

APLICAÇÕES DE ESTUDOS BIOQUÍMICOS QUANTITATIVOS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

Marcus Vinícius Paiva de Oliveira¹

¹: Bacharel e Licenciado em Biologia; Mestre em Biologia – área de concentração Biologia Celular e Molecular; docente do curso de Ciências Biológicas da Faculdade Araguaia – Goiânia – GO. mvpogen@gmail.com

RESUMO

A colorimetria e a espectrofotometria podem ser conceituadas como um procedimento analítico através do qual se determina as concentrações de espécimes químicas mediante a absorção de luz. Uma solução quando iluminada por luz branca, apresenta uma cor que é resultante da absorção relativa dos vários comprimentos de onda que a compõem. Esta absorção, em cada comprimento de onda, depende da natureza da substância, de sua concentração e da espessura da mesma que é atravessada pela luz. A espectrofotometria é amplamente utilizada nas análises bioquímicas para a determinação de biomoléculas das quais permitem chegar a um resultado analítico científico ou a um diagnóstico. Neste contexto, o presente artigo trata-se de uma revisão bibliográfica sobre a aplicação desta técnica quantitativa nas análises bioquímicas.

Palavras-chave: biomoléculas, espectrofotometria, pesquisa, saúde.

INTRODUÇÃO

Os conhecimentos adquiridos com estudos bioquímicos aliados aos conhecimentos das áreas exatas como a química e a física permitiram o desenvolvimento de inúmeras técnicas e metodologias analíticas que se difundiram a todos os laboratórios, sendo eles de pesquisas ou clínicos. Segundo Cisternas *et al.* (2005, p.5), o emprego de técnicas físico-químicas serve tanto à química quanto à biologia e tem permitido reduzir a maioria dos fenômenos celulares a termos moleculares. Assim, pode-se dizer que qualquer evento descrito macroscopicamente, descrito pela anatomia e fisiologia, existe uma razão microscópica, ao nível celular, que por sua vez relaciona-se intimamente com os mecanismos moleculares. Por sua vez, muitos desses mecanismos foram descritos graças a pesquisas que fizeram o uso de metodologias laboratoriais.

Estas idéias valem tanto para o normal como para o anormal, ou seja, as patologias, que a muito foram descritas macro e microscopicamente têm sempre, como causas, alterações do funcionamento celular e seu mecanismo metabólico. Então, por meio do uso de técnicas físico-químicas, as análises clínicas foram

beneficiadas enormemente com os métodos quantitativos de análises que utilizam, por exemplo, a espectrofotometria (CISTERNAS, *et al.* 2005).

Por exemplo, por meio da espectrofotometria aplicada às análises clínicas e por outras tecnologias, diretrizes da área médica foram sendo estabelecidas e delineadas para a condução de um diagnóstico mais consistente e assertivo, possibilitando assim um encaminhamento terapêutico eficaz. Segundo Cerri *et al.*, (2004, p.2), responsáveis pelo Projeto Diretrizes da Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina, tais condutas possuem o intuito de auxiliar nas decisões médicas e, conseqüentemente, otimizar o cuidado aos pacientes.

O presente estudo tem por objetivo discorrer a respeito dos fundamentos da técnica de espectrofotometria e sua aplicação nas análises clínicas. Adicionalmente, o mesmo apresenta e discute metodologias analíticas padrão, seus princípios e interpretações em patológicas que acometem o ser humano.

1. Fundamentos da Espectrofotometria

Segundo Motta (2009, p.15), a fotometria e a espectrofotometria estudam a medição das grandezas relativas à emissão, à recepção e à absorção da luz. Em bioquímica clínica, tais medições são essenciais para a compreensão de disfunções metabólicas desencadeadas por alguma patologia. Ainda de acordo o autor, as medições são analisadas quantitativamente baseadas na absorção de luz por soluções, como por exemplo, urina, plasma ou soro.

Os fotocolorímetros e espectrofotômetros são os instrumentos que efetuam as medições. Aliadas a esses instrumentos, estão às reações de identificação e caracterização de biomoléculas como carboidratos, proteínas, lipídios, colesterol entre outras, que no passado foram elucidadas e desenvolvidas por químicos e bioquímicos (HIRANTO *et al.*, 2001, p.25). Neste contexto, a indústria farmacêutica construiu kits comerciais de análises que possibilitam chegar a resultados quantitativos com certa rapidez e segurança. Hoje, estão disponíveis no mercado inúmeros kits para diagnósticos de diversas patologias, das mais diferentes marcas, que se baseiam nos princípios da espectrofotometria e bioquímica.

O princípio da espectrofotometria baseia-se na absorção da luz por moléculas dispersas em uma solução. As radiações eletromagnéticas, que compõem a luz, com comprimento (λ). de onda entre 380 e 750 nm são visíveis ao olho humano, constituindo numa pequena parcela do espectro eletromagnético. A zona do

espectro cujas radiações possuem um comprimento de onda abaixo de 380 nm é denominada ultravioleta (UV), já aquelas que possuem comprimento de onda acima de 750 nm correspondem à zona infravermelha (MOTTA, 2009, p.16)

A luz branca, quando passa por um prisma, é decomposta em raios de luz com distintos comprimentos de onda, que são projetados em faixas que vão do vermelho ao violeta, sendo então chamado de espectro de emissão. Assim, cada espectro luminoso possui um intervalo de comprimento de onda em nanômetros (tabela 01).

Tabela 01. Intervalos de comprimento de onda no espectro eletromagnético

Cores	Intervalos de λ (nm)
Ultravioleta (não visível)	< 380
Violeta	380 - 450
Azul	450 – 500
Verde	500 – 570
Amarela	570 – 590
Alaranjada	590 – 620
Vermelha	620 – 750
Infravermelha	750 a 2.000

Segundo princípios da Física, um objeto ou substância absorve toda a luz incidente exceto a do intervalo de comprimento de onda observado pela visão. Assim, uma solução de cor azul apresenta esta cor pelo fato de ter absorvido as demais cores que constituem o espectro luminoso terem sido absorvidas. Assim, a cor de uma solução é complementar à luz absorvida (MOTTA, 2009, p.16).

Dependendo a natureza da solução que será examinada, obtêm-se os espectros de absorção da luz, de modo que a imagem espectral pode servir para a identificação e quantificação de uma determinada substância.

1.1. Leis da Espectrofotometria

Segundo Cisternas *et al.* (2005, p.7), quando um raio de energia radiante atravessa uma solução colorida, a energia incidente (I_0) será sempre mais intensa que a energia emergente (I). Isso quer dizer que parte da energia radiante foi absorvida pela solução. Outro motivo para esta atenuação pode ser atribuída ao

material que constitui o recipiente que se deposita a solução teste chamado de cubeta.

Para Motta (2009, p.16), o quociente I / I_0 é denominado Transmitância (T). Se I_0 for igual a 100%, a intensidade de luz emergente poderá ser medida matematicamente como porcentagem de transmitância (%T) expressa pela equação: $\%T = T \times 100$. Mede-se a intensidade de luz absorvida por uma solução corada pela redução da medida da intensidade de luz transmitida, a isso dá-se o nome de Absorbância (A). Assim, a absorbância é igual à quantidade de luz absorvida e transmitância a fração total de luz transmitida. Desse modo, A e T são grandezas inversamente relacionadas. A absorção de luz trata-se de uma função logarítmica, assim, a relação básica entre A e T é expressa pela equação: $A = -\log\%T/100$. Desenvolvendo esta equação matematicamente tem-se: $A = -(\log \%T - \log 100)$; $A = -(\log\%T + 2)$; $A = -\log\%T + 2$; $A = 2 - \log\%T$

Os cientistas Bouger e em seguida Lambert investigaram a relação entre a diminuição da intensidade de luz e a espessura do meio absorvente. Ao incidir-se um raio de luz sobre diversas camadas opticamente homogêneas e de espessuras conhecidas, observa-se uma proporção direta entre a espessura das camadas e o logaritmo da transmissão: $-\log T = b \times k$, onde b é a espessura da camada e k uma constante. Ou seja, a transmissão da luz decresce logaritmicamente com o aumento linear da espessura da camada (MOTTA, 2009, p.17).

Tem-se, então, uma relação direta entre absorbância e a espessura da camada. Quanto maior a espessura da camada (b), maior a absorbância. Então, de acordo com a Lei de Bouguer-Lambert, pode-se expressar a equação: $A = b \times k$.

