



GUIA

DE AULAS PRÁTICAS



Bioquímica - Medicina

Hussen Machado
Thadeu Corrêa
Gilson Rodrigues Ferreira

Laboratório de Bioquímica e Farmacologia

Edição: 01

Bioquímica – Medicina

**Hussen Machado
Thadeu Corrêa
Gilson Rodrigues Ferreira**

Coordenador: Gilson Rodrigues Ferreira



**JUIZ DE FORA
2024**

Hussen Machado

Professor Adjunto na Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde (SUPREMA)
Doutor em Saúde pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Thadeu Corrêa

Professor Assistente na Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde (SUPREMA)
Mestre em Ciências pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

Gilson Rodrigues Ferreira

Doutor em Química pela Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF)
Gestor Laboratorial e Professor da Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora (SUPREMA)

Bibliotecária: Sabrina Valadão

Correção Gramatical e Ortográfica : Moema Rodrigues Brandão Mendes

Professor Adjunto na Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde (SUPREMA)
Doutora em Letras pela Universidade Federal Fluminense (UFF)

Ficha Catalográfica

Elaboração Sabrina Valadão CRB6-2542

E24

Guia de Aulas Práticas - Bioquímica / Hussen Machado, Thadeu Corrêa, Gilson Rodrigues, Brunno dos Santos Rodrigues, Yago Vieira Guerra Varotto – Juiz de Fora: Suprema, 2024.

77 f.

1. Guia de Aulas Práticas. 2. Bioquímica 3. Laboratório. 4. Medicina. 5. Aulas Práticas. I. Título.

CDD 372.372

SUMÁRIO

Prefácio.....	4
Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora - SUPREMA	5
Bem Vindo ao Laboratório de Bioquímica e Farmacologia.....	5
Conhecendo o Laboratório - Instruções Gerais e Materiais usados	6
INSTRUÇÕES GERAIS PARA O BOM TRABALHO DENTRO DO LABORATÓRIO	6
NORMAS DE SEGURANÇ A DO LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E FARMACOLOGIA	7
EXPERIMENTO 01 - Preparo de Soluções – Solut o Líquido	11
EXPERIMENTO 02 - Preparo de Soluções – Pesagem.....	13
EXPERIMENTO 03 - Preparo e Aplicação do Reativo de Benedict.....	15
EXPERIMENTO 04 Reações de Identificação dos Glicídios.....	17
EXPERIMENTO 05 Extração e Caracterização do Amido	21
EXPERIMENTO 06 Hidrólise do Amido	24
EXPERIMENTO 07 Dosagem da Amilase Salivar	26
EXPERIMENTO 08 Lipídios	28
EXPERIMENTO 09 – Identificação e Caracterização dos Componentes do Leite – Fatores Nutricionais	31
EXPERIMENTO 10 Reações dos Aminoácidos e Proteínas.....	33
EXPERIMENTO 11 Colorimetria / Fotometria de Absorção	35
EXPERIMENTO 12 Diferenciação entre Soro e Plasma Sanguíneos	38
EXPERIMENTO 13 Índices Hematométricos	41
EXPERIMENTO 14 Glicemia e Curva Glicêmica	44
EXPERIMENTO 15 Colesterolemia (Dosagem do Colesterol)	47
EXPERIMENTO 16 Proteínas Totais e Fracionadas.....	49
EXPERIMENTO 17 Uréia	52
EXPERIMENTO 18 Elementos Anormais e Sedimentoscopia.....	55
EXPERIMENTO 19 Noções sobre metabolismo e dosagem da Bilirrubina	59
Técnica de Coleta Sanguínea	64
ANOTAÇÕES	65

Prefácio

Caros estudantes,

É com grande satisfação que apresentamos este guia que acompanhará suas experiências práticas na disciplina de Bioquímica, parte integrante do curso de Medicina da Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora - MG. Desenvolvido especificamente para as aulas práticas realizadas no laboratório de Bioquímica e Farmacologia, este material foi concebido para enriquecer sua aprendizagem e preparação para a prática médica.

A Bioquímica é fundamental para compreender os processos bioquímicos que sustentam a vida humana e para interpretar os resultados laboratoriais que guiam o diagnóstico e tratamento de doenças. No laboratório, vocês terão a oportunidade não apenas de aplicar os conhecimentos teóricos adquiridos em sala de aula, mas também de desenvolver habilidades práticas essenciais para sua futura carreira médica.

Cada capítulo deste livro foi elaborado com o objetivo de fornecer uma base sólida em bioquímica, desde os princípios básicos até as técnicas mais atuais utilizadas na prática clínica.

Esperamos que este livro não apenas seja uma fonte de conhecimento, mas também uma ferramenta que inspire o desenvolvimento de sua curiosidade científica e aprimore suas habilidades práticas no laboratório. Que cada experimento realizado aqui seja uma oportunidade para aprender, explorar e crescer como profissionais de saúde comprometidos com a excelência e o cuidado com os pacientes.

Desejamos a todos uma excelente jornada de aprendizado no laboratório de Bioquímica e Farmacologia, e que este livro seja um valioso companheiro em sua formação acadêmica e profissional.

Boas descobertas!

*Equipe do Laboratório de Bioquímica e Farmacologia
Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora*

Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora - SUPREMA

Com base no sonho de um grupo de professores e profissionais com experiência em gestão de saúde nasceu uma das mais modernas organizações hospitalares e assistenciais de Juiz de Fora, a Sociedade Universitária para o Ensino Médico Assistencial (Suprema). A Faculdade iniciou suas atividades, em 2002, calcada em valores como ética, cidadania, humanização, competência, comprometimento, inovação, dinamismo e qualidade.

Hoje, sedimentou um caminho de excelência pedagógica que a transformou em referência acadêmica para todo o Estado de Minas Gerais. Excelência que pode ser traduzida em investimentos contínuos em infraestrutura, equipamentos de ponta e capacitação de seu corpo docente. O criterioso planejamento de sua diretoria, com a profissionalização da gestão, possibilitou o reconhecimento, em todas as instâncias do Governo Federal, do Ministério da Educação para a criação de uma faculdade multiprofissional da área da saúde, a Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora – FCMS/JF.

Quando, em 2002, a Faculdade percorreu todos os trâmites legais para obter a aprovação dos cursos, já contava com um planejamento estratégico que vislumbrava o vertiginoso crescimento da Instituição. Crescimento que permitiu à Suprema implantar um convênio com a Maternidade Therezinha de Jesus, transformando-a em hospital geral e, posteriormente, em um moderno Hospital de Ensino, nascendo assim o Hospital e Maternidade Therezinha de Jesus.

A Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora - SUPREMA foi construída numa área de 57.000 m², no Bairro Salvaterra, com uma arquitetura arrojada, funcional e cercada de verde, com um ambiente adequado ao ensino, à pesquisa e à promoção da saúde. São diversos laboratórios de formação geral e de habilidades específicas voltados para a prática profissional e a prestação de serviços à comunidade.



Bem Vindo ao Laboratório de Bioquímica e Farmacologia

Constituído em dois ambientes equipados com modernas instalações, para atender as normas de Biossegurança, de Ventilação e de Preservação ambiental, os Laboratórios de Bioquímica e Farmacologia I e II possuem um local amplo e arejado, com bancadas para execução de trabalhos práticos. Contam com microscópios, contador de células, centrífugas de micro-hematócrito, centrífugas, estufa, fotômetro de chama, espectrofotômetros, balanças, cuba para eletroforese, deionizador, agitador para tubos, chapa aquecedora, ponto de fusão, refratômetros, bomba de vácuo, polarímetro, viscosímetros, geladeira, capela de exaustão para gases, reagentes de alto grau de pureza e vidraria volumétrica e graduada.

O Laboratório encontra-se em local de fácil acesso no segundo andar do bloco A, com área total de 240 m² e conta com um almoxarifado dotado de um sistema de dupla exaustão (inferior e superior), apresentando condições de fácil higienização e construído dentro das normas de Biossegurança. Conta ainda com dimensão, limpeza, iluminação, acústica, ventilação, acessibilidade, conservação e comodidade adequados aos seus usuários.



