



# Práticas de Bioquímica Metabólica

Daniel Aparecido Marassatti  
Renato Massaharu Hassunuma  
Patrícia Carvalho Garcia  
Sandra Heloísa Nunes Messias

canal6 editora

# Práticas de Bioquímica Metabólica

**Daniel Aparecido Marassatti**

Aluno de Graduação do Curso de Biomedicina da Universidade Paulista – UNIP, campus Bauru

**Renato Massaharu Hassunuma**

Professor Titular da Universidade Paulista - UNIP, campus Bauru

**Patrícia Carvalho Garcia**

Coordenadora do Curso de Biomedicina da Universidade Paulista - UNIP, campus Bauru

**Sandra Heloísa Nunes Messias**

Coordenadora Geral do Curso de Biomedicina da Universidade Paulista – UNIP

1ª. Edição / 2021

Bauru, SP

canal6 editora

© Renato Massaharu Hassunuma.

**Conselho Editorial:**

BIÓLOGA TATIANE ANDREA LIONETE

*Especialista em Formação de Educadores em Diabetes pela Universidade Paulista - UNIP.*

PROF.<sup>A</sup> DR.<sup>A</sup> MICHELE JANEGITZ ACORCI VALÉRIO

*Professora Titular do Curso de Biomedicina da Universidade Paulista (UNIP), campus Bauru*

**Capa e Design:**

Renato Massaharu Hassunuma

**Crédito da figura da capa:**

Fonte: The free high-resolution photo of hand, glove, tube, blue, arm, research, human body, blood, laboratory, hospital, lab, medical, medic, diagnosis, the doctor, the test, diagnostics, diagnostician, human action, taken with an NIKON D80 04/03 2017. The picture taken with 48.0mm, f/5.6s, 1/25s, ISO 200. [acesso 2021 mai 29]. Disponível em: <https://pxhere.com/en/photo/1341945>. Imagem registrada como domínio público.

CIP – Brasil. Catalogação na Publicação

---

M3117p

Práticas de Bioquímica Metabólica / Daniel  
Aparecido Marassatti, Renato Massaharu  
Hassunuma, Patrícia Carvalho Garcia, Sandra  
Heloísa Nunes Messias. – Bauru. Canal 6, 2021.

77 f. : il. color

ISBN: 978-65-86030-70-9

1. Bioquímica. 2. Metabolismo. 3. Testes  
laboratoriais. I. Marassatti, Daniel Aparecido, II.  
Hassunuma, Renato Massaharu. III. Garcia,  
Patrícia Carvalho. IV. Messias, Sandra Heloísa  
Nunes. V. Título

---

CDU: 612.015

# Agradecimentos

Nossos sinceros agradecimentos a **Prof. Aziz Kalaf Filho**, Diretor da Universidade Paulista - UNIP, campus Bauru e **Prof. Dr. Paschoal Laércio Armonia**, Diretor do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Paulista - UNIP, pelo apoio fornecido ao **Curso de Biomedicina da Universidade Paulista - UNIP, campus Bauru** no desenvolvimento de eventos, publicações e projetos de extensão.

Agradecemos as valiosas contribuições na revisão deste material realizadas pela **Biol.<sup>a</sup> Tatiane Andrea Lionete** e a **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Michele Janegitz Acorci-Valério**.

Agradecemos a colaboração da Auxiliar Técnica de Laboratório **Nilceneia Adriana de Souza Gonzales** pelo apoio no desenvolvimento deste livro.

*Daniel Aparecido Marassatti*  
*Prof. Dr. Renato Massaharu Hassunuma*  
*Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patrícia Carvalho Garcia*  
*Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sandra Heloísa Nunes Messias*

# Apresentação

Este livro foi desenvolvido com o objetivo de apresentar algumas atividades práticas relacionadas à Disciplina de Bioquímica Metabólica. Na **Parte 1: Teste Enzimático pelo Método do Ponto Final**, apresentamos como são realizados testes enzimáticos pelo método do ponto final, onde a medição da absorbância da amostra é realizada quando a reação está terminada. A figura 1 pertence ao livro **Práticas de Bioquímica: material de laboratório**, publicado pela Canal 6 Editora, e foi reproduzida com a permissão dos autores. As figuras 2 a 6, 7b, 8a, 9 a 11, 15 a 34 pertencem ao livro **Práticas de Bioquímica: material de laboratório**, publicado pela Canal 6 Editora, também reproduzidos com a permissão dos autores.

Na **Parte 2: Atividades de Testes Enzimáticos pelo Método do Ponto Final**, propomos atividades práticas baseadas na leitura de bulas de kits enzimáticos, para o aluno se familiarizar com este tipo de leitura.

Na **Parte 3: Teste Bioquímico com Fitas de Urinálise**, apresentamos uma sequência de fotos que mostram como são realizados testes bioquímicos de urina com a utilização de fitas descartáveis.

*Daniel Aparecido Marassatti*  
*Prof. Dr. Renato Massaharu Hassunuma*  
*Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patrícia Carvalho Garcia*  
*Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sandra Heloísa Nunes Messias*

# Sumário

<b>Parte 1: Teste Enzimático pelo Método do Ponto Final</b> .....	<b>9</b>
1. Finalidade .....	10
2. Princípio .....	11
3. Cálculo das soluções .....	13
4. Identificação dos tubos de ensaio .....	14
5. Identificação das partes de uma micropipeta .....	15
6. Escolha da micropipeta .....	16
7. Ajuste volumétrico da micropipeta .....	17
8. Inserção da ponteira da micropipeta .....	18
9. Técnica da pipetagem direta ou por esgotamento total .....	19
9.1. Pipetagem da solução branco .....	19
9.2. Pipetagem da solução padrão .....	26
9.3. Pipetagem da solução teste .....	27
10. Incubação das soluções em banho-maria .....	28
11. Transferência das soluções para cubetas .....	29
12. Identificação das partes do espectrofotômetro .....	30
13. Ligando o espectrofotômetro .....	31
14. Seleção da lâmpada do espectrofotômetro .....	35
15. Ajuste do comprimento de onda do espectrofotômetro .....	36
16. Abertura da tampa do espectrofotômetro .....	37

17. Posicionamento das cubetas no carrinho móvel .....	38
18. Fechamento da tampa do espectrofotômetro .....	39
19. Posicionamento do carrinho móvel .....	40
20. Calibração do espectrofotômetro .....	41
21. Reposicionamento do carrinho móvel .....	44
22. Medição da absorbância da solução padrão .....	45
23. Reposicionamento do carrinho móvel .....	46
24. Medição da absorbância da solução teste .....	47
25. Lavagem das cubetas .....	48
26. Secagem das cubetas .....	49
27. Cálculos .....	50
<b>Parte 2: Atividades de Testes Enzimáticos pelo Método do Ponto Final .....</b>	<b>51</b>
1. Teste enzimático para glicose .....	53
2. Teste enzimático para colesterol total .....	54
3. Teste enzimático para triglicérides .....	55
4. Teste enzimático para proteínas totais .....	56
5. Teste enzimático para albumina .....	57
6. Teste enzimático para ácido úrico .....	58
7. Teste enzimático para bilirrubina .....	59
8. Teste enzimático para ferro sérico .....	61
9. Teste enzimático para cálcio .....	63

<b>Parte 3: Teste Bioquímico com Fitas de Urinálise .....</b>	<b>64</b>
1. Finalidade .....	65
2. Material .....	66
3. Coleta de amostra de urina .....	67
4. Pipetagem da amostra .....	68
5. Utilização da fita de urinálise .....	69
6. Análise da fita urinálise .....	70
<b>Referências e Sugestões de Leitura .....</b>	<b>71</b>
Referências .....	72
Sugestões de leitura .....	74



# Práticas de Bioquímica Metabólica

Parte 1: Teste Enzimático pelo Método do Ponto Final

# 1. Finalidade

Existem diferentes testes utilizados para avaliar a concentração da glicose em diferentes fluidos corporais como, por exemplo, sangue, líquido, líquidos ascítico, pleural e sinovial<sup>1-4</sup>.

Nesta atividade, será descrito como é realizado o teste laboratorial pelo método enzimático de ponto final. Vale ressaltar que existem vários kits disponíveis no mercado<sup>1-9</sup> e que a bula sempre deve ser consultada.

Este tipo de teste é usado na investigação de evidências de diferentes condições associadas a casos de hipoglicemia ou hiperglicemia<sup>1,2</sup>. Observe o Quadro 1.