Outra lei rege os princípios da espectrofotometria é a Lei de Lambert-Beer, a qual afirma que a concentração de uma substância é diretamente proporcional à quantidade de luz absorvida ou inversamente proporcional à quantidade de luz absorvida ou inversamente proporcional ao logaritmo da luz transmitida. A relação matemática radiante, a concentração de uma solução e o percurso da luz na solução é mostrada pela lei de Beer: $A = abc$, onde A é a Absorbância; a, a absorvidade; b, o percurso da luz em solução em cm; e c, a concentração da substância de interesse (NEPOMUCENO e RUGGIERO, 2004, p.99).

Quando c é expresso em mol por litro e b em cm, o símbolo ϵ , chamado absorvidade molar (a fração de um comprimento de onda específico de luz

absorvida por um dado tipo de molécula sob condições específicas de pH e temperatura), é usado em lugar de a (NEPOMUCENO e RUGGIERO, 2004).

Na prática laboratorial, a aplicação quantitativa da lei de Beer é realizada pelo emprego de espectrofotômetros, onde são lidas as absorvâncias de uma solução-teste de uma solução padrão de concentração conhecida, após submetida a reações apropriadas, e é aplicada a seguinte relação:

$$\frac{\text{Concentração do padrão}}{\text{Absorbância do padrão}} = \frac{\text{concentração do teste}}{\text{Absorbância do teste}}$$

$$\frac{\text{Concentração do padrão}}{\text{Absorbância do padrão}} = \frac{\text{concentração do teste}}{\text{Absorbância do teste}}$$

Então, a concentração do teste é calculada:

$$\text{Concentração do teste} = \frac{\text{Concentração do padrão} \times \text{Abs. do teste}}{\text{Absorbância do teste}}$$

Deve-se perceber que neste cálculo, considera-se que a espessura das cubetas que contêm as soluções lidas é constante. Esta relação só é aplicada quando a reação colorimétrica segue a lei de Beer e tanto o desconhecido como o padrão são lidos na mesma célula.

1.2. Medidas da Transmitância e da Absorbância:

A transmitância e a absorbância das soluções coloridas são medidas por meio de instrumentos chamados de fotômetros. Estes instrumentos empregam como fonte luminosa uma lâmpada incandescente produtora de luz branca. Potencialmente, pode-se empregar qualquer comprimento de onda da região visível. Para a resolução da luz em determinado comprimento de onda desejado, são utilizados monocromadores que consistem de filtros interferentes ou de absorção, prismas ou retículos de difração (espectrofotômetros) (PETKOWICZ, *et al.*, 2007, p.93).

A luz atravessa uma solução colorida presente em uma cubeta; parte é absorvida, que depende da intensidade da cor da solução. A luz transmitida, detectada por uma fotocélula, tem intensidade menor que a luz incidente. A fotocélula converte a energia elétrica, emitindo um sinal que pode ser lido na escala de um galvanômetro, em percentagem de transmitância ou em absorvância.

A determinação da absorbância ou transmitância de uma solução torna indispensável o conhecimento da intensidade de da luz incidente e emergente. São várias as dificuldades de ordem técnica para a medida absoluta da luz incidente. Considera-se então, por aproximação, a luz incidente igual em intensidade àquela

emergente de uma cubeta do fotômetro contendo somente o solvente, aqui chamado de branco (PETKOWICZ, *et al.*, 2007, p.93).

Desse modo, são superadas as dificuldades da determinação direta da luz incidente, assim, como ficam eliminadas a absorção e a dispersão de luz introduzida pelas paredes das cubetas, pelo solvente e algumas impurezas.

Portanto, para proceder à medida da absorbância, introduz-se uma cubeta na câmara de leitura contendo o solvente (branco) e ajusta-se o aparelho para que a absorbância seja zero, ou 100% de transmitância. Substitui-se o branco pela cubeta contendo a solução teste ou padrão e lê-se a absorbância da mesma.

1.3. Curva de Calibração:

Para diminuir a possibilidade de erro por tomar uma única concentração da solução padrão, é recomendado adotar a construção da curva de calibração ou também chamada de curva padrão, da qual é feita em gráfico (REMIÃO *et al.*, 2003).

Neste contexto, prepara-se uma série de soluções com concentrações conhecidas e de forma crescente de uma determinada substância a ser dosada por dado método e mede-se as respectivas densidades óticas (D.O.) ao fim do processo (HIRANO *et al.*, 2001, p.37).

Anotam-se no eixo da abcissa as concentrações e no eixo da ordenada as respectivas D.O. obtidas. Deve-se preparar um tubo contendo todos os reativos exceto a substância a ser dosada, sendo então chamada de branco. Nesta solução a concentração então é zero. As D.O. do branco deverão ser descontadas das demais para se obter, unicamente, as D.O. da substância nas várias concentrações. Uma alternativa é, quando possível, regular o fotômetro de modo que a D.O. do branco coincida com o valor zero (REMIÃO, *et al.*, 2003, p. 99).

Quando uma substância segue a lei de Beer, a curva padrão pode ser construída com um pequeno número de pontos, como, por exemplo, utilizar apenas 5 concentrações conhecidas. No entanto, quando uma substância não segue tal lei, a curva deve ter 10 (dez) ou mais pontos.

Segundo Hirano *et al.*, (2001, p.37) no caso de substância que seguem a lei de Beer, os eventuais erros podem ainda ser reduzidos pela correção da curva padrão, calculando-se o fator da reta (F) que resulta da divisão do somatório das concentrações (C) pelo somatório das D.O., conforme a fórmula: $F = \Sigma Cq / \Sigma D.O.$

Ainda, segundo Remião *et al.*, (2003, p.99), os procedimentos fotométricos devem ser realizados em regiões do espectro em que as diferenças de concentração ocasionem as maiores diferenças possíveis nas respectivas D.O. Para isso, é necessário preparar duas soluções da substância a ser analisada de modo que uma seja o dobro da concentração da outra e determinar a transmitância com diversos filtros de um fotocolorímetro ou em diversos comprimentos de onda (λ) de um espectrofotômetro, para estas duas soluções. Assim, registra-se num gráfico T contra λ e escolhe-se a melhor região. Em outras palavras, determina-se o espectro de absorção da substância a ser analisada, em duas concentrações conhecidas.

1.4. Espectrofotômetro:

O espectrofotômetro é um instrumento compacto e de fácil operação. Ele pode ser aplicado em medição de transmitância, absorbância e leitura direta de concentração de material transparente. São amplamente empregados no campo da higiene e medicina, exames clínicos, bioquímica, engenharia química de combustíveis, monitoramento e inspeção do meio ambiente, controle de qualidade para análises qualitativas e quantitativas em relação a amostras (HIRANO, *et al.*, 2001, p.37).

Os espectros podem ser obtidos com aparelhos do tipo esquematizado na figura 01, cujos componentes principais são:

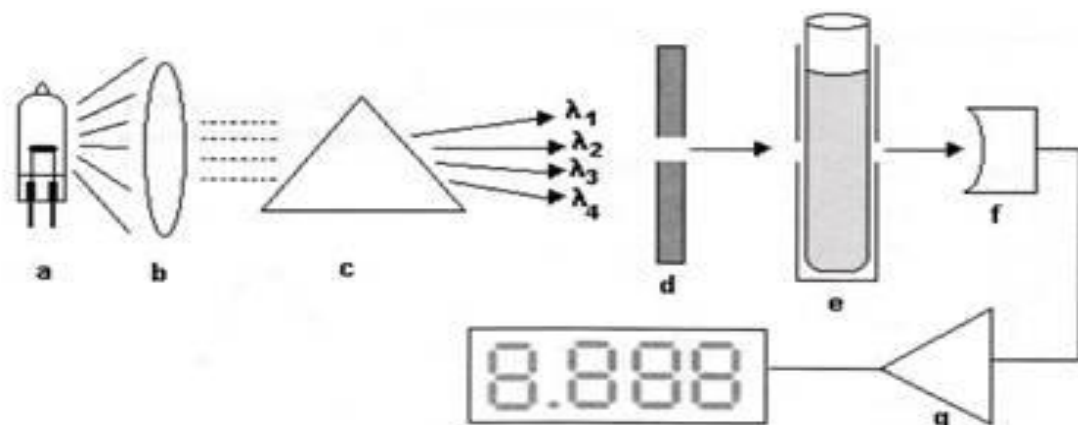


Figura 01. Esquema óptico dos principais componentes do espectrofotômetro. As letras representam: (a) fonte de luz, (b) colimador, (c) prisma ou rede de difração, (d) fenda seletora de λ , (e) compartimento de amostras com cubeta contendo solução, (f) célula fotelétrica, (g) amplificador. Fonte HIRANO *et al.*, 2001)

- a) Fonte de luz policromática** depende do comprimento de onda desejado. Podem ser de lâmpada de tungstênio (luz branca) e para visível de hidrogênio (ultravioleta).
- b) Colimador** que reflete um feixe de raios paralelos sobre o monocromador.