As seguintes instruções gerais devem ser OBEDECIDAS pelos alunos e usuários do laboratório, visando a sua própria integridade e segurança:

01 – NÃO é permitido o ingresso de aluno no laboratório sem o JALECO, CALÇA e CALÇADO FECHADO:

03 – NÃO é permitido brincadeiras, nem conversas entre os alunos, a não ser quando tratar-se de interesse da aula em questão;

05 – Leia com o máximo de atenção os rótulos dos frascos antes de usar as substâncias neles contidas:

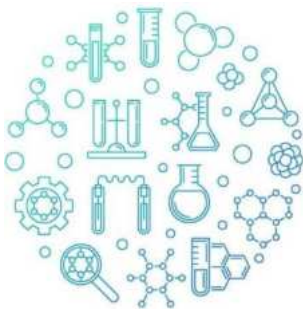
07 – Quando aquecer uma substancia num tubo de ensaio, não aponte a sua extremidade aberta para outras pessoas ou em sua direção e o faça sempre agitando o tubo ao qual se aquece;

09 – Quando trabalhar com equipamentos de vidro, proceda com cuidado para evitar cortes e quebra do aparelho:

11 – Antes de efetuar qualquer alteração nos reagentes empregados, em certa experiência (por qualquer motivo), discuta as mudanças com o responsável técnico pelo laboratório ou pela prática em questão;

13 – Qualquer material quebrado, ou qualquer droga alterada ou contaminada pelo aluno, deverá ser comunicado **IMEDIATAMENTE** ao professor responsável;

14 – Todo material necessário para determinada aula prática é disponibilizado sem falta de utensílios, portanto, atente-se aos seus materiais dispostos em bancada ao início da aula. Caso sinta falta de algum componente, informe ao técnico responsável para providencia-los.



NORMAS DE SEGURANÇA DO LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E FARMACOLOGIA



1. Não brinque no laboratório;
2. Em caso de acidente, procure imediatamente o professor, mesmo que não haja danos pessoais ou materiais;
3. Tenha todos os produtos químicos como venenos em potencial, enquanto não verificar sua inocuidade, consultando a literatura especializada;
4. Não fume no laboratório;
5. Não beba e nem coma no laboratório;
6. Use jaleco apropriado;
7. Caso tenha cabelos longos, mantenha-os presos durante a realização dos experimentos;
8. Nunca deixe frascos contendo solventes inflamáveis (acetona, álcool, éter, etc.) próximos à chama;
9. Nunca deixe frascos contendo solventes inflamáveis expostos ao sol;
10. Evite contato de qualquer substância com a pele;
11. Trabalhe calçado e nunca de sandálias;
12. Todas as experiências que envolvem a liberação de gases e/ou vapores tóxicos devem ser realizadas na câmara de exaustão (capela);
13. Ao preparar soluções aquosas diluídas de um ácido, coloque o ácido concentrado na água, nunca o contrário;
14. Nunca pipete líquidos diretamente com a boca, utilize pipetadores;
15. Nunca aqueça o tubo de ensaio, apontando sua extremidade aberta para um colega ou para si mesmo;
16. Sempre que necessário proteja os olhos com óculos adequados(EPI);
17. Não jogue nenhum material sólido dentro da pia ou nos ralos;
18. Não jogue resíduos de solventes na pia ou no ralo; há recipientes apropriados para isso;
19. Não coloque sobre a bancada do laboratório bolsas, agasalhos, ou qualquer material estranho ao trabalho que estiver realizando;
20. Caindo produto químico nos olhos, boca ou pele, lave abundantemente com água. A seguir, procure o tratamento específico para cada caso;
21. Saiba a localização e como utilizar o chuveiro de emergência, extintores de incêndio e lavadores de olhos;
22. Nunca teste um produto químico pelo sabor (por mais apetitoso que ele possa parecer);

23. Não é aconselhável testar um produto químico pelo odor, porém caso seja necessário, não coloque o frasco sob o nariz. Desloque com a mão, para a sua direção, os vapores que se desprendem do frasco;
24. Se algum produto químico for derramado, lave o local imediatamente;
25. Verifique que os cilindros contendo gases sob pressão estão presos com correntes ou cintas;
26. Consulte o professor antes de fazer qualquer modificação no andamento da experiência e na quantidade de reagentes a serem usados;
27. Caso esteja usando um aparelho pela primeira vez, leia previamente o manual;
28. Não aqueça líquidos inflamáveis em chama direta;
29. Lubrifique tubos de vidro, termômetros, etc, antes de inseri-los em rolhas e proteja sempre as mãos com um pano;
30. Antes de usar qualquer reagente, leia cuidadosamente o rótulo do frasco para ter certeza de que aquele é o reagente desejado;
31. Confira se as conexões e ligações estão seguras antes de iniciar uma reação química;
32. Abra os frascos o mais longe possível do rosto e evite aspirar o ar naquele exato momento.
33. Não use lentes de contato;
34. Apague sempre os bicos de gás que não estiverem em uso;
35. Nunca recolocar no frasco um reagente retirado em excesso e não usado. Ele pode ter sido contaminado;
36. Não armazene substâncias oxidantes próximas de líquidos voláteis e inflamáveis;
37. Dedique especial atenção a qualquer operação que necessite de aquecimento prolongado ou que libere grande quantidade de energia;
38. Cuidado ao aquecer vidro em chama: o vidro quente tem a mesma aparência do frio;
39. Antes de se retirar do laboratório, verifique se não há torneiras (água ou gás) abertas;
40. Desligue todos os aparelhos, deixe todo o equipamento limpo e lave as mãos.





MATERIAIS USADOS EM LABORATÓRIO

01 – Pipetas: é um material de laboratório muito utilizado, e sua função principal é transportar quantidades precisas de material líquido. Existem diversos tipos, como a pipeta graduada, pipeta volumétrica, a pipeta automática e também as micropipetas (para quantidades muito pequenas de líquido). Um tipo de pipeta mais barata é a Pipeta de Pasteur, utilizada geralmente para pingar líquidos em outras substâncias.

As graduações das pipetas e outros instrumentos de laboratório são geralmente gravadas em círculos e semi-círculos de modo a se evitar os fenômenos de paralaxe, pois o olho do observador e a base do menisco devem se situar no mesmo plano (em linha reta), nem muito abaixo e nem muito acima do olho do observador. Quando o líquido usado for colorido, o observador deve fazer coincidir com o ponto zero o menisco superior.

02 – Balões volumétricos: São balões de fundo chato, gargalo comprido, calibrados para conter determinado volume líquido. São providos de rolhas esmerilhadas ou então necessitam de adaptação de uma rolha própria. O traço de referência marcando o volume para o qual o balão foi calibrado é gravado sob a forma de uma linha circular, de modo que, por ocasião da observação, o plano tangente à superfície inferior do menisco coincida obrigatoriamente com a linha circular, lendo em posição que evite o caso de paralaxe. Não devem sofrer aquecimento ou resfriamento brusco e prolongado para não alterar a graduação.

03 – Cilindros Graduados ou Provetas: São cilindros graduados em milímetros, sendo empregado para medir sem muita precisão. Algumas delas podem apresentar tampas esmerilhadas servindo portanto para que se possa homogeneizar soluções.

04 – Pissetas: São frascos geralmente plásticos, tampados, apresentando um tubo fino que parte de seu interior e terminando em ponta afilada por onde se escoará o líquido de seu interior. É usada para completar volumes líquidos e lavagem de determinados frascos no preparo de soluções.

05 – Erlenmeyer: É um recipiente de vidro fino especialmente preparado para resistir ao aquecimento sem se quebrar. É usado em laboratório para operações tais como: destilações, titulações, acondicionamento e etc.

06 – Béquer: Também chamado de frascos de griffin, são frascos de vidro fino, especialmente resistentes que quando aquecidos não se quebram, pois dilatam-se ao mesmo tempo pela face interna como pela face externa. São usados como recipientes e também para transferência de líquidos.

07 – Tela de amianto: É uma tela de arame que contém no centro um círculo de massa de amianto. Colocada sobre a chama de um bico de gás, distribui uniformemente o calor, evitando que frasco em aquecimento se quebre pela diferente distribuição de aquecimento em seus diversos pontos.

