

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

CAMPUS DE BOTUCATU

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA

**PROCEDIMENTOS PARA DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS
BIOQUÍMICOS**

CURSO DE GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

DISCIPLINA: BIOQUÍMICA

ROTEIRO PARA AULAS PRÁTICAS

Professora Responsável:

Dr^a. ANA ANGÉLICA HENRIQUE FERNANDES

**Prof^a. Assistente Doutora do Departamento de Química e
Bioquímica**

BOTUCATU

2019

COORDENADORA

Profª. Drª. *Ana Angélica Henrique Fernandes*

**Profa. Ass. Drª. do Departamento de Química e Bioquímica
Instituto de Biociências-UNESP “Campus de Botucatu”**

COLABORADORAS

Profª. Drª. *Fernanda Mani*

**Profa. Ass. Drª. do Departamento de Química e Bioquímica
Instituto de Biociências-UNESP “Campus de Botucatu”**

Profª. Drª. *Ana Maria Lopes*

**Profa. Ass. Drª. do Departamento de Química e Bioquímica
Instituto de Biociências-UNESP “Campus de Botucatu”**

ASSISTÊNCIA TÉCNICA

Fábio Henrique Fava

**Assist. de Suporte Acadêmico – Departamento de Química e Bioquímica
Instituto de Biociências-UNESP “Campus de Botucatu”**

Danielle Fernandes da Silva

**Assist. de Suporte Acadêmico – Departamento de Química e Bioquímica
Instituto de Biociências-UNESP “Campus de Botucatu”**

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	5
.....	
1. Bioquímica básica	6
.....	
2. Análises especializadas	6
.....	
3. Análises de emergência	6
.....	
ORGANIZAÇÃO DO LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA	7
.....	
1. Controle de qualidade	8
.....	
2. Exatidão	9
.....	
3. Precisão	9
.....	
4. Valores de Referência	9
.....	
5. Validade dos testes de laboratório	10
.....	
6. Fatores biológicos que afetam a interpretação dos resultados	10
.....	
7. Amostras	11
.....	
a) Sangue	11
.....	
b) Obtenção do soro	11
.....	
c) Obtenção de plasma	11
.....	
8. Anticoagulantes	12
.....	
a. Heparina	12
.....	
b. Ácido etilenodiaminotetracético	12
.....	
c. Oxalatos	13
.....	
d. Fluoretos	13
.....	
e. Citrato de sódio	13
.....	
9. Sistema Internacional de Unidades	14
.....	
EXAMES BIOQUÍMICOS	15
.....	
1. Exames hematológicos	15
.....	
2. Exames bioquímicos sorológicos	16
.....	

3. Perfil lipêmico no soro

17

.....
4. Exames de urina

18
.....

ROTEIROS PARA AULAS PRÁTICAS:

1.	Estudo das propriedades bioquímicas dos aminoácidos	20
2.	Caracterização ou identificação qualitativa de proteínas em fluidos biológicos	21
3.	Determinação da amilase sérica	25
4.	Determinação qualitativa de vitamina C em suco de laranja	29
5.	Teste laboratorial para coagulação do sangue – Determinação da concentração de fibrinogênio no sangue	34
6.	Exame bioquímico de urina – Urina I	38
7.	Caracterização ou identificação qualitativa de carboidratos em fluidos biológicos	42
8.	Determinação da concentração de lactose no leite	48
9.	Determinação de glicemia	52
10.	Determinação de glicose – método enzimático	57
11.	Determinação da concentração de colesterol no soro	60
12.	Determinação de HDL-colesterol (lipoproteína de alta densidade) no soro	63
13.	Determinação de colesterolemia – método enzimático	66
14.	Determinação de HDL-colesterol – método enzimático	69
15.	Determinação de triglicerídeos – método enzimático	72
16.	Determinação da concentração de proteínas totais séricas e frações	76
17.	Determinação de proteína total e albumina em soro e urina – método enzimático	79
18.	Determinação de creatinina no soro	83
19.	Determinação da concentração de ureia	86
20.	Determinação da concentração de ácido úrico	90
21.	Elaboração de curva padrão – curva de referência para determinação quantitativa de caseína	94
22.	Determinação de carboidratos (açúcares solúveis totais) em alimentos vegetais	97
23.	Determinação de carboidratos (açúcares solúveis redutores) em alimentos vegetais	101
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
	PARÂMETROS NORMAIS PARA O RATO (Rattus norvegicus)	108

INTRODUÇÃO

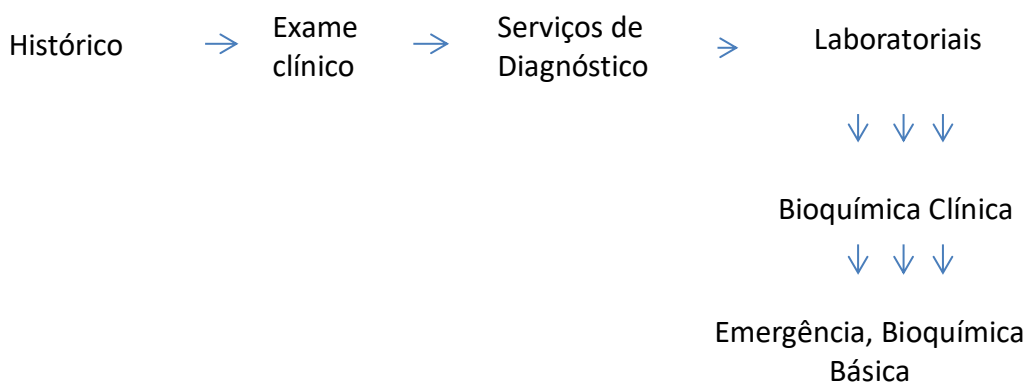
Há inúmeras documentações sobre o emprego do conhecimento da bioquímica na prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças; muitos exemplos podem ser citados, como infarto do miocárdio, aterosclerose, pancreatites, doenças genéticas, envolvendo erros metabólicos e, muitas outras.

Para elucidar a importância da bioquímica para o estudante de biomedicina e medicina, pode-se citar observações feitas pelo médico inglês Archibald Garrod, em pequeno grupo de erros congênitos do metabolismo, estimularam a investigação das vias bioquímicas afetadas nessas condições. Esforços para entender as bases bioquímicas da doença conhecida como hipercolesterolemia familiar, que acarreta aterosclerose severa na infância, conduziu ao enorme progresso no conhecimento de receptores celulares e mecanismos de entrada nas células. Atuais estudos sobre oncogênes de células cancerosas têm direcionado considerável atenção para os mecanismos moleculares envolvidos no controle do crescimento celular normal. Esses e muitos outros exemplos ilustram como observações originalmente realizadas na clínica podem ser aproveitadas na pesquisa básica em bioquímica sobre a função celular.

A bioquímica patológica/clínica define a área na qual os métodos bioquímicos, desenvolvidos no Laboratório Clínico, são aplicados para pesquisar uma determinada condição patológica.

Os testes de bioquímica clínica compreendem mais de um terço de todas as investigações laboratoriais e geralmente envolvem pesquisas que utilizam o sangue e urina, devido a facilidade de obter tais amostras.

Os testes bioquímicos podem ser usados no diagnóstico, no monitoramento do tratamento e na avaliação do prognóstico. Frequentemente, o laboratório de bioquímica está envolvido na pesquisa sobre a base bioquímica da patologia e nos testes clínicos de novos medicamentos.



Fluxograma da inserção da bioquímica clínica na medicina

Existem mais de 400 testes diferentes realizados nos laboratórios de bioquímica clínica. Algumas análises podem ser realizadas com kits comerciais, que contém os reagentes prontos para serem utilizados. Outras técnicas necessitam preparo dos reagentes ou são análises dinâmicas. Estes testes requerem muitas determinações, cronometradas após estímulo bioquímico como a carga de glicose, no teste de tolerância á glicose.

Em geral, os testes de Bioquímica Clínica podem ser divididos em Básicos, Especializados e de Emergência.

1. BIOQUÍMICA BÁSICA

São testes muito solicitados, que são realizados na maioria dos laboratórios. São análises básicas:

- a. Ureia e creatinina;
- b. Proteína total e albumina
- c. Bilirrubina e fosfatase alcalina
- d. Alanina aminotransferase (ALT) e Asparato aminotransferase (AST)
- e. Tiroxina e Hormônio tireoestimulante (TSH)
- f. γ -glutamil transpeptidase
- g. creatina quinase
- h. glicose
- i. amilase

2. ANÁLISES ESPECIALIZADAS

São análises solicitadas mais raramente. Exigem equipamentos especiais.

- a. Dosagens hormonais
- b. Proteínas específicas
- c. Vitaminas
- d. Lipídios e lipoproteínas
- e. Análises de DNA

3. ANÁLISES DE EMERGÊNCIA

Todos os laboratórios de Bioquímica possuem recursos para testes urgentes. São testes processados rapidamente. Os resultados podem ser comunicados via telefone devido a urgência nos resultados.

- a. Ureia e eletrólitos
- b. Amilase
- c. Glicose
- d. Cálcio

ORGANIZAÇÃO DE UM LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA

Um laboratório de Bioquímica compõe-se de um laboratório propriamente dito, um almoxarifado para armazenamento de drogas e materiais diversos, uma sala de coleta devidamente equipada, uma sala de aparelhos e sala de manutenção de animais, para permanência de animais de laboratório.

Os materiais necessários para as técnicas de laboratório em Bioquímica aqui descritas constituem aquelas consideradas mais simples e o mínimo possível em um laboratório. São eles:

- Água destilada ou deionizada
- Agitador magnético
- Agulhas
- Bastões
- Balança analítica
- Balões volumétricos
- Banho-maria com temperatura graduada
- Béqueres
- Bico de Bunsen
- Buretas
- Cânulas de polietileno
- Centrífuga
- Cubas de isopor
- Cubetas para leitura em espectrofotômetro
- Erlenmeyers
- Espectrofotômetros UV e luz visível
- Estantes para tubos de ensaio
- Estufa para secagem do material
- Funis
- Frascos de vidro e de plástico
- Geladeira
- Homogeneizador de tecidos
- Leitor de placa para determinações cinéticas e hormonais
- Material cirúrgico
- Micropipetas
- Papel de filtro

- Peras
- Pinças
- Pipetas graduadas e automáticas
- Ponteiras para micropipetadores automáticos
- Potenciômetro
- Provetas
- Relógio com alarme
- Seringas
- Suportes para pipetas
- Telas de amianto
- Termômetro
- Tripés
- Tubos conta-gotas
- Tubos de ensaio
- Tubos de centrífuga
- Tubos para leitura

1. CONTROLE DE QUALIDADE

Numerosos trabalhos publicados enfatizam a necessidade de que cada laboratório tenha um sistema adequado para testar a qualidade de seu trabalho, uma vez que as determinações bioquímicas são essenciais para o diagnóstico.

O termo “controle de qualidade” é um método de testar um produto para determinar se o mesmo atende as especificações estabelecidas. Para isso, é necessário conhecer a terminologia adequada.

Para que uma amostra possa desempenhar seu papel de aferidor ou de controle das determinações, ela deve:

- a. Ter os elementos a serem dosados, dissolvidos, o mais semelhante possível da amostra a ser dosada;
- b. Manter a estabilidade dos elementos dosados no estado congelado ou à temperatura ambiente.

2. EXATIDÃO

É a correção de uma medida ou a obtenção de um resultado o mais próximo possível do valor real. Um método é dito exato, quando os valores obtidos estão bem próximos dos valores verdadeiros. A exatidão pode ser avaliada quantitativamente através do erro da média.

3. PRECISÃO

É a propriedade de obter valores bastante próximos da média. Um método é dito preciso, quando os valores obtidos são considerados reprodutíveis ou repetitivos. A precisão é medida quantitativamente, usando o desvio-padrão ou o coeficiente de variação (CV).

A palavra repetibilidade é usada quando os testes são realizados ao mesmo tempo (precisão intratestes) e o termo reprodutibilidade é usado quando os testes são realizados por pessoas diferentes em dias distintos (precisão intertestes).

4. VALORES DE REFERÊNCIA

Em geral, a variação analítica é menor que a biológica. Geralmente os testes bioquímicos são comparados a uma faixa de referência considerada representativa do estado de normalidade.

A maioria das faixas de referência é selecionada arbitrariamente e inclui 95% dos valores encontrados em voluntários sadios; logo, por definição, 5% da população terão um resultado fora da faixa de referência. Na prática, não existem limites rígidos separando a população doente da sadia; entretanto, quanto mais afastado um resultado estiver dos limites da faixa, maior será a probabilidade de ele representar uma patologia. Em algumas situações, torna-se útil definir os “limites de ação”, nos quais se adota uma determinada intervenção em resposta a um resultado bioquímico.

Frequentemente existe um grau de sobreposição entre o estado de doença e o “valor normal”. Um paciente com um resultado anormal que não tem a doença é chamado de falso positivo; um paciente que tem a doença e que tem um resultado normal é chamado falso negativo.

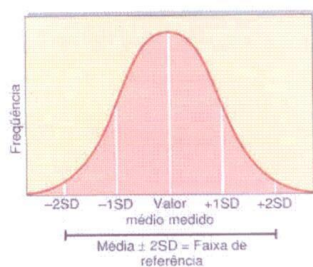


Figura 02: Faixa de referência em uma população normal sadia.

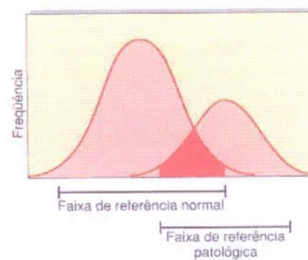


Figura 03: Sobreposição de resultados bioquímicos na saúde e na doença.

5. VALIDADE DOS TESTES DE LABORATÓRIO

O valor clínico de um teste é relacionado a sua especificidade e sensibilidade e incidência da patologia na população testada.

Sensibilidade reflete a porcentagem de resultados positivos em pacientes com a doença. O teste para fenilcetonúria é altamente sensível: um resultado positivo em todos que tem a moléstia (100% sensibilidade). O teste do antígeno carcinoembrionário tem baixa sensibilidade; apenas 72% daqueles com carcinoma de colo apresentam resultado positivo quando a doença é extensa, e apenas 20% são positivos na fase inicial da doença. Baixa sensibilidade ocorre em muitas moléstias em fase inicial da doença – com contraste a sensibilidade elevada em estágios bem avançados da doença.

6. FATORES BIOLÓGICOS QUE AFETAM A INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

A discriminação entre resultados normais e anormais é afetada por vários fatores fisiológicos que devem ser levados em consideração ao se interpretar qualquer resultado. Eles incluem:

- a. Sexo: valores de referência para alguns analisados, tais como a creatinina no soro, são diferentes para homens e mulheres;
- b. Idade: pode haver faixas de referência diferentes para neonatos, crianças, adultos e idosos;
- c. Dieta: a amostra pode não ser apropriada se for colhida quando o paciente estiver em jejum, ou após a refeição;
- d. Período do dia em que foi colhida a amostra: pode haver variação entre dia e noite;
- e. Estresse e ansiedade
- f. Postura do paciente: distribuição do líquidos pode afetar o resultado;
- g. Exercício físico: pode liberar enzimas dos tecidos, afetando os resultados;

- h. Histórico médico: infecções e/ou lesões de tecidos podem afetar os valores bioquímicos, independentemente da doença que está sendo investigada;
- i. Gravidez;
- j. Histórico de medicação: pode ter efeitos específicos nas concentrações plasmáticas de alguns analisados.

7. AMOSTRAS

a. SANGUE

O sangue coletado para exames bioquímicos e sorológicos não requer precauções especiais. Para determinações enzimáticas as amostras devem ser refrigeradas.

b. OBTENÇÃO DO SORO

Para obtenção do soro, colocamos o sangue retirado em um tubo sem anticoagulante e o deixamos coagular espontaneamente. Isso requer, normalmente, entre 5 e 15 minutos, quando o sangue é mantido à temperatura ambiente, ou um pouco menos se a temperatura for 37° C (banho-maria). O coágulo formado adere às paredes do tubo e é separado roçando-se (apenas uma vez) uma vareta de vidro em toda a profundidade da amostra, pela periferia do tubo. A seguir, centrifuga-se a 3500 rpm durante 10 min. Se deixarmos o coágulo retrair da centrifugação, obteremos maior volume de soro e será mais fácil evitar hemólise. A 37° C obteremos maior volume de soro.

Para decidir se é conveniente ou não permitir que o coágulo retraia antes de separar o soro, temos que levar em conta as possíveis trocas que podem sofrer as substâncias a analisar, durante o tempo necessário para que haja retração, trocas estas que se devem às transferências de determinadas substâncias do soro para as hemácias e vice-versa. Geralmente, separa-se o soro do coágulo durante a primeira hora após a coagulação. Uma vez centrifugado, o soro é separado através de uma pipeta automática, evitando-se aspirar as hemácias.

c. OBTENÇÃO DO PLASMA

Muitos componentes do sangue se encontram em concentrações diferentes no interior das hemácias e na fase plasmática. Em alguns casos, a substância está mais concentrada dentro das hemácias, sendo, portanto necessário efetuar a análise no sangue total. Os resultados, nesses casos, dependem do volume celular, isto é, do hematócrito.

Raras vezes, em Bioquímica Clínica, utilizamos o plasma em lugar do soro. Todavia, o emprego do plasma apresenta duas vantagens:

- a. Não é necessário nenhum intervalo desde o momento em que se retira o sangue e a centrifugação;
- b. Obtêm-se volumes maiores a partir de uma amostra de sangue determinada.

A coagulação do sangue é evitada através do uso de anticoagulantes e pode ser retardada recolhendo-se o material em recipientes revestido com parafina ou silicone, ou ainda em recipientes de polietileno ou teflon; nestas condições, pode-se conseguir a separação das hemácias e do plasma mediante centrifugação imediata. Este processo é utilizado quando se necessita obter plasma sem nenhum anticoagulante químico.

8. ANTICOAGULANTES

a. HEPARINA

Esta substância contém ácido glicurônico e glicosamina.

A heparina evita a coagulação impedindo a conversão da protrombina e conseqüentemente a transformação de fibrinogênio em fibrina, conservando as plaquetas intactas.

É encontrada no comércio sob a forma de sal sódico ou potássio. Geralmente utiliza-se este anticoagulante em concentrações de 0,2 mg/ml de sangue e costuma-se juntar o mesmo sob a forma de solução concentrada nos recipientes que vão conter o sangue e evaporar à temperatura a 100° C.

Diversos investigadores comprovaram que a heparina, inclusive em concentrações superiores às necessárias para evitar a coagulação, não determina alteração no volume das hemácias.

As preparações comerciais de heparina frequentemente estão contaminadas com fosfatos, motivo pelo qual não se deve empregá-las quando se trata de analisar o conteúdo de fósforo de uma amostra de sangue.

b. ÁCIDO ETILENODIAMINOTETRACÉTICO (EDTA)

Este ácido, comumente abreviado como EDTA, é um anticoagulante graças ao seu poder de quelação sobre os íons cálcio. Encontra-se no comércio sob a forma de ácido livre ou sob a forma de sal sódico, com os nomes registrados de Sequestrene ou Versene.

É suficiente para evitar a coagulação, 1mg do sal sódico ou potássico por ml de sangue; de qualquer forma, ainda que empregando em concentrações superiores, não se produzem mudanças detectáveis no volume eritrocitário. Recomenda-se o uso do sal potássico por ser mais solúvel.

Os vidros são preparados, depositando-se nos mesmos um volume adequado de uma solução do sal a 0,1%, deixando-se secar à temperatura ambiente.

O EDTA sódico (ou potássico) não interfere na determinação de glicose, ureia e creatinina, prolongando, todavia, o tempo de protrombina.

c. OXALATOS

Os oxalatos de potássio, sódio e lítio atuam como anticoagulantes por precipitarem o cálcio.

O oxalato de potássio é o mais empregado; ele é usado na concentração de 1 a 2 mg/ml de sangue. Pode ser utilizado em forma de solução aquosa a 20%, da qual se emprega 0,01 ml/ml de sangue.

Quando se prefere secar o oxalato antes de utilizar, a temperatura não deve ser superior a 100° C, uma vez que a temperaturas superiores o oxalato se decompõe.