Quadro 1 - Condições associadas à hipoglicemia e hiperglicemia

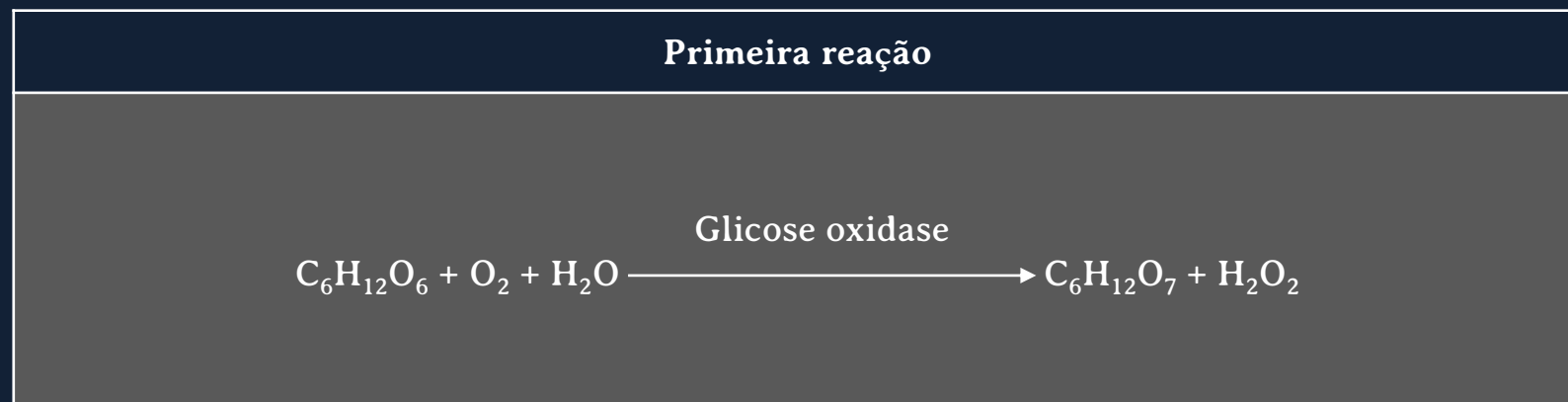
Hipoglicemia	Hiperglicemia
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Hipoglicemia de jejum:               <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Hiperinsulinismo endógeno em caso de insulinoma e sulfonilureia</li> <li>▪ Hiperinsulinismo exógeno (factício)</li> <li>▪ Tumores extrapancreáticos</li> <li>▪ Síndrome autoimune</li> <li>▪ Insuficiência suprarrenal</li> <li>▪ Insuficiência hipofisária</li> <li>▪ Doença hepática grave</li> <li>▪ Alcoolismo</li> </ul> </li> <li>▪ Hipoglicemia pós-prandial:               <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Hipoglicemia alimentar</li> <li>▪ Hipoglicemia do diabético tipo II</li> <li>▪ Hipoglicemia do indivíduo com intolerância à glicose</li> <li>▪ Hipoglicemia funcional ou reativa<sup>1,2</sup></li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Diabetes dos tipos I e II</li> <li>▪ Diabetes gestacional</li> <li>▪ Diabetes secundária a várias doenças como hipertireoidismo, hiperpituitarismo, hiperadrenocorticismo, entre outras</li> <li>▪ Intolerância à glicose<sup>1,2</sup></li> </ul>

## 2. Princípio

Na maioria dos kits de glicose, ocorrem duas reações químicas (observe os Quadros 2 e 3).

Na primeira reação química, a glicose ( $C_6H_{12}O_6$ ) presente na amostra reage com as moléculas de oxigênio ( $O_2$ ) e água ( $H_2O$ ), pela ação da enzima glicose oxidase, presente em uma solução que será denominada reagente. Ocorre a formação do ácido glucônico ( $C_6H_{12}O_7$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ )<sup>1-7</sup> (Quadro 2).

Quadro 2 - Primeira reação química que ocorre no teste enzimático de glicemia



Na segunda reação (Quadro 3), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), formado na primeira reação, reage com a 4-aminoantipirina ( $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}$ ) e o fenol ( $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$ ), pela ação da peroxidase. Os dois substratos e a enzima também estão presentes no reagente.

Ocorre a formação da antipirilquinonimina ( $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$ ) e quatro moléculas de água ( $\text{H}_2\text{O}$ ).

A 4-antipirilquinonimina é um cromógeno de cor vermelha, cuja intensidade da cor é proporcional à concentração de glicose presente na amostra<sup>1-7</sup>.

Quadro 3 - Primeira e segunda reação química que ocorre no teste enzimático de glicemia

Primeira reação	
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{Glicose oxidase}} \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_7 + \text{H}_2\text{O}_2$	
Segunda reação	
$2 \text{H}_2\text{O}_2 + \text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O} + \text{C}_6\text{H}_6\text{O} \xrightarrow{\text{Peroxidase}} \text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2 + 4 \text{H}_2\text{O}$	

### 3. Cálculo das soluções

No teste enzimático para glicose, devem ser preparadas três soluções:

- 1) **Branco:** que contém apenas o reagente e que será utilizado para calibrar o espectrofotômetro;
- 2) **Padrão:** que contém as soluções padrão e reagente;
- 3) **Teste:** que contém a amostra e a solução reagente<sup>1-5,7,8</sup>.

As soluções devem ser preparadas conforme indicado no Quadro 4 - A. Caso utilize uma cubeta para espectrofotômetro com volume de 3 mL, utilize os valores do Quadro 4 - B.

Quadro 4 - Preparo das soluções: A) para 1,0 mL de reagente e B) para 3,0 mL de reagente

A	Branco	Padrão	Teste
Amostra			0,01 mL
Padrão		0,01 mL	
Reagente	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

B	Branco	Padrão	Teste
Amostra			0,03 mL
Padrão		0,03 mL	
Reagente	3,0 mL	3,0 mL	3,0 mL

## 4. Identificação dos tubos de ensaio

Utilize uma caneta de tinta permanente para identificar por meio de letras os tubos de ensaio (Figura 1), que irão conter as três soluções que serão preparadas:

- 1) Branco: identifique com a letra B;
- 2) Padrão: identifique com a letra P;
- 3) Teste: identifique com a letra T.

1



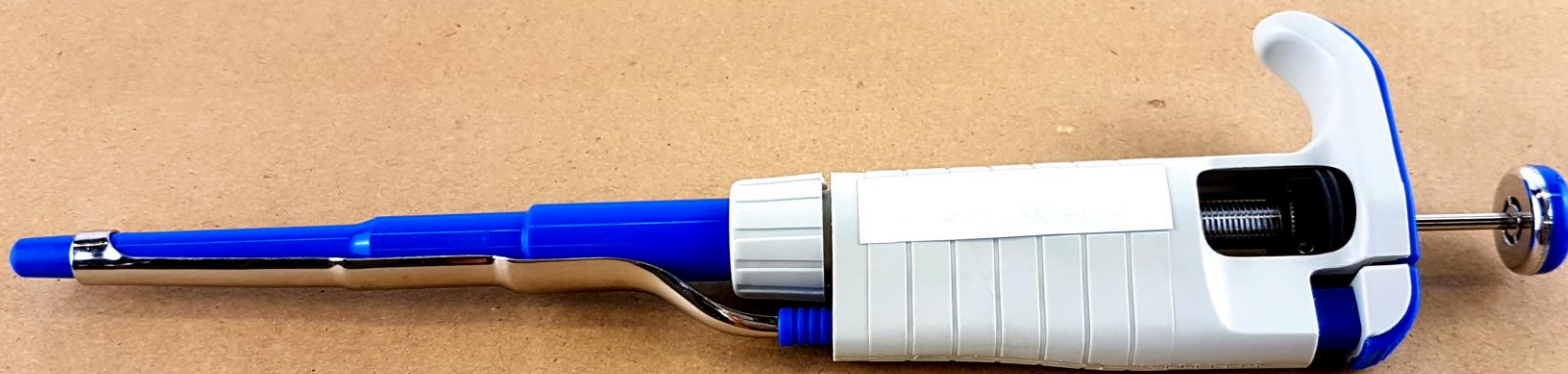


## 5. Identificação das partes de uma micropipeta

Identifique as partes da micropipeta (Figura 2):

- Alça para mão;
- Botão ou tambor de ajuste de volume;
- Botão de pipetagem;
- Botão ejetor de ponteira;
- Câmara de isolamento;
- Corpo;
- Cone;
- Ejetor de ponteiras;
- Porca de conexão;
- Visor digital não eletrônico indicador; de volume ou volúmetro.

2



## 6. Escolha da micropipeta

O código e a cor do botão de pipetagem indicam a faixa de volume ideal para pipetagem. Na pipeta apresentada na Figura 3, a faixa vai de 100 a 1000  $\mu\text{L}$ .

Neste caso, esta micropipeta poderia ser utilizada para aspirar 1 mL de reagente, ou seja, 1000  $\mu\text{L}$ .

Porém, não seria adequada para aspirar a solução padrão ou a amostra, pois nestes casos, deve ser aspirado um volume de 0,01 mL, ou seja, 10  $\mu\text{L}$ .

3





## 7. Ajuste volumétrico da micropipeta

Ajuste o volume a ser pipetado no botão de ajuste volumétrico. Observe o valor no visor digital (Figura 4).