08 – Bico de Bunsen: Para aquecimento em laboratório é o mais utilizado em cuja chama pode-se distinguir, principalmente, duas regiões. A mais externa denominada região oxidante e contém oxigênio por estar em contato com a atmosfera e a mais interna é a região redutora.

09 – Tripé: Para colocar a tela de amianto e o frasco sobre a chama do bico de gás.

10 – Tubos de Ensaio: Os tubos de ensaio são recipientes de vidros cilíndricos, de paredes delgadas, tendo uma de suas extremidades abertas a fim de ser utilizado para comportar pequenas quantidades de determinadas substâncias que servirão para o ensaio da reação. Deve ser manuseado com cuidado, pois há casos em que se necessita levar ao fogo, porque se não colocado como se deve (sem exposição prolongada à chama), poderá se quebrar com relativa facilidade.

11 – Cálice Graduado: São frascos contruídos por um vidro delgado apresentando pé, e a boca alargada com bico, para facilitar a transferência de líquidos. Serve para realizar medidas sendo entretanto estas sem a precisão exata das medidas das pipetas volumétricas.

12 – Funil: Os funis usados em laboratório são de vidro de polietileno possuindo haste curta ou haste longa. Nestes funis será colocado o papel de filtro dobrado, permitindo então a filtração de substâncias em laboratório.

13 – Papel de Filtro: É um papel poroso, que permite a passagem de uma solução, porém, retém os precipitados. O papel de filtro não pode ser utilizado para filtrações que contenham ácidos ou álcalis fortes, pois é atacado por ambos. Nesses casos usa-se algodão de vidro.

Dobra de papel de Filtro e Exemplos de Vidrarias

Se você optar por dobrar manualmente o papel de filtro ou decidir que dobrado de fábrica é melhor para sua aplicação, é hora de pensar na dobra.



Quadrante

- Economia de espaço
- Dobra-se em um cone



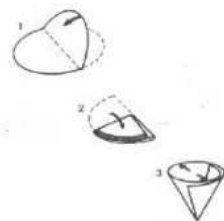
Pirâmide/Cone

- Pronto para ir direto para o funil
- Fácil de desembulhar e raspar o filtrado

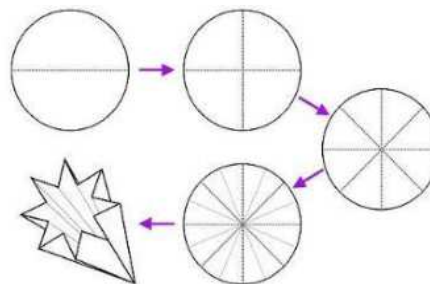


Plissado

- Características de fluxo aprimoradas
- Redução do tempo de infiltração



OU



Exemplos de materiais de laboratório de uso geral



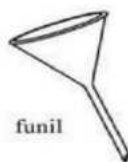
béquer



erlenmeyer



proveta



funil



quitassato



balão volumétrico



bureta



Pipeta volumétrica



Pipeta graduada

**1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Treinar nas manipulações usuais de laboratório
- Aprender a calcular equivalentes
- Conhecer o material do laboratório

2. PROCEDIMENTO**PREPARO DE UMA SOLUÇÃO DE ÁCIDO SULFÚRICO 0,1 N**

1. Calcular a normalidade do ácido sulfúrico original. Produto X

PM = 98,08

D = 1,84

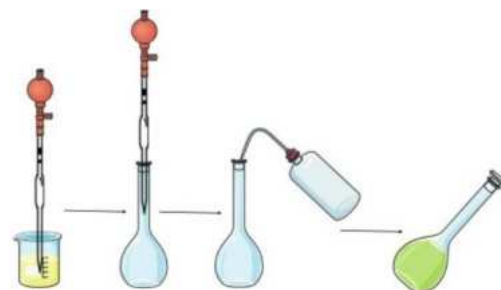
% = 96

$$\frac{D \times \%}{100}$$

$$\frac{1,84 \times 96}{100} = 1,84 \times 0,96 = 1,7664 \text{ g/ml}$$

$$1,7664 \text{ g/ml} = 1766,4 \text{ g/l}$$

$$1766,4 / 49,04 = \mathbf{36 \text{ N}}$$



2. A normalidade acima calculada pode ser colocada no frasco para que você não tenha que fazer o mesmo várias vezes.

3. Como a solução encontrada é 36 N e você quer preparar solução 0,1 N, temos:

$$\frac{36}{0,1} = 360$$

portanto a solução original deve ser diluída 360 vezes.

4. Para preparar 100 ml de solução 0,1 N vamos gastar:

$$1 \times 360$$

$$X \times 100$$

$$X = 0,28 \text{ ml}$$

5. Colocar (± 20 ml) de água destilada no balão volumétrico de 100 ml.

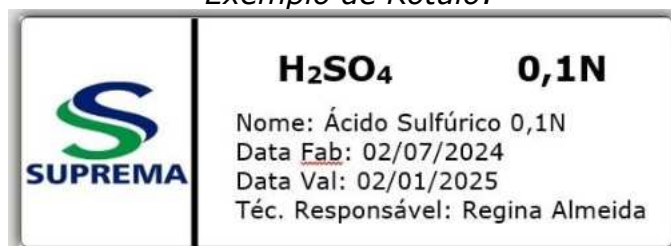
6. Medir o volume calculado usando de preferência, pipetas volumétricas, e colocar sobre a água do balão. Nunca colocar água sobre o ácido porque ela possui menor densidade. A pequena penetração desta sobre o ácido permite rápida liberação de energia, explosivamente.

7. Completar o volume para 100 ml, usando, no final a piseta que evita ultrapassar a marca do balão.

8. Por inversões, misturar o líquido do balão, passando-o depois para o frasco estoque.

9. Fazer o rótulo.

Exemplo de Rótulo:





Relatório Experimental: Preparo de Solução com soluto líquido: Ácido sulfúrico 0,1 N

1. Qual o volume de ácido sulfúrico gasto para preparar 100 ml de solução 0,1 N?

Dados: Pureza: _____ %

Densidade: _____

2. A partir da solução acima, pode-se preparar 500 ml da mesma 0,01 N? Como?

3. Por que se coloca primeiramente no balão volumétrico água destilada e depois o ácido sulfúrico concentrado?

4. Qual o volume deste ácido sulfúrico necessário para o preparo de 500 ml 5 N?

5. No caso da questão anterior, como proceder para:

a) sua dissolução?

b) para sua aferição no balão volumétrico?



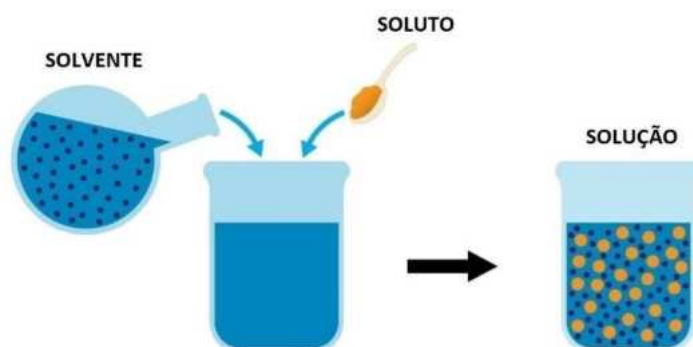
1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Treinar nas manipulações usuais de laboratório
- Aprender a fazer pesagem e soluções sólidas
- Conhecer o material do laboratório

2. PROCEDIMENTO

SOLUÇÃO PADRÃO DE CARBONATO DE SÓDIO 0,5 N

- Calcular a quantidade de carbonato de sódio anidro necessária para preparar 100 ml de solução 0,5 N.
- Com o auxílio da balança tríplice escala pesar exatamente a quantia determinada no item 1.
- Aquecer 50 ml de água destilada, colocando o bequer sobre o tripé e a tela de amianto.
- Retirar o bequer e dissolver o carbonato nesta água, agitando suavemente com um bastão de vidro.
- Depois que todo o carbonato estiver dissolvido (solução límpida) verta o líquido para o balão volumétrico, não se esquecendo de usar o funil e o bastão de vidro.
- Passar água destilada no bequer e verta no balão volumétrico.
- Repita o item 6 duas vezes, usando pequenos volumes de água.
- Complete com água destilada até a marca do balão volumétrico.
- Misture o líquido por inversões.
- Transfira a solução do balão para um frasco previamente rotulado.
- A partir da solução 0,5 N de carbonato de sódio prepare 10 ml de solução 0,05 N do mesmo sal.