O perigo de hemólise cresce ao aumentar a concentração e é praticamente inevitável quando a concentração do sal excede 3 mg/ml de sangue.

O maior inconveniente que apresenta o uso de oxalatos implica nas alterações produzidas nas concentrações dos componentes do plasma.

Utilizando-se oxalato de potássio, o hematócrito é de 8 a 13% inferior ao que se obtém com a heparina, devido à perda de líquido da hemácia para o plasma, por causa do aumento da pressão osmótica neste último.

d. FLUORETOS

Usa-se o fluoreto de sódio (NaF), que age como anticoagulante captando os íons cálcio e além disso possui ação conservadora sobre determinados elementos do sangue. Como é imprescindível utilizar quantidades relativamente altas para evitar a coagulação, tais concentrações causam uma perda de água significativa nos eritrócitos, produzindo facilmente a hemólise.

e. CITRATO DE SÓDIO ($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$)

Age como anticoagulante captando cálcio, na concentração de 5 mg/ml de sangue. Por causar notável perda de água por parte das hemácias, com conseqüente diluição do plasma, é pouco utilizado em Bioquímica Clínica.

9. SISTEMA INTERNACIONAL DE UNIDADES (SIU)

Um sistema “coerente” tem sido desenvolvido por uma organização internacional designada “General Conference of Weights and Measures”. Uma adaptação tem sido tentativamente recomendada pela “Commission on Quantities and Units of the Section on Clinical Chemistry, International Union on Pure and Applied Chemistry”. SIU são empregados em alguns países europeus, e a sua utilização continuará se o sistema mostra-se útil no entendimento dos processos fisiológicos.

EXAMES BIOQUÍMICOS

I – EXAMES HEMATOLÓGICOS

Exame realizado	Valores normais		
	Unidade	Homens	Mulheres
Hemácias	mm ³	4,5 – 6,0 x 10 ⁶	4,2 – 5,0 x 10 ⁶
Hemoglobina	g/100 ml	13 a 18	11 a 16
Hematócrito	%	40 a 54	36 a 46

Índices hematimétricos		
Parâmetro	Unidade	Valor
VCM = UGM ₂	micra ³	82 a 94
HCM = HGM	pg	27 a 32
CHCM	%	32 a 36
Plaquetas		150 000 a 440000
Leucócitos		5 000 a 10000

Contagem diferencial dos leucócitos		
Leucócito	Valor normal (%)	Valor normal (por mm ³)
Bastonetes	0 a 3	0 a 300
Segmentados	48 a 68	2 400 a 7000
Neutrófilos	50 a 70	2 500 a 7000
Eosinófilos	1 a 4	50 a 400
Basófilos	0 a 1	0 a 100
Linfócitos	20 a 30	1000 a 3000
Monócitos	3 a 9	150 a 900
Plasmócitos	0 a 1	0 a 100

Observações:

- **Leucocitose:** leucócitos em concentração superior a 10000/mm³ de sangue;
- **Leucopenia:** leucócitos em concentração inferior a 5000/mm³ de sangue;
- **VGM** = volume globular médio = hematócrito/número de hemácias;
- **HCM** = hemoglobina corpuscular média = % de hemoglobina/nº de hemácias;
- **CHCM** = concentração de hemoglobina corpuscular média = % de hemoglobina/hematócrito.

II – EXAMES BIOQUÍMICOS SOROLÓGICOS

DIAGNÓSTICO	EXAMES REALIZADOS	VALORES NORMAIS
Diabetes mellitus	Glicemia Hemoglobina A ₁ C Curva glicêmica 7,5 g – dextrosol V. O. Glicemia de jejum 60 minutos 120 minutos 180 minutos	70 a 110 mg (%) 5,85 a 8,85 (%) 70 a 110 mg (%) Abaixo de 200 mg (%) Abaixo de 140 (%) Abaixo de 140 (%)
Testes de função renal	Glicosúria (24h) Glicosúria (1º período) Glicosúria (2º período) Glicosúria (3º período) Glicosúria (4º período) Ureia – soro Creatinina – soro	Ausente Ausente Ausente Ausente Ausente 15 a 40 mg (%) 0,4 a 1,3 mg (%)
Testes de função hepática	Bilirrubina total Bilirrubina direta Bilirrubina indireta TGO = AST TGP = ALT Fosfatase alcalina	0 a 1,2 mg (%) 0 a 0,4 mg (%) 0 a 0,8 mg (%) 4 a 36 UI 4 a 32 UI 13 a 43 UI (adultos) / 56 a 156 UI (crianças)
Teste de função hepática, hipoproteinemia, desnutrição proteica e infecções	Proteínas totais Albumina Globulinas Relação A/G	6 a 8 g (%) 3,5 a 5,5 g (%) 1,3 a 3,2 g (%) 1,2 a 4 g (%)
Lesão prostática	Fosfatase ácida (PSA)	0,5 a 5 UI
Pancreatite aguda	Amilase	40 a 160 UI
Lesão muscular cardíaca	DHL = LDH Creatino quinase (CK)	80 a 240 U/l Menor que 150 U/l
Hipercalcemia = acidose Fraqueza muscular e alterações no ritmo cardíaco Hipocalcemia = hiporreflexia e arritmia cardíaca	Potássio	3,5 a 5 mEq/l
Hipernatremia = desidratação	Sódio	135 a 148 mEq/l

Hiponatremia = edema, perda de sódio		
Hipercalcemia = hiperparatireoidismo Hipocalcemia = hipoparatiroidismo, deficiência de vit. D, dano renal e alterações ósseas	Cálcio	8,8 a 11 mg (%)
Hiperfosfatemia = dano renal Hipofosfatemia = dieta	Fósforo	2,5 a 4,8 mg (%) (adultos) 3 a 7 mg (%) (crianças)
Anemia ferropriva	Ferro	50 a 150 µg (%)
Gota	Ácido úrico	2,5 a 7 mg (%) (homens) 1,5 a 6 mg (%) (mulheres)

III – PERFIL LIPÊMICO NO SORO

EXAMES REALIZADOS	VALOR OBTIDO	VALORES DE REFERÊNCIA (mg %) – método enzimático
Lipídios totais		350 a 500
Triglicérides		< 200 mg/dl
Colesterol total		< 200 mg/dl
Colesterol – HDL		> 50 mg/dl
Colesterol – LDL		< 130 mg/dl
Colesterol – VLDL		< 40 mg/dl
Colesterol total / Colesterol – HDL		≤ 4,97 (homens) ≥ 4,44 (mulheres)
Colesterol LDL / Colesterol – HDL		≤ 1,00

Risco de DCI (Incidência de Doença Cardiovascular)

- referente à fração LDL/HDL: > 1,0
- referente à fração colesterol total / colesterol HDL: > 4,97 (homens); > 4,44 (mulheres)

VALORES RECOMENDADOS PELO CONSELHO BRASILEIRO SOBRE DESLIPIDEMIAS

LIPÍDIOS SÉRICOS (mg/dl)	DESEJÁVEL	LIMÍTROFE	ELEVADO
Triglicérides	< 200	-	> 200
Colesterol total	< 200	200 – 239	> 240
Colesterol HDL (homem)	> 35	-	-
Colesterol HDL (mulher)	> 45	-	-

IV – EXAMES DE URINA

Exames realizados	Resultados	Valores normais
Depósito		Zero
Volume		
Cor		Amarelo
Cheiro		Próprio
Aspecto		Transparente
Reação		Ácida
Densidade		1016 a 1024
Proteínas		Ausente
Substância redutora		Ausente
Corpos cetônicos		Ausente
Bilirrubina		Ausente
Hemoglobina		Ausente
Sedimento celular		
Filamentos		
Leucócitos		Até 8000/ml
Hemácias		Até 7000/ml
Cilindros		
Cristais		
Outros elementos		

CONDIÇÕES ASSOCIADAS AO ESTADO ÁCIDO-BASE ANORMAL

Muitas condições patológicas são acompanhadas ou causadas por distúrbios do equilíbrio ácido-base e da composição de eletrólitos do sangue. Estas alterações são geralmente refletidas nos quadro de ácidos-base do líquido extracelular. Como o sangue é a única amostra líquida extracelular que pode ser facilmente obtida, o estado ácido-base é avaliado a partir de medidas se pH e $p\text{CO}_2$ no sangue, e da determinação de HCO_3^- e CO_2 . É importante notar, no entanto, que os resultados obtidos no sangue ou plasma nem sempre podem constituir uma verdadeira indicação do estado ácido-base do líquido intracelular.

As anormalidades do equilíbrio ácido-base do sangue são geralmente acompanhadas de alterações características das concentrações de eletrólitos no plasma, especialmente no caso dos distúrbios ácidos-base, classificados em um dos quatro tipos seguintes: acidose metabólica, alcalose metabólica, acidose respiratória e alcalose respiratória. Estes tipos podem, ainda, ser caracterizados como descompensados, parcialmente compensados ou completamente compensados. Para os distúrbios metabólicos primários, a compensação é feita alterando a $p\text{CO}_2$ pela respiração. Pra distúrbios respiratórios primários, o rim fornece a compensação, reajustando a HCO_3^- . A compensação completa está presente sempre que o paciente conseguir toda a correção de pH que seja fisiologicamente possível. Menos do que a correção possível é chamada de compensação parcial.

PRÁTICA 1

ESTUDO DAS PROPRIEDADES QUÍMICAS DOS AMINOÁCIDOS

1. INTRODUÇÃO

Os aminoácidos ocorrem em soluções aquosas como íons dipolares e não como moléculas não dissociadas. Podem agir como ácidos (doador de prótons) ou como bases (receptor de prótons). Na titulação, são neutralizados, volume a volume, por soluções de mesma normalidade. A faixa de pH onde exercem poder tampão varia de acordo com o valor da constante da dissociação dos seus grupos ionizáveis.

2. MATERIAL E REAGENTES

Potenciômetro, bureta, agitador magnético, béquer, erlenmeyer, solução de glicina 0,1 M, HCl 0,1 N, NaOH 0,1 N, papel milimetrado, fenolftaleína, pipetas.

3. TÉCNICA

Transferir 10 ml de glicina 0,1 M para béquer de 100 ml. Adicionar 10 ml de HCl 0,1N. Adicionar 3 gotas de fenolftaleína à solução no béquer. Titular com NaOH 0,1 N. Anotar os valores de pH no potenciômetro para cada adição de 1 ml de NaOH. Lançar os dados em papel milimetrado. Calcule o ponto isoelétrico da glicina, bem como os valores de pK'_1 e pK'_2 , obtidos através do gráfico. Indicar as regiões de pH no gráfico onde os grupos ionizáveis glicina atuam como tampão.

4. DISCUSSÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

- a. Interpretar os resultados, comparando com os valores esperados.
- b. Qual a relação entre ionização de aminoácidos e função tamponante?
- c. Qual a relação entre ionização de aminoácidos e estruturas secundárias, terciárias e quaternárias das proteínas?

PRÁTICA 2

CARACTERIZAÇÃO OU IDENTIFICAÇÃO QUALITATIVA DE PROTEÍNAS EM FLUIDOS BIOLÓGICOS

1. INTRODUÇÃO

As reações químicas que permitem identificar aminoácidos e proteínas podem ser de precipitação ou de coloração. As reações de precipitação são devidas ao caráter anfotérico das proteínas enquanto que as de coloração são características dos grupos funcionais: carboxílicos, α -amínicos e das cadeias laterais.

2. MATERIAL E REAGENTES

2.1. REAÇÕES DE PRECIPITAÇÃO

- **Coagulação com ácidos minerais fortes: Reação de Heller**

Introdução

Os ácidos minerais fortes desnaturam as proteínas, que perdem sua forma natural tornando-se insolúveis.

Material e reagentes

Solução proteica, ácido nítrico concentrado, tubos de ensaio, pipetas.

Método

Colocar 2 ml de solução proteica em um tubo de ensaio. Incline o tubo 45° e adicionar VAGAROSAMENTE 2 ml de ácido nítrico concentrado PELAS BORDAS DO TUBO, LENTAMENTE, com uma bureta, sem misturar. No limite de separação das duas camadas aparece um anel branco.

- **Precipitação pelos reagentes de alcaloides: Reação de Esbach**

Introdução

As proteínas ficam carregadas positivamente ($\text{pH} < \text{pI}$) em meio ácido, e reagem com alcaloides formando sais insolúveis.

Materiais e reagentes

Reativo de Esbach:

1 g de ácido pícrico, 2 g de ácido cítrico, água destilada q. s. p. 100 ml.

Método

Colocar 2 ml de solução proteica em um tubo de ensaio e adicione 10 gotas do reativo de Esbach. Forma-se um precipitado amarelo, solúvel em álcalis (experimentar adicionar 15 gotas de solução de hidróxido de sódio 10%).

2.2. REAÇÕES DE COLORAÇÃO OU ESTRUTURAIS

- **Reação da Ninhidrina**

Introdução

A ninhidrina (hidrato de hidreto – hidrineno) reage com grupos amínicos livres de aminoácidos, polipeptídeos e proteínas a quente em pH > 4,0, dando origem a púrpura de Ruheman de cor azul-arroxeadas.

Método

Colocar 2 ml de solução proteica em um tubo de ensaio e adicione 2 ml de solução de ninhidrina 0,2% em butanol normal saturada de água. Deixar ferver por 1 min. Notar a formação da cor azul.

3. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DO LEITE VACA (CASEÍNA)

3.1. TÉCNICA

- Transferir 5 ml de leite para tubo de centrífuga
- Adicione 5 ml de etanol absoluto
- Centrifugue
- Decantar, lavar mais de uma vez, com 5 ml de álcool
- Centrifugar e decantar
- Dissolver o precipitado com 5 ml de NaOH 10%
- Realizar o teste de Biureto: 2 ml da amostra + 5 gotas de Sulfato de Cobre 1%

4. DISCUSSÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

4.1. Interpretar os resultados.

4.2. Leitura programada: “Alteração no dobramento das proteínas pode ter consequências fatais” e “Elaboração da estrutura protéica com função de medicamento”

FUNDAMENTO DA ENZIMOLOGIA DIAGNÓSTICA

A enzimologia clínica é a aplicação da ciência das enzimas ao diagnóstico e tratamento das doenças. As enzimas são proteínas com propriedades catalíticas devido a sua capacidade de ativação específica dos seus substratos. Tal definição indica as propriedades características das enzimas, que, por sua vez, governam os fundamentos dos métodos de análise enzimática.

Todas as centenas de diferentes enzimas presentes no organismo humano são biossintetizadas dentro das células, e a maioria delas executa suas funções nas próprias células onde são formadas. Contudo, certas enzimas são secretadas numa forma ativa ou inativa, e estas, após um processo de ativação, exercem ação nos líquidos extracelulares. Os exemplos mais óbvios disso são as proteases e outras hidrolases secretadas no tubo digestivo, algumas das quais (por exemplo, a amilase pancreática) podem adentrar na corrente sanguínea. Outros exemplos de enzimas secretadas são as que participam do mecanismo da coagulação. Com poucas exceções, o bioquímico clínico está principalmente interessado em alterações a nos níveis (isto é, atividade ou massa) no soro ou plasma, das enzimas normalmente presentes no compartimento intracelular e que normalmente estão presentes no soro, somente em níveis baixos. Ao medir as alterações nas atividades dessas enzimas, podem-se tirar conclusões sobre a localização e a natureza das alterações patológicas teciduais. Portanto, é necessário compreender os fatores que afetam a taxa de liberação das enzimas a partir de suas células de origem e a taxa pela qual são depuradas da circulação, para que as alterações dos níveis na doença possam ser corretamente interpretadas.

PRÁTICA 3

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA AMILASE SÉRICA

1. INTRODUÇÃO

O amido é o polissacarídeo de reserva das plantas superiores. É formado por dois componentes, a α -amilose e amilopectina. A α -amilose consiste em longas cadeias não ramificadas nas quais todas as unidades de D-glicose são ligadas por ligações α (1 \rightarrow 4).

O amido forma um complexo coloidal azul intenso com solução de iodo. Esta cor é dada pela fixação do iodo no interior das hélices da α -amilose, formando complexos corados ou insolúveis azuis. A fixação do iodo pelas soluções micelares da amilopectina dá uma coloração vermelho-violeta.

A amilase (EC 3.2.1.1) é uma enzima que catalisa a hidrólise do amido com produção de dextrinas e maltose. O amido, mas não a maltose, forma um complexo colorido azul com solução de iodo, proporcional à concentração de amido remanescente, após a ação enzimática.

Uma unidade amilásica corresponde à atividade capaz de hidrolisar 10 mg de amido em 30 minutos na condição do teste.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. SUBSTRATO DE AMIDO TAMPONADO PH = 7,0

Dissolver 13,3 g de Na_2HPO_4 (ou 33,55 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) e 4,3 g de ácido benzoico ($\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{COOH}$) em aproximadamente 250 ml de água destilada em um béquer de 500 ml. Levar a solução à ebulição e juntar 0,2 g de amido solúvel previamente suspenso em 5 ml de água destilada fria. Lavar o recipiente com água destilada de modo a transferir todo o amido. Continuar a ebulição da solução durante 1 min após a adição do amido. Deixar esfriar à temperatura ambiente, transferir o volume para um balão de 500 ml e completar com água destilada. O pH deve ser $7,0 \pm 0,1$.

Observações:

- Esta solução é estável por pelo menos 3 meses em temperatura ambiente;
- Usar água destilada recente. Evitar contaminação com saliva.

2.2. Solução estoque de iodo

Dissolver 0,3567 g de iodato de potássio (KIO₃) e 4,5 g de iodeto de potássio (KI) em 80 ml de água destilada. Transferir para balão de 100 ml. Adicionar lentamente e com agitação 0,9 ml de ácido clorídrico concentrado e completar o volume para 100 ml. Guardar em refrigerador.

2.3. Solução de iodo

Dissolver 5,9 g de fluoreto de potássio (KF . H₂O) em 35 ml de água destilada. Transferir para balão de 50 ml. Adicionar 5 ml da solução estoque de iodo e completar o volume com água destilada. Guardar em frasco âmbar, no refrigerador. Esta solução é estável por 2 meses.

3. PRÁTICA

Em dois tubos de ensaio, marcados (A) e (C), pipetar:

Reagentes	Amostra (A)	Controle (C)
Substrato de amido	1,0 ml	1,0 ml

Levar os tubos ao banho-maria a 37° C para estabilizar a temperatura. Continuar com os tubos no banho-maria (marcar o número do seu grupo nos tubos).

Reagentes	Amostra (A)	Controle (C)
Soro	0,1 ml	-

Deixar em repouso no banho-maria por 7,5 minutos. Retirar do banho-maria.

Reagentes	Amostra (A)	Controle (C)
Solução de iodo do uso	1,0 ml	1,0 ml
Água destilada	8,0 ml	8,0 ml

Misturar e transferir para tubos de leitura. Efetuar as leituras a 660 nm acertando o zero do aparelho com água destilada.

4. CÁLCULOS

1 U de amilase = 10 mg de amido / 100 ml / 30 minutos, ou:

$$1 U = \frac{10 \text{ mg de amido}}{100 \text{ ml de solução}/30 \text{ minutos}} = \frac{10}{3000}$$

Controle:

0,2 g de amido ----- 500 ml de solução

X g de amido ----- 1 ml de solução

X = 0,0004 g (ou 0,4 mg) de amido

Usando a equação anterior, podemos calcular quantos U de amido existem na amostra. Basta dividir a Amostra pela Unidade calculada na equação.

$$\frac{0,4}{0,1 \times 7,5} / \frac{10}{3000} = \frac{0,4 \times 3000}{0,1 \times 7,5 \times 10} = \frac{1200}{7,5} = 160 \text{ (fator de correção)}$$

Usando a fórmula:

$$\frac{Ab_{controle} - Ab_{amostra}}{Ab_{controle}} \times 160 = U_{amilásicas}/100 \text{ ml de soro}$$

O uso do controle se refere ao amido que não foi hidrolisado.

5. VALORES DE REFERÊNCIA E INTERPRETAÇÃO

A amilase encontra-se no plasma sanguíneo, pâncreas, saliva, fígado e fezes. Os valores normais no soro e plasma humano variam entre 40 a 160 U amilásicas / 100 ml (plasma) e entre 43 e 245 U amilásicas / hora (urina), baseados em coletas de 6 a 24 h.