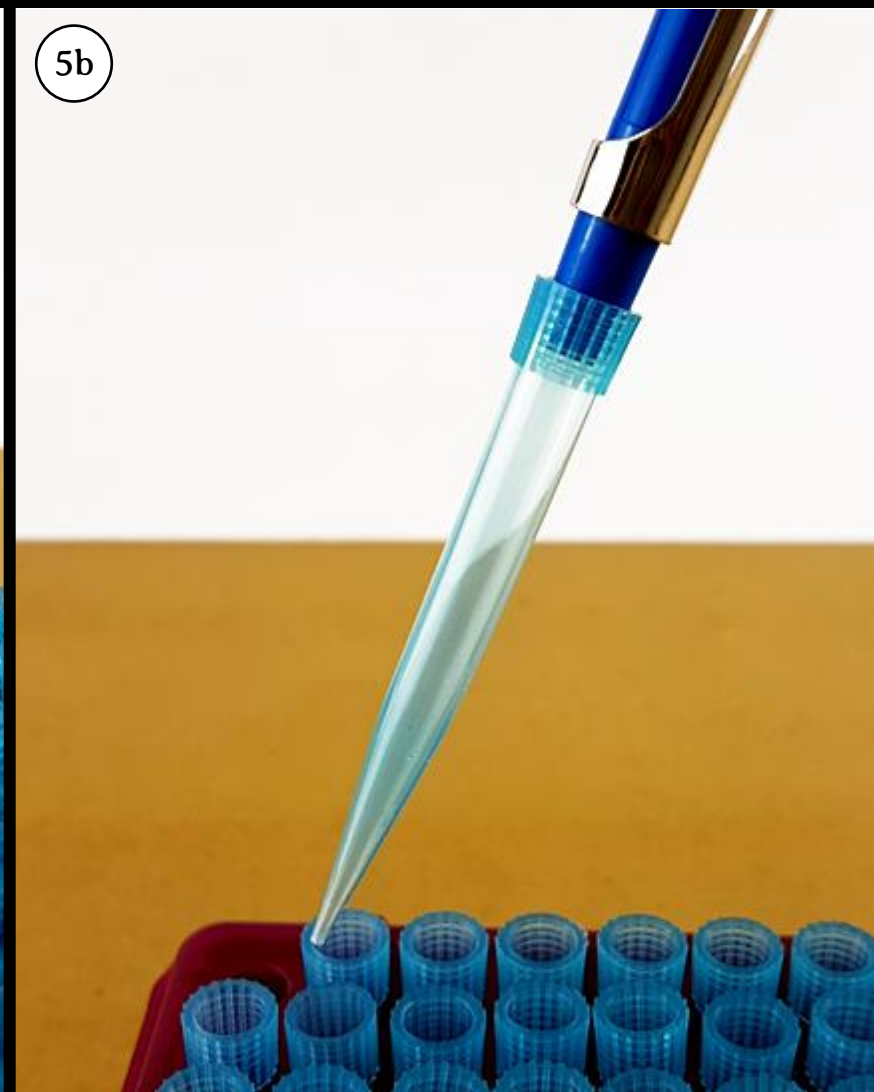
Em alguns modelos de micropipetas, o ajuste de volume é feito no próprio botão de pipetagem.

4



## 8. Inserção da ponteira da micropipeta

Encaixe a ponteira depositada no rack de ponteiras no cone da micropipeta (Figura 5a). Verifique o encaixe correto da ponteira no cone da micropipeta (Figura 5b).



## 9. Técnica da pipetagem direta ou por esgotamento total

9.1. Pipetagem da solução branco: inicialmente realize a pipetagem da solução reagente no tubo de ensaio B.

a) **Etapa de preparação:** segure a micropipeta em posição vertical. Pressione suavemente o botão de pipetagem até a posição do primeiro estágio (Figura 6).

6



A aspiração do líquido deve ocorrer dentro de um tempo de espera que varia de acordo com o volume a ser pipetado.

A profundidade de imersão da ponteira também varia de acordo com o volume a ser pipetado (Quadro 5).

Tempos de espera mais curtos ou profundidades incorretas de imersão da ponteira da micropipeta podem ocasionar erros no volume de líquido aspirado.

Quadro 5 - Tempos de espera para aspiração do líquido

Faixa de volume a ser pipetado	Tempo de espera	Profundidade de imersão
0,1 $\mu\text{L}$ a 1 $\mu\text{L}$	1s	1 a 2 mm
1 a 100 $\mu\text{L}$	1s	2 a 3 mm
100 a 1000 $\mu\text{L}$	1s	2 a 4 mm
Acima de 1000 $\mu\text{L}$	3s	3 a 6 mm

b) **Aspiração:** segure a micropipeta verticalmente e imerja a ponteira no líquido (Figura 7a).

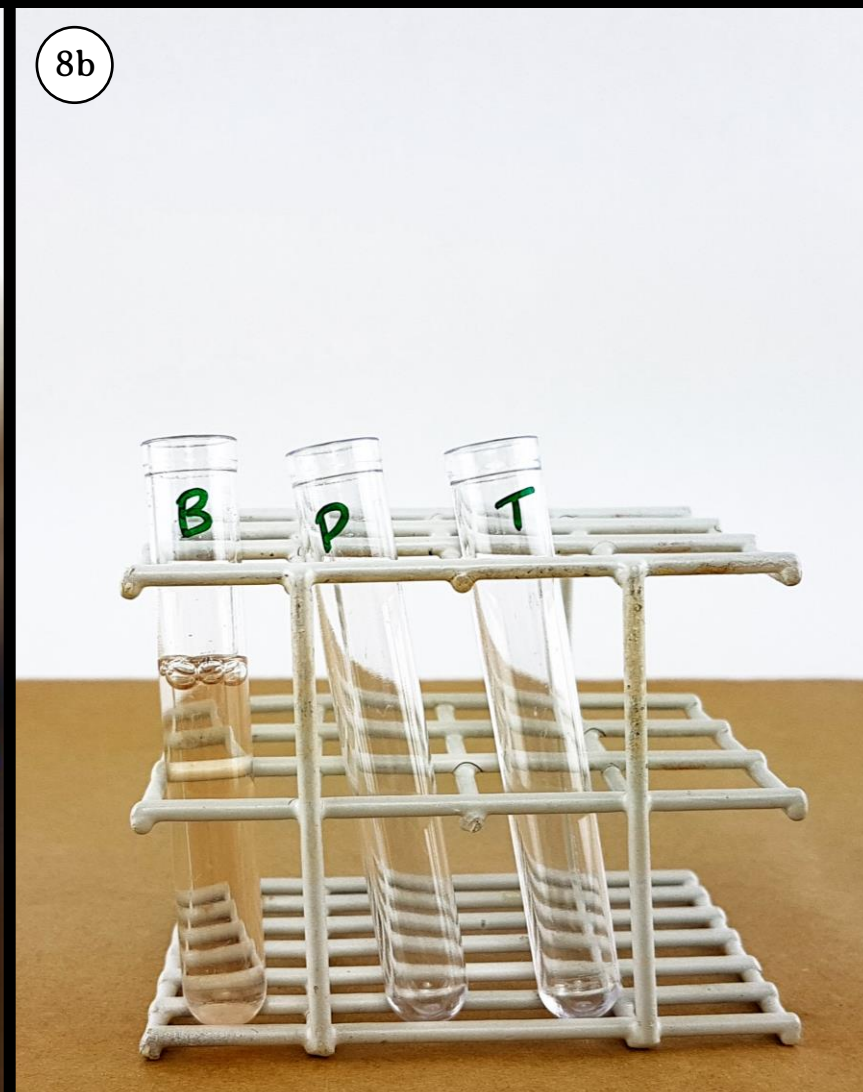
Libere o botão de pipetagem até a posição de repouso (Figura 7b). Lembre-se de aguardar o tempo de espera correto até o líquido se acomodar no interior da ponteira.





c) **Transferência:** apoie a ponteira em um ângulo de 10 a 45 graus contra a parede interna do recipiente. Pressione suavemente o botão de pipetagem até a posição do primeiro estágio. Segure o botão nesta posição (Figura 8a).

Observe a solução reagente dispensada no tubo de ensaio B (Figura 8b).



d) Esgotamento: pressione o botão de pipetagem até o 2º estágio (Figura 9), para promover um golpe de sopro que irá esvaziar a ponteira completamente.

9



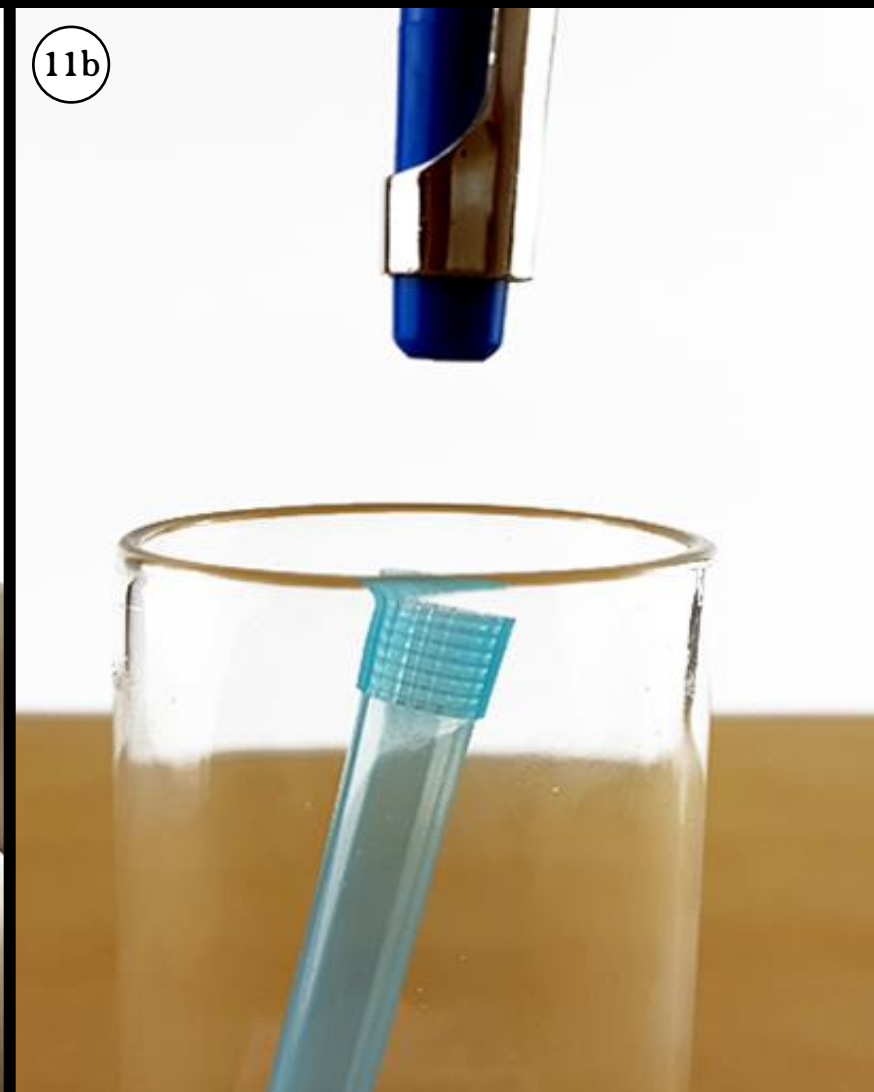
e) Repouso: libere o botão de pipetagem até a posição de repouso (Figura 10).