Relatório Experimental: Preparo de Solução - Pesagem

1. Qual a massa de Carbonato de sódio anidro gasta para preparar 100ml de solução a 0,5 N?
2. A partir da solução acima, pode-se preparar 100ml da mesma 0,1 N? Como?
3. Por quê se usa balão volumétrico e não proveta no preparo desta solução?
4. Como se verifica o volume da solução no balão volumétrico?
5. Como tornar a solução homogênea?
6. Usa-se somente piseta para completar o volume do balão volumétrico? Por quê?
7. A solução de carbonato de sódio anidro pode ser usada como padrão? Por quê?
8. Como deve ser feito o rótulo?



1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Visa ensinar a preparação do reativo com o qual se demonstra a possibilidade de obter aproximadamente o teor de substâncias redutoras (glicose) na urina.

2. PROCEDIMENTO

Tomar um tubo de ensaio, colocar 1,0 ml de solução de sulfato cúprico a 0,2 N e 1,0 ml de solução de hidróxido de sódio 0,2 N. Observar a formação de um precipitado azul de hidróxido cúprico. Em seguida, ferver diretamente na chama ou em banho Maria fervente, por 2 minutos e observar a formação de um precipitado preto de óxido cúprico, devido à ausência de um estabilizador. **NÃO HOUVE REDUÇÃO.**

O reativo de Benedict é preparado pelo seguinte processo: Colocar em um tubo de ensaio 0,5 ml de sulfato cúprico 0,2 N mais 0,5 ml de água destilada e 2,0 ml de carbonato de sódio 1,0 N. Observar a formação de um precipitado azul. **ACRESCENTAR** 1,0 ml de solução de citrato de sódio a 10% e agitar batendo o tubo levemente, de encontro com a outra mão. O precipitado azul se dissolverá. Aquecer este tubo como anteriormente e observar que o seu conteúdo permanece azul, devido à ação estabilizante do citrato de sódio. Resfriar o tubo. Fazer uso deste reativo acrescentando 1,0 ml de solução de glicose a 1,0%. Misturar. Aquecer como anteriormente, agora por 3 a 5 minutos e observar a redução do Cu^{++} para Cu^+ (Azul para amarelo ao amarelo-tijolo).

TESTES COM REATIVO DE BENEDICT JÁ PRONTO PARA USO:

Num tubo de ensaio colocar 2,0 ml do reativo de Benedict que está na estante e juntar 04 gotas de solução de glicose a 1,0 %. Homogeneizar e aquecer como anteriormente por 3 a 5 minutos. Observar. Houve redução? _____. Repita este teste usando 04 gotas de sua urina e 2,0 ml do reativo de Benedict. Resultado: Após o aquecimento se a cor azul se manteve – **teste negativo** para substâncias redutoras na urina. Se houve desenvolvimento de cor verde ao amarelo ou amarelo-tijolo (alaranjado) – **positivo**.

O reativo de Benedict é ideal para se verificar a capacidade redutora dos glicídios, sendo preparado com uma base fraca (carbonato de sódio) para alcalinizar o meio e o citrato de sódio como estabilizante dos íons cúpricos:

Complexo azul de Cu^{++} + glicídio redutor _____ ► óxido cuproso (CuO - vermelho).

VALORES APROXIMADOS DE GLICOSE NA URINA: Numerar 05 tubos de ensaio de 1 a 5. Colocar em cada destes tubos, 2,0 ml do reativo de Benedict. Em seguida, com o conta-gotas ou com uma pipeta graduada de 2,0 ml acrescentar a **partir do tubo 02:**

Tubo 02 – 0,05 ml (ou 01 gota) de solução de glicose a 1,0%

Tubo 03 – 0,2 ml (ou 04 gotas) de solução de glicose a 1,0%

Tubo 04 – 0,4 ml (ou 08 gotas) de solução de glicose a 1,0%

Tubo 05 – 1,0 ml (ou 20 gotas) de solução de glicose a 1,0%

Tubo 01 – Observar que neste tubo não foi colocada a solução de glicose (glicídio redutor). Este tubo fica como controle (tubo branco). Misturar bem todos os cinco tubos e coloca-los em banho Maria fervente por 3 a 5 minutos.

Findo este tempo, estimar, aproximadamente, a concentração de glicose através de cruzes (+). Assim:

Tubo 01 – controle negativo (ausência de glicosúria)

Tubo 02 – cor correspondente à concentração de glicose de uma cruz (+).

Tubo 03 – cor correspondente à concentração de glicose de duas cruzes (++)

Tubo 04 – cor correspondente à concentração de glicose de três cruzes (+++)

Tubo 05 – cor correspondente à concentração de glicose de quatro cruzes (++++)

Observar que a intensidade da cor após a redução, é proporcional à concentração de glicose (substâncias redutoras) e quando tal fato ocorre com a urina do diabético, é sinal de que a concentração de glicose no seu sangue (glicemia) está acima do seu limiar renal. Entende-se por limiar renal, a concentração sanguínea de determinada substância, acima da qual esta substância aparece na urina, ou seja, é eliminada pelos rins.



Relatório Experimental: Preparo e Aplicação do Reativo de Benedict

1. No primeiro teste, por que houve desenvolvimento de cor escura após o aquecimento?
2. Neste mesmo teste, a cor escura é devida a formação do: _____
3. No reativo de Benedict, qual a função do citrato de sódio?

E do carbonato de sódio?
4. Como podemos verificar um teste de Benedict positivo e negativo?
5. Quais as condições necessárias e indispensáveis para que um glicídio (monose) seja redutor de íons cúpricos?
6. O uso do reativo de Benedict tem alguma importância? Por que?
7. O que é limiar renal para a glicose?
8. Um paciente apresentou limiar renal com uma glicemia de 140 mg/dl. O que isto significa?



REAÇÃO DE MOLISCH-UDRANSKY

1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Serve para identificar substâncias glicídicas (glucídicas). Estas quando desidratadas em presença de ácido sulfúrico concentrado e do Reativo de Molisch, desenvolvem uma coloração violácea, por formação de furfural ou hidroximetilfurfural. As pentoses formam furfural e as hexoses formam hidroximetilfurfural que se condensam com o alfa-naftol ou com o timol, presente no Reativo de Molisch, produzindo a cor violeta.

2. PROCEDIMENTO

Colocar num tubo de ensaio 1,0 ml de solução de glicídio a 2%, acrescentar 1,0 ml de água destilada e 3 gotas do Reativo de Molisch. Homogeneizar. Inclinar o tubo de ensaio e acrescentar pelas suas paredes 1,0 ml de ácido sulfúrico concentrado, sem agitação. Observar o desenvolvimento do anel violáceo entre os dois líquidos.

REAÇÃO DE TAUBER

1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Serve para diferenciar uma pentose de uma hexose. Baseia-se no fato de que as pentoses são as únicas monoses que formam furfural quando aquecidas com ácidos fracos como o ácido acético. Quando aquecido, o furfural se condensa com a anilina contida no Reativo de Tauber produzindo um composto de cor avermelhada.

2. PROCEDIMENTO

Tomar dois tubos de ensaio e adicionar a cada um deles 1,5 ml de ácido acético mais 3,0 gotas do Reativo de Tauber (anilina). Ao primeiro tubo adicionar 1,5 ml de solução de pentose e ao segundo 1,5 ml de solução de hexose. Colocar ambos os tubos em banho maria fervente por 1 a 2 minutos. Observar a coloração avermelhada no tubo contendo pentose. No tubo contendo hexose não haverá alteração na coloração.

REAÇÃO DE SELIWANOFF

1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Destina-se a diferenciação entre **aldose e cetose**. Quando aquecidas com ácido clorídrico presente no Reativo de Seliwanoff, as **cetohexoses (frutose)** produzem furfural que se condensa com o resorcinol do reativo dando uma coloração de tom avermelhado.