- c) **Monocromador** que pode ser um prisma ou uma grade de difração para dispersar a luz.
- d) **Fenda** que deixa passar um feixe monocromático cujo comprimento de onda depende da posição do prisma.
- e) **Luz incidente** é o feixe monocromático que passou pela fenda.
- f) **Célula fotoelétrica** que é um detector sensível à radiação luminosa.
- g) **Amplificador** que recebe e amplifica o sinal detectado.

2. Reações Colorimétricas e suas correlações

Com alguma frequência é necessário quantificar substâncias em misturas complexas, ou que não absorvem significativamente a luz a nenhum comprimento de onda, assim, utiliza-se os chamados métodos colorimétricos. Neles uma determinada substância entra em contato com um reagente específico produzindo então uma cor, cuja intensidade, é diretamente proporcional à concentração da substância na mistura original (GORDON, 1995, p.324).

Neste contexto, ao longo das pesquisas na área da Bioquímica, várias reações foram desenvolvidas das quais detectam, especificamente, a presença de biomoléculas em soluções desenvolvendo cores variadas. Assim, tais reações puderam ser utilizadas para a determinação qualitativa e quantitativa de biomoléculas em diversas amostras, sendo então aplicadas às análises clínicas para diagnósticos de diabetes, lipidemias, colesterolemias, proteinúrias e produtos nitrogenados como ácido úrico, uréia e amônia, enzimas como amilase, lipase, fosfatase alcalina, fosfatase ácida, aminotransferases, lactato desidrogenas entre outras, além de íons como cálcio, sódio e potássio.

2.1. Determinação de glicose pelo método da O-toluidina

Nesse método a glicose reage com a o-toluidina (orto-toluil) em meio ácido e a quente, resultando glicosamina e base de Schiff correspondentes. Esta reação desenvolve cor azul que é proporcional à quantidade de glicose até 200 mg/dL presente na amostra que pode ser soro, plasma, urina ou liquor. Os valores normais do soro ou plasma é de 75 a 110mg/dL, sangue total de 80 a 120 mg/dL e urina zero (ausente) e a leitura espectrofotométrica é feita entre 600 a 650 nm. (CISTERNAS *et al.*, 2005, p. 13).

A dosagem de glicose é amplamente utilizada na determinação da glicemia. Esta dosagem torna-se extremamente importante no diagnóstico de doenças como a diabetes mellitus (tipo 1 e tipo 2), diabetes mellitus gestacional, diabetes tipo MODY (do inglês, *Maturity onset diabetes of the young*) (SBEM, 2004, p.3).

Para o diagnóstico do diabetes, devem ser seguidos métodos e critérios específicos dos quais irão determinar glicemia casual, glicemia de jejum, glicemia pós-prandial, glicosúria entre outros sinais clínicos.

2.2. Determinação de Lipídios Totais

Os lipídios totais incluem os triacilgliceróis, colesterol e seus ésteres, ácidos graxos não esterificados, fosfolipídeos, hormônios esteroidais e vitaminas lipossolúveis (CHAMPE *et al.*, 2006, p. 171). O material que é utilizado é o soro do qual é aquecido em banho-maria fervente em presença de ácido sulfúrico concentrado. O reativo de fosfo-vanilina reage com uma fração de solução sulfúrica, para formar um composto de coloração rósea, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de lipídios totais da amostra, sendo os valores normais de referência de 20 a 30 anos de idade de 400 a 700 mg/dL e acima dos 30 até 900 mg/dL e a leitura espectrofotométrica deve ser feita entre 500 a 550 nm. (CISTERNAS *et al.*, 2005, p.15).

2.3. Determinação de Colesterol Total

O método de Huang e colaboradores modificado tem como o princípio a precipitação de proteínas pelo anidro acético, retirando a água de solvatação das mesmas e, ao mesmo tempo, contribuindo para a formação de um complexo. Com a adição de ácido sulfúrico, o mesmo dissolve o precipitado, pois baixa o pH além do pI (ponto isoelétrico) das proteínas. Pela desidratação que ocorre no nível insaturado do núcleo do colesterol, forma-se um derivado sulfônico de coloração verde, cuja intensidade é diretamente proporcional à concentração de colesterol existente na amostra (MOTTA, 2000, p.261).

2.4. Determinação de Proteínas Totais pelo Método do Biureto

A reação do biureto é característica para identificação de proteínas, sendo positiva quando há no mínimo 3 ligações peptídicas (NEPOMUCENO e RUGGIERO,

2004, p.99). O biureto é formado pelo aquecimento da uréia a 180°C, havendo a liberação de uma molécula de amônia. Soluções fortemente alcalinas de biureto, em presença de sulfato de cobre diluído, desenvolvendo uma coloração violeta. A coloração desenvolvida deve-se à formação de um complexo entre o íon cúprico (Cu^{++}) e 4 átomos de nitrogênio. As proteínas dão positiva a reação pela existência das várias ligações peptídicas, formando-se o complexo entre duas cadeias adjacentes (HIRANO *et al.*, 2001, p.81).

O complexo formado entre o íon cúprico e as múltiplas ligações peptídicas das proteínas apresenta um ponto máximo de absorbância em 545nm (filtro verde do equipamento) (CISTERNAS *et al.*, 2005, p. 16).

2.5. Determinação de Albumina Sérica pelo Método do Verde de Bromocresol

A albumina é uma proteína plasmática que tem função de transportar diversas biomoléculas, como por exemplo, cálcio, hormônios entre outras (RHOADES E TANNER, 2005, p. 601). Segundo Cisterinas *et al.*, (2005, p.16), a albumina possui a propriedade de se ligar a certos corantes, os quais mudam de cor ligados a ela, em meio tamponado. O verde de bromocresol, em pH 4.2, apresenta cor amarela e quando combinado à albumina adquire coloração verde, cuja intensidade é diretamente proporcional à concentração de albumina existente na amostra. Os valores normais são de 3,8 a 5,1 g/dL e a leitura espectrofotométrica é feita entre 600 a 650 nm.

2.6. Determinação de Creatinina pelo método de Jaffé

A creatinina é produzida a partir da creatina no músculo. A creatina, por sua vez, é sintetizada no fígado, rim e pâncreas e é transportada para as células musculares e cérebro, onde é fosforilada a creatina-fosfato que atua como reservatório de energia (GARCIA E KANAAN, 2008, p.37) Tanto a creatina-fosfato como a creatina, em condições fisiológicas, espontaneamente perdem o ácido fosfórico ou água, respectivamente, para formar seu anidro, a creatinina. A creatinina difunde do músculo para o plasma de onde é removida, quase exclusivamente, pela filtração glomerular e excretada na urina. Em presença de teores marcadamente elevados de creatinina no plasma, parte da mesma é também excretada pelos túbulos renais. A quantidade de creatinina excretada diariamente é uma função da massa muscular e não é afetada pela dieta pela dieta, idade ou

exercício e corresponde a 2% das reservas corpóreas da creatina-fosfato. A mulher excreta menos creatinina do que o homem devido a menor massa muscular (MOTTA, 2000, p. 125).

A creatinina reage com o ácido pícrico em meio alcalino (pH 12,4, reação de Jaffé) produzindo o picrato de creatinina, tautômero de cor vermelha, proporcional à concentração de creatinina existente na amostra. A leitura espectrofotométrica é feita entre 450 a 510 nm.