10





f) Ejeção da ponteira: pressione o botão de ejeção de ponteira (Figura 11a) e descarte a ponteira em recipiente apropriado (Figura 11b).



**9.2. Pipetagem da solução padrão:**  
realize a pipetagem das soluções  
reagente e padrão (Figura 12a),  
conforme descrito anteriormente.

Dispense os líquidos aspirados no tubo  
P (Figura 12b).

Lembre-se que devido ao fato do volume  
aspirado da solução padrão ser menor,  
deverá ser utilizada outra  
micropipeta.

12a



12b



9.3. Pipetagem da solução teste: realize a pipetagem das soluções reagente e amostra (Figura 13a), conforme descrito anteriormente.

Dispense os líquidos aspirados no tubo T (Figura 13b).

Lembre-se que devido ao fato do volume aspirado da amostra ser menor, deverá ser utilizada outra micropipeta.

13a



13b





## 10. Incubação das soluções em banho-maria

Misture vigorosamente as soluções preparadas nos tubos B, P e T. Disponha os tubos de ensaio na estante e leve para incubar em banho-maria a 37 °C durante 10 minutos (Figura 14).

O nível da água do banho-maria deve ser superior ao nível das soluções nos tubos de ensaio.

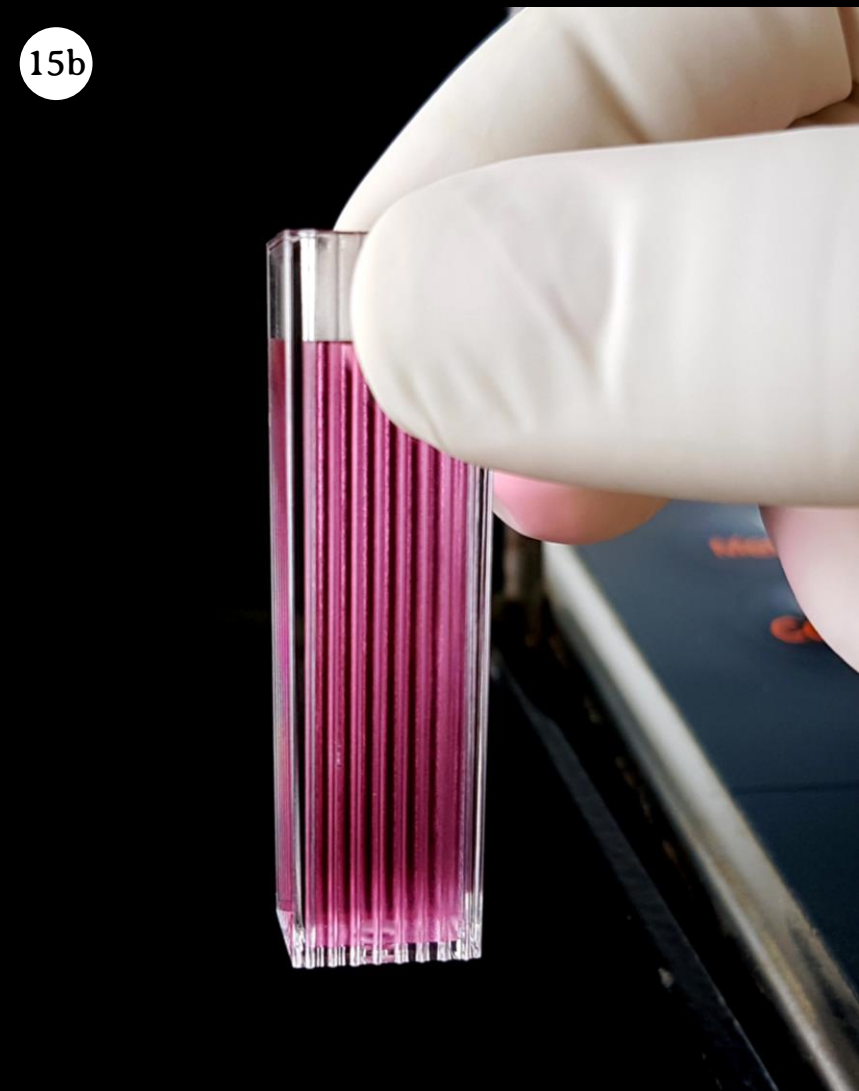
14



## 11. Transferência das soluções para cubetas

Transfira as soluções preparadas para as cubetas até cerca de 2 mm aquém da borda (Figura 15a).

A cubeta deve ser manipulada segurando-a pelos lados onde existem ranhuras (Figura 15b).





## 12. Identificação das partes do espectrofotômetro

Identifique as seguintes partes do espectrofotômetro (Figura 16):

- Visor ou indicador digital;
- Teclado;
- Compartimento de amostra;
- Botão seletor de comprimento de onda;
- Visor de comprimento de onda.

16



## 13. Ligando o espectrofotômetro

Ao ligar o aparelho, aparecerá a mensagem “aguarde...” no visor (Figura 17).

17



Aguarde...

Quando o aparelho estiver pronto, será exibida a leitura em transmitância (Figura 18).

18

100%T



Clique no botão A do teclado (Figura 19) para realizar medições de absorbância (normalmente, ao ser ligado, o aparelho está programado para fazer medições de transmitância).

19



20

Observe a indicação “0.000 Abs” no visor do aparelho (Figura 20), a qual indica que o aparelho está programado para exibir valores de absorbância.

A close-up photograph of a digital display on a laboratory instrument. The display is rectangular with rounded corners and a dark green background. It shows the text "0.000 Abs" in a black, pixelated font. The "0" is followed by a decimal point and three zeros. The word "Abs" is to the right of the zeros. The display is set within a dark, possibly black, plastic housing. The surrounding area of the instrument is a light, metallic or off-white color. A small white circle with the number "20" is visible in the upper left corner of the image area.

0.000 Abs



## 14. Seleção da lâmpada do espectrofotômetro

Alguns modelos de espectrofotômetros possuem duas lâmpadas (Figura 21):

- **Lâmpada de deutério (D<sub>2</sub>):** que emite radiação ultravioleta com comprimento de onda de 200 a 360 nm;
- **Lâmpada de tungstênio-halogênio (W):** que emite luz visível no comprimento de onda de 360 a 1100 nm).

Caso esteja usando um kit cuja absorbância seja medida em um comprimento de onda de luz de 505 nm, deve-se girar o botão de troca de lâmpada para a posição W.

21



## 15. Ajuste do comprimento de onda do espectrofotômetro

. O comprimento de onda a ser utilizado deve ser verificado nas instruções de uso do kit a ser utilizado.

Caso esteja usando um kit cuja absorvância seja medida no comprimento de onda de 505 nm (que corresponde à luz de cor verde), ajuste o botão de comprimento de onda até o valor ser mostrado no visor (Figura 22).

22





## 16. Abertura da tampa do espectrofotômetro

Erga a tampa do compartimento de amostras (Figura 23a).

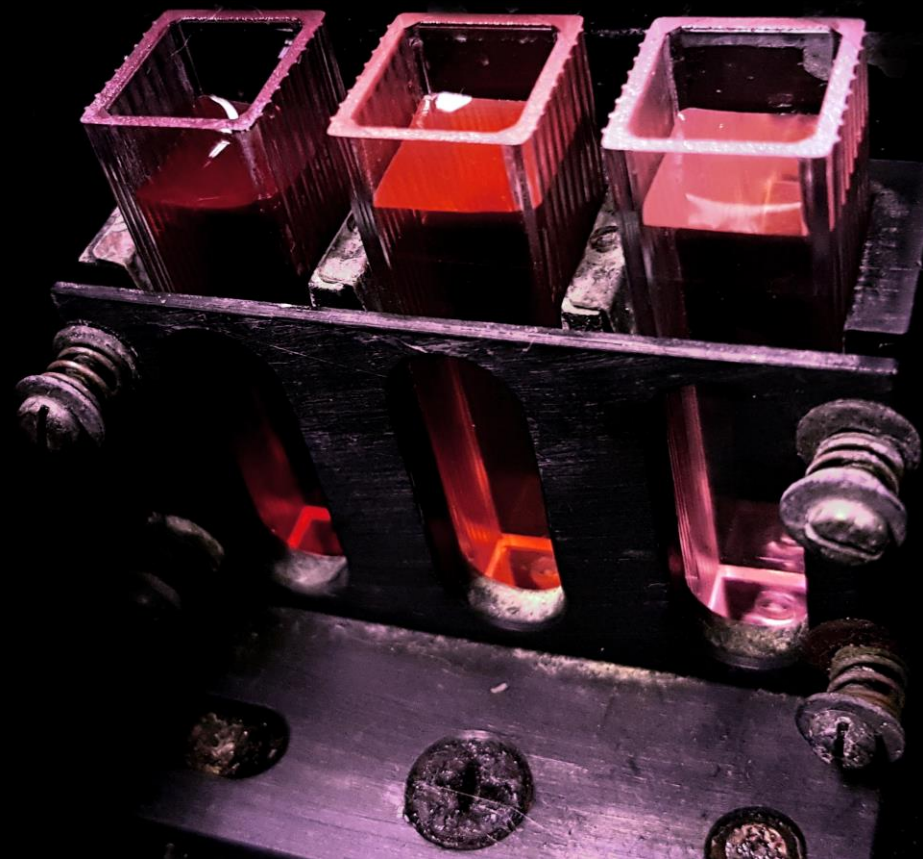
Observe o carrinho móvel, onde serão inseridas as cubetas (Figura 23b).