O aquecimento prolongado da **aldohexose (glicose)** em meio ácido transforma-a em cetohexose dando teste de Seliwanoff levemente positivo. Também os glúcides (glicídios) que liberam frutose por hidrólise ácida darão teste positivo, como é o caso da sacarose.

2. PROCEDIMENTO

Tomar três tubos de ensaio e colocar em cada um deles, respectivamente, 2,0 ml das soluções de glicídios: glicose, frutose e sacarose. A cada tubo adicionar 2,0 ml do Reativo de Seliwanoff. Colocar em banho maria fervente. Observar a coloração após 2 ou 3 minutos.

REAÇÃO DE BENEDICT:

1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Demonstrar o poder redutor de certos glicídios (carboidratos). O Reativo de Benedict é uma solução de sulfato cúprico em meio alcalino e estabilizado por citrato de sódio. O sulfato cúprico, nestas condições, apresenta cor azul. Quando reduzido a sua cor vai do amarelo esverdeado ao amarelo tijolo, porque o sal cúprico foi reduzido para cuproso ($\text{Cu}^{++} \rightarrow \text{Cu}^{+}$). Os glicídios só são redutores em meio alcalino e a quente. Em meio ácido os glicídios não são redutores.

2. PROCEDIMENTO

Tomar dois tubos de ensaio e colocar em cada um, 2,0 ml do Reativo de Benedict. Ao primeiro juntar 4,0 gotas de glicose a 2% e ao segundo, 4,0 gotas de sacarose a 2%. Aquecer diretamente à chama, com muito cuidado e com técnica, enquanto se observa a mudança de coloração no tubo que está ocorrendo à redução.

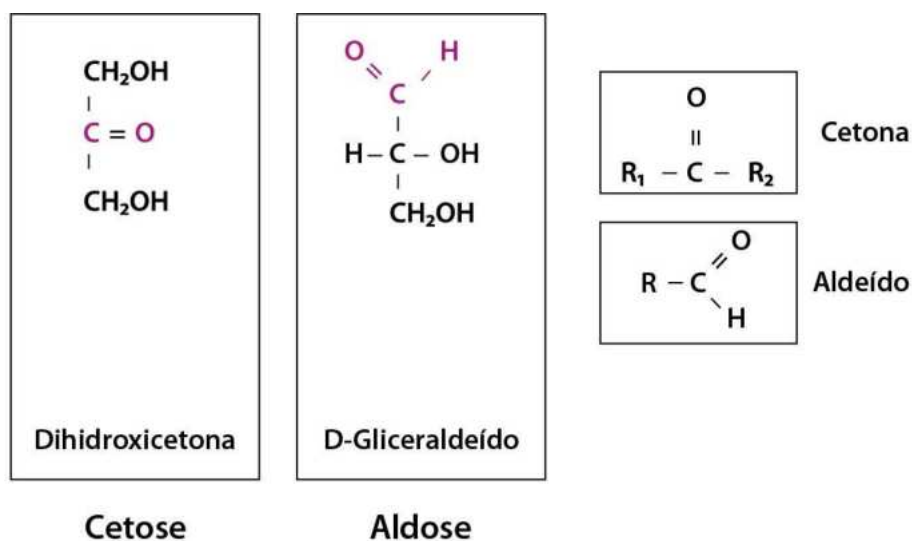
REAÇÃO DO AZUL DE METILENO

1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Demonstrar a ação redutora dos glicídios. O azul de metileno oxidado apresenta cor azul. Quando em meio alcalino a quente e em presença de glicídio redutor, se tornará incolor. Esta redução se dá em ausência de oxigênio. Durante a agitação do tubo de ensaio o oxigênio do ar provoca a oxidação (reoxidação) do azul de metileno que novamente apresentará cor azul.

2. PROCEDIMENTO

Tomar dois tubos de ensaio e colocar no primeiro 0,5 ml de solução de glicose a 2%, no segundo colocar 0,5 ml de solução de sacarose a 2%. Acrescentar aos dois tubos 1,0 ml de solução de hidróxido de sódio a 0,1 N (NaOH 0,1 N). Aquecer diretamente na chama até ebulição. Colocar em ambos os tubos 1,0 ml de solução de azul de metileno a 0,1%. Deixar os tubos em repouso até que a solução se torne incolor. Para promover a reoxidação, agitar o tubo em que houve redução.





Relatório Experimental: Reações de Identificação dos Glicídios

1. Para que serve a reação de Molisch?
2. Qual a ação do ácido sulfúrico na reação de Molisch?
3. Quando podemos dizer que a reação de Molisch é positiva?
4. Todos os glicídios apresentam esta reação positiva?
5. Para que serve a reação de Tauber (anilina)?
6. Quando podemos dizer que a reação de Tauber foi positiva? Porque?
7. Qual reação usada para diferenciar pentose de hexose? E para diferenciar uma aldose de uma hexose?

8. Quais são as condições principais para que um glicídio seja redutor?
9. Por quê a sacarose não é redutora?
10. Por quê na reação do azul de metileno a cor azul reaparece quando se agita o tudo?
11. Qual a finalidade do hidróxido de sódio na reação do azul de metileno com glicídio?
12. Quais componentes do Reativo de Benedict?
13. O Reativo de Benedict serve para pesquisa de glicose de urina?_____, porque a glicose é o que se observa pela mudança de cor do reativo de Benedict de _____para_____comprovando sua positividade.



1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Demonstrar técnicas extrativas para o polissacarídeo usado em larga escala na nossa nutrição.

2. PROCEDIMENTO

Extração: Com auxílio de um raspador (ralo), ralar a batata sobre o papel alumínio. Transferir o resíduo para um erlenmeyer de 150 ml, adicionando a este 100ml de água destilada e agitar vigorosamente tampando o frasco com a mão. Filtrar essa suspensão em gaze ou pano fino para um cálice graduado de 125 ml. Deixar em repouso durante 05 minutos para o amido se depositar no fundo do cálice (depósito branco). Decantar na pia cuidadosamente o líquido sobrenadante, deixando o resíduo formado por grãos de amido.

Exame microscópico: Com auxílio de uma pipeta de 1,0 ml, colher pequena amostra do amido obtido e coloca-la sobre lâmina de vidro para microscópio e mais uma gota de lugol. Cobrir com lamínula. Não deixar secar. Observar ao microscópio as estrias dos grãos de amido. O formato dos grãos permite determinar a origem do amido (banana, mandioca, trigo, batata-doce, etc). Colocar num Becker cerca de 50 ml de água destilada e deixar em aquecimento sobre tela de amianto e bico de Bunsen.



Grãos de amido do tubérculo de *Solanum tuberosum* L. corados com soluto de Lugol e observados ao microscópio óptico. O amido, um polímero complexo constituído por amilose e amilopectina, é sintetizado e armazenado em amiloplastos nas células de parênquima (parênquima amiláceo). Os grãos de amido foram destacados do tubérculo mediante a raspagem com um bisturi, posteriormente colocados entre lâmina e lamela e corados. São visíveis as estrias e o hilo excêntrico em diversos grãos.

Purificação e dissolução do amido: Ressuspender o amido obtido em 10,0 ml de água destilada. Quando a água do Becker estiver em ebulição, adicionar a esta, a suspensão de amido. A adição é feita de em pequenas porções, com agitação constante das duas soluções. A solução é feita a quente, o que permite o rompimento da membrana de celulose que envolve o grão de amido. Resfriar em água corrente.

Identificação do amido: Num tubo de ensaio, colocar 5,0 ml da solução de amido resfriada. Juntar 1 a 2 gotas de lugol. A presença de amido é verificada pelo desenvolvimento de cor azul. Aquecer este tubo diretamente na chama ou em banho Maria fervente e observar o desaparecimento da cor azul. Em seguida, resfriar o tubo e observar o reaparecimento da cor azul. Isto se deve a presença da amilose, que espacialmente, se acha em forma de alfa hélice (mola helicoidal) formada pelas unidades de glicose, permitindo a criação de compostos de inclusão com o iodo do lugol, que nesta condição, apresenta forte absorção de luz, originando a cor azul característica. Com o aquecimento, há dilatação da hélice, desprendendo o iodo (desaparece a cor azul). Com o resfriamento, a hélice volta ao seu estado normal (reaparece a cor azul). Se houver hidrólise do amido, nunca haverá desenvolvimento de cor azul com a adição de lugol (teste do iodo)

Precipitação do amido: Num tubo de ensaio, colocar 1,0 ml da solução resfriada de amido. Juntar 4,0 ml de álcool. Agitar o tubo. Dobrar devidamente o papel de filtro (pregueado), colocar num funil de vidro e filtrar a solução alcoólica de amido para um outro tubo de ensaio. Pesquisar a presença de amido, pelo teste do iodo, tanto no filtrado como no precipitado retido no papel de filtro.