2.7. Determinação de Uréia

A uréia constitui 45% do nitrogênio não-protéico no sangue. É sintetizada no fígado a partir do dióxido de carbono e amônia, sendo esta proveniente da desaminação dos aminoácidos, em todos os tecidos, como produto final do catabolismo protéico (MOTTA, 2000, p. 119). Após sua síntese hepática, a uréia é transportada pelo plasma até os rins, onde é rapidamente filtrada pelos glomérulos, é excretada na urina, embora mais de 40% seja reabsorvida por difusão passiva durante a passagem do filtrado pelos túbulos. O nível no plasma é notadamente afetado pela função renal, pelo conteúdo protéico da dieta e pelo teor de proteólise.

O fundamento da determinação da uréia basea-se na hidrólise ácida da diacetilmonoxima à diacetil, a qual reage diretamente com a uréia na presença de tiosemicarbazida (que intensifica a cor) e íons de cádmio (que estabiliza a cor). Assim, forma um derivado diazídico de coloração rósea, cuja intensidade é diretamente proporcional à concentração de uréia presente na amostra. Os valores normais para soro ou plasma de 15 a 40 mg/dL e na urina até 50mg/dL (LABTEST, 1999, p.2).

2.8. Determinação de Ácido Úrico

No homem o ácido úrico é o principal produto do catabolismo das purinas, bases nitrogenadas adenina e guanossina, sendo formado principalmente no fígado, a partir da xantina pela ação da enzima xantina oxidase (GARCIA E KANAAN, 2008, p. 165).

O teor de urato encontrado no plasma, que está ao redor de 6m/dL, representa o equilíbrio entre a produção (700 mg/dia) e a excreção pela urina (500 mg/dia) e fezes (200 mg/dia). O ácido úrico é transportado pelo plasma até os rins, onde é filtrado pelos glomérulos. Quase todo o ácido úrico é reabsorvido pelos

túbulos proximais e pequenas quantidades são secretadas pelos túbulos distais e excretadas na urina. Os triglicerídeos, os corpos cetônicos e o lactato competem com o urato na excreção renal. Parte do urato é excretado pelo trato gastrointestinal e degradado pelas enzimas bacterianas (MOTTA, 2009, p. 258).

É pequena a contribuição dos ácidos nucleicos da dieta nos níveis de ácido úrico circulante, pois aqueles são degradados no intestino pela xantina oxidase da mucosa e somente, em quantidades mínimas, são absorvidos e canalizados para os processos metabólicos intracelulares (CHAMPE, *et al.*, 2006, p. 297).

O fundamento da determinação de ácido úrico baseia-se na oxidação do ácido à alantoína e dióxido de carbono pela ação do ácido fosfotúngstico em meio alcalino. Ao mesmo tempo, o ácido fosfotúngstico é reduzido a azul de tungstênio, produzindo uma coloração cuja intensidade é diretamente proporcional à concentração do ácido úrico presente na amostra. A leitura espectrofotométrica de 680 a 730 nm e os valores normais para o homem é 2,5 a 7 mg/dL de soro ou plasma e para a mulher é 1,5 a 6 mg/dL (MOTTA, 2009, p. 258).

2.9. Determinação de Amônia

A amônia é produzida pela desaminação oxidativa dos aminoácidos provenientes do catabolismo protéico. Entretanto, a maior parte a amônia é absorvida do trato gastrointestinal, onde é formada pela degradação bacteriana das proteínas da dieta e desdobramento da uréia presente nas secreções intestinais. Embora a amônia, em baixas concentrações, seja um metabólito normal no sangue, em teores elevados torna-se neurotóxica. A maior parte da mesma é detoxificada pelas células hepáticas em uréia, e nesta forma, excretada. Parte da amônia é incorporada, temporariamente, à glutamina, que nos rins sofre ação da glutaminase, sendo então excretada também na urina (RHOADES E TANNE, 2005, p. 508)

Segundo Motta (2009, p. 218), em enfermidades hepáticas severas, a amônia não é removida da circulação e os níveis sanguíneos se elevam. Diferentemente de outras substâncias nitrogenadas não protéicas, os teores plasmáticos da amônia não dependem do funcionamento dos rins, mas da função hepática, assim, não servindo de parâmetro para a função renal.

O método enzimático é um dos vários métodos que permite determinar a concentração de amônia no plasma. Este método emprega a enzima glutamato desidrogenase na reação da amônia com o alfa-cetoglutarato, na presença de

NADPH. Sob condições apropriadas, a redução da absorvância em 340 nm é proporcional à concentração da amônia. Em adultos normais, o nitrogênio amoniacal varia de 35 a 120 µg/dL ou 43 a 146 µg/dL de amônia (MOTTA, 2000, p. 139).

2.10. Determinação da Amilase

A amilase é uma enzima da classe das hidrolases que catalisa o desdobramento do amido e glicogênio ingeridos na dieta. A amilase sérica é secretada, fundamentalmente, pelas glândulas salivares e pancreáticas. A medida desta enzima no soro e urina é empregada no diagnóstico de pancreatite aguda (CHAMPE *et al.*, 2006 p. 86).

Existem aproximadamente 200 métodos de análise de atividade da amilase sérica, sempre derivados da mistura de uma amostra do soro com um polissacarídeo com condições controladas de pH (entre 6,9 e 7,0) e na presença de íons cálcio e cloreto. No Brasil, a técnica mais utilizada é a iodométrica, que monitora o desaparecimento do amido após certo tempo de hidrólise, através da reação deste com o iodo. A absorvância medida após o período de reação em 660 nm é inversamente proporcional à atividade da amilase da amostra. a dificuldade de estabilização do reagente do amido é a principal desvantagem deste método. Suas principais vantagens são o baixo custo, a facilidade de obtenção de substratos, a simplicidade e rapidez da técnica e sua boa sensibilidade (MILLER, 1991, p. 80).

O fundamento do método para determinação da amilase pancreática sérica (Caraway modificado) baseia-se na adição do reativo de cor, no caso o iodo a dois tubos, sendo o padrão, contendo amido e o outro sendo o teste, também contendo amido, mas com a adição de amilase. A extensão da hidrólise do substrato do amido pela amilase, no teste, nas condições padrão de 37°C, é medida pela perda da cor azul no teste após a adição do reativo de cor, comparado com o padrão, na qual a hidrólise enzimática não ocorre. Os valores de referência no soro vão de 60 a 160 unidades/Dl. Já na urina são excretados de 40 a 260 unidades/hora ou até 2.000 unidades/ 24 horas (MILLER, 1991, p.80).

2.11. Determinação da Fosfatase Alcalina

A fosfatase alcalina pertence a um grupo de enzimas relativamente inespecíficas, que catalisam a hidrólise do grupo fosfato terminal de vários fosfomonoésteres em pH alcalino, portanto, é capaz de reagir com diferentes substratos. O pH ótimo da reação *in vitro* está ao redor de 10, mas depende da

natureza e concentração do substrato empregado (GARCIA E KANAAN, 2008, p. 98).

O significado clínico dos níveis da fosfatase alcalina sérica é importante para a investigação das desordens hepatobiliares e ósseas. Nas enfermidades hepatobiliares, as elevações são encontradas, predominantemente, na obstrução extra-hepática, visto em cálculo ou câncer de cabeça de pâncreas (MOTTA, 2000, p. 160).

O método de Bowers e McComb é o método mais utilizado para determinar as concentrações séricas de fosfatase alcalina. O princípio consiste na hidrólise do 4-nitrofenilfosfato (incolor) a íon 4-nitrofenóxido (amarelo) e fosfato. A reação é acompanhada por monitoramento contínuo do aumento na absorbância em 404 nm. Os valores de referência para adultos vão de 20 a 105 U/L, crianças de 0 a 3 meses vão de 60 a 150 U/L e jovens de 10 a 15 anos de 60 a 260 U/L (GARCIA E KANAAN, 2008, p. 98).

2.12. Determinação da Fosfatase Ácida

Segundo Garcia & Kanaan (2008, p. 30), a fosfatase ácida designa um grupo de fosfatases que exibem atividade máxima ao redor do pH 5 e catalisam a hidrólise de monoéster ortofosfórico, produzindo um álcool e um grupo fosfato. A atividade da fosfatase ácida é encontrada na próstata, ossos, fígado, baço, rins, eritrócitos e plaquetas. Em homens adultos normais, a próstata contribui com quase a metade da enzima presente no soro.