O principal valor clínico da determinação da atividade amilásica é no diagnóstico da pancreatite aguda. Neste caso, alcançam-se valores que atingem 500 a 3000 U amilásicas/100 ml. A elevação é transitória, aumentando durante as próximas 24 - 30 h, podendo diminuir nas 24 - 48 h subsequentes.

Valores baixos são encontrados na cirrose hepática, carcinoma hepático, hepatites, toxemia da gravidez e alcoolismo agudo.

TABELA 1. VALORES NORMAIS DA AMILASE SÉRICA EM MAMÍFEROS

Diagnóstico	UA/dl de soro
Normal	40 – 160
Pancreatite aguda	500 – 3000
Pancreatite crônica	Até 200
Outros processos abdominais agudos (sem pancreatites)	Iguais ao normal

Observações:

- a. Oxalatos, citratos e fluoretos inibem a atividade amilásica;
- b. Não devemos usar plasma, pois anticoagulantes interferem no resultado;
- c. O tempo de incubação deve ser cronometrado;
- d. As amostras de soro e urina são estáveis por 7 dias, à temperatura ambiente.
- e. As hemácias não contêm amilase, portanto a hemólise não interfere no resultado.

6. DISCUSSÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

- 6.1. Resultados obtidos (leitura).
- 6.2. Cálculos.
- 6.3. Interpretar os resultados.
- 6.4. Observar que amilase sérica elevada é indicador de lesão celular na pancreatite aguda.
- 6.5. Diferenciar concentração (mg / dl) de atividade amilásica (U).

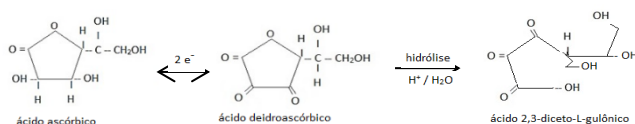
PRÁTICA 4

DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE VITAMINA C EM SUCO DE LARANJA

1. INTRODUÇÃO

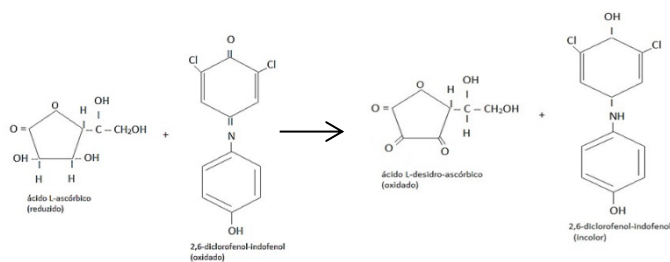
A vitamina C (ácido ascórbico) é uma vitamina hidrossolúvel, essencial na dieta do homem, outros primatas, cobaias, peixes e alguns invertebrados. Ela pode ser sintetizada a partir de várias reações a partir de glicose pelas outras espécies de animais e também pelos vegetais.

O ácido ascórbico é especialmente abundante nas frutas cítricas e nos tomates. Em grande parte é destruído pelo cozimento. Ele é um agente fortemente redutor, que perde com facilidade seus átomos de hidrogênio para se transformar em ácido L-desidroascórbico (ativo), o qual também apresenta atividade de vitamina C. Contudo, a atividade vitamínica é perdida quando o anel lactona do ácido desidroascórbico (ativo) é hidrolisado, formando o ácido dicetogulônico (inativo):



2. MÉTODO

Para determinação quantitativa de vit. C em sucos de frutas é usado o método de Tillman. O 2,6-diclorofenol-indofenol é azul quando está oxidado, e incolor quando reduzido.



O ácido L-ascórbico é praticamente o único agente presente nos extratos vegetais e animais capaz de reduzir o 2,6-diclorofenol-indofenol entre pH 1 e 4. Nestas condições, o 2,6-diclorofenol-indofenol passa de azul (oxidado) para incolor (reduzido).

O reagente empregado para extrair o ácido ascórbico das plantas e tecidos animais é a solução de ácido metafosfórico a 5%. Este reagente, além de extrair o ácido ascórbico, precipita proteínas e inativa as enzimas que oxidam o ácido ascórbico, além de ser quelante para os metais e fornecer a acidez necessária para a reação.

3. REAGENTES

3.1. ÁCIDO METAFOSFÓRICO A 5%

- 5 g de ácido metafosfórico
- Água destilada q. s. p. balão volumétrico de 100 ml

3.2. SOLUÇÃO DE 2,6-DICLOROFENOL-INDOFENOL (0,1 mg / ml)

- 10 mg de 2,6-diclorofenol-indofenol
- Água destilada q. s. p. balão volumétrico de 100 ml

3.3. SOLUÇÃO DE REFERÊNCIA ESTOQUE DE ÁCIDO ASCÓRBICO (1 mg / ml)

- 100 mg de ácido ascórbico
- Água destilada q. s. p. balão volumétrico de 100 ml

3.4. SOLUÇÃO DE REFERÊNCIA DE ÁCIDO ASCÓRBICO (100 µg / ml)

- 100 ml de solução estoque de ácido ascórbico (1 mg / ml)
- Ácido metafosfórico 5% q. s. p. balão volumétrico de 100 ml

4. PRÁTICA

- 4.1. Retirar o suco de 1 laranja e filtrar em algodão;
- 4.2. Pipetar 5 ml de suco filtrado e transferir para balão volumétrico de 50 ml, completando o volume com ácido metafosfórico 5%. Esta solução será denominada SOLUÇÃO-PROBLEMA.
- 4.3. Numerar 2 erlenmeyers de 125 ml. Transferir 10 ml da solução de 2,6-diclorofenol-indofenol 0,1 mg/ml a cada um.
- 4.4. Titular o erlenmeyer nº 1 com a solução de referência de ácido ascórbico 100 µg/ml, até que 1 gota produza o descolorimento completo da cor da solução de corante 2,6-diclorofenol-indofenol 0,1 mg/ml. Anotar o volume consumido.

4.5. Titular o erlenmeyer nº 2 com a solução-problema, até que 1 gota produza o descoramento completo da cor da solução de corante 2,6-diclorofenol-indofenol 0,1 mg/ml. Anote o volume consumido.

5. CÁLCULOS

Sabendo a correspondência em mg da solução de referência de ácido ascórbico, faz-se a determinação da quantidade deste na solução-problema, e posteriormente, para 100 ml do material usado, expressando o resultado em mg de ácido ascórbico por 100 ml de suco.

5.1. Erlenmeyer nº 1

1 ml da solução de referência ----- 0,1 mg de vit. C

X ml gastos na titulação ----- Y

$$Y = X \cdot 0,1 \text{ mg de vit. C}$$

5.2. Erlenmeyer nº 2

50 ml da solução-problema ----- 5 ml de suco de laranja

Z ml gastos na titulação ----- W

$$W = \frac{Z \cdot 5}{50} \text{ ml de suco de laranja}$$

Fazendo a correspondência:

W ml de suco ----- Y mg de vit. C

100 ml de suco ----- V mg de vit. C

$$V = \text{mg de vit. C} / 100 \text{ ml de suco}$$

6. DISCUSSÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

6.1. Resultados obtidos (leituras).

6.2. Cálculos.

6.3. Interpretar os resultados.

6.4. Observação: urina (dieta comum sem suplementação) – 20 a 60 mg / 24 h; soro – 0,2 a 0,6 mg / 100 ml.

7. Quantidade de ácido ascórbico em alguns produtos vegetais

Nome comum	Nome científico	mg vit. C / 100 g (ou 100 cc)
Cabeluda	<i>Eugenia tomentosa</i> Cambess	3802,03 – 7764,22

Araçá do Amazonas	<i>Briota acida</i> Berg.	205,05
Mamão	<i>Carica papaya</i> L.	162,31
Goiaba branca	<i>Psidium guayava</i> Raddi	104,42 – 151,55
Morango	<i>Fragaria</i> sp.	131,14
Laranja bergamota	<i>Citrus aurantium</i>	82,18
Laranja japonesa	<i>Fortunela crassifolia</i>	55,46
Laranja pera	<i>Citrus cinensis</i> Osbeck	46,04 – 61,75
Limaquat	<i>Citrus</i> sp	36,61 – 49,18
Maracujá	<i>Passiflora edulis</i> Sims	36,61 – 44, 47
Limão ponderosa	<i>Citrus limon</i> Burm	36,61 – 42,90
Abricot do Pará	<i>Mammea americana</i> L.	33,47
Tomate	<i>Lycopersicum esculentum</i> Mill	31,90
Grape fruit	<i>Citrus Paradise</i> Macf	25,61 – 44,47
Limão siciliano	<i>Citrus limon</i> Burm	25,61 – 39,75
Laranja azeda	<i>Citrus bergamia</i>	22,47 – 39,76
Jabuticaba	<i>Myrciarea jabuticaba</i> Berg.	22,47
Laranja azeda	<i>Citrus aurantium</i>	20,90 – 42,90
Limão lima da Pérsia	<i>Citrus limon</i> Burm	17,76 – 42,90
Laranja lima	<i>Citrus sinensis</i> Osbeck	14,61 – 30,32
Banana maçã	<i>Musa</i> sp	14,62
Chuchu	<i>Sechium edule</i> Sw.	6,73
Laranja cravo	<i>Citrus reticulata</i> Blanco	6,73 – 8,33
Limão cravo	<i>Citrus aurantifolia</i> Sw.	5,19 – 11,37
Abio	<i>Lucuma caimito</i> Roem e Schult	Traços
Garcínia	<i>Gardinia conchichinensis</i>	Traços
Mel	-	traços

Folhas e flores

Nome comum	Nome científico	Mg vit. C / 100 g (ou 100 cc)
Folha de amoreira	<i>Morus</i> sp	177,88 – 190,45
Folha de mandioqueira	<i>Manhiot esculenta</i> Crantz	131,74
Flor de ervilha de cheiro	<i>Lathyrus odorantus</i> L. (pétalas)	183,21
Flor de jambeiro	<i>Jambosa vulgaris</i> DC	83,75

SIGNIFICADO CLÍNICO

As proteínas da coagulação são sintetizadas no fígado interagem numa cascata de reações, produzindo o coágulo de fibrina. Dois sistemas proteicos *fibrinolíticos*, o *plasminogênio* e a α 2-*antiplasmina*, bem como a proteína anticoagulante *antitrombina III* são também sintetizados no fígado. Evidências atuais sugerem que o *fator VIII* é sintetizado no endotélio vascular e, possivelmente, também no fígado. Alguns dos fatores da coagulação (*II, VII, IX e X*) necessitam da vitamina K para a carboxilação após a tradução dentro do hepatócito. A proteína C é também sintetizada no fígado por um zimogênio plasmático dependente da vitamina K. A doença hepática parenquimatosa, de gravidade bastante para bloquear a síntese proteica, ou a doença obstrutiva, capaz de bloquear a absorção intestinal da vitamina lipossolúvel K é, por conseguinte, uma causa em potencial de distúrbios de sangramento.

Devido a grandes reservas funcionais do fígado, o distúrbio da homeostasia pode não ser uma complicação de todas as doenças hepáticas ou pode se tornar uma complicação, a não ser na doença hepática crônica ou grave. Assim, testar um defeito da coagulação não é um procedimento de triagem, mas sim um meio de seguir a evolução da doença ou de avaliar o risco de sangramento, antes de uma conduta diagnóstica invasiva e traumática a ser empreendida.

PRÁTICA 5

TESTE LABORATORIAL PARA COAGULAÇÃO DO SANGUE

DETERMINAÇÃO DO FIBRINOGÊNIO NO SANGUE

1. INTRODUÇÃO

O fibrinogênio é uma proteína do plasma que tem origem exclusiva no fígado, as demais proteínas do plasma são originadas do fígado, nos órgãos hematopoiéticos, no intestino e outros órgãos.

O fibrinogênio tem função relacionada à coagulação do sangue e portanto sua diminuição está relacionada a processos hemorrágicos. Sua concentração normal no plasma varia entre 100 e 500 mg/dl. Em geral, somente surgem processos hemorrágicos quando o fibrinogênio está abaixo de 100 mg/dl. A hipofibrinogenemia (fibrinogeniopenia) pode ser congênita ou adquirida. Esta última é geralmente causada por hepatopatias graves.

A técnica se baseia no impedimento de transformação do fibrinogênio em fibrina pela trombina, sendo o fibrinogênio determinado pela técnica de determinação de concentração de proteínas plasmáticas. Desta forma, o anticoagulante usado deve ser o oxalato de sódio ou potássio 0,1 N ou 2 mg/ml de sangue ou EDTA (1 mg/ml de sangue), que atuam por precipitar cálcio, ou heparina, que impede a formação de trombina.

2. TÉCNICA

- 2.1. Pipetar em um tubo de centrífuga 1 ml de plasma
- 2.2. Colocar em banho-maria a 56° C por 15 min (a água do banho deve cobrir o conteúdo do tubo – logo acima). Tampar o tubo com bolinha de vidro para evitar evaporação. Este procedimento precipita o fibrinogênio.
- 2.3. Resfriar o tubo (colocar num béquer com água fria durante alguns minutos).
- 2.4. Centrifugar a 3000 rpm por 10 min
- 2.5. Transferir o sobrenadante para um tubo de ensaio
- 2.6. Marcar outros 2 tubos de ensaio como F e PT
- 2.7. No tubo F pipetar 0,5 ml do sobrenadante e 9,5 ml de sulfito de sódio 24%
- 2.8. No tubo PT pipetar 0,5 ml de plasma (não aquecido) e 9,5 ml de sulfito de sódio 24%

2.9. Marcar outros 4 tubos de ensaio como F, PT, R e B:

- Tubo F: pipetar 1 ml da mistura do tubo F (sobrenadante e 9,5 ml de sulfito de sódio).
- Tubo PT: pipetar 1 ml da mistura do tubo PT (sobrenadante e 9,5 ml de sulfito de sódio).
- Tubo R: pipetar 1 ml de solução de referência de caseína 5 mg / ml.
- Tubo B: pipetar 1 ml da solução de sulfito de sódio 24%.

2.10. Adicionar aos 4 tubos 4 ml do reativo de Biureto. Agitar os tubos.

2.11. Deixar os tubos em repouso por 30 min, à temperatura ambiente.

2.12. Efetuar a leitura no espectrofotômetro a 535 nm. Ajustar o zero do aparelho com o tubo B (branco).

3. CÁLCULOS

3.1. Quantidade de plasma utilizado

$$\begin{array}{l} 0,5 \text{ ml de plasma} \text{ ----- } 10 \text{ ml de solução} \\ X \text{ ml de plasma} \text{ ----- } 1 \text{ ml de solução} \end{array}$$

$$\mathbf{X = 0,05 \text{ ml}}$$

3.2. Solução de referência = 5 mg / ml de caseína

3.3. Absorbância da amostra

$$\begin{array}{l} \text{Absorbância da amostra} \text{ ----- } Y \text{ mg} \\ \text{Absorbância da solução de referência} \text{ ----- } 5 \text{ mg} \end{array}$$

$$\mathbf{Y = \frac{\text{Absorbância da amostra} \times 5}{\text{Absorbância de referência}}}$$

3.4. Quantidade de proteína no plasma

$$\begin{array}{l} Y = \text{mg de proteína em } 0,05 \text{ ml de plasma} \\ X = 0,05 \text{ ml} \end{array}$$

$$Z = 100 \text{ ml de plasma}$$

$$\mathbf{Z = \frac{Y \cdot 100}{0,05} = \text{mg} / 100 \text{ ml}}$$

3.5. Quantidade de fibrinogênio no plasma

Proteína total – o valor obtido no tubo F = fibrinogênio em mg / 100 ml

4. INTERPRETAÇÃO

4.1. Índice de proteína total e fibrinogênio (PF)

$$PF = \frac{PT - \text{fibrinogênio}}{\text{fibrinogênio}}$$

Quando o PF for menor que 10, significa aumento do fibrinogênio e conseqüente inflamação.

4.2. Diminuição dos valores de fibrinogênio

Abaixo de 100 mg / dl, pode ser indicativo de hemorragia.

5. REAGENTES

5.1. Sangue total e oxalato de sódio (anticoagulante) ou heparina

5.2. Reativo de Biureto

Em balão volumétrico de 1000 ml, colocar 1,5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (fornece cobre e precipita proteínas), 300 ml de NaOH 10% (deixa o meio básico) e 6 g de tartarato de sódio e potássio (estabilizador de cobre). Completar o volume a 1000 ml com água destilada.

5.3. Solução de referência de caseína 5 mg/ml

5.4. Sulfito de sódio 24% (precipita globulinas)

6. DISCUSSÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

6.1. Resultados obtidos (leituras).

6.2. Cálculos.

6.3. Determinar a concentração de fibrinogênio

6.4. Determinar o índice proteína total-fibrinogênio

6.5. Interpretar os resultados.

OBTENÇÃO E ARMAZENAMENTO DA AMOSTRA DE URINA

O tipo de amostra de urina a ser colhida é ditado pelos testes a serem executados. Geralmente as amostras de urina têm de ser colhidas em um intervalo predeterminado de tempo, tal como 1, 4 ou 24 horas. Uma amostra limpa, de manhã cedo em jejum é em geral a amostra mais concentrada e, portanto, é a preferida para se detectar quantidades anormais de constituintes, como as proteínas, ou os compostos não comuns, como gonadotropina. Uma amostra limpa, com prazo marcado é a obtida em horas específicas do dia, ou durante certas fases do ato da micção.

Uma das formas mais satisfatórias de preservação de amostras de urina, colhidas num recipiente limpo, é a refrigeração imediatamente após a colheita.

PRÁTICA 6

EXAME BIOQUÍMICO DE URINA (URINA I)

1. INTRODUÇÃO

O exame de urina constitui um recurso laboratorial utilizado na análise clínica para diagnóstico de várias alterações no organismo, renais e em outros órgãos, como glicosúria no *diabetes mellitus*, e fígado (bilirrubinúria, danos hepatobiliares).

2. COLETA

Deve-se coletar sempre a primeira urina do dia, após jejum de 12 h. Quando a análise não for imediata, guardar a amostra em refrigerador. O volume mínimo a ser coletado é entre 50 e 100 ml, em frascos limpos e secos.

O tipo de dieta influi no volume urinário e em seus constituintes. Uma dieta predominantemente proteica proporciona urina ácida. Dietas vegetarianas promovem alcalinidade da urina, podendo destruir as hemácias, e precipitar fosfatos e uratos. A interpretação exata da concentração urinária (quantitativa) é obtida quando a ingestão de líquidos não ocorre após o meio-dia que antecede a dieta. Nessas condições, a densidade da urina corresponde entre 1020 a 1030, quando a função renal é considerada normal.

3. CARACTERÍSTICAS GERAIS

3.1. VOLUME

O volume urinário eliminado diariamente varia entre 1000 e 2000 ml. Dependendo da ingestão de água, vômito, diarreia, edemas, pode ocorrer variação nesse volume.

3.2. COR

Varia de amarelo a amarelo-avermelhado. Algumas condições patológicas podem alterar a cor da urina.

Cor	Estado clínico
Amarelo claro / incolor	Ingestão excessiva de água, diabetes <i>mellitus</i> ou <i>insipidus</i> , insuficiência renal
Amarelo escuro / castanho	Oligúria, febre ou icterícia
Alaranjado	Ingestão de medicamentos
Escura / negra	Metemoglobinúria, hematúria, alcaptonúria

3.3. ODOR

A urina normal recém-coletada apresenta odor “específico” devido à presença de ácidos graxos voláteis, passando a apresentar odor amoniacal, após repouso relacionado à hidrólise bacteriana da ureia formando a amônia, pela ação da uréase. A acetonúria leva à “urina aromática” com cheiro doce.

3.4. ASPECTO

A urina normal tem pH ácido (pH = 5-6), é cristalina e translúcida. O aspecto turvo pode se relacionar à concentração elevada de ácido úrico, oxalato de cálcio, ou celular, como leucócitos.

3.5. pH

O pH da urina varia entre 5 e 6, ou seja, levemente ácido.