Filtrado:

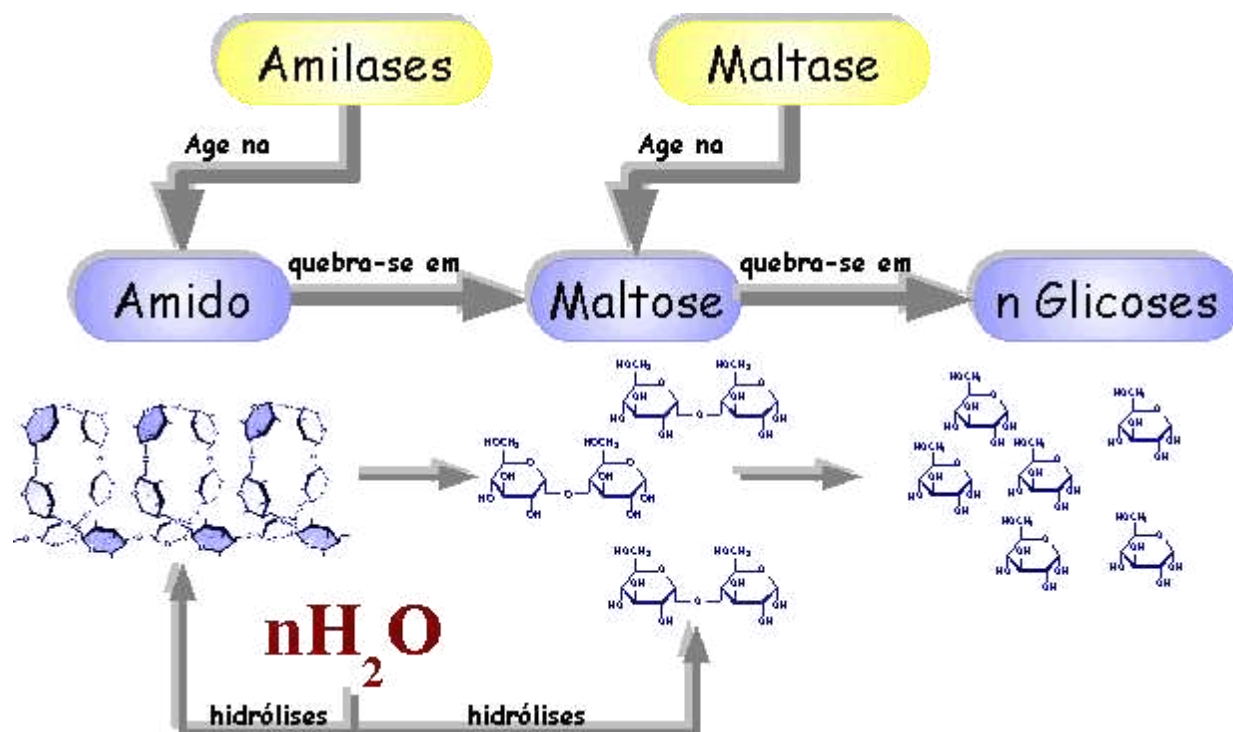
Precipitado:

A filtração permite separar os grãos de amido dos outros tecidos. O álcool, pelo seu poder desidratante, retira a camada de água das micelas de amido, causando a precipitação das mesmas. O amido em solução forma uma solução coloidal.

REPRESENTAÇÃO HELICOIDAL DA AMIOLOSE



DIGESTÃO DO AMIDO





Relatório Experimental: Extração e Caracterização do Amido

1. Para que se faz a decantação?
2. Cada grão de amido possui somente amilose? Explicar.
3. Por que se mistura o amido com água fervente?
4. Como é feito o teste de identificação do amido?
5. Por que aparece coloração azul no teste positivo?
6. Por que a adição do álcool promove a precipitação do colóide de amido?
7. Explicar o desenvolvimento da cor azul da solução de amido com o lugol. O que acontece com seu aquecimento? E se houver hidrólise do amido, como fica o teste com lugol?
8. O que é micela?



1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Demonstrar as fases da hidrólise do amido comparando com a hidrólise verificada no nosso organismo, quando da digestão enzimática (amilase).

2. PROCEDIMENTO

Colocar no erlenmeyer de 150 ou 250 ml, já contendo algumas PÉROLAS DE VIDRO, 50,0 ml da solução de amido e mais 2,0 ml de ácido clorídrico. Homogeneizar bem. Tomar 2 tubos de ensaio e proceder como descrito abaixo:

a) Num tubo pipetar 1,0 ml da mistura do erlenmeyer, juntar 1,0 gota de solução de lugol. Observar a cor azul desenvolvida.

b) No outro tubo pipetar 1,0 ml da mistura do erlenmeyer, **acrescentar 1.0 ml de hidróxido de sódio**, misturar e juntar 2,0 ml do reativo de Benedict. Colocar este tubo em banho de água fervente ou **aquece-lo diretamente na chama, observando a técnica para tal finalidade**. Observar se houve redução.

Tomar o erlenmeyer com a solução restante e iniciar o seu aquecimento. Marcar o tempo e de 5 em 5 minutos retirar 2,0 ml da mesma. Com 1,0 ml fazer o teste com lugol (item "a") e com o outro mililitro, o teste de Benedict (item "b"). **REPOR SEMPRE A ÁGUA DE EVAPORAÇÃO USANDO UMA PISETA**. Proceder desta mesma maneira e acompanhar as diversas fases da hidrólise. Lembrar que o teste de Benedict é realizado a quente, com prévia neutralização do HCl com NaOH.

OBSERVAÇÕES: Para realizar os testes dentro do tempo coloque, previamente, 2,0 ml do reativo de Benedict em 5 tubos de ensaio. Marcar outros 5 tubos para o teste com o lugol. Lembrar de resfriar a solução de amido-HCl antes de colocar a gota de lugol.

Quando a mistura amido-HCl entrar em ebulição, acrescentar mais ou menos 5,0 ml de água destilada de 5 em 5 minutos, para repor a água de evaporação.

As pérolas de vidro ou os caquinhos de porcelana, são acrescentados para evitar o "bumping".

Se for possível utilizar dois bicos de Bunsen: um para aquecer a solução amido-HCl e o outro para o teste de Benedict.

INTERPRETAÇÃO: À medida que ocorrer a hidrólise do amido, a cor azul no teste do lugol, vai desaparecendo surgindo cores diferentes (avermelhado) até chegar ao chamado ponto acromico (cor do lugol). Observar que simultaneamente, o poder redutor aparece devido à liberação de dextrinas, maltoses, isomaltoses e glicoses livres. Ao final todo o amido será hidrolisado em moléculas de glicose.



Relatório Experimental: Hidrólise do Amido

1. Para o teste de Benedict, por que houve adição prévia de hidróxido de sódio à solução de hidrólise?
2. Como explicar o desenvolvimento da cor azul pela adição do lugol ao amido?
3. Qual a importância da reação do lugol e de Benedict na hidrólise do amido?
4. Qual a outra técnica utilizada para se proceder a hidrólise do amido?
5. Durante a hidrólise do amido a prova de Benecdit é intensificada ou enfraquecida? Por que?
6. Idem à anterior, porém em relação à prova do lugol: intensificada ou enfraquecida?_Por que?
7. Que são dextrinas?

**Método: Wohlgemuth****1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

A amilase é um(a) enzima que atua sobre a molécula de amido, hidrolisando as ligações glicosídicas alfa 1-4. A molécula de amido em presença de iodo (solução de lugol), desenvolve uma coloração azul. A medida que a amilase atua, a molécula de amido vai sendo hidrolisada e o desenvolvimento da cor azul vai se atenuando até chegar ao chamado ponto acrômico, isto é, em que os fragmentos da molécula de amido não mais formam complexo corado com o iodo (lugol).