Os níveis de fosfatase ácida no soro apresentam grande importância clínica no diagnóstico e monitoramento do câncer prostático. Os métodos empregados nesta determinação devem diferenciar os aumentos provenientes da fosfatase prostática da fosfatase não-prostática. Para isso são utilizados vários inibidores químicos como, por exemplo, o tartarato e formaldeído, substratos específicos como timolftaleína monofosfato, alfa-naftil fosfato e técnicas imunológicas (MOTTA, 2000, p. 167).

A determinação da atividade da fosfatase ácida no soro tem como principal finalidade o diagnóstico e o monitoramento do câncer prostático, particularmente, da forma metastisada.

Vários métodos foram desenvolvidos para avaliar a atividade de fosfatase ácida. No método de Roy, Brower e Hauden modificado, a timolftaleína monofosfato

é um substrato auto-indicador com alto grau de especificidade para a fosfatase ácida prostática. A timolftaleína liberada após a ação da fosfatase, desenvolve cor em meio alcalino. Fosfatases ácidas provenientes de outros tecidos, reagem em grau bem menor com este substrato.

O princípio da reação baseia-se na hidrólise da timolftaleína pela fosfatase ácida à timolftaleína e fosfato em pH 5,4 a 37°C. Os produtos são incolores em pH ácido, entretanto, a timolftaleína atua como cromogênio autoindicador quando a reação é interrompida pela adição de solução alcalina de carbonato de sódio-hidróxido de sódio. A timolftaleína liberada desenvolve cor medida em 595 nm e os valores de referência variam entre 0,5 e 1,9 U/L (MOTTA, 2000, p. 167).

2.13. Determinação de Aminotransferases

As enzimas aspartato aminotransferase (AST), transaminase glutâmica-oxalacética (GOT) e alanina aminotransferase (ALT) e transaminase glutâmica-pirúvica (GPT) catalisam a transferência reversível dos grupos amino de um aminoácido para o alfa-cetoglutarato, formando cetoácido e ácido glutâmico. Estas enzimas exercem papéis centrais tanto para a síntese como para a degradação de aminoácidos. Além disso, como estas reações envolvem a interconversão dos aminoácidos a piruvato ou ácidos dicarboxílicos, atuam como uma ponte entre o metabolismo dos aminoácidos e carboidratos (MOTTA, 2009, p. 100).

Estas enzimas estão amplamente distribuídas nos tecidos humanos. As atividades mais elevadas de AST (GOT) encontram-se no tecido cardíaco, fígado, músculo esquelético, com pequenas quantidades encontradas nos rins, pâncreas, baço e eritrócitos. Especificamente, a ALT (GPT) apresenta-se em elevados níveis no fígado (MOTTA, 2009, p. 101).

As desordens hepatocelulares aguda apresentam um aumento significativo na atividade das aminotransferases (AST e ALT). Na hepatite virótica, os níveis podem atingir até 100 vezes os limites superiores dos valores de referência, apesar de valores entre 20 e 50 vezes estes limites, serem mais frequentemente encontrados. Na cirrose hepática são detectados níveis até 5 vezes os limites superiores de referência, dependendo das condições do progresso cirrótico. Aumentos semelhantes são encontrados também no carcinoma de hepático, após ingestão de álcool, durante o delirium tremens e após administração de certas drogas, tais como, opiatos, salicilatos ou ampicilina (MOTTA, 2000, p. 171).

No infarto do miocárdio, ao redor de 6 a 8 horas do ocorrido, a atividade sérica da AST (GOT) começa a elevar-se, atingindo o máximo entre 18 e 24 horas, diminuindo depois, progressivamente, retornando aos valores de referência ao redor do 5º dia.

Elevações da AST (GOT) e, ocasionalmente, da ALT (GPT), são encontradas nas desordens do músculo esquelético, como a distrofia muscular progressiva e na dermatomiosite (aumentos de 4 a 8 vezes). Na insuficiência cardíaca congestiva, os níveis de AST podem, também, estar aumentados, provalvemente, refletindo o envolvimento hepático devido ao suprimento sanguíneo inadequado deste órgão. A AST (GOT) apresenta pequenos aumentos na embolia pulmonar, pancreatite aguda, gangrena, esmagamento muscular e enfermidade hemolítica (MOTTA, 2009, p. 101).

Existem dois métodos básicos para a determinação das aminotransferases: o método baseado no princípio proposto por Karmen e pelo método proposto por Reitman e Frankel. No primeiro, o soro é incubado com excesso de alfa-cetoglutarato que se transforma em oxaloacetato ou piruvato pela ação da AST (GOT) ou ALT (GTP), respectivamente. Os cetoácidos formados são medidos indiretamente por reação de redução catalisada por desidrogenases específicas e monitorada pela modificação da absorvância a 340 nm dos níveis de NADH. A diminuição da absorvância é proporcional à conversão dos cetoácidos nos correspondentes hidroxíácidos. Estes métodos necessitam o emprego de espectrofotômetro de boa qualidade com exatidão no comprimento de onda e boa resolução a 340 nm (MOTTA, 2000, p. 171).

Já no método colorimétrico de Reitman e Frankel os produtos formados pela ação das aminotransferases (oxalato e piruvato) são medidos pela reação com a 2,4-dinitrofenilhidrazina para produzir dinitrofenil-hidrazonas. Estes compostos desenvolvem cor marrom em solução alcalina. Entretanto, a dinitrofenilhidrazina pode formar hidrazona também com o ácido alfa-cetoglutarato provocando assim, uma interferência. Mesmo assim, este método é relativamente simples apresentando bons resultados com exatidão aceitáveis além de empregar aparelhagem comum a todos os laboratórios. A leitura espectrofotométrica é feita em 340 nm e os valores de referências para adultos normais para AST (GOT) vai de 8 a 40 unidade/mL e ALT (GPT) de 5 a 35 unidades/mL (MOTTA, 2000, p. 171).

2.14. Determinação da Lactato Desidrogenase

A lactato desidrogenase (LD) catalisa a conversão reversível do lactato a piruvato, em reações de oxidorredução na presença da coenzima NAD⁺ que atua como doador ou aceptor de hidrogênio. A LD está presente no citoplasma de todas as células do organismo, onde as atividades mais elevadas são encontradas no coração, fígado, músculo esquelético, rim e eritrócitos. (MARZZOCO E TORRES, 1999, p. 126).

Devido à ampla distribuição em numerosos tecidos do organismo, a LD está aumentada em várias condições patológicas, tais como cardíacas, hepáticas, renais, hematológicas e outras doenças. Aproximadamente, 8 a 12 horas após o infarto do miocárdio, os níveis séricos de LD começam a elevar-se, atingindo o pico máximo entre 24-48 horas e estes valores permanecem aumentados por 7 a 12 dias (GARCIA E KANAAN, 2008, p. 37).

Desordens hepáticas como hepatite virótica, cirrose e icterícia obstrutiva mostram elevações de duas a 3 vezes os limites superiores dos valores de referência. As anemias hemolíticas agudas e crônicas apresentam aumentos acentuados da LD. Esta elevação é devida a altas concentrações da enzima nos eritrócitos. Desordens no músculo esquelético e algumas leucemias contribuem para o aumento da atividade sérica de LD (MOTTA, 2009, p. 105).

O método de Kieding é o método amplamente utilizado que consiste na redução do piruvato à lactato em pH 7,4 a 37°C na presença da enzima. A oxidação do NADH a NAD⁺ é monitorada continuamente pelo decréscimo da absorvância em 340 nm e os valores de referência em adultos normais varia entre 200 e 380 U/L (GARCIA E KANAAN, 2008, p. 37).

2.15. Determinação da Glutamiltransferase

A enzima gama-glutamiltransferase (GGT) é encontrada, predominantemente, no fígado, rim, próstata e pâncreas. Catalisa a transferência do grupo gama-glutamil de peptídeos e outros compostos para outros peptídeos, aminoácidos e água. A função fisiológica específica da GGT não está claramente estabelecida, a membrana das células é sua principal localização e, provavelmente, atua no transporte de aminoácidos e peptídeos para as células, na síntese protéica e na regulação dos níveis de glutatona tecidual (SALAWAY, 2009, p. 84).