24

## 17. Posicionamento das cubetas no carrinho móvel

Deposite as cubetas no carrinho móvel. As cubetas devem ser colocadas em ordem de frente para trás: solução em branco, padrão e teste (Figura 24).



## 18. Fechamento da tampa do espectrofotômetro

Feche a tampa do compartimento de amostras (Figura 25).

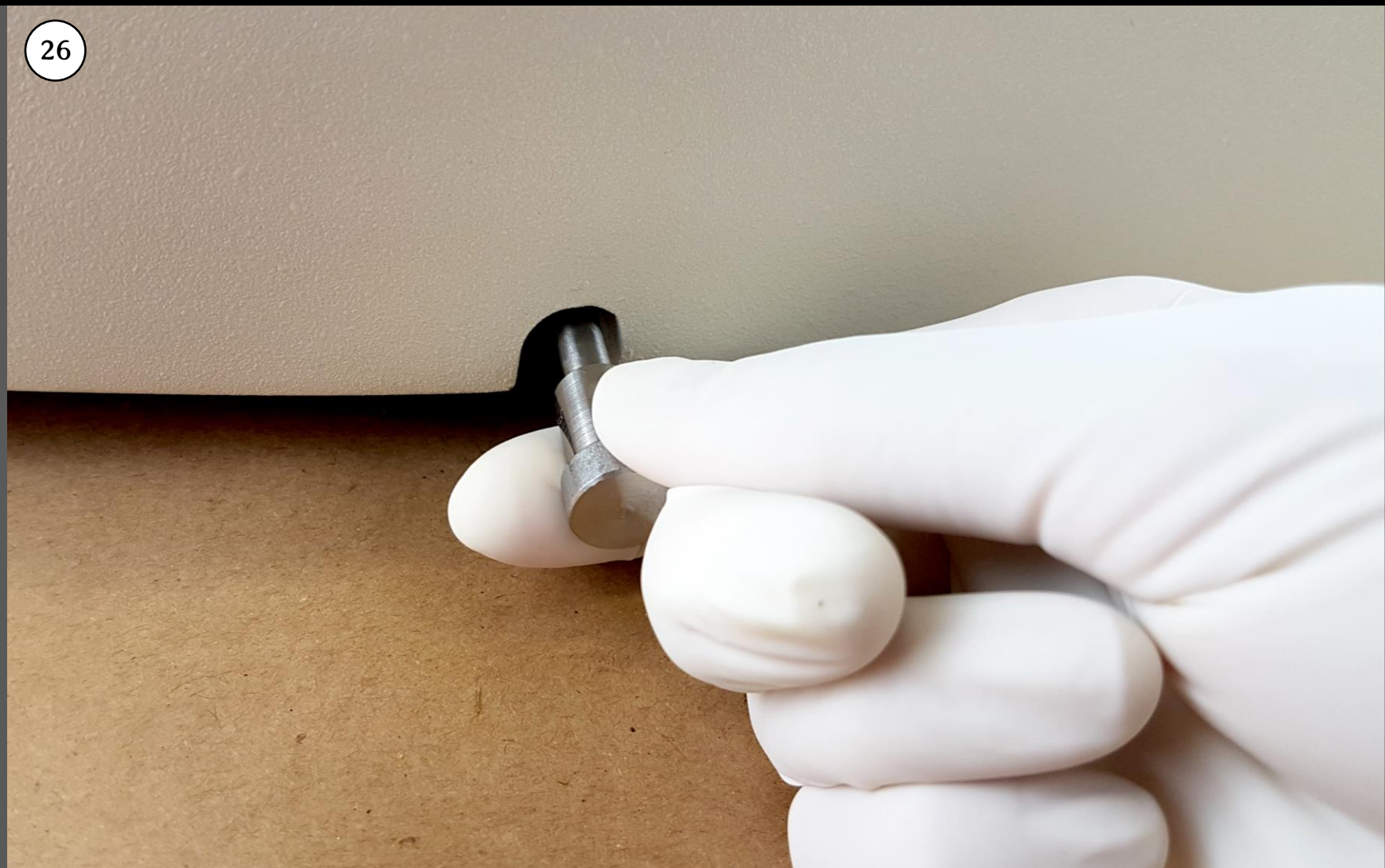




## 19. Posicionamento do carrinho móvel

Utilize o botão de deslocamento do carrinho para deslocá-lo para a posição 1 de leitura. Nesta posição, o aparelho irá medir o nível de absorbância da solução em branco (Figura 26).

26





## 20. Calibração do espectrofotômetro

Aperte o botão CAL no teclado para iniciar o processo de calibração do aparelho. Neste caso, a solução em branco será utilizada para este processo (Figura 27).



Ao clicar o botão CAL para iniciar o processo de calibragem, aparecerá a mensagem “calibrando...” no visor (Figura 28).

28

A close-up photograph of a device's LCD screen. The screen is rectangular with rounded corners and displays the text "calibrando..." in a black, pixelated font. The background of the screen is a light green color. The device's casing is dark grey or black, and the screen is set within a recessed area. The lighting is bright, creating some reflections on the screen's surface.

29

Após alguns segundos, observe no visor, o valor de absorvância da solução branco, que deverá ser de 0.000 Abs. Ao término do processo, o espectrofotômetro irá voltar a fazer as leituras normalmente (Figura 29).

A close-up photograph of a spectrophotometer's LCD display. The display is rectangular and shows the text '0.000 Abs' in a black, pixelated font on a light green background. The device's casing is dark grey or black, and the display is set within a recessed area. The lighting is bright, creating some reflections on the top edge of the device.

0.000 Abs



## 21. Reposicionamento do carrinho móvel

Utilize o botão de deslocamento do carrinho para deslocá-lo para a posição 2 de leitura. Nesta posição, o aparelho irá medir o nível de absorbância da solução padrão (Figura 30).

30



## 22. Medição da absorvância da solução padrão

Observe no visor, o valor de absorvância da solução padrão. Anote este valor (Figura 31).

31



0.340 Abs



## 23. Reposicionamento do carrinho móvel

Utilize o botão de deslocamento do carrinho para deslocá-lo para a posição 3 de leitura. Nesta posição, o aparelho irá medir o nível de absorbância da solução teste (Figura 32).

32



## 24. Medição da absorvância da solução teste

Observe no visor, o valor de absorvância da solução teste. Anote este valor (Figura 33).

33



0.362 Abs



## 25. Lavagem das cubetas

Após realizar as medições, lave as cubetas com água destilada (Figura 34).

34

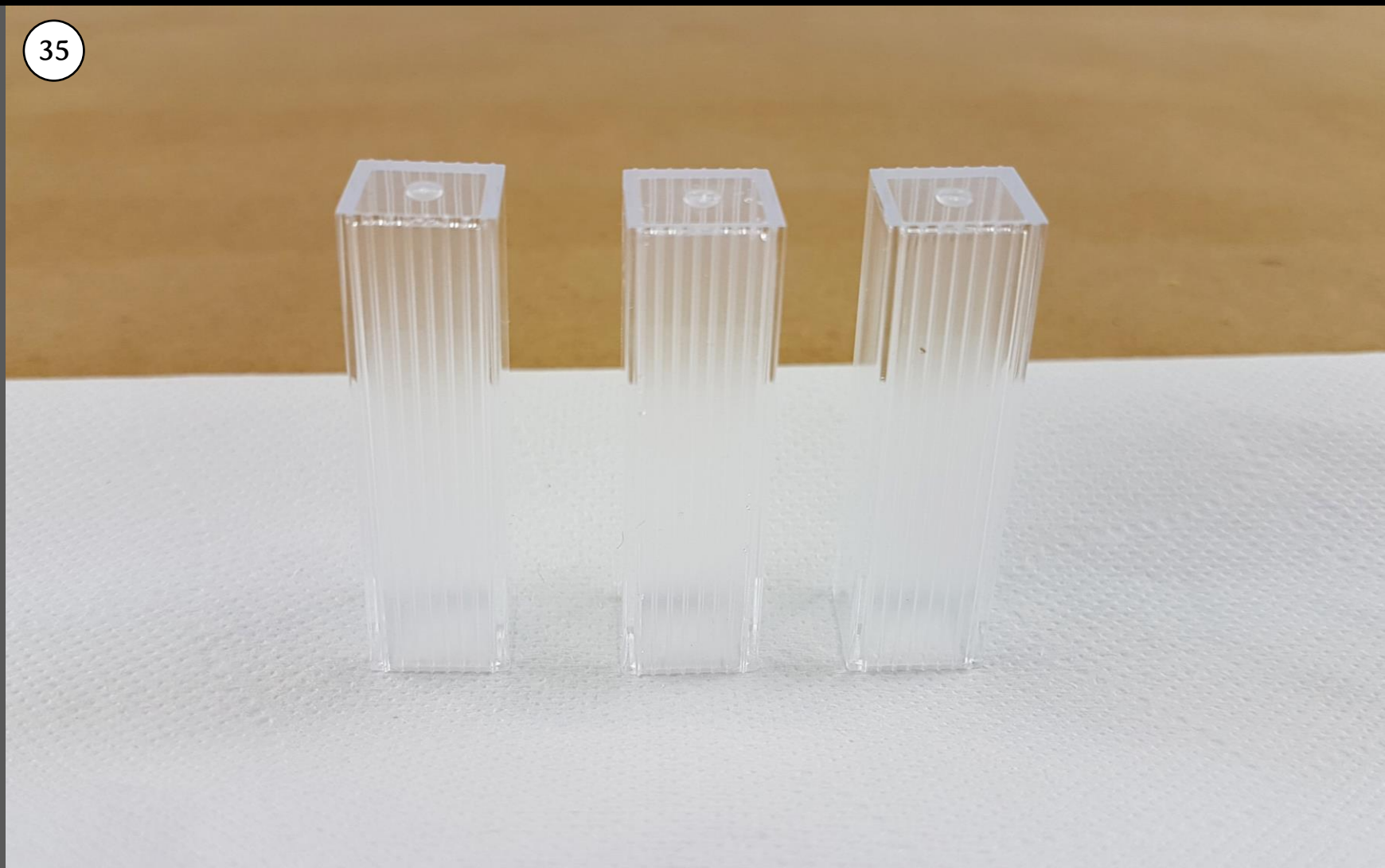


## 26. Secagem das cubetas

Seque as cubetas, depositando-as delicadamente sobre uma folha dobrada de papel toalha (Figura 35).