Condições que determinam acidez: clima quente, dieta proteica, intoxicação por álcool metílico, medicações acidificantes (cloreto de amônio), acidose respiratória (enfisema), acidose metabólica (acidose diabética, diarreias graves).

Condições associadas com urina neutra e alcalinas: hidratação em excesso, dieta vegetariana, diuréticos, alcalose respiratória (hiperventilação), alcalose metabólica (obstrução intestinal), deficiência potássica.

4. PRÁTICA

4.1. Coletar a urina

4.2. Observar e anotar as características; cor, odor, aspecto da urina coletada (A) e da urina preparada (B).

4.3. Realizar a pesquisa de elementos anormais:

- *pH*: com uso de papel tornassol, determinar o pH das amostras. Colocar o papel tornassol em um azulejo branco e gotejar a urina com um bastão de vidro.

- *Proteínas (proteinúria)*:

1. Reação de Heller: colocar em um tubo de ensaio 1 ml de ácido nítrico concentrado (bureta). Colocar 2 ml de urina no mesmo tubo, fazendo-a escorrer pela parede do tubo, para evitar a mistura dos líquidos. Se aparecer um anel branco, a reação é positiva. Pode se formar outro anel esbranquiçado, o qual não tem significado patológico. Ele indica a presença de pseudoalbumina de

Moerner. O anel avermelhado que aparece nessa reação não tem significado, porque ele ocorre devido à oxidação dos pigmentos normais da urina.

Causas de erro:

- a. Urinas muito ricas em ureia também originam um anel branco (nitrato de ureia), mas ele é solúvel a quente.
- b. Urinas muito ricas em ácido úrico ou uratos originam um anel branco logo acima da superfície de separação, e que é solúvel a quente.
- c. Urinas conservadas com timol originam anel branco de nitrotimol, solúvel em éter.
- d. Substâncias resinosas, como terebintina, cebaíba (medicamentos), originam um anel branco, insolúvel a quente, mas solúvel em álcool.

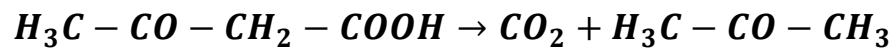
2. Glicose (glicosúria): Reação de Benedict – colocar em um tubo de ensaio 3 ml do reativo de Benedict. Acrescentar **8 gotas** (não mais do que isso) de urina e ferver por 2 min. Se a urina contiver açúcar, formar-se-á um precipitado verde, amarelo ou vermelho tijolo, conforme teor crescente de carboidrato. De um modo geral, se o precipitado se formar durante o aquecimento, é porque o teor de açúcar é maior do que o precipitado que se forma com o resfriamento espontâneo. Uma turvação branca não tem significado, é devido à presença de uratos ou fosfatos.

3. Sangue (hemoglobinúria): Reação de Kastle-Mayer – pipetar 2 ml de urina para um tubo de ensaio. Juntar a ela 2 ml do reativo de Kastle-Mayer. Misturar e adicionar 10 gotas de água oxigenada 3%, pelas paredes do tubo. Se a solução ficar rosa, a reação é positiva para sangue (hemoglobina).

4. Acetona ou corpos cetônicos: Reação de Imbert-Bonnamour (reação legal modificada) – colocar 5 ml de urina em um tubo de ensaio. Acrescentar 20 gotas do reativo de Imbert-Bonnamour. Agitar e esperar 1 min. Colocar 20 gotas de solução de NH_4OH (na capela, de uma bureta), escorrendo pelas paredes do tubo. Na camada amoniacal aparece, quando a reação é positiva, um anel violeta, quanto maior a concentração de corpos cetônicos na urina.

5. Ácido diacético: Reação de Gerhardt - colocar 5 ml de urina em um tubo de ensaio. Acrescentar 5 gotas de solução de cloreto férrico 10%. Filtrar para um tubo de ensaio e acrescentar ao filtrado 5 gotas de solução férrica. Quando a reação é positiva, a solução fica vermelha (marrom escura, semelhante a iodo-lugol) que desaparece pelo aquecimento. Dão reação positiva o ácido salicílico, aspirina, fenacetina (medicamentos), fenóis,

tiocianato, mas a cor não desaparece com o aquecimento. O ácido diacético é sempre acompanhado de acetona, visto que, com o tempo, ele se transforma em acetona, conforme a equação:



5. DISCUSSÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

5.1 Anotar e analisar os resultados de cada uma das reações, para as amostras de urina A e B.

5.2 Interpretar os resultados, relacionando-os a condições patológicas.

PRÁTICA 7

CARACTERIZAÇÃO OU IDENTIFICAÇÃO QUALITATIVA DE CARBOIDRATOS EM FLUIDOS BIOLÓGICOS

1. INTRODUÇÃO

Os carboidratos são poliálcoois que contêm um grupo aldeído ou cetona, bem como seus derivados. Sabendo que suas propriedades químicas são devidas aos radicais acima citados, é possível através de reações específicas, identificar qualitativamente os açúcares.

2. PRÁTICA

2.1. REAÇÕES DE REDUÇÃO

Os monossacarídeos e polissacarídeos que apresentam em sua estrutura molecular um grupo aldeído ou cetona livre possuem poder redutor. No entanto, as aldoses são mais facilmente oxidadas do que as cetoses.

- *REAÇÃO DE BENEDICT*

- *Fundamento*

Os grupos aldeído que reduzem os íons cúpricos (Cu^{2+}) do reativo de Benedict a cuprosos (Cu^+) sob a forma de Cu_2O (precipitado vermelho tijolo), enquanto que os grupos cetona são oxidados a ácido carboxílico, conforme a figura:



A reação é positiva para todas as oses e dissacarídeos que possuem grupos aldeído ou cetona livre. Pela mesma razão, a reação é negativa para tri e tetrassacarídeos. Os polissacarídeos como amido e glicogênio não reduzem o reativo porque apresentam poucos radicaia aldeído / cetona livres, em relação ao tamanho molecular.

- *Reativos e material*

- Reativo de Benedict (citrato de sódio + Na_2CO_3 + CuSO_4)
- Solução de glicose 1%

- Solução de sacarose 1%
- Solução de açúcar de concentração desconhecida
- Pipetas
- Tubos de ensaio
- Bico de Bunsen
- Pinças

➤ ***TÉCNICA***

Colocar em 3 tubos de ensaio numerados (1, 2 e 3), 2 ml do reativo de Benedict (para isso, usar pipetador automático). Aquecer até a ebulição. Adicionar ao tubo nº 1, 1 ml da solução de glicose 1%. Ao tubo 2 adicionar 1 ml de solução de sacarose 1%. Ao tubo 3, 1 ml de solução de sacarose de concentração desconhecida. Ferver por alguns segundos e notar o aparecimento de precipitado cor vermelho tijolo. Anote o resultado.

- ***INVERSÃO DA SACAROSE (TESTAR APENAS A SACAROSE)***

➤ ***Fundamento***

A sacarose não é açúcar redutor; portanto, não dá positivo o teste de Benedict. No entanto, a ação do HCl sobre a sacarose (+ 66,5°) transforma-a em uma solução de glicose + frutose (açúcar invertido: - 39,7°), porque a glicose tem rotação específica +52,7° e a frutose, - 92,4°.

➤ ***Reativos e material***

- Reativo de Benedict
- HCl concentrado
- Solução de sacarose 1%
- Pipetas
- Tubos de ensaio
- Bico de Bunsen
- Pinças

➤ ***Técnica***

Colocar em um tubo de ensaio 2 ml da solução de sacarose 1%. Juntar a ela 1 gota de HCl concentrado (bureta). Ferver por alguns segundos e deixar esfriar. Realize a reação de Benedict. Conclua e anote os resultados.

- **REAÇÃO DE BARFOED**

- **Fundamento**

Esta reação distingue monossacarídeos e dissacarídeos, a partir da diferença de velocidade da reação. Os monossacarídeos reduzem os íons Cu^{2+} do reativo com maior velocidade que os dissacarídeos (quando redutores).

- **Reativos e material**

- Reativo de Barfoed (acetato cúprico + ácido acético)
- Solução de glicose 5%
- Solução de sacarose 5%
- Solução de açúcar de concentração desconhecida
- Pipetas
- Tubos de ensaio
- Bico de Bunsen
- Pinça de madeira

- **Técnica**

Enumerar 3 tubos de ensaio e colocar em cada um 2 ml do reativo de Barfoed. Ao tubo 1, acrescente 1 ml da solução de glicose 5%; ao tubo 2, 1 ml de solução de sacarose 5%; e ao tubo 3, 1 ml da solução de açúcar de concentração desconhecida. Ferver cada tubo por 2 min e observar o resultado. Anote os resultados, cronometrando o tempo de surgimento do precipitado. Concluir.

- **REAÇÃO DE TOLLENS**

- **Fundamento**

O açúcar, possuindo grupamentos reativos livres, reduz o complexo de prata amoniacal a prata metálica, que adere à parede do tubo de ensaio.

- **Reativos e material**

- Solução de nitrato de prata 1%
- Solução de hidróxido de amônio 1%
- Solução de sacarose 5%
- Solução de açúcar de concentração desconhecida

- Tubos de ensaio
- Bico de Bunsen
- Pinça de madeira

➤ **Técnica**

Enumere dois tubos de ensaio. Em um dos tubos coloque 1 ml de nitrato de prata 1%, 1 ml de hidróxido de amônio 1% e 1 ml de solução de sacarose 5%. No outro tubo, coloque 1 ml de nitrato de prata 1%, 1 ml de hidróxido de amônio 1% e 1 ml de solução de açúcar de concentração desconhecida. Anote os resultados. Concluir.

2.2. REAÇÕES DE COLORAÇÃO

Os carboidratos, pela ação desidratante do ácido sulfúrico transformam-se em furfural (pentoses) ou hidroximetil-furfural (hexoses), que em reação com fenóis originam pigmentos coloridos.

- **REAÇÃO DE MOLISH**

➤ **Fundamento**

O hidroximetil-furfural combina-se com o α -naftol formando um pigmento colorido que é evidenciado pela formação de um anel violeta. É um teste positivo para todos os açúcares.

➤ **Reativos e material**

- Solução de sacarose 1%
- Solução alcoólica de α -naftol 5%
- Ácido sulfúrico concentrado
- Tubos de ensaio
- Pipetas

➤ **Técnica**

Em um tubo de ensaio, coloque 2 ml de solução de sacarose 1%. A seguir, coloque 5 gotas de solução alcoólica de α -naftol 5%. Agite e acrescente lentamente e pela parede do tubo 2 ml de H_2SO_4 concentrado. Notar se há formação de anel violeta na superfície de separação entre as duas camadas.

- **REAÇÃO DE SELIVANOFF**

➤ **Fundamento**

O HCl do reativo age como desidratante, produzindo furfurais, os quais são complexados pelo resorcinol, dando origem a pigmentos coloridos. Por meio desta reação pode-se distinguir cetoses e aldoses, pois as cetoses produzem os furfurais mais velozmente.

➤ **Reativos e material**

- Reativo de Selivanoff (resorcinol + HCl + H₂O)
- Solução de frutose 1%
- Solução de glicose 1%
- Pipetas
- Tubos de ensaio
- Bico de Bunsen
- Pinça de madeira

➤ **Técnica**

Colocar em um tubo de ensaio 5 ml do reativo de Selivanoff (bureta) 3 gotas de solução de frutose 1%. Ferver até surgir cor (marcar o tempo), esperar esfriar e colocar 1 ml de álcool. Observe a formação de um precipitado pardacento. Repita o experimento usando a solução de glicose 1%, mas NÃO COLOQUE ÁLCOOL. Anote os resultados. Concluir.

• **REAÇÃO DE BIAL**

➤ **Fundamento**

É uma reação específica para determinar pentoses e ácido glicurônico. Admite-se que pela ação do HCl a quente, as pentoses originam furfural e este se combina com orcinol, originando substâncias que se coram em verde na presença da sais fênicos.

➤ **Reativos e material**

- Reativo de Bial (orcinol + HCl + FeCl₃)
- Goma arábica 10% (ácido urônico + arabinose)
- Tubos de ensaio
- Pipetas
- Pinça de madeira
- Bico de Bunsen

➤ **Técnica**

Em um tubo de ensaio colocar 5 ml do reativo de Bial e 5 gotas de solução de goma arábica 10%. Ferver prolongadamente e verificar o aparecimento de cor roxa e depois verde, com a formação de precipitado verde-azulado.

- **REAÇÃO DE IODO**

- **Fundamento**

A cor azul é produzida por um complexo instável (produto de adsorção constituído pelo carboidrato, iodo atômico e água). As dextrinas produzem várias cores (do roxo ao vermelho) dependendo da estrutura e da extensão da molécula.

- **Reativos e material**

- Goma de amido 1%
- Lugol diluído (iodo + iodeto de potássio + água)
- Tubos de ensaio
- Pipetas
- Pinça de madeira
- Bico de Bunsen

- **Técnica**

Coloque em um tubo de ensaio 5 ml de água, 0,5 ml de goma de amido 1% e 5 gotas de lugol. Verificar o aparecimento de uma intensa cor azul que desaparece pelo aquecimento brando e reaparece mais fraca pelo resfriamento rápido.

3. DISCUSSÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

- 3.1. Anotar e analisar os resultados de cada uma das reações.
- 3.2. Interpretar os resultados.
- 3.3. Identificar o açúcar desconhecido.

PRÁTICA 8

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LACTOSE NO LEITE

1. INTRODUÇÃO

Antes de nascer, o feto recebe sua alimentação a partir do organismo materno, por meio da placenta. Após o nascimento, o alimento é fornecido pelo leite, produzido pelas glândulas mamárias.

O leite contém proteínas, lipídios, carboidratos, minerais e vitaminas, que podem apresentar teores significativamente diferentes, dependendo da espécie animal.

As principais diferenças entre o leite humano e o leite de vaca residem na maior quantidade de proteína e resíduo mineral no leite de vaca e maior quantidade de carboidratos no leite humano.

O carboidrato do leite é a lactose, dissacarídeo constituído por dois monossacarídeos: galactose e glicose.

2. FUNDAMENTO

Todos os monossacarídeos apresentam em sua molécula um radical aldeído ou cetônico livre. Tais radicais apresentam propriedades redutoras.

Quando dois ou mais monossacarídeos se unem, podem fazê-lo através de ligações com seus radicais redutores (aldeídos ou cetonas). Nesse caso, o açúcar resultante não irá mais apresentar propriedades redutoras, como é o caso do dissacarídeo sacarose (frutose + glicose).

A lactose é um açúcar redutor, porque apesar de haver ligação denominada glicosídica envolvendo o radical aldeído da galactose, o radical aldeído da glicose permanece livre, dando caráter redutor ao carboidrato. É no poder redutor da OH-aldeídica livre da lactose que está baseado seu doseamento.

O reativo de Fehling contém sulfato de cobre, que em meio alcalino a quente, produz $\text{Cu}(\text{OH})_2$, de cor azul. Duas moléculas de $\text{Cu}(\text{OH})_2$ em presença de carboidrato redutor a quente e em meio alcalino são reduzidas a Cu_2O (cor vermelho tijolo).

3. REAGENTES E MATERIAL

- Pipetas volumétricas de 2 ml e 5 ml
- Pipetas graduadas de 5 e 10 ml
- Bico de Bunsen
- Balão volumétrico de 100 ml
- Erlenmeyers de 125 e 250 ml
- Funil
- Bastão de vidro
- Bureta
- Provetas de 20 ou 50 ml
- Pisseta com água destilada
- Suporte para funil e bureta
- Papel de filtro

4. TÉCNICA

- 4.1. Transferir 5 ml de leite para o balão volumétrico de 100 ml
- 4.2. Adicionar 20 ml de água destilada, 2 ml de NaOH 0,44 N e 2 ml de $\text{Cu}(\text{SO}_4)_2$ 6,925%
- 4.3. Completar o volume e agitar
- 4.4. Deixar em repouso por 10 min.
- 4.5. Filtrar, evitando colocar a proteína precipitada. *Este processo precipita a proteína por metal pesado (Cu^{2+}) e separa as proteínas por filtração [proteína] Cu^{2+} /precipitado. O filtrado contém lactose.*
- 4.6. Transferir o filtrado para bureta.
- 4.7. Marcar 2 erlenmeyers e adicionar 2 ml de solução de Fehling A e 2 ml de solução de Fehling B em cada um. Coloque 10 ml de água destilada em cada um deles
- 4.8. Aquecer o erlenmeyer nº 1 sobre o tripé, no bico de Bunsen. Titular com solução padrão de lactose 1%. Anotar o volume gasto na bureta.
- 4.9. Aquecer o erlenmeyer nº 2 sobre o tripé, no bico de Bunsen. Titular com solução filtrada de leite. Anotar o volume gasto na bureta.

5. CÁLCULOS

$$\frac{100 \text{ a. A}}{\text{V. L.}} = \text{g de lactose} / 100 \text{ ml de leite}$$

Em que:

L = quantidade em ml de amostra (5 ml)

A = volume total de solução de amostra (100 ml)

V = volume gasto na titulação da amostra

a = massa de lactose que corresponde à quantidade de 2 ml de solução de Fehling A + 2ml de solução de Fehling B

Cálculo de uma amostra de leite de vaca:

V = 10,5 ml

a = ?

Referência de lactose 1% gasto na bureta: 2,4 ml

1 g de lactose ----- 100 ml de solução de referência

a g de lactose ----- 2,4 ml de solução de referência

$$a = \frac{2,4}{100} = 0,024 \text{ g de lactose}$$

Cálculo final: substituir na 1ª equação

$$\frac{100 \times 100 \times 0,024}{10,5 \times 5} = \frac{240}{52,5} = 4,5\%$$

6. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

O leite de vaca possui o teor de carboidratos que varia entre 4,5 a 5,0 g / ml. O leite humano possui uma concentração entre 7 e 7,5%.

A composição média do leite humano e de vaca são:

Componente	Humano (%)	Vaca (%)
Água	87,5	87,0
Sólidos totais	12,5	13,0
Proteína	1 – 2	3 – 4
Lipídios	3 – 4	3,5 – 5,0
Carboidratos	7 – 7,5	4,5 – 5
Resíduos minerais	0,2	0,75

7. DISCUSSÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Calcule a concentração da lactose.

SIGNIFICADO CLÍNICO DA GLICEMIA

O diagnóstico do *diabetes mellitus* depende unicamente da demonstração de hiperglicemia. Para o diabetes tipo 1, o diagnóstico é geralmente fácil, porque a hiperglicemia aparece abruptamente, é grave e acompanhada de sérios transtornos metabólicos. No *diabetes mellitus* gestacional, os critérios estabelecidos por *O'Sullivan e Mahan* (1964), identificam a maioria das gestações de alto risco, e os rastreamentos eficientes e os protocolos de testes têm aceitação geral. O diabetes do tipo II é que tem o diagnóstico difícil, porque as anormalidades da glicose podem ser brandas, mas o desenvolvimento das complicações torna importante identificar os indivíduos com a doença.

A elevação dos níveis plasmáticos de glicose em jejum acima de 140 mg/dl, em mais de uma ocasião, é diagnosticada de diabetes mellitus. O diagnóstico na maioria dos casos de *diabetes mellitus* pode ser estabelecido com este critério. Contudo, alguns pesquisadores acreditam que tal possa ser um desenvolvimento relativamente tardio no curso do *diabetes mellitus* tipo II, retardando o diagnóstico e subestimando a prevalência dos *diabetes mellitus* na população.

PRÁTICA 9

DETERMINAÇÃO DA GLICEMIA

1. INTRODUÇÃO

Os valores da glicemia de jejum variam com o método de dosagem empregado, baseando-se na propriedade redutora desse glicídio ou não (método enzimático). Como o sangue contém outras substâncias redutoras além da glicose, há necessidade de desproteinização.

Dosando-se a glicose pelo método Somogyi, a normalidade situa-se entre 70 e 100 mg/100 ml. Esses valores se referem à glicemia de jejum, com 8 a 10 h de jejum e com o paciente em repouso. O esforço físico, certos estados emocionais e o tabagismo podem produzir uma elevação no teor, provavelmente aumentando a glicogenólise hepática através de um aumento na secreção de adrenalina. A elevação seria em torno de 10 mg.

As dosagens feitas no soro ou plasma são cerca de 10 mg mais elevadas do que as realizadas no sangue.