No fígado, a GGT está localizada nos canalículos das células hepáticas e, particularmente, nas células epiteliais que revestem os ductos biliares. Deste modo, a atividade desta enzima está elevada em todas as formas de desordens hepatobiliares. Os maiores aumentos (5-30 vezes os limites superiores dos valores de referência) são observados nos casos de obstrução biliar intra ou pós-hepática. A GGT é mais sensível do que a fosfatase alcalina na detecção de icterícia obstrutiva, colangite e colecistite. A GGT também é importante para a avaliação do envolvimento hepatobiliar em adolescentes. Elevados níveis estão também presentes no câncer prostático e moderados aumentos em hepatite infecciosa e em pacientes com fígado gorduroso (SALAWAY, 2009, p. 84).

Os métodos usuais empregam a L-gama-glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida como substrato-doador mantendo a glicilglicina comoceptor. Este substrato-doador é rapidamente solúvel em água e não é detectada a hidrólise e espontânea do mesmo. O método consiste pela ação da enzima GGT, o resíduo gama-glutamil do substrato gama-glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida é transferido para a glicilglicina. A absorvância do produto de hidrólise, o ácido 2-nitro-5-aminobenzóico, é medida em 410 nm e os valores de referência são para o homem 5 a 25 U/L e mulheres 8 a 40 U/L (MOTTA, 2009, p. 105).

2.16. Determinação de Creatina Quinase

A enzima creatina quinase (CK) catalisa a fosforilação reversível da creatina pela adenosina trifosfato (ATP) com a formação de creatina fosfato. A CK está associada com a geração de ATP nos sistemas contráteis ou de transporte. A função fisiológica predominante desta enzima ocorre nas células musculares, onde está envolvida no armazenamento de creatina fosfato. Cada ciclo de contração muscular, promove o consumo de ATP, com formação de ADP, a enzima CK catalisa a transformação de ADP em ATP, a partir da creatina fosfato. A CK está amplamente distribuída nos tecidos, com atividades mais elevadas no músculo esquelético, cérebro e tecido cardíaco. Quantidades menores são encontradas na tireóide, placenta, bexiga, trato gastrointestinal, útero, rim, pulmão, próstata, baço, fígado e pâncreas (CHAMPE, *et al.*, 2006, p. 285).

Como a principal localização da creatina quinase é o músculo esquelético e cardíaco, os níveis séricos estão frequentemente elevados nas lesões destes tecidos. De fato, a atividade da CK sérica é um indicador sensível no infarto do

miocárdio e distrofia muscular, particularmente a de Duchenne. Nesta última, os teores atingem 50 a 100 vezes os limites superiores dos valores de referência. Apesar a CK total apresentar grande utilidade nestas desordens, não é uma avaliação inteiramente específica já que as elevações são encontradas em outras anormalidades do músculo cardíaco e esquelético. Atividades aumentadas de CK são também encontradas, ocasionalmente, nas desordens do sistema nervoso central (SNC), como no acidente vascular cerebral (AVC), degeneração nervosa e choque do SNC. A liberação da enzima para a circulação periférica, ocorre por lesão da barreira hematoencefálica. Outras condições patofisiológicas também elevam os níveis de CK, tais como, o hipotireoidismo, hiperpirexia maligna e síndrome de Reye (MOTTA, 2000, p. 188).

A determinação da atividade da creatina quinase emprega os produtos formados na reação direta (creatina fosfato + ADP) ou inversa (creatina + ATP) tanto o ATP como o ADP são facilmente medidos por reações específicas. Os métodos mais utilizados empregam a reação inversa, que em condições ótimas se desenvolve 6 vezes mais rapidamente que a reação direta. Oliver descreveu uma sequência de reações onde a transformação de creatina fosfato em creatina e ATP, catalisada pela creatina quinase, é acoplada ao sistema hexoquinase/glicose-6-fosfato desidrogenase/NADH. A variação da absorvância em 340 nm é medida na avaliação de CK. Rosalki incluiu um tiol ao reagente para aumentar a atividade da CK mantendo os grupos sulfidrílicos na forma reduzida. A modificação proposta por Szasz é sensível e apresenta boa precisão e está livre da interferência exercida pela adenilado quinase. Entretanto, estes métodos utilizam reagentes complexos, o que obriga a maioria dos laboratório a comprar os reagentes prontos em lugar de prepará-los (MOTTA, 2009, p. 107).

O princípio da reação consiste na transformação da creatina fosfato em creatina para a produção de ATP pela CK que é acoplada ao sistema hexoquinase/glicose-6-fosfato desidrogenase/NADH. A adição de N-acetilcisteína evita a oxidação dos grupos sulfidrílica da CK. O EDTA é incluído no reagente para ligar o cálcio e aumenta a estabilidade da reação. A diadenosina pentafofato e o AMP são adicionados para inibir a adenilato quinase. A diferença de absorvância em 340 nm é proporcional à atividade da CK e os valores de referência à 37°C varia nos homens 15 a 160 U/L e nas mulheres 15 a 130 U/L (LABTEST, 2004, p.4)

2.17. Determinação do Cálcio

Aproximadamente, 99% de cálcio do organismo está localizado no esqueleto. O restante desempenha numerosas e significativas funções como a participação na transmissão do impulso nervoso, no mecanismo da coagulação, na modulação da ação de vários hormônios, nas atividades de vários sistemas enzimáticos, na contração muscular etc (MOLINA, 2007, p. 95).

A determinação das concentrações de cálcio é importante para o diagnóstico de distúrbios relacionados como a hipercalcemia e hipocalcemia. A hipercalcemia é causada por hiperparatireoidismo, imobilizações de caráter agudo, doenças neoplásicas, intoxicações por vitamina D, sarcoidose, síndrome leite-álcalis, hipertireoidismo e insuficiência supra-renal aguda, tirotoxicose, acromegalia, diuréticos tiazídicos e fase diurética de necrose tubular aguda.

A hipocalcemia deve ser examinada em relação a concentração de proteínas plasmáticas e pH sanguíneo antes de avaliar sua importância. O cálcio total está reduzido nos casos de hipoalbuminemia e acidoses crônicas, devido a uma diminuição do cálcio ligado a proteínas. Nestes casos a fração ionizada do cálcio permanece normal.

As causas comuns de hipocalcemia verdadeira incluem a hipoavitaminose D, hipoparatiroidismo, pseudo-hipoparatiroidismo, hiperfosfatemia, desordens neoplásicas, tetania neonatal, pancreatite aguda, deficiência de magnésio, acidose tubular renal excesso de corticoesteróides e terapia prolongada com anticonvulsivantes (MOLINA, 2007, p. 95).

O método de espectrofotometria de absorção atômica é o método de escolha por ser seguro, preciso e sensível, no entanto, os equipamentos são pouco acessíveis aos laboratórios. O princípio da reação baseia-se na formação de um complexo de cor púrpura entre o cálcio e a o-cresolftaleína complexona, em meio alcalino (pH 11,7) de tampão dietanolamina. O reagente contém 8-hidroquinolina que reduz a interferência de cátions, como o magnésio, a uréia para diminuir a turvação das amostras lipêidicas e aumentar a formação do complexo metal-corante. O etanol inibe o desenvolvimento de cor no branco. Após a medida de cor, a adição de excesso de EDTA (um quelador de cálcio) corrige a hemólise. Esse tratamento dissocia o complexo cálcio-cromogênio sem modificar o complexo hemoglobina-cromogênio. A absorbância devida ao complexo hemoglobina-cromogênio é subtraída da absorvância total. A leitura é feita em 578 nm e os

valores de referências para os adultos normais está entre 8,8 a 10,2 mg/dL, já recém-nascidos de 7 a 12 mg/dL e criança de 8,8 a 11 mg/dL (GARCIA E KANAAN, 2008, p. 71).

2.18. Determinação do Fósforo

O organismo de um adulto contém 500 a 600g de fósforo medido como fosfato inorgânico. É um ânion importante tanto intra como extracelularmente. No líquido extracelular e em pH fisiológico, a maior parte do fósforo existe nas formas inorgânicas monovalentes (diidrogenofosfato) e divalentes (hidrogenofosfato). Nas células, predomina o fosfato orgânico, onde é encontrado como componente dos ácidos nucleicos, fosfolípidios e fosfoproteínas, além de participar do metabolismo intermediário. Extracelularmente, o fosfato está intimamente associado ao cálcio. Juntos formam cristais de hidroxapatita presentes nos ossos. Ocasionalmente, cristais de fosfato de cálcio precipitam em outras áreas do corpo. Níveis de cálcio anormalmente elevados muitas vezes provocam a formação de cálculos nos rins ou bexiga. (GARCIA E KANAAN, 2008, p. 71).