Ao secar, não dê batidas com a cubeta sobre o papel toalha para remover o excesso de água. Apenas deposite a cubeta sobre a superfície do papel.

35



## 27. Cálculos

Para obtenção do valor de glicemia, podem ser feitos cálculos de duas formas diferentes:

- **Cálculo direto:** primeiro cálculo do Quadro 6;
- **Cálculo a partir do fator de calibração:** segundo cálculo do Quadro 6.

Verifique na bula do fabricante, como deve ser realizado o cálculo de glicemia. As fórmulas apresentadas no Quadro 6 são apenas exemplos de como podem ser realizadas.

Quadro 6 - Duas formas de calcular a glicemia

Primeiro cálculo
$\text{Glicose (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 100$
Segundo cálculo
$\text{Fator de calibração} = \frac{100}{\text{Absorbância do padrão}}$
$\text{Glicose (mg/dL)} = \text{Absorbância do teste} \times \text{fator de calibração}$

# Práticas de Bioquímica Metabólica

Parte 2: Atividades de Testes Enzimáticos pelo Método do Ponto Final

# Atividades de testes enzimáticos pelo método do ponto final

Nas páginas a seguir, sugerimos como atividade o preenchimento dos resumos de diferentes testes enzimáticos. Esta atividade permitirá reconhecer as diferenças entre os testes enzimáticos, comparar bulas de diferentes fabricantes e auxiliar a consulta em atividades práticas. Comece pesquisando bulas de kits de testes enzimáticos disponíveis na internet e preencha os resumos de acordo com as instruções do fabricante. Vale ressaltar que alguns kits possuem reagentes e técnicas diferentes.

# 1. Teste enzimático para glicose

Leia a bula do kit de teste enzimático a ser utilizado e preencha com os dados abaixo:

a) Preparo das soluções:

	<b>Branco</b>	<b>Padrão</b>	<b>Teste</b>
<b>Amostra</b>			
<b>Padrão</b>			
<b>Reagente 1</b>			

b) Temperatura do banho-maria:

c) Duração do banho-maria:

d) Comprimento de onda utilizado:

e) Duração da estabilidade da cor:

f) Absorbância do padrão:

g) Absorbância do teste:

h) Cálculo da glicemia:

## 2. Teste enzimático para colesterol total

Leia a bula do kit de teste enzimático a ser utilizado e preencha com os dados abaixo:

a) Preparo das soluções:

	<b>Branco</b>	<b>Padrão</b>	<b>Teste</b>
<b>Amostra</b>			
<b>Padrão (reagente 2)</b>			
<b>Reagente 1</b>			

b) Temperatura do banho-maria:

c) Duração do banho-maria:

d) Comprimento de onda utilizado:

e) Duração da estabilidade da cor:

f) Absorbância do padrão:

g) Absorbância do teste:

h) Cálculo da colesterolemia:



### 3. Teste enzimático para triglicérides

Leia a bula do kit de teste enzimático a ser utilizado e preencha com os dados abaixo:

a) Preparo das soluções:

	<b>Branco</b>	<b>Padrão</b>	<b>Teste</b>
<b>Amostra</b>			
<b>Padrão</b>			
<b>Reagente 1</b>			

b) Temperatura do banho-maria:

c) Duração do banho-maria:

d) Comprimento de onda utilizado:

e) Duração da estabilidade da cor:

f) Absorbância do padrão:

g) Absorbância do teste:

h) Cálculo da trigliceridemia:

## 4. Teste enzimático para proteínas totais

Leia a bula do kit de teste enzimático a ser utilizado e preencha com os dados abaixo:

a) Preparo das soluções:

	<b>Branco</b>	<b>Padrão</b>	<b>Teste</b>
<b>Amostra</b>			
<b>Padrão (reagente 2)</b>			
<b>Água destilada ou deionizada</b>			
<b>Reagente de Biureto</b>			

b) Tempo de mistura:

c) Temperatura de incubação:

d) Comprimento de onda utilizado:

e) Duração da estabilidade da cor:

d) Absorbância do padrão:

e) Absorbância do teste:

f) Cálculo da proteinemia:

## 5. Teste enzimático para albumina

Leia a bula do kit de teste enzimático a ser utilizado e preencha com os dados abaixo:

a) Preparo das soluções:

	<b>Branco</b>	<b>Padrão</b>	<b>Teste</b>
<b>Amostra</b>			
<b>Padrão (reagente 2)</b>			
<b>Reagente de cor (reagente 1)</b>			

\* Geralmente nos kits de albumina não é utilizado o banho-maria.

b) Modo de preparação das soluções:

c) Comprimento de onda utilizado:

d) Duração da estabilidade da cor:

e) Absorbância do padrão:

f) Absorbância do teste:

g) Cálculo da albuminemia:

## 6. Teste enzimático para ácido úrico

Leia a bula do kit de teste enzimático a ser utilizado e preencha com os dados abaixo:

a) Preparo das soluções:

	<b>Branco</b>	<b>Padrão</b>	<b>Teste</b>
<b>Amostra</b>			
<b>Padrão (reagente 3)</b>			
<b>Reagente de trabalho*</b>			

\* Em alguns kits de teste enzimático para ácido úrico, o reagente de trabalho é obtido a partir da mistura dos reagentes 1 e 2

b) Temperatura do banho-maria:

c) Duração do banho-maria:

d) Comprimento de onda utilizado:

e) Duração da estabilidade da cor:

f) Absorbância do padrão:

g) Absorbância do teste:

h) Cálculo da uricemia:



## 7. Teste enzimático para bilirrubina

Leia a bula do kit de teste enzimático a ser utilizado e preencha com os dados abaixo:

a) Preparo das soluções branco e padrão de bilirrubina:

	<b>Branco</b>	<b>Padrão</b>
Acelerador (reagente 1)		
Ácido sulfanílico (reagente 2)		
Diazo Reagente		
Padrão		

\* Geralmente nos kits de padrão para bilirrubina não é utilizado o banho-maria.

b) Modo de preparação das soluções:

c) Comprimento de onda utilizado:

d) Duração da estabilidade da cor:

e) Absorbância do padrão:

f) Preparo das soluções branco, bilirrubina direta e bilirrubina total:

	<b>Branco</b>	<b>Direta</b>	<b>Total</b>
Água destilada ou deionizada			
Acelerador (reagente 1)			
Ácido sulfanílico (reagente 2)			
Diazo Reagente			
Amostra (soro ou plasma)			

\* Geralmente nos kits de teste enzimático para bilirrubina não é utilizado o banho-maria.

g) Modo de preparação das soluções:

h) Comprimento de onda utilizado:

i) Duração da estabilidade da cor:

j) Absorbância da bilirrubina direta:

k) Absorbância da bilirrubina total:

l) Cálculo de bilirrubina direta:

m) Cálculo de bilirrubina total:

n) Cálculo de bilirrubina indireta:

## 8. Teste enzimático para ferro sérico

Leia a bula do kit de teste enzimático a ser utilizado e preencha com os dados abaixo:

a) Preparo das soluções da etapa 1:

<b>Etapa 1</b>	<b>Branco</b>	<b>Padrão</b>	<b>Teste</b>
Tampão (reagente 1)			
Soro sanguíneo			
Padrão (reagente 2)			
Água deionizada			

b) Comprimento de onda utilizado:

c) Absorbância do teste da etapa 1 ( $A_1$ ):

d) Preparo das soluções da etapa 2:

<b>Etapa 2</b>	<b>Branco</b>	<b>Padrão</b>	<b>Teste</b>
Ferrozine (reagente 3)			

e) Temperatura do banho-maria:

f) Duração do banho-maria:

g) Comprimento de onda utilizado:

h) Absorbância do padrão:

i) Absorbância do teste na etapa 2 ( $A_2$ ):

j) Cálculo da dosagem de ferro:



## 9. Teste enzimático para cálcio

Leia a bula do kit de teste enzimático a ser utilizado e preencha com os dados abaixo:

a) Preparo das soluções da etapa 1:

	<b>Branco</b>	<b>Padrão</b>	<b>Teste</b>
Reagente 1			
Reagente 2			
Padrão			
Amostra			

\* A mistura dos reagentes 1 e 2 é denominada reagente de trabalho. Não é utilizado o banho-maria.

b) Modo de preparação das soluções:

c) Comprimento de onda utilizado:

d) Duração da estabilidade da cor:

e) Absorbância do padrão:

f) Absorbância do teste:

g) Cálculo da calcemia:

# Práticas de Bioquímica Metabólica

Parte 3: Teste Bioquímico com Fitas de Urinálise

# 1. Finalidade

No teste bioquímico da urina, serão utilizadas fitas descartáveis, que são impregnadas com reagentes coloridos, separados por bandas<sup>10</sup>.