A glicemia se eleva depois de uma refeição contendo carboidratos: 120 – 130 mg / 100 ml, podendo chegar a até 160 mg / 100 ml, em até 60 min após a refeição, em um indivíduo normal. Transpondo esse nível (limiar renal), a glicose é excretada na urina, o que significa uma situação patológica. A elevação da taxa glicêmica. Em jejum, acima de 120 mg / 100 ml pode ter significado patológico.

A concentração de glicose no sangue origina-se de três fontes principais:

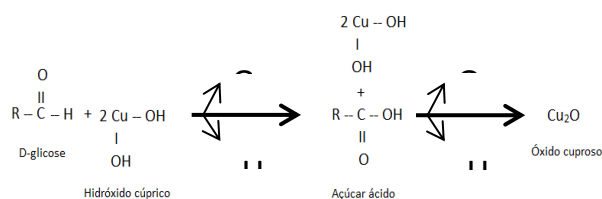
- a. Ingestão de carboidratos por meio da dieta, ou digestão de polissacarídeos (amido) e dissacarídeos (sacarose e lactose)
- b. Neoglicogênese (síntese de glicose)
- c. Degradação do glicogênio hepático (glicogenólise)

A regulação da concentração de glicose sanguínea envolve o fígado, tecidos extra-hepáticos e vários hormônios. A insulina, secretada pelo pâncreas, exerce papel central na regulação da concentração da glicose sanguínea.

2. MÉTODO

Há vários métodos para determinar a glicemia. O método enzimático é aquele no qual a glicose é oxidada pela glicose oxidase à ácido glicônico, formando água oxigenada. Em presença de peroxidase a H_2O_2 é convertida em H_2O e O_2 . Este oxigênio oxida substâncias (como 0-dianisidina) formando composto colorido que pode ser lido fotocolorimetricamente (no espectrofotômetro).

O método usado nesta prática é o método Somogyi-Nelson. Nele, o reativo de Somogyi (cúprico) reage com a glicose formando óxido cuproso.



A quantidade de óxido cuproso formada é proporcional à concentração de glicose no meio. Esse óxido cuproso reage com o reativo de Nelson (reagente arsenomolibdico) formando óxido de molibdênio de cor azul, cuja intensidade é proporcional à quantidade de glicose existente na amostra.

3. REAGENTES

3.1. SOLUÇÃO DE REFERÊNCIA ESTOQUE DE GLICOSE

- 1 g de ácido benzoico dissolvido em 300 ml de água destilada quente
- 1 g de glicose anidra
- Água destilada q. s. p. balão volumétrico de 1000 ml

3.2. SOLUÇÃO DE REFERÊNCIA DE GLICOSE

Transferir 50 mg de ácido benzoico para balão volumétrico de 250 ml. Acrescentar 200 ml de água destilada e em seguida 12,5 ml da solução de referência estoque de glicose. Agitar e completar o volume. A concentração final é 0,05 g de glicose / ml.

3.3. Reativo cúprico (Somogyi)

➤ **Reativo A:**

- 25 g de carbonato de sódio anidro
- 25 g de tartarato duplo de sódio e potássio
- 20 g de bicarbonato de sódio
- 200 g de sulfato de sódio anidro
- Água destilada q. s. p. 1000 ml

➤ **Reativo B:**

- 15 g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$)
- 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado
- Água destilada q. s. p. 100 ml

➤ **Reativo cúprico**

- 25 ml de Reativo A
- 1 ml de Reativo B
- **Preparar na hora de usar.**

3.4. REATIVO ARSENOMOLÍBDICO $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (NELSON)

Dissolver 25 g de molibdato de amônio em 450 ml de água destilada. Adicione 21 ml de ácido sulfúrico concentrado e misture.

Em 25 ml de água destilada, dissolver 3 g de arseniato dissódico ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Juntar a essa solução à primeira e agitar. Manter a mistura a 56°C por 25 min. Guardar em frasco âmbar.

3.5. HIDRÓXIDO DE BÁRIO 0,3 N (BaOH_2)

3.6. SULFATO DE ZINCO 5% (ZnSO_4)

4. PRÁTICA

4.1. Em um tubo de centrífuga (marcar o nº do seu grupo), colocar 1,5 ml de água destilada e 0,1 ml de sangue. Lavar a pipeta (por sucção) 3 vezes com a mistura, para impedir que reste sangue na ponteira.

4.2. Adicionar 0,2 ml de solução de BaOH_2 0,3 N, misturar e esperar a solução resultante ficar acastanhada.

- 4.3. Acrescente 0,2 ml de ZnSO₄ 5% e agite. Deixe em repouso por 5 min. Centrifugue por 10 min a 2500 rpm. Este processo retira as proteínas do meio (desproteínizar).
- 4.4. Separe o sobrenadante, despejando com cuidado em um tubo de ensaio. Coloque cerca de 100 ml de água destilada em um béquer de 250 ml e coloque para aquecer sobre o bico de Bunsen.
- 4.5. Marcar 3 tubos de ensaio e marcar (A), (R) e (B). Pipetar as soluções em cada tubo conforme a tabela:

Solução	Tubo de ensaio		
	A	R	B
Sobrenadante (amostra)	1 ml	-	-
Solução padrão de glicose	-	1 ml	-
Água destilada	1 ml	1 ml	2 ml
Reativo de Somogyi (cúprico)	1 ml	1 ml	1 ml

- 4.6. Colocar os 3 tubos para ferver por 20 min, dentro de um béquer com água destilada, sobre o bico de Bunsen
- 4.7. Esfriar os tubos colocando-os em béquer com água corrente fria (da torneira comum)
- 4.8. Pipetar em cada tubo:

Solução	Tubo de ensaio		
	A	R	B
Reativo de Nelson (arsenomolibdico)	1 ml	1 ml	1 ml
Água destilada	6 ml	6 ml	6 ml

- 4.9. Ler a 500 nm no espectrofotômetro, ajustando o zero do aparelho com o tubo B.
- 4.10. Anote os resultados.

5. CÁLCULOS

5.1. SOLUÇÃO DE REFERÊNCIA ESTOQUE DE GLICOSE

1 g de glicose ----- 1000 ml de solução

X g de glicose ----- 1 ml de solução

$$X = 0,001 \text{ g de glicose ou } 1 \text{ mg}$$

5.2. SOLUÇÃO DE REFERÊNCIA DE GLICOSE

12,5 ml de glicose ----- 250 ml de solução

Y ml de glicose ----- 1 ml de solução

$$Y = 0,05 \text{ ml de glicose (corresponde a } 0,05 \text{ mg de glicose)}$$

5.3. Fazendo a correspondência

0,05 mg de glicose ----- Absorbância (leitura) da solução de referência

Z mg de glicose ----- Absorbância (leitura) da solução de amostra

$$\frac{Abs_{amostra}}{Abs_{padrão}} \times 0,05 = \text{mg de glicose em 0,05 ml de soro}$$

5.4. CÁLCULO DO SORO OU SANGUE

0,1 ml de sangue + 0,2 ml de Ba(OH)₂ + 0,2 ml de ZnSO₄ + 1,5 ml de água destilada

0,1 ml de sangue ----- 2 ml de solução

W ----- 1 ml de solução

W = 0,05 ml de soro

5.5.

$$\frac{0,05 \cdot Abs_{amostra}}{0,05 \cdot Abs_{padrão}} \times 100 = \text{mg de glicose em 100 ml de soro}$$

6. VALORES DE REFERÊNCIA E INTERPRETAÇÃO

Dosagem	Teor normal (100 ml)	Material	Observações
Glicose verdadeira	60 – 100 mg / dl	Sangue	Jejum
Glicose (foin)	80 – 120 mg / dl	Sangue	Jejum
Glicose	70 – 100 mg / 100 ml	Soro	Jejum (colher com fluoreto)
Glicose (orto-toluidina) verdadeira	60 – 100 mg / 100 ml	Sangue total	Jejum (colher com fluoreto)

Observações:

- A concentração varia conforme o método usado
- Após uma refeição de carboidratos: 120 – 130 mg/dl

7. DISCUSSÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

7.1. Calcular a concentração de glicose na amostra

7.2. Identificar técnicas do "Diagnóstico do *Diabetes mellitus*"

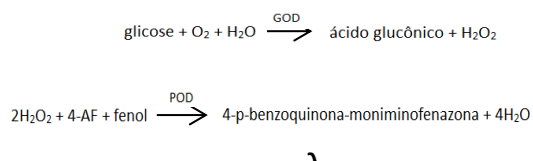
PRÁTICA 10

DETERMINAÇÃO DA GLICEMIA (MÉTODO ENZIMÁTICO)

1. INTRODUÇÃO

Método enzimático-colorimétrico (GOD-POD), segundo Trinder, para determinar glicose no sangue e outros líquidos biológicos. Somente para uso “in vitro”.

2. FUNDAMENTO



Em que: GOD = glicose peroxidase; POD = peroxidase; 4-AF = 4-aminofenazona

3. AMOSTRA

Soro ou plasma colhido com fluoreto-EDTA, livre de hemólise, ou outros líquidos biológicos. Centrifugar o sangue no máximo até 2 h após a coleta, para evitar a glicólise pelas células sanguíneas. Assim, a amostra é estável por até 3 dias, conservada entre 2 e 8 ° C.

4. REATIVOS FORNECIDOS

- 4.1. **Reativo 4-AF:** solução de 4-aminofenazona 25 mmol/l em tampão TRIS 0,92 mol/l.
- 4.2. **Reativo fenol:** solução de fenol 55 mmol/l. O fenol é tóxico e irritante, portanto tenha cuidado ao manusear.
- 4.3. **GOD/POD:** solução estabilizada de glicose oxidase ≥ 1000 U / ml e peroxidase ≥ 120 U / ml.
- 4.4. **Padrão:** 4 ml de solução estabilizada de glicose 100 mg / dl.

Estes reativos são estáveis quando refrigerados entre 2 e 8° C, até a data de validade indicada na embalagem.

4.5. Preparação do reativo de trabalho

Em uma proveta de 1000 ml colocar aproximadamente 500 ml de água destilada, 50 ml do reativo 4-AF, 50 ml do reativo fenol e 3 ml do reativo GOD/POD. Completar o volume e

transferir para frasco âmbar e armazenar em geladeira, por até 30 dias. Esta quantidade de reativo de trabalho rende até 400 análises. Para outras quantidades, ver tabela abaixo:

Nº de análises	Água (ml)	Rvo. 4-AF (ml)	Rvo. fenol (ml)	Rvo. GOD/POD (ml)	Água q. s. p. (ml)
10 – 20	25	2,5	2,5	0,15	50
21 – 40	50	5	5	0,30	100
51 – 100	125	12,5	12,5	0,75	250
101 – 200	250	25	25	1,5	500
201 – 400	500	50	50	3,00	1000

4.6. PROCEDIMENTO

Marcar 3 tubos de ensaio B (branco), P (padrão) e D (desconhecido) e colocar em cada um conforme segue:

Solução	Tubo B	Tubo P	Tubo D
Padrão	-	20 µl	-
Amostra	-	-	20 µl
Rvo. de trabalho	2 ml	2 ml	2 ml

Deixar em repouso no banho-maria a 37° C por 10 min. Retirar do banho-maria e ler em espectrofotômetro a 505 nm ou em fotocolorímetro com filtro verde (490 – 530 nm), zerando o aparelho com o branco. A cor é estável por até 60 min.

5. CÁLCULOS

$$\text{Glicose (mg/dl)} = D / (P \times 100)$$

6. VALORES DE REFERÊNCIA E INTERPRETAÇÃO

Soro / plasma: 70 – 110 mg/dl

Líquor (LCR): 40 – 74 mg/dl

7. LINEARIDADE

A reação é linear até 450 mg/dl. Para valores superiores repetir o teste com amostra reduzida à metade, completando o volume com solução fisiológica, multiplicando o resultado por 2.

8. DISCUSSÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

8.1. Calcular a concentração de glicose na amostra

8.2. Associar glicosúria e *diabetes mellitus*.

IMPORTÂNCIA CLÍNICA DA LIPIDEMIA

Os testes mais úteis e confiáveis são as determinações de triacilgliceróis e colesterol total. Um só valor de colesterol e de triacilgliceróis a mais de 20% abaixo dos limites de referência superiores sugeridos para a idade e sexo praticamente elimina um diagnóstico de hiperlipoproteinemia. Se os valores lipídicos estiverem próximos dos pontos críticos de limite de decisão, os testes deverão ser repetidos em pelo menos duas ocasiões subsequentes, de preferência a um intervalo de duas ou quatro semanas. É importante que nenhuma intervenção (diabética ou medicamentosa) seja instituída, enquanto a avaliação está sendo feita.

Além da amostragem repetitiva para as determinações de triacilgliceróis e colesterol total em pacientes com níveis marginais ou elevados, devem ser feitas avaliações das lipoproteínas específicas.

HIPERLIPOPROTEINEMIA

Aumento da Lipoproteína de baixa densidade

O aumento gradual do risco de aterosclerose, com o aumento de concentração da LDL-C, torna-se difícil estabelecer um ponto-limite de definido para esta determinação no diagnóstico da hiperlipoproteinemia. O Estudo de *Framingham* sugere que os valores de colesterol total acima de 180 mg/dL estão associados a um risco progressivamente crescente de DAC (Doença Arterial Coronariana). Em 1987, o painel de especialistas em tratamento e detecção de níveis altos de colesterol no sangue, do *National Cholesterol Education Program* (NCEP, Programa Nacional de Educação sobre colesterol), publicou linhas de conduta específicas para a classificação de pessoas em risco de aterosclerose devida a hipercolesterolemia. E, 1991, outro painel de especialistas do NCEP publicou linhas de condutas para detecção e tratamento da hipercolesterolemia em crianças com risco.

PRÁTICA 11

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE COLESTEROL NO SORO

1. INTRODUÇÃO

O colesterol é um lipídio da classe dos esteróis. É produzido a partir do acetato, principalmente no fígado. É convertido a ácidos biliares, eliminados na bile. É sintetizado também no intestino, córtex da adrenal, testículos e aorta. É precursor de hormônios esteroides (sexuais e corticoadrenais). O colesterol pode formar ésteres pela ligação com ácidos graxos e normalmente $\frac{2}{3}$ do colesterol total sérico existe na forma de éster. Quando acumulado nas artérias, forma placas ateromatosas, levando à aterosclerose.

2. CARACTERÍSTICAS DO MÉTODO

O anidrido acético presente no reagente cromogênico precipita proteínas e atua como agente desidratante, permitindo a formação de um complexo de colesterol e ácido sulfúrico (presente no reagente cromogênico). Este complexo apresenta cor verde, de intensidade proporcional à quantidade de colesterol presente na amostra.

3. MATERIAL E REAGENTES

- **SOLUÇÃO DE REFERÊNCIA DE COLESTEROL:**

- 200 mg de colesterol P. A.
- 100 ml de ácido acético glacial P. A.

Esta solução é estável por 1 ano, quando conservada a 4° C.

- **REAGENTE CROMOGÊNICO:**

- 110 ml de anidrido acético
- 100 ml de ácido acético
- 15 ml de ácido sulfúrico concentrado

Esta solução é estável por 1 ano, quando conservada a 4° C.

4. PROCEDIMENTO

Atenção: OS TUBOS DE ENSAIO NÃO PODEM ESTAR ÚMIDOS. NÃO DEVEM SER LAVADOS NO MOMENTO DA PRÁTICA. A VIDRARIA DEVE ESTAR SECA.

- Em um tubo de ensaio (marcar A), pipetar 0,1 ml de soro
- Em outro tubo de ensaio (marcar R), pipetar 0,1 ml de solução de referência de colesterol
- Colocar 6 ml de reagente cromogênico no tubo A e 6 ml de reagente cromogênico no tubo R – EM BURETA, NA CAPELA.
- Colocar os tubos em banho-maria a 37° C por 20 min (marcar o número do seu grupo nos tubos)
- Ler em espectrofotômetro a 625 nm, zerando o aparelho com o reagente cromogênico (pegar na capela, em cubetas de vidro). Anotar o resultado.

5. CÁLCULOS

$$\frac{Abs_{amostra}}{x 200} = mg de$$

6. DISCUSSÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

- Calcular a concentração de colesterol na amostra
- Associar o resultado e “Diagnóstico laboratorial da aterosclerose”

REDUÇÃO DA LIPOPROTEINA DE ALTA DENSIDADE (HIPOALFALIPOPROTEINEMIA)

Os estudos mostraram um significativo aumento do risco de aterosclerose em pessoas com baixos níveis de HDL-C. Devido a serem pequenas as diferenças destes níveis entre vários grupos de risco (5 a 10 mg/dl), as medidas da HDL-C podem ser substituídas por outras medida da HDL, tal como a da apo A-I.

Vários estados patológicos ou influências ambientais subjacentes podem estar associados aos níveis reduzidos de HDL; um dos mais comuns é a hipertrigliceridemia. Alguns estudos sugeriram que a hipoalfalipoproteinemia familiar obedece à transmissão medeliana dominante.

Ingestão de certos medicamentos, falta de exercícios, obesidade e consumo de álcool são fatores que interagem com o padrão genético subjacente, controlando os níveis de HDL. A identificação dos indivíduos com hipoalfalipoproteinemia familiar é importante no tratamento de outros fatores de risco associados. Níveis extremamente baixos de HDL-C e apo A-I têm sido encontrados em alguns pacientes; estes são geralmente assintomáticos, não tendo sido encontrados sinais clínicos de aterosclerose. O defeito básico parece ser na estrutura primária aa Apo A-I. Em outros distúrbios, conhecido como doença do olho de peixe (*fish-eye disease*), os níveis de HDL estão reduzidos para aproximadamente 10% do normal, com um aumento dos níveis dos triacilgliceróis. Uma grave opacidade da córnea é notada na clínica. Apesar de os níveis da HDL estarem diminuídos, sua composição em apolipoproteínas parece normal. Ocorre aterosclerose em alguns pacientes, mas é geralmente uma manifestação tardia.

PRÁTICA 12

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HDL-COLESTEROL (LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE) NO SORO

1. INTRODUÇÃO

As lipoproteínas de alta densidade são separadas precipitando seletivamente as lipoproteínas de baixa e muito baixa densidade (LDL e VLDL).

Desde 1951 é conhecido o fato de que indivíduos sadios apresentam concentrações elevadas de HDL em relação aos que tinham danos nas coronárias; mas somente em 1977 ficou estabelecido que a relação entre HDL colesterol e as enfermidades cardíacas coronárias (E. C. C.) é inversamente proporcional, isto é, quanto maior a concentração de HDL, menor a incidência de E. C. C. Isto se deve ao fato de que as HDL transportam colesterol dos tecidos periféricos ao fígado, evitando o aparecimento de lesões ateromatosas.

Estudos epidemiológicos sobre as E. C. C. e a aterosclerose têm levado à identificação de fatores de risco, os quais promovem o desenvolvimento dessas doenças. A colesterolemia elevada está associada com a maior incidência de E. C. C.; definiu-se um valor limite, acima do qual o risco aumenta. Analisando-se o HDL-colesterol determinou-se um limite negativo, abaixo do qual existe pouco risco de desenvolver E. C. C. Para um risco normal de E. C. C., a taxa de HDL-colesterol é em média 20% para homens e 22,5% para mulheres.

TABELA 1. DISTRIBUIÇÃO NORMAL DE HDL-COLESTEROL

Idade (anos)	Homens (mg/dl)	Mulheres (mg/dl)
até 19	30 – 65	30 – 70
20 – 29	35 – 70	35 – 75
30 – 39	30 – 65	35 – 80
40 – 49	30 – 65	40 – 80
50 – 59	30 – 65	40 - 95

TABELA 2. RELAÇÃO HDL-COLESTEROL E RISCO DE DESENVOLVER E. C. C.

HDL-colesterol (mg/ml de sangue)	Risco de E. C. C.
até 25	Perigoso
26 - 35	Alto
36 – 44	Moderado alto
45 – 59	Médio
60 – 74	Moderado baixo
Acima de 75	Baixo

2. FUNDAMENTO DO MÉTODO

O soro submetido à precipitação, após sofrer centrifugação, apresenta um precipitado de β e pré- β -lipoproteínas. A fração α -lipoproteínas permanece no sobrenadante e o colesterol da mesma é quantificado por métodos rotineiros.

