos vermelhos é evitado recorrendo-se a membranas com espessura de poucos micrómetros. A membrana do LifeScan One Touch® apenas exclui parcialmente as células sanguíneas. Esta situação obriga a que a medição seja efectuada em dois comprimentos de onda distintos. As tiras Accutrend® (Roche) operam com uma película mais espessa. Os glóbulos vermelhos são filtrados pela membrana química usando uma fibra de vidro que funciona como um filtro extremamente rápido (cerca de 0,5 segundos). Contudo, esta fibra de vidro tem uma espessura superior o que requer um volume de amostra maior, necessitando de pelo menos 10 µL de amostra e, como tal, não se enquadra nos produtos actualmente no mercado.

MÉTODOS DE MEDIÇÃO: ELECTROQUÍMICOS E FOTOMÉTRICOS

Quer os métodos electroquímicos quer os métodos fotométricos usam *designs* similares na zona de detecção das tiras reactivas. Em ambos os casos, a amostra é colocada na película. O produto é observado do lado oposto à aplicação da amostra. Contudo, os métodos de medição são diferentes. Nas tiras reactivas fotométricas Accu-Chek Active® (Figura 11) a medição é feita por iluminação.

Usualmente, recorre-se a um feixe de luz com comprimentos de onda curtos, por exemplo, um díodo de emissão de feixes de luz. Uma parte da reflexão difusa de luz atinge o fotodetector e é convertida em corrente. A medição pode ser feita com um feixe de luz rápido. O produto da reacção não é alterado pela medição, a qual é puramente física. Estas tiras têm como características exactidão e precisão de resultados. O volume de amostra necessário para a determinação da glicose sanguínea é definido por:

Área do filme químico x espessura necessária da amostra sobre o filme.

O volume captado pelo filme é desprezível no caso das tiras reactivas de reduzida espessura. Existe uma relação entre a cor e a espessura da amostra, relação essa que define uma curva de saturação, isto é, somente acima de um determinado limite, a cor torna-se independente do volume de amostra. A área medida é definida pela área iluminada pela fonte de luz. Esta fonte de luz tem uma área que é, normalmente, superior à área iluminada. O limite teórico para minimização da área e, por inerência, minimização do volume de amostra necessário é dado pela granulometria da película, à qual está ligada à precisão da medição. Por outras palavras, a área mínima de tira a utilizar varia em função da granulometria da película. Este limite mínimo de sensibilidade da tira reactiva é, correntemente, de alguns nanolitros. Pelo contrário, as me-

Quadro II - Dispositivos de determinação da glicose sanguínea: vantagens e desvantagens (adaptado da referência 10).

Equipamento	Amostra (µl)	Amostra Alternativa	Tempo (seg)	Tamanho	Memória (n.º de testes)	Capacidade de Download
Accu - Chek Active	1	Sim	5	4.6 x 1.7 x 0.9	200	Sim
Accu - Chek Advantage	4	Não	26	3.3 x 2.2 x 0.8	480	Sim
Ascensia Breeze	2.5 - 3.5	Sim	30	2.5 x 4.1 x 1	100	Sim
Ascensia Dex 2	3	Sim	30	3.2 x 2.6 x 1	100	Sim
FreeStyle	0.3	Sim	15	2.0 x 3.8 x 1	250	Sim
FreeStyle Flash	0.3	Sim	7	1.6 x 3.0 x 0.8	250	Sim
OneTouch Ultra	1	Sim	5	3.1 x 2.3 x 0.9	150	Sim
Precision Ultra	1.5	Sim	10	2.9 x 2.1 x 0.6	450	Sim

dições amperométricas ou colorimétricas convertem o produto da reacção, isto é, o mediador reduzido, de novo na sua forma oxidada. Esta reacção ocorre na superfície do eléctrodo, e a difusão é necessária para transportar as espécies reduzidas para a superfície do eléctrodo e o mediador oxidado para longe dele. Em princípio, este é um processo lento, contudo a reacção ocorre em poucos segundos ou mesmo em menos de 1 segundo. Quer as tiras fotométricas quer as tiras electroquímicas demoram cerca de 5 segundos.

EQUIPAMENTO ACTUALMENTE DISPONÍVEL

Os dispositivos de auto-vigilância da glicose sanguínea disponíveis no mercado têm por base uma tecnologia que pretende simplificar, com exactidão, a determinação da glicose sanguínea. Alguns dispositivos estão representados na Figura 6. Ao seleccionar um dispositivo o paciente deve ter em consideração uma série de características do equipamento e ter em conta preocupações específicas, como por exemplo a má visualização ou uma fraca destreza. O Quadro II resume de modo sintético as vantagens e as desvantagens do equipamento de auto-vigilância actualmente disponível no mercado.