Com uma série de diluições de saliva incubada com o amido, pode-se fazer uma estimativa da atividade amilásica, verificando-se a **diluição mínima** capaz de levar o substrato ao ponto acrômico.

2. PROCEDIMENTO

Lavar a boca com água e colher a saliva colocando sob a língua um algodão levemente embebido em éter etílico. Aguardar a salivagem, colhendo o material em bquer de 50,0 ml. A seguir, diluir a saliva colhida a 1:100 em tampão fosfato pH 6,6, ou seja, pipetar 0,5 ml de saliva para uma proveta de 50,0 ml e completar o volume com a solução tampão fosfato pH 6,6 (pode-se usar no lugar da proveta um balão volumétrico). **Homogeneizar bem.**

Numerar 10 tubos de ensaio de 1 a 10 e colocar em todos eles, 1,5 ml de tampão fosfato pH 6,6 e mais 0,5 ml de cloreto de sódio a 4% (NaCl 4%) para atuar como ativador da amilase. Ao tubo de número 01, adicionar 2,0 ml de saliva diluída a 1:100. **Homogeneizar bem.**

Desta mistura (tubo 01) retirar 2,0 ml transferindo para o tubo de número 02. **Homogeneizar bem.** Transferir 2,0 ml do tubo 02 para o tubo 03.

Homogeneizar bem. Proceder desta mesma forma para os demais tubos até o tubo de número 10, de onde se retiram e se desprezam os 2,0 ml. As diluições em cada tubo são as seguintes:

Tubo 01	1/200
Tubo 02	1/400
Tubo 03	1/800
Tubo 04	1/1.600
Tubo 05	1/3.200
Tubo 06	1/6.400
Tubo 07	1/12.800
Tubo 08	1/25.600
Tubo 09	1/51.200
Tubo 10.....	1/102.400.

Em seguida, adicionar a todos os tubos, 1,0 ml da solução de amido 0,1% (substrato). Homogeneizar bem cada tubo. Levar todos os tubos para banho maria 37-40°C, deixando-os em incubação por 10 minutos. Terminada a incubação, acrescentar a cada tubo 1-2 gotas de solução de lugol, homogeneizar e proceder a leitura.

Leitura em Unidades Wohlgemuth: Corresponde ao tubo de maior fator de diluição no qual a hidrólise do amido a 0,1 % foi completa nas condições experimentais. Significa dizer que mesmo a salivar diluída na proporção de _____ continha amilase suficiente para hidrolisar completamente o amido nas condições experimentais.



Relatório Experimental: Dosagem da Amilase Salivar – Método Wohlgemuth

1. Qual é o substrato para amilase?
2. Por que usou-se solução tampão Ph 6,6?
3. Qual a função do cloreto de sódio?
4. Por que foi utilizado banho Maria a 37-40° C?
5. Por que foi utilizado iodo (solução de lugol)?
6. O que significa a Unidade Wohlgemuth?
7. Qual a enzima encontrada na saliva?



1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Demonstrar a capacidade emulsificante, as propriedades dos sabões sobre as gorduras em geral, assim como demonstrar a presença de determinadas substâncias que se encontram associadas aos lipídios naturais.

2. PROCEDIMENTO

1) Reação de ROSENHEIM: Distinção entre colesterol e estigmaesterol.

Reativos: Solução de colesterol a 0,1% em clorofórmio.
Óleo vegetal (estigmaesterol)
Ácido Sulfúrico

Técnica: Usar dois tubos de ensaio, colocando no primeiro 0,25 ml da solução de colesterol a 0,1% e no segundo 0,25 ml de óleo vegetal. A ambos acrescentar 0,5 ml de ácido Sulfúrico e em seguida 2,0 ml de clorofórmio. Misturar bem. Deixar em repouso por 05 minutos observar.

Interpretação: No tubo contendo colesterol, a camada superior (clorofórmio), permanecerá incolor. No tubo contendo óleo vegetal (estigmaesterol) apresentará coloração amarelo-avermelhada, portanto reação positiva. O ergosterol, presente em fungos (micoesterol), também apresenta esta reação positiva.

2) Reação de LIEBERMANN-BURCHARD:

Reativos: Solução de colesterol 0,1% em clorofórmio.
Óleo vegetal. Anidrido acético.
Ácido sulfúrico concentrado.

Técnica: Usar um tubo de ensaio, colocando 1,0 ml da solução de colesterol a 0,1%.

Acrescentar: **Anidrido acético - 5,0 gotas.**
Ácido sulfúrico concentrado - 1,0 gota
Misturar.

Interpretação: No tubo haverá desenvolvimento de cor verde pela formação do bis-colestadieno monosulfônico (complexo de cor verde), portanto, reação positiva. Esta reação é utilizada na dosagem de colesterol sanguíneo.

3) **EMULSIFICAÇÃO** – Estabilização de uma emulsão.

Reativos: Óleo vegetal
NaOH a 40%
Solução de sabão (sabão líquido)

Técnica: Numerar 03 tubos de ensaio de 1 a 3. Em todos colocar 0,25 ml de óleo vegetal + 2,5 ml de água destilada. Agitar vigorosamente. Ao tubo de número 02 acrescentar 2,5 ml de NaOH a 40%. MISTURAR BEM. Aquecer, **cuidadosamente e com técnica adequada**, diretamente na chama. MISTURAR BEM. Ao tubo de número 03 acrescentar 1,0 ml da solução de sabão ou detergente. Agitar fortemente. Deixar os tubos em repouso e observar.

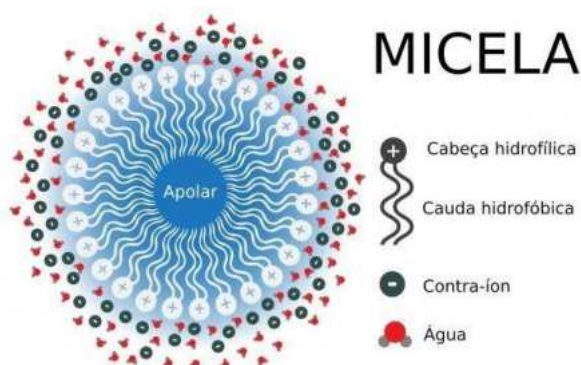
Interpretação: Tubo 01 – Separação de duas camadas (insolubilidade em água).
Tubo 02 – Emulsão estável pela saponificação.
Tubo 03 – Emulsão estável pela detergência dos sabões.

PROPIEDADES DE UM SABÃO:

Reativos: Solução de sabão líquido
Ácido acético concentrado
Cloreto de bário ou de cálcio a 10%
Solução saturada de cloreto de sódio.

Técnica: Marca 03 tubos de ensaio de 01 a 03. Em cada tubo colocar 2,0 ml da solução de sabão. Ao tubo de número 01 colocar de 3 a 5 gotas de ácido acético concentrado, observando a formação de um precipitado branco. Ao tubo de número 02, juntar 1,0 ml da solução de cloreto de bário ou cálcio. Ao terceiro tubo, juntar 1,0 ml da solução saturada de cloreto de sódio.

Interpretação: Os tubos apresentam precipitado de natureza diferente. No tubo 01, com a acidificação, o sabão solúvel foi transformado em ácidos graxos insolúveis em água + acetato de sódio ou potássio. No tubo 02, o sabão de sódio ou potássio foi transformado em sabão de bário ou cálcio insolúvel em água. No tubo 03, o sabão de sódio ou potássio foi precipitado por excesso de eletrólitos (retirada de água).



LÍPIDIOS



Relatório Experimental: Lipídios

1. Para que serve e qual a importância da reação de Liebermann-Burchard?
2. O que é um sabão? Qual a diferença de um detergente?
3. Por que o sabão de bário, cálcio ou magnésio não espumam, não têm detergência?
4. Explicar a detergência dos sabões.
5. O colesterol está presente nos óleos vegetais? Por que?
6. O que é soro lipêmico?
7. Os lipídios no nosso organismo só apresentam propriedades geradoras de doenças? Por que?
8. Qual o papel dos sais biliares na digestão dos lipídios?