3. MATERIAL E REAGENTES

3.1 SOLUÇÃO DE REFERÊNCIA DE COLESTEROL:

- 200 mg de colesterol P. A.
- ácido acético glacial P. A. q. s. p. 100 ml

Esta solução é estável por 1 ano, quando conservada a 4° C.

3.2 REAGENTE CROMOGÊNICO:

- 200 ml de anidrido acético (gelado)
- 100 ml de ácido acético glacial (temperatura ambiente)
- 15 ml de ácido sulfúrico concentrado (gelado)

Esta solução é estável por 1 ano, quando conservada a 4° C

3.3 REAGENTE DE PRECIPITAÇÃO 1:

- Solução de ácido fosfotúngstico (proporção 10 g para 250 ml de água)
- Solução de NaOH 0,16 mol/l (proporção 1,6 g para 250 ml de água)
- Juntar as duas soluções, armazenar em frasco âmbar e em refrigeração

3.4 REAGENTE DE PRECIPITAÇÃO 2:

- 20,33 g de cloreto de magnésio ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)
- Água destilada q. s. p. 100 ml

Armazenar em frasco âmbar e em refrigeração.

4. TÉCNICA

1. Pipetar 0,5 ml de soro em um tubo de centrífuga. Manter esse tubo em um béquer com gelo.
2. Adicionar nesse tubo 1 gota do reagente de precipitação 1 gelado e misturar.
3. Adicionar nesse mesmo tubo 1 gota do reagente de precipitação 2 gelado e misturar.
4. Agitar o tubo no béquer com gelo por 3 min
5. Coloque o nome do seu grupo no tubo, e deixe o tubo em repouso dentro do béquer com gelo por 10 min.
6. Centrifugar a 3000 rpm por 10 min
7. Transferir o sobrenadante para um tubo de ensaio. Despreze o precipitado.
8. Em outro tubo de ensaio, marcar nele HDL e pipete 0,1 ml do sobrenadante.
9. Em outro tubo de ensaio, marcar colesterol e pipete 0,1 ml de soro.
10. Em outro tubo de ensaio, marcar R e pipete 0,1 ml de solução de referência de colesterol.
11. Colocar nos 3 tubos 6 ml de reagente cromogênico em cada um deles (utilizar a capela).
12. Colocar os 3 tubos no banho-maria a 37° C por 20 min.
13. Retirar os tubos do banho-maria e efetuar as leituras no espectrofotômetro a 625 nm.
Ajustar o zero do aparelho com o reagente cromogênico, em cubetas de vidro.

5. CÁLCULOS

Usar este cálculo para amostra (HDL) e amostra (colesterol)

$$\frac{Abs_{amostra}}{Abs_{referência}} \times 200 = \text{mg de colesterol} / 100 \text{ ml de soro}$$

6. DISCUSSÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

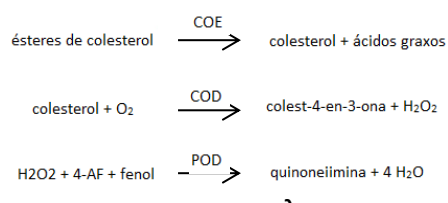
1. Calcular a concentração de HDL-colesterol na amostra
2. Calcular a relação colesterol total / HDL-colesterol
3. Associar o resultado e “Diagnóstico laboratorial da aterosclerose”

DETERMINAÇÃO DA COLESTEROLEMIA – MÉTODO ENZIMÁTICO

1. INTRODUÇÃO

Método enzimático-colorimétrico (COE/COD/POD) para determinar colesterol no soro ou no plasma. Somente para uso “in vitro”.

2. Fundamento do método



Em que: COE = colesterol esterase; COD = colesterol oxidase; POD = peroxidase

3. MATERIAL E REAGENTES

3.1. Amostra: soro ou plasma com EDTA. O sangue deve ser coletado após jejum de 12 h. o colesterol do soro é estável por 7 dias em refrigerador e 60 dias em congelador.

3.2. Reativos:

- 100 ml de tampão TRIS e fenol pH = 7
- Enzimas: 2 x 250 mg de mistura de COE, COD, POD, 4-AF e estabilizantes

3.3. Padrão: 5 ml de solução aquosa de colesterol 200 mg / dl.

Misturar por inversão. Todos os reativos são estáveis no refrigerador até a data de validade, indicada na embalagem.

3.4. REATIVO DE TRABALHO:

Dissolver o conteúdo de uma embalagem de enzimas com 50 ml de tampão. Homogeneizar suavemente, sem formar espuma. Armazenar em refrigeração por até 30 dias.

4. PROCEDIMENTO

Marcar 3 tubos de ensaio (branco – B; padrão – P; desconhecido – D)

Solução	Tubo B	Tubo P	Tubo D
Padrão	-	-	10 µℓ
Amostra	-	10 µℓ	-
Rvo. de trabalho	1 ml	1 ml	1 ml

Levar ao banho-maria por 10 min, a 37° C. Retirar, esperar esfriar e ler em espectrofotômetro a 505 nm ou em fotocolorímetro com filtro verde (490 – 530 nm), zerando o aparelho com o tubo B. a leitura deve ser feita em até 2 h.

5. CÁLCULOS

$$\text{Colesterol (mg / dl)} = D / (P \times 200)$$

6. VALORES DE REFERÊNCIA

De acordo com a recomendação do NCEP (*National Cholesterol Education Program*), estabeleceram-se níveis de HDL e LDL colesterol quanto ao risco de doenças cardiovasculares em pacientes acima e abaixo de 20 anos:

Valores para indivíduos acima de 20 anos

Nível	Colesterol (mg/dl)	LDL-colesterol (mg/dl)
Aceitável	< 200	< 130
Limiar superior de alto risco	200 – 239	130 – 159
Alto risco	> 240	> 160

Valores para indivíduos até 20 anos

Nível	Colesterol (mg/dl)	LDL-colesterol (mg/dl)
Aceitável	< 170	< 110
Limiar superior de alto risco	170 – 199	110 – 139
Alto risco	> 200	> 130

7. LINEARIDADE

A reação é linear até 500 mg / dl. Para valores superiores repetir o teste com amostra reduzida à metade, completando o volume com solução fisiológica, multiplicando o resultado por 2.

8. CONTROLE DE QUALIDADE

Soro liofilizado REACTROL CELM.

9. DISCUSSÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

9.1. Associar colesterol e lipoproteínas LDL e HDL-colesterol.

PRÁTICA 14

DETERMINAÇÃO DA HDL-COLESTEROL – MÉTODO ENZIMÁTICO

1. FUNDAMENTO DO MÉTODO

As lipoproteínas de baixa e muito baixa densidade (LDL e VLDL-colesterol) são precipitadas seletivamente pelo ácido fosfotúngstico. No sobrenadante, separado por centrifugação, ficam as HDL-colesterol e então é possível determiná-las, empregando o sistema enzimático-colorimétrico CPO-POD, segundo Trinder.

2. MATERIAL E REAGENTES

2.1. Amostra: soro ou plasma com EDTA. O sangue deve ser coletado após jejum de 12 a 14 h. Centrifugar o sangue até 2 h após a coleta, e conservar em refrigerador até o momento da análise, em até 24 h.

2.2. Reativo precipitante: 2 frascos com 80 ml cada, contendo solução de ácido fosfotúngstico 0,55 mmol/l e cloreto de magnésio 25 mmol/l.

Preparação do reativo precipitante:

- **Preparação Macro:** utilizar o conteúdo do frasco sem diluir. Estável até a data de validade, com temperatura entre 15 e 25 ° C.
- **Preparação Semimicro:** completar o volume do frasco na proporção 4 partes de reativo precipitante : 1 parte de água destilada. Estável até a data de validade, com temperatura entre 15 e 25 ° C.

2.3. Colesterol E

3. PRECIPITAÇÃO:

Em um tubo de ensaio, pipetar o Reativo Precipitante e a amostra de acordo com a tabela abaixo. Agitar durante 20s e deixar em temperatura ambiente. Centrifugar por 10 min a 4000 rpm. Usar o sobrenadante límpido como amostra (A1). Utilizar somente o sobrenadante no prazo de 2 h.

Tubo	Reativo precipitante	
	Macro	Semimicro
Padrão	500 µl	200 µl
Amostra	1000 µl	-
Rvo. Precipitante diluído	-	500 µl

4. DETERMINAÇÃO DO HDL-COLESTEROL

Em dois tubos de ensaio marcados B (branco) e D (desconhecido), colocar:

Solução	Tubo B	Tubo D
Água destilada	100 µl	-
Amostra (sobrenadante)	-	100 µl
Rvo. de trabalho colesterol E	1000 µl	1000 µl

5. CÁLCULOS HDL-COLESTEROL

HDL = F x A; fator = 219,2 (para a marca do kit usado)

Reativo precipitante	F (mg/dl)	F (nmol/ℓ)
Macro 500 nm	187,9	4,86
Semimicro 500 nm	219,2	5,67

* Ler os tubos a 500 nm, no espectrofotômetro.

Quando utilizar reagente colesterol de outras marcas, calcular novos fatores usando as fórmulas abaixo:

$$\text{Macro: } FATOR (mg/dl) = \frac{200}{Abs PD} \times 3 \times 1,09 \times 0,1$$

$$\text{Semimicro: } FATOR (mg/dl) = \frac{200}{Abs PD} \times 3,5 \times 1,09 \times 0,1$$

Sendo que:

- 3 e 3,5 = fator de diluição da amostra na precipitação;
- 1,09 = fator de diluição da amostra/diluição do padrão, na reação;
- 0,1 = relação volume de padrão/amostra na reação;
- AbsPD = padrão de absorbância do padrão do kit colesterol E – resultado obtido na reação do colesterol.

6. VALORES DE REFERÊNCIA

De acordo com a recomendação do NCEP (*National Cholesterol Education Program*), valores abaixo de 35 mg/dl constituem elevado risco para doenças cardiovasculares em pacientes acima de 20 anos, e devem ser tratados.

Valores para indivíduos acima de 20 anos

Nível	HDL-colesterol (mg/dl)
Baixo risco	> 55
Limiar superior de alto risco	33 – 55
Alto risco	< 35

7. LINEARIDADE

A reação é linear até 500 mg/dl.

8. DISCUSSÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

8.1. Associar HDL-colesterol e aterosclerose.

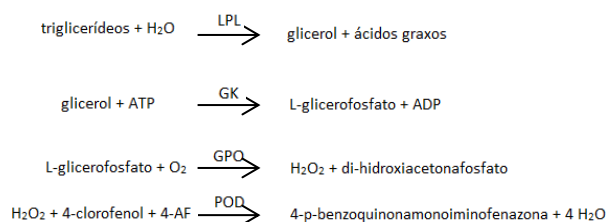
PRÁTICA 15

DETERMINAÇÃO DE TRIACILGLICERÓIS – MÉTODO ENZIMÁTICO

1. INTRODUÇÃO

Método enzimático-colorimétrico (GPO/POD) para determinar triglicerídeos no soro ou no plasma. Somente para uso “in vitro”.

2. FUNDAMENTO DO MÉTODO



3. MATERIAL E REAGENTES

3.1. **AMOSTRA:** soro ou plasma heparinizado ou coletado com EDTA. O sangue deve ser coletado após jejum de 12 h. Conservar em refrigerador até o momento da análise, em até 72 h.

3.2. REATIVOS:

1. **Padrão:** 5 ml de solução estabilizada de glicerol, equivalente a 200 mg/dl (2,29 mmol/ℓ).
2. **Tampão:** 100 ml de tampão PIPES, pH = 6,5.
3. **Enzimas:** 2 frascos contendo enzimas, ATP, 4-aminofenazona e ingredientes não reativos.

3.3. **PREPARAÇÃO DO REATIVO DE TRABALHO:** reconstituir um frasco de enzimas (3) com 50 ml de tampão (2), misturando suavemente, sem formar espuma. Marcar a data. Esta solução é estável por pelo menos 10 dias, em refrigeração e por 2 dias à temperatura ambiente.

➤ **Concentração do reativo de trabalho:**

- PIPES: 55 mmol/ℓ, pH = 6,5
- Lipoproteína lipase (LPL): ≥ 120000 U/ℓ
- Glicerol quinase (GK): ≥ 1000 U/ℓ
- Glicerol fosfato oxidase (GPO): ≥ 3000 U/ℓ
- Peroxidase (POD): ≥ 440 U/ℓ
- 4-aminoantiperidina: 0,7 mmol/ℓ
- 4-clorofenol: 1 mmol/ℓ
- ATP: 30 mmol/ℓ
- Surfactante, ativadores e estabilizantes.

4. PROCEDIMENTO:

Em 3 tubos de ensaio, colocar:

Solução	Tubo B	Tubo P	Tubo D
Padrão (1)	-	-	10 µl
Amostra	-	10 µl	-
Reativo (3) A	1 ml	1 ml	1 ml

Misturar e levar ao banho-maria a 37° C, por 10 min. Retirar do banho-maria e ler a 505 nm, zerando o aparelho com o tubo B, em até 60 min.

5. CÁLCULOS

$$\text{Triglicerídeos (mg/dl)} = D / (P \times 200)$$

6. VALORES DE REFERÊNCIA

10 – 190 mg/dl. Recomenda-se que cada laboratório estabeleça seus valores de referência.

Valores para indivíduos acima de 20 anos

Nível	HDL-colesterol (mg/dl)
Baixo risco	> 55
Limiar superior de alto risco	33 – 55
Alto risco	< 35

7. LINEARIDADE

A reação é linear até 1000 mg/dl. Para valores maiores, diluir a amostra a $\frac{1}{5}$ com solução fisiológica e multiplicar o resultado por 5.

8. CONTROLE DE QUALIDADE: soro liofilizado REACTROL CELM

9. PRECAUÇÕES: os reativos padrão contêm azida sódica. Evitar ingerir e contato com a pele e mucosas.

10. DISCUSSÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

10.1. Associar triglicerídeos e VLDL-colesterol.

10.2. Cálculo de Friedewald (1972).

SÍNTESE DE PROTEÍNAS NAS DOENÇAS HEPÁTICAS

O fígado é a principal sede da síntese de proteínas plasmáticas. Doenças hepáticas grave ou crônicas conduz a uma diminuição da síntese de proteínas (p. ex. albumina, antitripsina α , fibrinogênio, ceruloplasmina, heptoglobina, transferrina, colinesterase e as proteínas da coagulação) e nas concentrações de proteínas plasmáticas. O fígado responde à lesão ou à inflamação com uma síntese aumentada de certas proteínas, isto é, os reagentes da fase aguda (p. ex. haptoglobina, proteína C-reativa e ceruloplasmina).

O padrão das alterações das proteínas plasmáticas depende do tipo, da gravidade e da duração da lesão ou doença hepática. Por exemplo, na disfunção hepática aguda, normalmente ocorre muito pouca alteração no perfil das proteínas plasmáticas. Na doença hepática crônica, os níveis de albumina no soro diminuem e os níveis de globulina γ aumentam.

PRÁTICA 16

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS SÉRICAS TOTAIS E FRAÇÕES

1. INTRODUÇÃO

O teste de Biureto é sensível à dosagem de proteínas, mesmo para cadeias polipeptídicas e tripeptídeos. Substâncias que possuam 2 ou mais enlaces peptídicos ($O = C - NH -$) produzem um meio fortemente alcalino, uma cor violeta com solução diluída de $CuSO_4$. A cor é devida a um complexo entre o íon cúprico e 4 átomos de Nitrogênio de duas cadeias polipeptídicas adjacentes.

O aumento da força iônica pela adição de sulfito de sódio precipita globulinas, as quais são separadas por filtração.

A reação de Biureto é realizada no soro total e no filtrado livre de globulina, e seu valor é dado pela diferença entre proteínas totais e albumina.

2. REAGENTES E MATERIAL

2.1. SOLUÇÃO DE REFERÊNCIA DE CASEÍNA: 500 mg/100 ml ou 'pool' de soro com concentrações de proteína determinadas por microkjeldahl.

2.2. SULFITO DE SÓDIO 24%: dissolver 240 g de Na_2SO_3 em água destilada quente q. s. p. 1000 ml.

2.3. REATIVO DE BIURETO

Num balão volumétrico de 1000 ml adicionar:

- 500 mg de $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ (fornece íons Cu e precipita globulinas)
- 5 ml de NH_4OH 28% (alcaliniza o meio)
- 85 ml de solução de tartarato de sódio e potássio
- Água destilada q. s. p. 1000 ml

3. TÉCNICA

- 3.1. Preparo do soro: Em tubo de ensaio, colocar 0,5 mL de soro e 9,5 mL de solução de sulfito de sódio
- 3.2. Rotular 4 tubos de ensaio: PT, AB, B, R.
- 3.3. Pipetar no tubo PT 1 ml da solução do item 3.1
- 3.4. Filtrar o restante da mistura do item 3.1, devendo obter um filtrado límpido e transparente
- 3.5. Pipetar no tubo AB 1 ml do filtrado límpido.
- 3.6. Pipetar no tubo B 1 ml de sulfito de sódio
- 3.7. No tubo R, pipete 1 ml de solução de referência de caseína
- 3.8. Coloque 4 ml de reativo de Biureto em cada um dos tubos e deixe-os em repouso por 30 min, à temperatura ambiente
- 3.9. Efetuar a leitura no espectrofotômetro ajustado para 535 nm. Zerar o aparelho com o tubo B.

4. EXEMPLO DE CÁLCULO

Tubos	Absorbância	mg de proteína
PT	0,66	x
AB	0,2	y
R	0,92	5

Absorbância mg de proteína

0,66	x	0,92	5
0,2	y	0,66	x
0,92	5		

$$x = \frac{5 \times 0,66}{0,92} = 3,5 \text{ (PT)}$$

$$y = \frac{5 \times 0,20}{0,92} = 1,08 \text{ (AB)}$$

Volume de soro usados na reação: 0,05 ml

0,5 ml de soro ----- 10 ml

0,05 ml de soro ----- 1 ml

mg de proteína ---- ml de soro

3,5 (PT) ----- 0,05

X ----- 100

$$X = \frac{3,5 \times 100}{0,05}$$

$$X = 3,5 \times 2000$$

$$X = 7000 \text{ mg/100 ml} \rightarrow X = 7 \text{ g/100 ml} = 7\%$$

Calcule a porcentagem de AB, usando a leitura em absorbância (AB); no exemplo, AB = 0,2.

5. DETERMINAÇÃO DOS VALORES DE GLOBULINA

Concentração de globulinas = (concentração de proteínas totais) – (concentração de albumina)

As proteínas plasmáticas encontram-se numa concentração de 6 a 8 g /100 ml de sangue. Tais proteínas podem ser separadas por eletroforese, dando as seguintes frações: fibrinogênio, albumina e globulinas. No soro, apenas são obtidas a albumina e as globulinas, uma vez que o fibrinogênio ficou retido no coágulo sob a forma de fibrina. A concentração normal dessas frações no plasma são as seguintes:

Fração protéica	g / 100 ml de plasma
Albumina	2,8 – 4,5
Globulinas totais	3 – 3,5
α_1	0,3 – 0,6
α_2	0,4 – 0,9
β	0,6 – 1,1
γ	0,7 – 1,5

Relação normal albumina/globulina: 1,2 – 4,0.

6. DISCUSSÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

- 6.1. Calcule a concentração de proteína total no soro
- 6.2. Calcular a concentração total de albumina e a relação albumina/globulina.

PRÁTICA 17

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS E ALBUMINA NO SORO E NA URINA – MÉTODO ENZIMÁTICO

1. INTRODUÇÃO

Método colorimétrico (Biureto) para determinar proteínas totais e albumina (verde de bromocresol) no soro ou na urina. Somente para uso *in vitro*.

2. FUNDAMENTO DO MÉTODO

2.1. Determinação de proteínas totais

As ligações peptídicas das proteínas reagem com o íon cúprico, em meio alcalino, resultando em um complexo de cor violeta com o máximo de absorção a 540 nm, cuja intensidade é proporcional à concentração protéica total na amostra.