Vale ressaltar que existem vários kits disponíveis no mercado<sup>11-14</sup>, que podem avaliar diferentes componentes presentes na urina (Quadro 7). Vale lembrar também que a bula sempre deve ser consultada, pois pode haver diferenças em sua utilização.

Quadro 7 - Exemplos de componentes presentes na urina detectados por fitas de urinálise

Componentes
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Ácido ascórbico</li><li>▪ Bilirrubina</li><li>▪ Corpos cetônicos</li><li>▪ Densidade específica</li><li>▪ Glicose</li><li>▪ Leucócitos</li><li>▪ Nitrito</li><li>▪ pH</li><li>▪ Proteínas</li><li>▪ Sangue</li><li>▪ Urobilinogênio</li></ul>

36

## 2. Material

Neste experimento, serão usados:

- Kit de fitas descartáveis para urinálise;
- Tubo de ensaio de plástico para centrífuga tipo Falcon;
- Pipeta de Pasteur;
- Caneta de tinta permanente;
- Coletor universal;
- Estante para tubo de ensaio (Figura 36).



### 3. Coleta da amostra de urina

A amostra de urina fresca deve ser coletada em um coletor universal limpo e não necessita ser centrifugada<sup>14</sup> (Figura 37).

Caso a análise não seja realizada dentro do período de uma hora, a amostra deve ser conservada sob refrigeração. Antes do teste ser realizado, é preciso que a amostra esteja em temperatura ambiente e seja homogeneizada<sup>15</sup>.

37

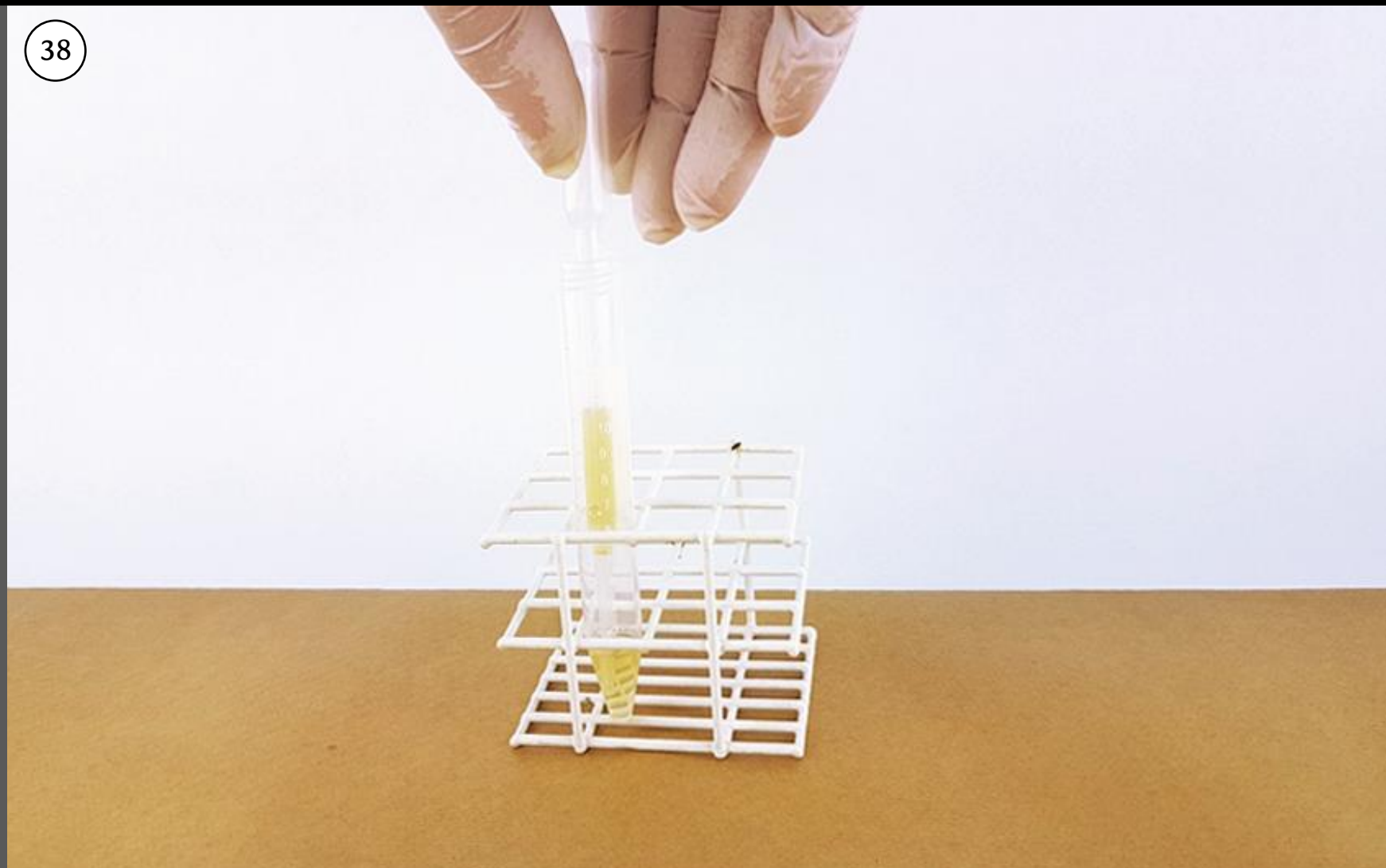




## 4. Pipetagem da amostra

Utilize a pipeta de Pasteur para transferir um volume de amostra para o tubo de ensaio de plástico para centrífuga tipo Falcon (Figura 38), que seja suficiente para embeber a fita descartável.

38

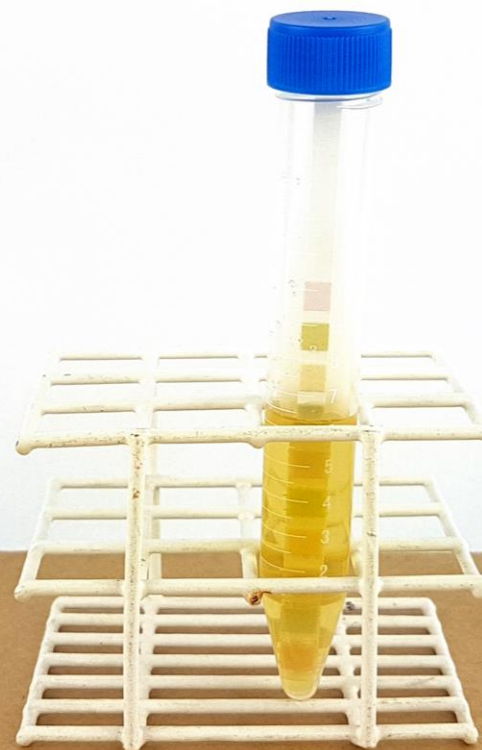


## 5. Utilização da fita de urinálise

A fita de urinálise deve ser mergulhada completamente na urina por até um segundo, sendo observada a mudança de cor das áreas de teste com reagentes<sup>10,15</sup>.

Caso o volume de urina presente no interior do tubo de centrifugação não seja suficiente para cobrir todos reagentes (Figura 39), o frasco pode ser levemente inclinado para que o líquido tenha contato com toda extensão da fita. A fita deve ser manipulada pela extremidade lisa, evitando o contato com os reagentes.

39



40

## 6. Análise da fita de urinálise

A fita de urinálise deve ser removida do interior do frasco e o excesso de urina deve ser removido com o uso de papel absorvente. Compare cuidadosamente as cores observadas na fita de urinálise com a tabela do fabricante. A fita deve ser mantida na horizontal e com uma boa fonte de luz<sup>10,15</sup>.

Evite analisar a fita de urinálise no interior do tubo de ensaio de plástico, pois o revestimento do tubo e a urina irão dificultar a observação correta das cores (Figura 40). A fita deve ser devidamente descartada.



# Práticas de Bioquímica Metabólica

Referências e Sugestões de Leitura

# Referências

1. Glicose liquiform: instruções de uso. Ref.: 133. MS 10009010236 [Internet]. 2016 set [acesso 2021 jun 05]. Disponível em: [https://labtest.com.br/wp-content/uploads/2016/09/Ref\\_133\\_Edi%C3%A7%C3%A3oDezembro2011\\_Ref050219\\_Port.pdf](https://labtest.com.br/wp-content/uploads/2016/09/Ref_133_Edi%C3%A7%C3%A3oDezembro2011_Ref050219_Port.pdf).
2. Glicose - PP. Kit para determinação da glicose por metodologia enzimática-colorimétrica. Cat. 434. MS 80022230067 [Internet]. 2012 ago [acesso 2021 jun 05]. Disponível em: [http://www.goldanalisa.com.br/arquivos/%7B978C997F-7160-4B09-BE11-43F657A655C8%7D\\_glicose\\_pp.PDF](http://www.goldanalisa.com.br/arquivos/%7B978C997F-7160-4B09-BE11-43F657A655C8%7D_glicose_pp.PDF).
3. Glicose. Ref. BA244. MS 81666810002. [Internet]. 2021 abr [acesso 2021 jun 05]. Disponível em: <http://bioanalitica.com.br/wp-content/uploads/2019/06/glicose-ref-ba244.pdf>.
4. Glicose monoreagente. Ref.: K082 [Internet]. 2020 mar [acesso 2021 jun 05]. Disponível em: [https://quibasa.bioclin.com.br/anexos/INSTRUCOES\\_GLICOSE\\_MONOREAGENTE.pdf](https://quibasa.bioclin.com.br/anexos/INSTRUCOES_GLICOSE_MONOREAGENTE.pdf).
5. Glicose cepa. Instruções de uso [Internet]. [acesso 2021 jun 05]. Disponível em: [http://www.mbiolog.com.br/produtos/Bula\\_Glicose\\_C.pdf](http://www.mbiolog.com.br/produtos/Bula_Glicose_C.pdf).
6. Glicose enzimática. Instruções de uso [Internet]. 2016 fev [acesso 2021 jun 05]. Disponível em: [https://www.vidabiotecnologia.com.br/novo\\_site/content/uploads/2015/08/GLICOSE.pdf](https://www.vidabiotecnologia.com.br/novo_site/content/uploads/2015/08/GLICOSE.pdf).
7. Glicose enzimática líquida [Internet]. 2018 nov [acesso 2021 jun 05]. Disponível em: <http://www.doles.com.br/produtos/instrucoes/0fe92b177750ab1a4d4078d1eec60b65.pdf>.
8. Glicose GOD-PAP [Internet]. [acesso 2021 jun 05]. Disponível em: <http://www.reagelabor.com.br/pdf/1523027160Glicose-GOD-PAP-Liquid-Stable.pdf>.