A determinação do fosfato é importante para o diagnóstico de hiperfosfatemia e hipofosfatemia. A primeira é encontrada no hipoparatiroidismo, hipervitaminose D, fraturas ósseas em consolidação, obstrução pilórica, doença de Addison, tratamento citotóxico de certas leucemias e linfomas, tumores ósseos metastáticos e cetoacidose diabética. Já a hipofosfatemia está presente nas deficiências de vitamina D, como por exemplo, raquitismo, osteomalácia e esteatorrea, hiperparatiroidismo, síndrome de Fanconi, hiperinsulinismo, uso crônico de antiácidos, alcoolismo crônico, síndromes de má-absorção e, ocasionalmente, hiperalimentação. O princípio da reação baseia-se no método de Goldenber e Fernandes do qual o soro é desproteínizado com ácido tricloroacético contendo íon ferroso e tiouréia. Então, o sobrenadante é misturado com o ácido molíbdico para formar o fosfomolibdato que é reduzido pelo íon ferroso produzindo o azul de molibdênio. A leitura é feita em 660 nm e os valores de referência para adultos varia de 2,7 a 4,5 mg/dL, recém-nascidos de 3,5 a 8,6 mg/dL e crianças de 4,5 a 5,5 mg/dL (GARCIA E KANAAN, 2008, p. 71).

2.19. Determinação de Magnésio

Trata-se do segundo cátion mais abundante na célula. Mais da metade do magnésio no organismo está associado ao cálcio e fósforo, no esqueleto. O restante é encontrado no músculo esquelético e cardíaco, rim, fígado e líquido intersticial. Tem importante papel como co-fator em vários sistemas enzimáticos, no metabolismo de carboidratos, contração muscular e coagulação. É essencial, também, na manutenção da estrutura macromolecular do RNA, DNA e ribossomos (RHOADES E TANNER, 2005, p. 620).

A determinação do magnésio é importante para o diagnóstico de hipomagnesemia, do qual apresenta sintomas similares aos provocados pela redução de cálcio, tais como a irritabilidade neuromuscular severa, tetania, convulsões e alterações eletrocardiográficas. As concentrações de magnésio sérico estão diminuídas nos seguintes casos: desordens associadas com ingestão inadequada e/ou impedimento na má-nutrição calórica protéica, desordens associadas com o aumento das necessidades de magnésio e reposição inadequada (prolongada ou severa perda de líquidos, lactação excessiva), distúrbios relacionados com o impedimento renal da conservação do magnésio (hipercalcemia de qualquer causa, hiperaldosterismo, acidose diabética, hipertireoidismo, terapia diurética, secreção inapropriada do hormônio antidiurético) (MOTTA, 2009, p. 154).

A hipermagnesemia sintomática ocorre mais frequentemente em pacientes com insuficiência renal. Nas outras condições, as manifestações clínicas estão, em geral, ausentes. As causas são insuficiência renal aguda ou crônica, diabetes mellitus não controlada, insuficiência adrenocortical, adrenalectomia, hipotireoidismo e ingestão excessiva de magnésio. O método de escolha para a determinação do magnésio é a espectrofotometria de absorção atômica. Outro método é a reação do magnésio com o azul de metiltimol formando complexos coloridos medidos em 510 e 600 nm. O método de Abernethy e Fowler consiste na determinação do magnésio no plasma com a reação com calmagite contendo um detergente anfotérico chamado Empigen BB e tamponado com 2-amino-2-metil-1-propanol a pH 11,5. A presença do cálcio e ferro é minimizada pelo estrôncio tamponado pelo EDTA e pela trietanolamina, respectivamente. A leitura é feita em 520 nm e os valores de referência para crianças, adolescentes e adultos varia de 0,7 a 1,1 mmols/L e recém-nascidos de 0,6 a 1,0 mmols/L (MOTTA, 2009, p. 154).

2.20. Determinação de Ferro Sérico

Segundo Motta (2009, p. 1999), adultos normais contêm 3 a 5 g de ferro, dos quais 70% estão incorporados na hemoglobina eritrocitária, 25% no sistema retículoendotelial (fígado, baço e medula óssea), armazenado na hemossiderina e na ferritina. A mioglobina, os citocromos e certas enzimas, constituem 4,9% do ferro restante. A concentração plasmática de ferro corresponde a 0,1% do total.

A determinação do ferro sérico e da capacidade total de ligação do ferro é necessária no estabelecimento do diagnóstico diferencial de várias enfermidades. A redução dos níveis de ferro é provocada pela deficiência de ferro total no organismo, pela perda aumentada de ferro ou ainda, pela elevação na demanda de ferro dos estoques do corpo (por exemplo, gravidez). Teores aumentados são encontrados na ingestão terapêutica, incremento na absorção de ferro (hemocromatose e hemossiderose), anemia hemolítica (destruição anormal de hemácias), envenenamento pelo chumbo (redução na utilização de ferro), anemia perniciosa (defeito no armazenamento do ferro) e hepatite (redução dos estoques de ferro no fígado) (GARCIA E KANAAN, 2008, p. 59).

Valores elevados da capacidade total de ligação ao ferro estão associados com as deficiências crônicas de ferro, necrose hepática e aumento na liberação da ferritina sérica. Os níveis baixos são associados à cirrose, hemocromatose, deficiência de ferritina e nefrose ou proteinúria (perda de proteínas pelos rins).

Para a determinação do ferro sérico, amostras de soro ou plasma heparinizado isentos de hemólise. Um método utilizado para esta determinação é o de Lewis modificado do qual tem o princípio da dissociação da transferrina, reduzindo a estado férrico e as proteínas séricas precipitadas com um reagente contendo ácido clorídrico, ácido tioglicólico e ácido tricloroacético. Então, o íon ferroso é complexado com o cromogênio contendo batofenantrolina em acetato de sódio. O complexo ferro-cromogênio é quantificado espectrofotometricamente em 535nm. Os valores de referência para o ferro sérico é de 70 a 180 µg/dL para homens, de 60 a 180 µg/dL para mulheres, de 95 a 225µg/dL recém nascidos (após um mês de idade, os valores estão próximos aos dos adultos) (GARCIA E KANAAN, 2008, p. 59).

2.21. Determinação de Bilirrubina

A degradação do grupo hemo provém, em 80 a 85% das hemácias envelhecidas, destruídas, após quatro meses, no sistema reticulendotelial, e, em 15 a 20%, de hemoproteínas hepáticas assim como de hemácias em maturação na

medula óssea. A oxidação do hemo leva à síntese de biliverdina e depois da bilirrubina. (KAMOON *et al.*, 2006, p. 330).

A bilirrubina é transportada para o fígado, onde sofre uma conjugação com glicuronato, tornando-a solúvel. Sua eliminação é feita normalmente pelas vias biliares. No intestino, a bilirrubina sofre, por influência das bactérias intestinais, uma série de transformações que levam aos pigmentos biliares (STRYER, *et al.*, 2008, p. 708).

O conjugado de bilirrubina é pouco absorvido pela mucosa intestinal. No íleo terminal e intestino grosso, o diglicuronídeo de bilirrubina é hidrolizado para formar bilirrubina livre e ácido glicurônico. Esta bilirrubina livre é então reduzida pela ação de enzimas provenientes da flora bacteriana intestinal, a tetrapirróis lineares incolores, denominados coletivamente de urobilinogênios. Cerca de 20% dos urobilinogênios produzidos diariamente são absorvidos e entram na circulação enterohepática. A maior parte do composto reabsorvido é captado pelo fígado e reexcretado na urina. Na porção baixa do trato gastrointestinal, os urobilinogênios oxidam espontaneamente para produzir os pigmentos biliares estercobilina, mesobilina e urobilina, pigmentos marrom alaranjados responsáveis pela cor característica das fezes (GARCIA E KANAAN, 2008, p. 96).