2.2. Determinação de albumina

A albumina reage especificamente e sem separação prévia com a forma aniônica do Verde de Bromocresol (VBC), em presença de excesso de corante em meio tamponado a pH = 3,8. O aumento de absorbância do branco de reativo a 625 nm é proporcional à quantidade de albumina presente na amostra.

3. MATERIAL E REAGENTES

3.1. **Amostra:** soro livre de hemólise ou urina recém-coletada. Conservar em refrigerador até o momento da análise, em até 72 h.

3.2. Reativos:

1. **Padrão:** 2 ml de solução de albumina e globulinas em estado inativo com título constante de proteínas totais (Biureto ou Kjeldahl) e albumina (ligação à VBC). Ver a concentração no rótulo do frasco.
2. **Reativo de Biureto:** 1 frasco com 250 ml de complexo EDTA/Cu 13 mmol/l, NaOH 875 mmol/l e alquil aril poliéter (AAP).
3. **Reativo VBC:** 1 frasco com 250 ml de solução de Verde de Bromocresol 71 mmol/l em tampão acetato, pH = 3,8.

Se os frascos estiverem lacrados, não necessitam de refrigeração. Uma vez aberto o padrão (1), manter em refrigerador.

4. PROCEDIMENTO PARA DETERMINAR PROTEÍNAS TOTAIS

Em 3 tubos de ensaio B (branco, P (padrão) e D (desconhecido), colocar:

Solução	Tubo B	Tubo P	Tubo D
Padrão (1)	-	50 µl	-
Amostra	-	-	50 µl
Reativo (2)	3,5 ml	3,5 ml	3,5 ml

Misturar e levar ao banho-maria a 37° C, por 15 min. Retirar do banho-maria e deixar esfriar. Ler em espectrofotômetro a 540 nm ou fotocolorímetro com filtro verde, zerando o aparelho com o tubo B. A cor final da reação é estável por até 2 h. Os volumes podem ser alterados proporcionalmente, respeitando-se a capacidade do equipamento.

5. CÁLCULOS

$$\text{Proteínas totais (g/dl)} = D / (P \times C)$$

6. **LINEARIDADE:** a reação é linear até 12 g/dl.

7. PROCEDIMENTO PARA DETERMINAR ALBUMINA

Em 3 tubos de ensaio B (branco, P (padrão) e D (desconhecido), colocar:

Solução	Tubo B	Tubo P	Tubo D
Padrão (1)	-	10 µl	-
Amostra	-	-	10 µl
Reativo (3)	3,5 ml	3,5 ml	3,5 ml

Misturar e deixar em repouso por 10 min à temperatura ambiente. Ler em espectrofotômetro a 620 nm ou fotocolorímetro com filtro vermelho (620 – 650 nm), zerando o aparelho com o tubo B. A solução é estável por até 20 min.

8. CÁLCULOS

$$\text{Albumina (g/dl)} = D / (P \times C)$$

$$\text{Relação A/G} = \frac{\text{Albumina (g/dl)}}{\text{PT(g/dl)} - \text{Albumina (g/dl)}}$$

9. LINEARIDADE

A reação é linear até 6 g / dl.

10. VALORES DE REFERÊNCIA

Fração	Soro (g/dl)
Proteínas totais	6,1 – 7,9
Albumina	3,5 – 4,8
A/G	1,2 – 2,2

11. CONTROLE DE QUALIDADE: soro liofilizado REACTROL CELM

12. DISCUSSÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

12.1. Relacionar proteinúria e albuminúria com dano renal.

SIGNIFICADO CLÍNICO NA DISFUNÇÃO RENAL E HEPÁTICA

A creatina é sintetizada nos rins, fígado e pâncreas por duas reações enzimáticas. Uma vez formada é transportada pelo sangue a outros órgãos, como músculos e o cérebro, onde é fosforilada a fosfocreatina, um composto de alta energia. A interconversão entre fosfocreatina e creatina é uma característica particular do processo metabólico da contração muscular; parte da creatina livre no músculo se transforma espontaneamente em creatinina, seu anidrido. Em virtude de a creatinina ser de produção endógena e ser liberada nos líquidos corporais uma taxa constante, e de seus níveis plasmáticos permanecerem dentro de limites estreitos, sua depleção pode ser determinada como um indicador de insuficiência renal.

PRÁTICA 18

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CREATININA NO SORO

1. INTRODUÇÃO

A creatina-fosfato é importante como reserva energética, dando origem ao ATP nos músculos. A síntese de creatina envolve os aminoácidos glicina, arginina e S-adenosil metionina. A creatina-fosfato transforma-se em creatinina sendo executada em nível renal.

2. FUNDAMENTO

A creatinina reage com o picrato em meio alcalino tamponado, com prévia desproteinização com ácido pícrico, obtendo-se um cromógeno que é medido a 510 nm.

3. TÉCNICA (USAR SORO)

- **Desproteinização:**
 - Pipetar 0,5 ml de soro e colocar em um tubo de centrífuga marcado S.
 - Adicionar nesse tubo 2,5 ml do reativo de desproteinização (reativo 1)
 - Misture usando o agitador de tubo de ensaio
 - Deixar em repouso por 10 min
 - Centrifugar a 3000 rpm, por 5 min
 - Transferir o sobrenadante para um tubo marcado com um S.
- **Colorimetria**
 - Marcar 3 tubos de ensaio (S – soro; P – padrão; B – branco) e pipetar:
 - Tubo S: 1,2 ml do sobrenadante do tubo de ensaio marcado S, onde foi colocado o sobrenadante centrifugado
 - Tubo P: 0,2 ml de solução padrão e 0,3 ml de água destilada
 - Tubo B: 0,5 ml de água destilada
 - Nos tubos P e B, coloque 0,7 ml do Reativo I (com ácido pícrico) em cada um
 - Nos 3 tubos, coloque 0,2 ml do reativo 2 (tampão glicina/NaOH) e misture
 - Deixe os tubos de ensaio em repouso por 20 min à temperatura ambiente
 - Fazer a leitura no espectrofotômetro a 510 nm, zerando o aparelho com o tubo B.

4. CÁLCULOS

4.1. Soro

$$\text{Creatinina (mg/dl)} = \text{leitura S} / \text{leitura P} \times 2$$

4.2. Urina

$$\text{Creatinina (g/24 h)} = \text{leitura U} / (\text{leitura P} \times 0,002 \times \text{volume total})$$

$$\text{mg/dl} = (\text{leitura U}/\text{leitura P}) \times 2 \times 100$$

4.3. Depuração de creatinina

$$\text{Depuração (ml/min)} = (C_u/C_s) \times (V_t/t) \times (1,73/S)$$

$$S = M^{0,425} \times H^{0,725} \times 71,84 \times 10^{-4}$$

Em que:

M = massa em kg;

H = altura em cm;

S = superfície corporal em m² (1,73 = superfície corporal de um indivíduo com 1,70 m de altura);

C_u = concentração de creatinina na urina;

C_s = concentração de creatinina no soro;

V_t = volume total de urina em ml;

t = intervalo de coleta de urina em min.

5. Valores de referência e interpretação

Valores-padrão:

soro = 0,8 – 1,4 mg/dl;

urina = 1 – 2 g/24 h;

depuração renal = 80 – 140 ml/min.

5.1. Calcular a concentração de creatinina

5.2. Associar elevação na creatinina sérica e dano renal.

SIGNIFICADO CLÍNICO NA DISFUNÇÃO HEPÁTICA E RENAL

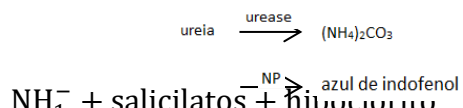
A uréia é o principal produto metabólico nitrogenado do catabolismo proteico nos seres humanos. Responsável por mais de 75% do nitrogênio não-proteico excretado. A biossíntese da ureia, a partir da amônia derivada do nitrogênio amínico, é executada exclusivamente por enzimas hepáticas do ciclo da uréia. Como mais de 90% da uréia são excretados pelos rins, uma ampla variedade de doenças renais, com diferentes permutações de lesão glomerular, tubular ou vascular, pode causar um aumento na concentração de uréia no plasma. A utilidade da ureia como um indicador independente da função renal é limitada pela variabilidade de seus níveis no sangue, como resultado de fatores não-renais. Desidratação leve, muita proteína no alimento, catabolismo protéico aumentado, devastação muscular como no jejum prolongado, reabsorção de proteínas sanguínea após uma hemorragia gastrointestinal, tratamento com cortisol ou seus análogos sintéticos e perfusão diminuída dos rins podem causar uma azotemia (uréia sanguínea aumentada).

PRÁTICA 19
DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE UREIA

1. INTRODUÇÃO

Método colorimétrico (Berthelot) para determinar ureia no soro, plasma ou na urina. Somente para uso “in vitro”.

2. FUNDAMENTO DO MÉTODO



A intensidade da cor formada é diretamente proporcional á concentração de ureia na amostra.

NP = nitroprussiato

3. MATERIAL E REAGENTES

- **Amostra:** soro, plasma ou urina diluída 1: 100 (0,1 ml de urina + 9,9 ml de água). A ureia presente no soro ou no plasma é estável por até 24 h a 25° C, alguns dias entre 2 e 8° C; se congelado a – 20° C, a ureia é estável por 6 meses.
- **REATIVOS**
 1. **Reativo 1 (concentrado):** frasco com 100 ml de tampão fosfato 0,1 M, salicilato 0,3 M, nitroprussiato de sódio 17 mM e EDTA 7 mM.
 2. **Reativo 2 (concentrado):** frasco com 17 ml de hipoclorito de sódio 0,32 N em NaOH 0,4 M.
 3. **Enzimas:** frasco com 20 ml de solução de uréase em tampão fosfato.
 4. **Padrão:** frasco com 5 ml de solução aquosa de ureia 60 mg/dl (10 mmol/l)

Os reativos são estáveis até a data de validade indicada na embalagem, sob refrigeração.

• **PREPARAÇÃO DOS REATIVOS**

1. **Reativo 1:** transferir o conteúdo do frasco de reativo 1 para um balão volumétrico de 500 ml e completar com água destilada. Transferir para frasco âmbar e guardar sob refrigeração, por até 18 meses. De acordo com o nº de análises, diluir esta solução nas proporções conforme a tabela abaixo. Estas diluições são estáveis por 15 dias sob refrigeração.

Reativo 1 (ml)	Reativo enzimático 3 (ml)
12,5	0,5
25	1,0
50	2,0
125	5,0
250	10,0
500	20,0

2. Reativo 2: transferir o conteúdo do frasco de reativo 2 para um balão volumétrico de 500 ml e completar com água destilada. Transferir para frasco de polietileno e guardar sob refrigeração, por até 18 meses.

4. PROCEDIMENTO

- **Para soro ou plasma**

Marcar 3 tubos de ensaio (B – branco; P – padrão; D – desconhecido) e pipetar:

Solução	Tubo B	Tubo P	Tubo D
Padrão	-	10 µl	-
Amostra	-	-	10 µl
Rvo. 1 diluído	1 ml	1 ml	1 ml

Misturar, levar ao banho-maria por 5 min a 37° C. Em seguida, coloque 1 ml do reativo 2 em cada tubo, leve novamente ao banho-maria por 5 min a 37° C. Ler em espectrofotômetro a 600 nm, zerando o aparelho com o tubo B, em até 2 h.

- **Para urina ou soros lipêmicos, ictericos ou hemolisados**

Marcar 4 tubos de ensaio (B – branco; P – padrão; BD – branco do desconhecido; D – desconhecido), pipetar os seguintes reagentes:

Solução	Tubo B	Tubo P	Tubo D	Tubo BD
Padrão	-	10 µl	-	-
Amostra (soro/urina – 1: 100)	-	-	10 µl	10 µl
Rvo. 1 diluído	1 ml	1 ml	1 ml	-

Misturar e levar ao banho-maria a 37° C por 5 min. Após esse tempo, adicionar:

Solução	Tubo B	Tubo P	Tubo D	Tubo BD
---------	--------	--------	--------	---------

Rvo. 2 concentrado	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Rvo. 1 diluído	-	-	-	1 ml

Misturar e levar novamente ao banho-maria a 37° C. Retirar do banho-maria e ler no espectrofotômetro a 660 nm, zerando o aparelho com o tubo B. Fazer a leitura em até 2 h.

5. CÁLCULOS

Resultados expressos como uréia:

- **Soro ou plasma**

$$\text{Uréia (mg/dl)} = D / (P \times 60)$$

$$\text{Uréia (mmol/l)} = D / (P \times 10)$$

- **Urina**

$$\text{Ureia (mg/dl)} = \frac{D - BD}{P} \times 60 \times 100$$

$$\text{Ureia (g/dia)} = [g/dl] \times V \times 100$$

Em que: V = volume (em ℓ) de urina em 24 h; 100 = fator de conversão de mg/dl para g/ℓ

6. VALORES DE REFERÊNCIA

	Soro ou plasma	Urina
Ureia	10 – 50 mg/dl	15 – 30 g/24h
	1,7 – 8,3 mmol/l	

7. LINEARIDADE

A reação é linear até 250 mg/dl. Para valores maiores, repetir o teste com amostra reduzida à metade, com o volume completado com água destilada, multiplicando resultado por 2.

8. CONTROLE DE QUALIDADE

Soro liofilizado REACTROL CELM.

9. OBSERVAÇÕES

- Fluoretos devem ser utilizados como coagulante em concentração superior a 5 mg/dl de sangue. Outros coagulantes, exceto sais de amônio, não interferem.
- Devido à extrema sensibilidade da reação ao amoníaco, evite contaminar a amostra ou os reativos com amoníaco ou compostos derivados.

10. DISCUSSÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

- Uréia: função hepática e renal.

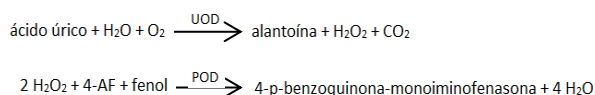
PRÁTICA 20
DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO ÚRICO

1. INTRODUÇÃO

O ácido úrico é um metabólito das purinas, ácidos nucleicos e nucleoproteínas. Normalmente a concentração de ácido úrico no soro varia entre indivíduos, devido a fatores como sexo, idade, etnia, gravidez etc.. Níveis anormais de ácido úrico no soro são indícios de desordens no metabolismo das substâncias que lhe dão origem ou são defeitos de eliminação. A hiperuricemia é típica, porém não exclusiva, de casos de gota. Em caso de persistência dessa condição, pode haver risco de insuficiência renal irreversível. Outros medicamentos, como drogas uricosúricas (salicilatos, fenilbutazona), aumentam a excreção de ácido úrico diminuindo os níveis séricos do mesmo.

2. FUNDAMENTO DO MÉTODO

O ácido úrico é oxidado enzimaticamente pela uricase (UOD – ureato oxigênio-reductase, EC 1.7.3.3) a alantoína, com produção de gás carbônico e água oxigenada. A água oxigenada gerada na oxidação produz a ligação do fenol com a 4-aminofenasona, reação catalisada por peroxidase (POD-doador: peróxido de hidrogênio oxidoreductase, EC 1.11.1.7) com formação de uma quinonimina vermelha de acordo com o seguinte esquema:



3. CARACTERÍSTICA DO SISTEMA

Este método reúne a conhecida especificidade da uricase e a comprovada eficiência do revelador cromogênico, introduzido por Trinder. Peroxidas/fenol/4AF configuram um sistema analítico com as seguintes características

- Método direto sem desproteíntização
- Reativo de trabalho único e estável por 15 dias sob refrigeração
- Ótima reprodutibilidade devido ao controle do tempo e temperatura não serem críticos
- Linearidade até 20 mg/dl.

4. MATERIAL E REAGENTES

- **Amostra:** usar somente soro fresco separado rapidamente do coágulo. Em caso de turbidez, fazer um Blank de soro com água destilada. O soro se conserva por até 3 dias se congelado.
- **Padrão:** 4 ml de solução de ácido úrico 10 mg/dl. Pronto para uso. Manter sob refrigeração, até a validade indicada na caixa. Retirar da geladeira apenas para uso imediato, retornando o frasco em seguida.
- **Uricase:** 2 ml de solução de uricase $\geq 3U/ml$. Pronto para uso. Manter sob refrigeração, até a validade indicada na caixa. Retirar da geladeira apenas para uso imediato, retornando o frasco em seguida.
- **Reativos (uso *in vitro*)**
 - **Reativo 4-AF/POD:** frasco com peroxidase $\geq 50 U$, 12 mmol de tampão fosfato para pH = 7,3 e 3 mmol de 4-aminofenasona. Reconstituir adicionando 25 ml de água destilada. Misturar sem agitar até dissolução completa. Homogeneizar antes de usar. Estável por 3 meses à temperatura ambiente ou 10 meses sob refrigeração (neste caso, pode cristalizar). Redissolver colocando o frasco em banho-maria a 37° C por 2 min.
 - **Reativo fenol:** 25 ml de solução de fenol 24 mmol/l. É tóxico e irritante, portanto manusear com cuidado. Manter sob refrigeração, até a validade indicada na caixa. Retirar da geladeira apenas para uso imediato, retornando o frasco em seguida.
 - **Reativo de trabalho:**
 - ✓ Em uma proveta, colocar 80 ml de água destilada, 10 ml de reativo fenol, 10 ml de reativo 4-AF/POD e 0,8 ml de uricase. Misturar por inversão, sem agitar para evitar formar espuma. Guardar em frasco âmbar, na geladeira por até 15 dias ou até 72 h à temperatura ambiente. Para outras quantidades, proceder como na tabela abaixo:

Nº de análises em 15 dias	Água destilada (ml)	Reativo fenol (ml)	Reativo 4-AF (ml)	Uricase (ml)
20 (50 ml)	40	5	5	0,4
40 (100 ml)	80	10	10	0,8
100 (250 ml)	200	25	25	2

Durante o uso, pode surgir uma cor rosada no líquido, o que não afeta seu funcionamento, desde que se controlem as leituras no Blank e se processe periodicamente um Padrão. Quando as leituras ultrapassarem o valor de 0,160 A, desprezar este reativo.

5. CONCENTRAÇÕES FINAIS

O reativo de trabalho, uma vez preparado, tem a seguinte composição:

- **Uricase:** 24 U/l
- **POD:** 200 U/l
- **Fenol:** 2,4 mmol/l
- **4-AF:** 12,5 mmol/l
- **pH:** 7,3 ± 0,1

6. PROCEDIMENTO

Marque 3 tubos de ensaio (B – Blank; P – padrão; D – desconhecido) e coloque:

Solução	Tubo B	Tubo P	Tubo D
Padrão	-	50 µl	-
Amostra	-	-	50 µl
Rvo. de trabalho	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml

Misturar e levar ao banho-maria a 37° C por 15 min ou deixar em repouso por 30 min à temperatura ambiente. Ler em espectrofotômetro a 520 nm ou fotocolorímetro com filtro verde (500 – 550 nm), zerando o aparelho com o tubo B. A leitura deve ser feita em até 45 min. Valores de amostra / padrão e reativo de trabalho podem ser diminuídos ou aumentados proporcionalmente de acordo com o aparelho utilizado.

Exemplo:

Qtde. Amostra/padrão	Qtde. reativo de trabalho
20 µl	1 ml
100 µl	5 ml

7. CÁLCULOS

$$\text{Ácido úrico (mg/dl)} = D \times f$$

$$f = \frac{10 \text{ mg/dl}}{P}$$

Unidades S.I.: de acordo com a I. F. C. C., os resultados de análises clínicas e biológicas devem ser expressos em Unidades S. I. como quantidade de substância por unidade de volume (mol/l e submúltiplos). Para o ácido úrico, a interconversão de unidades é a seguinte:

$$\text{ácido úrico mmol/l} = \text{ácido úrico mg/dl} \times 0,0595$$

$$\text{ácido úrico mg/dl} = \text{ácido úrico} \times 16,81$$

8. VALORES DE REFERÊNCIA

Sexo	Valores normais (mg/dl)
Masculino	2,5 – 6,0
Feminino	2,0 – 5,0

9. DISCUSSÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

- Associar ácido úrico e gota.

PRÁTICA 21
ELABORAÇÃO DE CURVA PADRÃO
CURVA DE REFERÊNCIA PARA DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE CASEÍNA

1. INTRODUÇÃO

Uma das maneiras de se calcular a concentração de uma solução-problema é através de determinações fotométricas quantitativas.