9. Glicose WS. Instruções de uso [Internet]. 2017 Set [acesso 2021 jun 09]. Disponível em: <http://www.kovalent.com.br/wp-content/uploads/2015/08/BL0246-%E2%80%93REV04-%E2%80%9309-2017-GLICOSE-WS.pdf>.
10. Gaw A, Murphy MJ, Srivastava R, Cowan RA, O'Reilly DSJ. Bioquímica Clínica. 5a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2015a. Capítulo 16. Urinálise; p. 32-3.
11. Uri-color check [Internet]. 2010 out [acesso 2021 ago 06]. Disponível em: <https://www.wamadiagnostica.com.br/bulas/uri-color-check/uri-color-check-1.pdf>.
12. Urigold [Internet]. 2012 ago [acesso 2021 ago 06]. Disponível em: [http://www.goldanalisa.com.br/arquivos/%7B14D05C6F-27F8-4D4B-A191-22DC5AE3B0CD%7D\\_URIGOLD.pdf](http://www.goldanalisa.com.br/arquivos/%7B14D05C6F-27F8-4D4B-A191-22DC5AE3B0CD%7D_URIGOLD.pdf).
13. Urine Strip: 10, 10 AA, 11, 11 AA. Tiras reativas para a detecção de urobilinogênio, glicose, corpos cetônicos, bilirrubina, proteínas, nitrito, pH, sangue, densidade específica, leucócitos e ácido ascórbico em urina [Internet]. 2000 [acesso 2021 ago 06]. Disponível em: [https://www.wiener-lab.com.ar/VademecumDocumentos/Vademecum%20portugues/urine\\_strip\\_po.pdf](https://www.wiener-lab.com.ar/VademecumDocumentos/Vademecum%20portugues/urine_strip_po.pdf).
14. Uriscan 11 [Internet]. 2008 set 30 [acesso 2021 ago 06]. Disponível em: <http://www.masterdiagnostica.com.br/produto/uriscan-11>.
15. Mundt LA, Shanhan K. Exame de urina e de fluidos corporais de Graff. 2ª ed. São Paulo: Artmed; 2012. Capítulo 4. Análise química da urina; p. 35-56.

# Sugestões de leitura

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D., Raff M, Roberts K et al. *Biologia molecular da célula*. 6a ed. Porto Alegre: Artmed; 2017a. Painel 2-8. Detalhes das 10 etapas da glicólise; p. 104-5.
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D., Raff M, Roberts K et al. *Biologia molecular da célula*. 6a ed. Porto Alegre: Artmed; 2017b. Painel 2-9. O ciclo do ácido cítrico completo; p. 106-7.
3. Baynes JW. Metabolismo anaeróbico da glicose nos eritrócitos. In: Baynes JW, Dominiczak MH. *Bioquímica médica*. 3a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010. Capítulo 12; p. 143-54.
4. Bender DA, Mayes PA. O ciclo do ácido cítrico: a via central do metabolismo de carboidratos, de lipídeos e de aminoácidos. In: Rodwell VW, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Weil PA. *Bioquímica ilustrada de Harper*. 30a ed. Porto Alegre: AMGH; 2017a. Capítulo 16; p. 161-7.
5. Bender DA, Mayes PA. Glicólise e oxidação do piruvato. In: Rodwell VW, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Weil PA. *Bioquímica ilustrada de Harper*. 30a ed. Porto Alegre: AMGH; 2017b. Capítulo 17; p. 168-75.
6. Campbell MK, Farrell SO. *Bioquímica*. 2a ed. São Paulo: Cengage Learning; 2017a. Capítulo 17. Glicólise; p. 481-510.
7. Campbell MK, Farrell SO. *Bioquímica*. 2a ed. São Paulo: Cengage Learning; 2017b. Capítulo 19. Ciclo do ácido cítrico; p. 539-68.
8. Colesterol liquiform: instruções de uso. Ref.: 76. MS 10009010068 [Internet]. 2014 jul [acesso 2021 jun 21]. Disponível em: [https://labtest.com.br/wp-content/uploads/2016/09/Colesterol\\_Liquiform\\_76\\_Port.pdf](https://labtest.com.br/wp-content/uploads/2016/09/Colesterol_Liquiform_76_Port.pdf).
9. Gaw A, Murphy MJ, Srivastava R, Cowan RA, O'Reilly DSJ. *Bioquímica Clínica*. 5a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2015b. Capítulo 31. Metabolismo de glicose e diabetes melito; p. 62-3.

10. Gaw A, Murphy MJ, Srivastava R, Cowan RA, O'Reilly DSJ. Bioquímica Clínica. 5a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2015c. Capítulo 32. Diagnóstico e monitoramento de diabetes melito; p. 64-5.
11. Gaw A, Murphy MJ, Srivastava R, Cowan RA, O'Reilly DSJ. Bioquímica Clínica. 5a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2015d. Capítulo 34. Hipoglicemia; p. 68-9.
12. Goodsell D. Citric acid cycle [Internet]. 2012 [acesso em: 2019 mai 15]. Disponível em: <http://pdb101.rcsb.org/motm/154>.
13. Goodsell D. Glycolytic enzymes [Internet]. 2004 [acesso em: 2019 abr 16]. Disponível em: <http://pdb101.rcsb.org/motm/50>.
14. Harvey RA; Ferrier DR. Bioquímica ilustrada. 5a ed. Porto Alegre: Artmed; 2012a. Capítulo 8. Glicólise; p. 91-108.
15. Harvey RA; Ferrier DR. Bioquímica ilustrada. 5a ed. Porto Alegre: Artmed; 2012b. Capítulo 9. Ciclo do ácido cítrico; p. 109-24.
16. Hassunuma RM, Lionete TA, Garcia PC, Acorci-Valério MJ, Messias SHN. Práticas de Bioquímica: material de laboratório. 1ª ed. Bauru: Canal 6 Editora; 2018 [acesso 2021 jun 10]. 41p. Disponível em: <http://www.canal6livraria.com.br/pd-5c6921-praticas-de-bioquimica-material-de-laboratorio.html?ct=18bb3e&p=1&s=1>.
17. Hassunuma RM, Lionete TA, Garcia PC, Precipito KCP, Messias SHN. Práticas de Bioquímica: micropipeta, pHmetro e espectrofotômetro. 1ª ed. Bauru: Canal 6 Editora; 2018 [acesso 2021 jun 10]. 107p. Disponível em: <http://www.canal6livraria.com.br/pd-5bcae7-praticas-de-bioquimica-micropipeta-phmetro-e-espectrofotometro.html?ct=18bb3e&p=1&s=1>.
18. Marzzoco A, Torres BB. Bioquímica básica. 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2017a. Capítulo 5. Enzimas; p. 54-81.
19. Marzzoco A, Torres BB. Bioquímica básica. 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2017b. Capítulo 9. Metabolismo de carboidratos: glicólise e formação de acetil-CoA; p. 117-27.
20. Marzzoco A, Torres BB. Bioquímica básica. 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2017c. Capítulo 10. Ciclo de Krebs; p. 128-33.

21. Nelson C, Cox MM. Princípios de bioquímica de Lehninger. 6a ed. Porto Alegre: Artmed; 2014a. Capítulo 14. Glicólise, gliconeogênese e a via das pentoses-fosfato; p. 543-85.
22. Nelson C, Cox MM. Princípios de bioquímica de Lehninger. 6a ed. Porto Alegre: Artmed; 2014b. Capítulo 16. Ciclo do ácido cítrico; p. 633-65.
23. Salway JG. Metabolismo passo a passo. 3a ed. Porto Alegre: Artmed; 2009. Capítulo 5. Metabolismo da glicose; p. 18-9.
24. Stillway LW. O ciclo do ácido tricarboxílico. In: Baynes JW, Dominiczak MH. Bioquímica médica. 3a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010. Capítulo 14; p. 173-84.
25. Voet D, Voet JG. Bioquímica. 4a ed. Porto Alegre: Artmed; 2013a. Capítulo 17, Glicólise; p. 593-637.
26. Voet D, Voet JG. Bioquímica. 4a ed. Porto Alegre: Artmed; 2013b. Capítulo 21, O ciclo do ácido cítrico; p. 789-822.



Este livro foi desenvolvido com o objetivo de facilitar a organização e o desenvolvimento de atividades práticas na área de Bioquímica Metabólica.

Os autores apresentam os principais equipamentos e material utilizados em testes laboratoriais.

Este livro contém atividades que podem ser utilizadas para estudo e como apoio no desenvolvimento de atividades práticas laboratoriais.