São formados diariamente 250 a 300 mg de bilirrubina no adulto normal. A excreção deste composto pelo fígado necessita que a bilirrubina esteja na forma glicuronídeo, solúvel em água. Conforme mencionado, quase toda a bilirrubina formada é eliminada nas fezes e uma pequena quantidade de urobilinogênio é removido pela urina. Sob condições normais, somente 0,2 a 1,0 mg/dL é encontrado no plasma, a maior parte da qual, na forma não conjugada. Uma pequena percentagem (0,2 mg/dL existe no soro normal na forma conjugada) (MOTTA, 2009, p. 213).

A presença de hiperbilirrubinemia promove a deposição deste pigmento amarelo na pele, nas membranas mucosas e nas escleróticas. Esta pigmentação é denominada icterícia (KAMOON *et al.*, 2006, p. 331).

Vários estados fisiopatológicos afetam uma ou mais fases envolvidas na produção, captação, armazenamento, conjugação e excreção da bilirrubina. Dependendo da desordem, a bilirrubina conjugada e/ou não conjugada, são responsáveis pela hiperbilirrubinemia resultantes destes distúrbios, como por exemplo, anemia hemolítica, síndrome de Gilbert, síndrome de Dubin-Johnson,

síndrome de Rotor e síndrome de Crigler-Najjar, entre outras (MOTTA, 2009, p. 213).

A bilirrubina foi detectada pela primeira vez em 1883 por Ehrlich, em reação com o ácido sulfanílico diazotado, em amostras de urina. Van den Bergh e Snapper demonstraram a presença de bilirrubina no soro sanguíneo pelo emprego do diazoto-reagente de Ehrlich e álcool como acelerador. Malloy e Evelyn propuseram o uso de metanol a 50% para evitar a precipitação das proteínas. Em 1938, Jendrassik e Grof desenvolveram um método com uso de cafeína-benzoato-acetato para acelerar a reação azo acoplada. Na maioria dos laboratórios clínicos são empregadas algumas modificações de destes dois métodos. O método de Jendrassik e Grof é um pouco mais complexa mas apresenta algumas vantagens sobre o de Malloy e Evelyn (MOTTA, 2000, p. 280).

A análise da bilirrubina sérica também é realizada por técnica de espectrofotometria, pela diluição da amostra com uma solução tampão. Este método direto é satisfatório na avaliação de icterícia do recém-nascido cujo soro não contém ainda, lipocromos amarelos interferentes. A introdução da enzima bilirrubina oxidase estão sendo amplamente utilizados. Esta enzima promove a oxidação da bilirrubina incolor. A reação é monitorada pela redução na absorbância.

Para a determinação da bilirrubina total, pelo método de Jendrassik e Grof, o soro é misturado com uma solução de cafeína levemente ácida e benzoato de sódio, compostos que aceleram a diazotação da bilirrubina não conjugada. O ácido sulfanílico diazoto desdobra as duas formas de bilirrubina e desenvolve um azo com os dipirróis. A adição de tartarato alcalino de sódio em pH 13 converte a azobilirrubina cuja absorbância é média a 600 nm (MOTTA, 2000, p. 281).

Para a bilirrubina conjugada, o soro é misturado com o reagente diazo, em ausência de catalisadores, para reagir com a bilirrubina conjugada. Após cinco minutos, o ácido ascórbico é adicionado para decompor o excesso de sal diazo e interromper a reação. O reagente tartarato alcalino produz um meio alcalino para formar uma cor mais intensa de azobilirrubina, medida a 600 nm em presença de cafeína. Os valores de referência de bilirrubina total em adultos vão de 0,2 a 1,1 mg/dL, a conjugada de 0 a 0,2 mg/dL. Já para recém-nascidos a bilirrubina total para 0 a 24 horas 1 a 6 mg/dL, 24 a 48 horas de 6 a 8 mg/dL, de 3 a 5 dias de 4 a 6 mg/dL (MOTTA, 2000, p. 281).

A bilirrubina também pode ser determinada pelo método de White, Haidar e Reinhold. Neste a bilirrubina total no soro de recém-nascidos é determinada diretamente pela medida da absorbância a 455 nm. Este teste não pode ser realizado com soro de adultos que contém carotenos e outros pigmentos e, por conseguinte, aumentam a absorbância neste comprimento de onda. Estes pigmentos não estão presentes no soro dos recém-nascidos, mas a hemólise produz falsas elevações na concentração da bilirrubina devido a absorção de parte da luz em 455 nm pela oxiemoglobina. A concentração da hemoglobina é corrigida por uma segunda leitura a 575 nm (MOTTA, 2000, p. 281).

CONCLUSÃO

A espectrofotometria é considerada qualquer procedimento que utiliza a luz para medir a concentração química de qualquer espécie. Trata-se de método de análise óptico mais usado nas investigações biológicas e físico-químicas.

Esta técnica tornou-se fundamental para a determinação de diagnósticos laboratoriais. Neste contexto, inúmeras doenças puderam ser diagnosticadas pelo uso de técnicas colorimétricas específicas, possibilitando também compreender melhor a fisiopatologia dessas enfermidades. A rotina laboratorial de espectrofotometria possibilitou o desenvolvimento e o aprimoramento de métodos de determinação de biomoléculas, o que levou as indústrias químicas e farmacêuticas à elaboração de kits comerciais variados de boa especificidade e sensibilidade.

A escolha dos métodos de análises deve ser feita de acordo com o material biológico analisado, bem como, a estabilidade de moléculas que serão quantificadas. Adicionalmente, deve-se levar em consideração também se o método é exigem equipamentos mais sofisticados ou reagentes de alto custo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

CERRI, G.G., JATENE, F.B.; NOBRE, M.R.; CUCE, BERNARDO, W.M. **Introdução**. Projeto Diretrizes. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. Disponível em http://www.projetodiretrizes.org.br/projeto_diretrizes/texto_introdutorio.pdf Acesso em 20 de abril de 2011.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A.; FERRIER, D.R. **Bioquímica Ilustrada**. 3ª edição. Porto Alegre: ArtMed, 2006.

CISTERNAS, J.R.; VARGAS, J.; MONTE, O. **Fundamentos de Bioquímica Experimental**. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

GARCIA, M.A.T.; KANAAN, S. **Bioquímica Clínica**. São Paulo: Editora Atheneu, Universidade Federal Fluminense, 2008.

GORDON, D.B. **Spectroscopic Techniques**. *in* Principles and Techniques in Practical Biochemistry. K. Cambridge: Cambridge University Press, 1996.

HIRANO, Z.M.B.; SILVA FILHO, H.H.; MULLER, G.C.K.; SCHMIDT, S.R. **Bioquímica – manual prático**. Blumenau: EDIFURB, 2001.

LABTEST Diagnóstica. **Creatinina – instruções de uso**. Minas Gerais, 2004.

LABTEST Diagnóstica. **Uréia CE – instruções de uso**. Minas Gerais, 1999.

MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. **Bioquímica Básica**. 2ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

MILLER, O. **Laboratório para o Clínico**. 7ª edição. São Paulo: Atheneu, 1991.

MOLINA, P.E. **Fisiologia Endócrina**. 2ª edição. São Paulo: McGraw Hill, 2007.

MOTTA, V.T. **Bioquímica Clínica – métodos e interpretações**. 2ª edição. Rio de Janeiro: Editora Médica Missau, 2000.

MOTTA, V.T. **Bioquímica Clínica para Laboratório – princípios e interpretações**. 5ª edição. Rio de Janeiro: MedBook, 2009.

NEPOMUCENO, M.F.; RUGGIERO, A.C. **Manual de Bioquímica – roteiros de análises bioquímicas quantitativas e qualitativas**. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004.

PETKOWICZ, C.L. **Bioquímica: aulas práticas**. 7ª edição. Curitiba: Editora UFPR, 2007.

REMIÃO, J.O.R.; SIQUEIRA, A.J.S.; AZEVEDO, A.M.P. **Bioquímica – guia de aulas práticas**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003.

RHOADES, R.A.; TANNER, G.A. **Fisiologia Médica**. 2ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

SALAWAY, J.G. **Metabolismo – passo a passo**. 3ª edição. São Paulo: Artmed, 2009.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA. **Diabetes Mellitus: classificação e diagnóstico**. Projeto Diretrizes. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. Disponível em: <http://www.projetodiretrizes.org.br/4_volume/06-Diabetes-c.pdf> Acesso em 20 de abril de 2011.

STRYER, L., BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L. **Bioquímica**. 6ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.