Ao se passar luz branca através de uma solução colorida, são absorvidas relativamente algumas radiações luminosas e através da medida de absorção de luz, é possível determinar quantitativamente certas substâncias.

Para a medida espectrofotométrica das concentrações de uma substância, necessitamos de uma série de padrões (soluções com concentração conhecida) e um “branco”. O “branco” é uma solução que contém todos os reagentes da solução, exceto a substância a ser determinada. Supõe-se que qualquer diferença na cor do “branco” e da amostra seja devida à amostra.

As curvas de referência são feitas preparando-se uma série de soluções padrão da espécie em questão (analitos) com um mínimo de 5 pontos, cujas concentrações são exatamente conhecidas, as quais cobrem a faixa de concentração com erro mínimo, ou então a faixa de concentração de trabalho. Em seguida, faz-se a leitura destas soluções e os resultados são utilizados para a construção de um gráfico, em que a absorbância é colocada na ordenada e a concentração na abscissa.

Quando as concentrações experimentais são apropriadas e houver uma proporcionalidade entre absorbância e concentração, o gráfico apresentará uma sucessão de pontos formando uma linha ascendente. Experimentalmente, pode acontecer que a sucessão de pontos não seja exatamente alinhada sob uma reta e tal fato não invalida a curva. A reta deve então ser traçada de modo a se aproximar ao máximo de todos os pontos obtidos. Para corrigir tais erros experimentais utiliza-se uma regressão linear ou método dos Quadrados Mínimos. Nesse método, determinam-se os coeficientes **a** e **b** de uma equação de reta $y = ax + b$, de maneira que a soma dos desvios ao quadrado (S^2) seja mínima. O desvio S^2 é calculado por:

$$ax + b - y = S,$$

em que a equação da reta é dada por:

$$ax + b - y = 0 \text{ ou } y = ax - b$$

2. MÉTODO

A caseína é submetida à reação de Biureto, que é específica para ligações peptídicas encontradas nas proteínas.

Em meio fortemente alcalino, uma substância que possua ligações peptídicas reagirá com solução diluída de CuSO_4 , produzindo uma cor violeta, de intensidade proporcional ao número de ligações peptídicas envolvidas. Quanto maior o número de moléculas de caseína presente na amostra em questão, maior a intensidade da cor, a qual será medida espectrofotometricamente.

3. MATERIAL E REAGENTES

3.1. Solução de referência de caseína 5 mg/ml

- 5 g de caseína
- Água destilada q. s. p. 1000 ml

3.2. Reativo de Biureto:

- 1,5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
- 6 g de tartarato duplo de sódio e potássio
- 300 ml de NaOH 10%
- Água destilada q. s. p. 1000 ml

Dissolver o $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ e o tartarato duplo de sódio e potássio em 500 ml de água destilada. Adicione a solução de NaOH, agitando com bastão de vidro. Completar o volume com a água destilada.

3.3. SOLUÇÃO DE NaOH 10%:

- 100 g de NaOH
- Água destilada q. s. p. 1000 ml

4. PROCEDIMENTO

Marque 7 tubos de ensaio e coloque conforme a tabela abaixo:

Tubo	Sol. padrão de caseína (ml)	Água destilada (ml)	Rvo. de Biureto (ml)
0	-	1	4
1	0,1	0,9	4
2	0,2	0,8	4
3	0,4	0,6	4
4	0,6	0,4	4
5	0,8	0,2	4
6	1	-	4

Misturar e manter os tubos em repouso por 30 min. Ler em espectrofotômetro a 535 nm, zerando o aparelho com o tubo 0. Anote os resultados.

5. CÁLCULOS

Tabular os dados. Calcular a equação da reta, montando a seguinte tabela:

Tubo	x (mg %)	y (absorbância)	x ²	y ²
1	0,5			
2	1,0			
3	2,0			
4	3,0			
5	4,0			
6	5,0			
Σ				

x = concentração de caseína (mg)

y = absorbância

Equação da reta: $y = ax + b$

$$a = \frac{\Sigma(x) \cdot \Sigma(y) - n \cdot \Sigma(xy)}{[\Sigma(x)]^2 - n \cdot \Sigma(x^2)}$$

$$b = \frac{\Sigma(x) \cdot \Sigma(xy) - n \cdot \Sigma(x^2) \cdot \Sigma(y)}{[\Sigma(x)]^2 - n \cdot \Sigma(x^2)}$$

n = número de leituras (6).

6. DISCUSSÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

6.1. Construir um gráfico, colocando na ordenada os valores da absorbância obtidos, e na abscissa o valor das concentrações de caseína.

6.2. Calcule os coeficientes a e b da equação da reta, através do método dos Quadrados Mínimos.

PRÁTICA 22

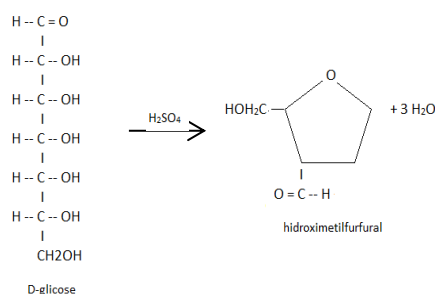
DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS (AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS) EM ALIMENTOS VEGETAIS

1. INTRODUÇÃO

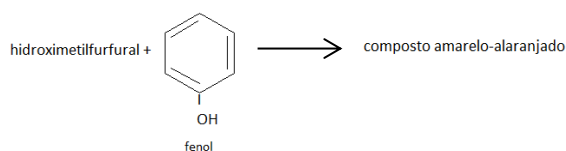
Esse método é usado na determinação colorimétrica quantitativa de monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos e derivados. A celulose, apesar de ser um polissacarídeo, não é solúvel, por fazer parte da parede celular dos vegetais, não sendo, portanto, determinada.

2. MÉTODO

Os glicerídeos, em presença de ácido sulfúrico concentrado, são convertidos a hidroximetilfurfural, pela liberação de moléculas de água.



O hidroximetilfurfural reage com o fenol, dando um composto colorido amarelo-alaranjado, cuja intensidade de cor é proporcional à quantidade de açúcar existente na amostra:



3. MATERIAL E REAGENTES

3.1. Solução de fenol 5 %

- 5 g de fenol
- Água destilada q. s. p. 100 ml

3.2. Ácido sulfúrico concentrado

3.3. Solução de referência de glicose (200 µg/ml):

- 0,2 mg de glicose
- Água destilada q. s. p. 100 ml

4. PROCEDIMENTO

4.1. Extração (amostra):

- Pesar 200 mg de folhas secas e finamente moídas
- Colocar em um erlenmeyer com 50 ml de água destilada
- Levar ao banho-maria a 40° C por 30 min, com agitação casual
- Filtrar em algodão em um balão volumétrico de 100 ml
- Completar o volume e homogeneizar.

4.2. DETERMINAÇÃO:

- Marque 7 tubos de ensaio e coloque conforme a tabela abaixo:

Tubo	Sol. ref. de glicose (ml)	Água destilada (ml)	Amostra (ml)	Sol. de fenol (ml)	AGITAÇÃO	H ₂ SO ₄ conc. (ml)
0	-	0,5	-	0,5		2,5
1	0,1	0,4	-	0,5		2,5
2	0,2	0,3	-	0,5		2,5
3	0,3	0,2	-	0,5		2,5
4	0,4	0,1	-	0,5		2,5
5	0,5	-	-	0,5		2,5
amostra	-	-	0,5	0,5		2,5

- Homogeneizar os tubos e levar ao espectrofotômetro para leitura a 490 nm, zerando aparelho com o tubo 0. Anote os resultados.

5. CÁLCULOS

5.1. Curva de referência

- Tabular os dados.
- Calcular a equação da reta, usando o método dos Quadrados Mínimos, montando a seguinte tabela:

Tubo	x (µg %)	y (absorbância)	x ²	y ²
1				
2				
3				
4				
5				
6				
Σ				

Observação: para esses cálculos, verificar a aula prática nº 1 – Curva de referência, lembrando que:

x = concentração de glicose (µg)

y = absorbância

Equação da reta: $y = ax + b$

$$a = \frac{\Sigma(x) \cdot \Sigma(y) - n \cdot \Sigma(xy)}{[\Sigma(x)]^2 - n \cdot \Sigma(x^2)}$$

$$b = \frac{\Sigma(x) \cdot \Sigma(xy) - n \cdot \Sigma(x^2) \cdot \Sigma(y)}{[\Sigma(x)]^2 - n \cdot \Sigma(x^2)}$$

n = número de leituras (5).

5.2. DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE GLICOSE NA AMOSTRA

Substituir o valor de y na equação da reta, para obter o valor da concentração de glicose.

Concentração de glicose (µg) ----- 2000 µg de amostra

Z µg de glicose ----- 100 µg de amostra

$$Z = \frac{\mu g \text{ de glicose} \cdot 100}{2000} = \% \text{ de açúcar solúvel total}$$

6. DISCUSSÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

- 6.1. Construir um gráfico, colocando na ordenada os valores da absorbância obtidos, e na abscissa o valor das concentrações de glicose.
- 6.2. Calcule os coeficientes a e b da equação da reta, através do método dos Quadrados Mínimos.
- 6.3. Calcular a porcentagem de açúcar solúvel total na amostra.

PRÁTICA 23

DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS SOLÚVEIS (AÇÚCARES SOLÚVEIS REDUTORES) EM ALIMENTOS VEGETAIS

1. INTRODUÇÃO

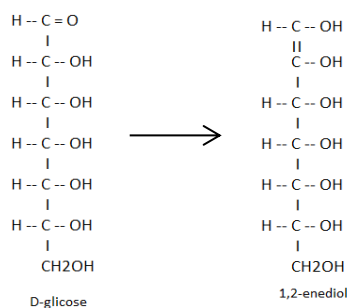
Os monossacarídeos podem ser oxidados por agentes oxidantes relativamente suaves, como os íons férrico (Fe^{3+}) e cúprico (Cu^{2+}). O carbono do grupo carbonila é oxidado a ácido carboxílico.

A glicose e outros açúcares capazes de reduzir os íons Fe^{3+} e Cu^{2+} são chamados de açúcares redutores. Esta propriedade é muito útil na análise dos açúcares.

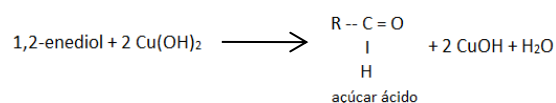
É possível dosar a concentração de um açúcar redutor pela medida da quantidade de agente oxidante que é reduzido pela solução deste mesmo açúcar.

2. MÉTODO

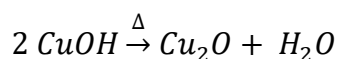
O método empregado nesta prática é o de Somogyi-Nelson. A glicose em solução encontra-se em equilíbrio nas formas aldônicas e enólicas. Em meio alcalino (do reativo de Somogyi), a solução se transforma na sua forma enólica, e o equilíbrio se desloca para a direita.



Ao mesmo tempo, o cobre do reativo de Somogyi, na forma de $\text{Cu}(\text{OH})_2$ se reduz a CuOH , com a formação de açúcar ácido:



O hidróxido cuproso, em presença de calor é convertido a óxido cuproso, de cor vermelha:



A quantidade de óxido cuproso formada é proporcional à concentração de glicose no meio. O óxido cuproso reage com o reativo de Nelson (reagente arsenomolibdico) formando óxido de molibdênio, de cor azul, cuja intensidade é proporcional à quantidade de glicose presente na amostra.

3. MATERIAL E REAGENTES

3.1. SOLUÇÃO DE REFERÊNCIA ESTOQUE DE GLICOSE (200 µG/ML):

- 1 g de ácido benzóico dissolvido em 300 ml de água destilada
- 1 g de glicose anidra
- Água destilada q. s. p. 1000 ml

3.2. SOLUÇÃO DE REFERÊNCIA DE GLICOSE

- Transferir 50 mg de ácido benzóico para balão volumétrico de 250 ml
- Acrescentar 200 ml de água destilada e 12,5 ml da solução estoque de glicose
- Agitar e completar o volume. A concentração final é de 0,05 g de glicose/ml de solução.

3.3. REATIVO CÚPRICO (SOMOGYI)

- **Reativo A:**
 - 25 g de carbonato de sódio anidro
 - 25 g de tartarato duplo de sódio e potássio
 - 20 g de bicarbonato de sódio
 - 200 g de sulfato de sódio anidro
 - Água destilada q. s. p. 1000 ml
- **REATIVO B:**
 - 15 g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$)
 - 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado
 - Água destilada q. s. p. 100 ml

- **REATIVO CÚPRICO**

- 25 ml de Reativo A
- 1 ml de Reativo B
- **Preparar na hora de usar.**

- **REATIVO ARSENO MOLÍBDICO [(NH₄)₆MO₇O₂₄ . 4 H₂O] (NELSON)**

Dissolver 25 g de molibdato de amônio em 450 ml de água destilada. Adicione 21 ml de ácido sulfúrico concentrado e misture.

Em 25 ml de água destilada, dissolver 3 g de arseniato dissódico (Na₂HAsO₄ . 7H₂O). juntar a essa solução a primeira e agitar. Manter a mistura a 56° C por 25 min. Guardar em frasco âmbar

4. PROCEDIMENTO

4.1. Extração (amostra):

- Pesar 200 mg de folhas secas e finamente moídas
- Colocar em um erlenmeyer com 50 ml de água destilada
- Levar ao banho-maria a 40° C por 30 min, com agitação casual
- Filtrar em algodão em um balão volumétrico de 100 ml
- Completar o volume e homogeneizar.

4.2. DETERMINAÇÃO:

- Marque 7 tubos de ensaio e coloque conforme a tabela abaixo:

Tubo	Sol. ref. de glicose (ml)	Água destilada (ml)	Amostra (ml)	Reativo de Somogyi (ml)
0	-	2,5	-	1,0
1	0,5	2,0	-	1,0
2	1,0	1,5	-	1,0
3	1,5	1,0	-	1,0
4	2,0	0,5	-	1,0
5	2,5	-	-	1,0
amostra	-	-	1,0	1,0

- Homogeneizar os tubos e levar ao banho-maria fervente por 20 min.
- Resfriar os tubos em água corrente
- Adicionar a cada tubo 1 ml do reativo de Nelson e 5,5 ml de água destilada

- Homogeneizar novamente os tubos
- Levar os tubos ao espectrofotômetro para leitura a 500 nm, zerando aparelho com o tubo 0. Anote os resultados.

5. CÁLCULOS

5.1. CURVA DE REFERÊNCIA

- Tabular os dados.
- Calcular a equação da reta, usando o método dos Quadrados Mínimos, montando a seguinte tabela:

Tubo	x (µg %)	y (absorbância)	x ²	y ²
1				
2				
3				
4				
5				
6				
Σ				

Observação: para esses cálculos, verificar a aula prática nº 1 – Curva de referência, lembrando que:

x = concentração de glicose (µg)

y = absorbância

Equação da reta: $y = ax + b$

$$a = \frac{\Sigma(x) \cdot \Sigma(y) - n \cdot \Sigma(xy)}{[\Sigma(x)]^2 - n \cdot \Sigma(x^2)}$$

$$b = \frac{\Sigma(x) \cdot \Sigma(xy) - n \cdot \Sigma(x^2) \cdot \Sigma(y)}{[\Sigma(x)]^2 - n \cdot \Sigma(x^2)}$$

n = número de leituras (5).

5.2. DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE GLICOSE NA AMOSTRA

Substituir o valor de y na equação da reta, para obter o valor da concentração de glicose.

Concentração de glicose (µg) ----- 2000 µg de amostra

Z µg de glicose ----- 100 µg de amostra

$$Z = \frac{\mu\text{g de glicose} \cdot 100}{2000} = \% \text{ de açúcar solúvel total}$$

6. DISCUSSÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

- 6.1.** Construir um gráfico, colocando na ordenada os valores da absorbância obtidos, e na abscissa o valor das concentrações de glicose.
- 6.2.** Calcule os coeficientes a e b da equação da reta, através do método dos Quadrados Mínimos.
- 6.3.** Calcular a porcentagem de açúcar solúvel total na amostra.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BURTIS, CA; ASHWOOD, ER. Tietz, Fundamentos de Química Clínica. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1998. 836 p.
- CARAWAY, WT. A stable starch substrate for the determination of amylase in serum and other body fluids. *Am. J. Clin. Pathol.* 32: 97-99, 1959.
- CASSIOLATO, S; ROSSI, ALR; PEDRAZZI, AHP; ZANARDO, FA. Estudo comparativo da metodologia normalmente usada na Bioquímica Clínica para a determinação da concentração de colesterol sérico. *An. Farm. Quim.* 26: 78-90, 1998.
- CELM, Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos. Reatoclin. Manual de Laboratório. São Paulo: 1992.
- CURI, P; POMPEIA, C; MIYASAKA, CK; PROCÓPIO, J. Entendendo a gordura. Os ácidos graxos. 1ª ed. São Paulo: Manole, 2002. 579 p.
- FILIP, DJ; ECKSTEIN, MD; SIBLEY, CA. Observation on diagnostic kits for the determination of plasma fibrinogen. *Am. J. Clin. Pathol.* 62: 32-39, 1974.
- FOSTER, JBT; DeNATALE, A; DOTTI, LB. Determination of plasma fibrinogen by means of centrifugation after heating. *Am. J. Clin. Pathol.* 31: 42-45, 1959.
- FRIEDWALD, WT; LEVY, R; FREDRICKSON, DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge.
- GAW, A; COWAN, RA; O'REILLY, DSTJ; STEWART, MJ; SHEPHERD, J. Bioquímica Clínica. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2001. 165 p.
- GORNALL, AG; BARDWELL, CJ; DAVID, MM. Determination of serum protein by Biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177: 751-756, 1949.
- GUIMARÃES, RX; GUERRA, CCC. Clínica e laboratório. 4ª ed. São Paulo: Sarvier, 1990. 717 p.
- HUANG, TC; CHEN, CP; NEFFLER, V; RAFIERY, P. A stable reagent for the Liebermann Buchard reaction. Application to rapid serum cholesterol determination. *An. Chem* 33: 1405-1407, 1963.
- LOPES-VIRELLA, MF; STONE, P; ELLIS, S; COLWEL, JA. Cholesterol determination in high-density lipoproteins separated by three different methods. *Clin. Chem* 23: 882-884, 1977.
- MARCONDES, M; SUSTOVICH, DR; RAMOS, OL. Clínica médica, propedêutica e fisiopatologia. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1979.
- MEDEIROS, AS. Semiologia do exame sumário de urina. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1985. 125 p.

- MILLER, O. Laboratório para o clínico. 7ª ed. São Paulo: Atheneu, 1993. 593 p.
- MOURA, RA. Técnicas de Laboratório. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 1982.
- MURRAY, RK; GRANNER, DK; MAYES, PA; RODWELL, VW. Harper: Bioquímica. 7ª ed. São Paulo: Atheneu, 1994. 763 p.
- NELSON, DL; COX, MM. Lehninger: Princípios de Bioquímica. 3ª ed. São Paulo: Saraiva, 2002. 975 p.

PARÂMETROS NORMAIS PARA O RATO (*Rattus norvegicus*)

Parâmetro	Quantidades
Ingestão diária de água	20 – 45 ml/dia
Urina	10 – 25 ml/dia
Ingestão de ração	10 – 20 g/dia
Hb%	11 – 17 (14,2) g/100 ml
Volume de sangue	50 – 65 ml/kg
Glicose	50 – 135 (75) mg/dl
Colesterol	28 – 76 mg/dl
Proteína total	4,7 – 8,2 (7,6) g/dl
Albumina	2,7 – 5,1 g/dl
SGOT (AST)	46 – 81 IU/l
SGPT (ALT)	18 – 30 (24) IU/l
Sódio	140 – 156 (147) mEq/l
Potássio	5,4 – 7,0 (11,5) mEq/l
Cálcio	5 – 14 (11,5) mg/dl
Magnésio	1,6 – 4,4 (2,9) mg/dl

Referência: Manual de normas técnicas – Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA). Instituto de Biociências/UNESP – “Campus de Botucatu”.