CONCLUSÃO

As crescentes demandas e interesses no desenvolvimento de sensores implantáveis para a determinação da glicose no tratamento da diabetes tem levado a progressos notáveis nesta área. Vários sensores electroquímicos foram desenvolvidos para aplicações intravasculares e subcutâneas. No entanto, os implantes são atormentados pela destruição tecidual e pelas infecções circundantes. Além disso, a resposta aos sinais deve ser interpretada em termos sanguíneos e de concentrações plasmáticas de utilidade clínica, em vez de níveis de fluidos nos tecidos. Em termos científicos, há um maior sucesso no desenvolvimento de biossensores de mão do que de dispositivos implantáveis. Além de materiais convencionais como os eléctrodos de platina, ouro, prata e carbono vítreo, novos eléctrodos têm sido fabricados, nomeadamente de diamante dopado com boro, de modo a alargar o potencial. Nanomateriais, como nanotubos de carbono, juntamente com nanopartículas (ouro, platina, cobre, etc.) têm sido notificados por melhorarem significativamente o limite de detecção e a sensibilidade, bem como por facilitarem a imobilização da biomolécula. Estes materiais combi-

nados também podem promover reacções de transferência electrónica entre os sítios activos da enzima e os electrões detectados no eléctrodo. O sector dos biossensores é dominado por algumas grandes multinacionais, empresas com enormes fontes de financiamento para aquisição de tecnologia e validação. A entrada no mercado de um novo equipamento é muito difícil, a menos que um nicho de produto possa ser desenvolvido e a empresa possa dispor de vastos recursos financeiros para o desenvolvimento tecnológico, demonstração, validação e comercialização. Um exemplo de um potencial nicho de produto é o desenvolvimento de um sistema autónomo, descartável, de baixo custo e sem necessidade de equipamentos externos, reagentes, ou fontes de energia.

BIBLIOGRAFIA

- Owens DR. History and Vision: What is Important for Patients with Diabetes? *Diabetes Technology & Therapeutics*. 2008; 10(s1): p. S-5-S-9.
- Hönes J, Müller P, SurrIDGE N. The Technology Behind Glucose Meters: Test Strips. *Diabetes Technology & Therapeutics*. 2008; 10(s1): p. S-10-S-26.
- Schnell O, Hummel M, Weber C. Economic and Clinical Aspects of Diabetes Regarding Self-Monitoring of Blood Glucose. *Diabetes Technology & Therapeutics*. 2008; 10(s1): p. S-72-S-81.
- Heinemann L, Koschinsky T. Clinical Application and Challenges of Blood Glucose Measurement Technology for Self-Monitoring. *Diabetes Technology & Therapeutics*. 2008; 10(s1): p. S-27-S-34.
- Wild SH, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global Prevalence of Diabetes: Estimates for the Year 2000 and Projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004; 27(10): p. 2569.
- Joshi SR. Self-Monitoring of Blood Glucose in the Asia-Pacific Region. *Diabetes Technology & Therapeutics*. 2008; 10(s1): p. S-89-S-92.
- Poolsup N, Suksomboon N, Jiamsathit W. Systematic Review of the Benefits of Self-Monitoring of Blood Glucose on Glycemic Control in Type 2 Diabetes Patients. *Diabetes Technology & Therapeutics*. 2008; 10(s1): p. S-51-S-66.
- Laird T, Zisser H, Jovanovic L. Self-Monitoring of Blood Glucose in Pregnancy: Past to Present. *Diabetes Technology & Therapeutics*. 2008; 10(s1): p. S-82-S-88.
- Saudek CD, Derr RL, Kalyani RR. Assessing Glycemia in Diabetes Using Self-monitoring Blood Glucose and Hemoglobin A1c. *JAMA*. 2006; 295(14): p. 1688-1697.
- LeRoith D, Smith DO. Monitoring glycemic control: The cornerstone of diabetes care. *Clinical Therapeutics*. 2005; 27(10): p. 1489-1499.
- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global Prevalence of Diabetes. *Diabetes Care*. 2004; 27(5): p. 1047-1053.
- Goldstein DE, et al. Tests of Glycemia in Diabetes. *Diabetes Care*. 2004; 27(7): p. 1761-1773.