1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O leite é o único material elaborado especificamente como alimento para mamíferos, após o nascimento, e é nutricionalmente um alimento natural quase completo. Nele encontramos proteínas, lipídios, glicídios, vitaminas e sais minerais.

Quando recente apresenta pH 6,6. A pequena acidez deve-se provavelmente aos fosfatos presentes. Fosfatos, citrato, bicarbonato e proteínas conferem-lhe propriedades tamponadoras. Quando deixado sem esterilização por períodos mais ou menos longos, se azeda; pois as bactérias fermentam a lactose produzindo ácido lático. O ácido lático baixando o pH promove a precipitação da caseína (uma das proteínas).

Nesta prática demonstra-se: a precipitação da caseína, a separação das proteínas do leite e a existência de outros fatores nutricionais.

2. PROCEDIMENTO

1) Precipitação isoeletrica da Caseína: Colocar 50,0 ml de leite em um béquer de 250 ml e aquecer diretamente na chama até mais ou menos 50° C (mornar). Com uma pipeta de 1 ml, adicionar de 6 a 8 gotas (no máximo 0,2 ml) de ácido acético concentrado agitando com um bastão de vidro ou por rotação do béquer até o leite coagular. Filtrar lentamente em algodão e guardar o filtrado. O coágulo retido pelo algodão é a proteína chamada caseína. No filtrado (soro) também existem proteínas, as quais podem ser pesquisadas pelo reativo do Biureto, pelo seguinte processo: Colocar num tubo de ensaio 2,0 ml do reativo do Biureto e 2,0 ml do filtrado obtido. A reação será positiva pelo aparecimento de coloração violácea.

2) Separação da lactalbumina e lactoglobulinas: Colocar o filtrado anteriormente obtido num béquer e acrescentar 2,0 ml de solução de NaOH 2% ou 0,5 N (hidróxido de sódio a 2% ou 0,5 N). Aquecer a seguir, para a lactalbumina e lactoglobulinas se separem como proteínas coaguladas. Filtrar em papel de filtro e separar o filtrado para outras pesquisas. Do mesmo modo, as proteínas contidas no coágulo retido pelo papel de filtro, podem ser pesquisadas pelo reativo do Biureto.

3) Pesquisa de Ferro: A 1,0 ml do filtrado adicionar 3 gotas de ácido nítrico concentrado e 2,0 ml de sulfocianeto de potássio 3 N (KSCN). Será positivo com o aparecimento de coloração rósea ao vermelho. Esta coloração é devida a formação de sulfocianeto férrico - $(Fe(SCN)_3)$. O leite apresenta fraca coloração rósea porque possui pequena concentração de ferro (0,32 mg/dl).

Observação: demonstrativo:

4) Pesquisa de Cálcio: Tomar um tubo de ensaio e colocar 1,0 ml do filtrado juntamente com 0,5 ml de oxalato de amônio a 4%. A formação de precipitado branco de oxalato de cálcio indica a presença de cálcio.

5) Pesquisa de Fosfatos: A 2,0 ml do filtrado acrescentar 1,0 ml de molibdato de amônio a 5%. O aparecimento de cor amarelo-esverdeada indica a presença de fosfatos, pela formação do fosfomolibdato de amônio.

Pesquisa de Lactose (glicídio redutor): Num tubo de ensaio colocar 1,0 ml do filtrado e 2,0 ml do Reativo de Benedict. Aquecer diretamente na chama (observar a técnica) até ebulição. Será positivo se houver redução, isto é se a cor azul do Reativo de Benedict passar para verde, amarelo ou amarelo tijolo.



Relatório Experimental: Identificação e Caracterização dos Componentes do Leite Fatores Nutricionais

1. Para que se adicionou ácido acético concentrado ao leite?
2. Quais as proteínas que se encontram no leite?
3. Na primeira precipitação, qual proteína ficou retida no algodão?
4. No primeiro filtrado, quais as proteínas nele contidas?
5. Na filtração usando o papel de filtro, quais proteínas ficaram nele retidas?
6. O segundo filtrado ainda contém alguma proteína?
7. Como foram realizadas as pesquisas para evidenciar a presença de proteínas nos filtrados obtidos através do algodão e do papel de filtro?
8. Por que o leite se azeda quando deixado sem esterilização por períodos mais ou menos longos?
9. Como ficou evidenciada a presença de Cálcio no Leite?
10. Por que o leite é um alimento nutricionalmente **quase** completo?



1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Mostrar algumas reações dos aminoácidos, das proteínas e a verificação de grupos reagentes constituintes destas estruturas.

2. PROCEDIMENTO

1) REAÇÃO DAS PROTEÍNAS COM O REATIVO DE BIURETO

Colocar em um tubo de ensaio 1,0 ml da solução de proteínas. Acrescentar 2,0 ml do reativo de biureto. Homogeneizar. Observar o desenvolvimento de coloração violácea. A reação é positiva com todas as substâncias que possuam duas ou mais ligações peptídicas. Essa reação tem grande aplicação em análises clínicas na dosagem de proteínas.

2) REAÇÃO XANTOPROTEICA

Num tubo de ensaio colocar: 2,0 ml de solução de proteínas e 0,5 ml de ácido nítrico. Ocorre a formação de um precipitado branco que se torna amarelo por ligeiro aquecimento e finalmente se dissolve, prevalecendo a cor amarela. Juntar 2 a 3 gotas de amônia (hidróxido de amônio) e observar a intensificação da cor.

3) PRECIPITAÇÃO DAS PROTEÍNAS POR SAIS METÁLICOS

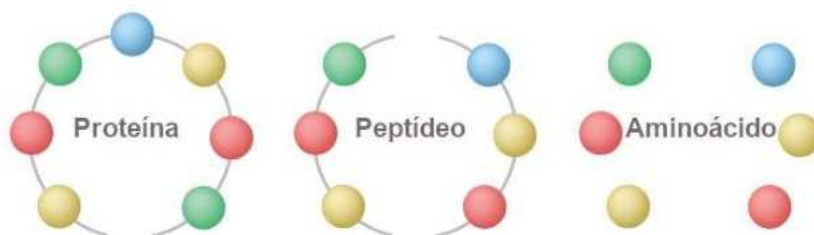
Preparar dois tubos de ensaio. Colocar 2,0 ml de solução de proteínas em cada um deles. Alcalinizar o meio com aproximadamente 2 gotas de amônia. No primeiro tubo colocar duas gotas de cloreto férrico a 2%. Observar o que está acontecendo. Homogeneizar. No segundo tubo colocar 2 gotas de acetato de chumbo a 2%. Observar como no anterior. Homogeneizar. Em ambos os tubos houve a formação de um complexo entre a proteína e os íons de ferro e de chumbo, formando um proteinato insolúvel (precipitado). A ovoalbumina por este motivo é usada como antídoto para envenenamento por ametais pesados.

4) DESNATURAÇÃO PELO CALOR

Num tubo de ensaio colocar 2,0 ml da solução de proteínas e coloca-lo em banho- maria fervente por 3 a 5 minutos. Observar se houve coagulação da proteína.

5) PRECIPITAÇÃO NO PONTO ISOELÉTRICO

Num tubo de ensaio colocar 1,0 ml da solução de proteína, mais 1,0 ml da solução tampão pH = 4,6. Homogeneizar. Observar. Acrescentar 2,0 ml de álcool etílico. Homogeneizar. Observar o desenvolvimento de turvação. Pode-se concluir que o pH = 4,6 corresponde ao pI da proteína usada. O álcool atua como desidratante retirando as camadas de solvatação das moléculas protéicas.





Relatório Experimental: Reações dos Aminoácidos e Proteínas

1. O que é proteína?
2. Por que a reação do biureto é positiva com as proteínas?
3. Explicar a reação xantoproteica e por que a cor foi intensificada em meio alcalino?
4. Por que os sais metálicos precipitam as proteínas?
5. Por que a ovoalbumina ou o leite podem ser usados como antídotos para envenenamento por metais pesados?
6. Por que uma proteína se precipita mais facilmente no ponto isoelétrico (pI)?
7. Na precipitação protéica no pI, qual a função do álcool etílico?
8. O que é a desnaturação protéica? O calor é um agente desnaturante?

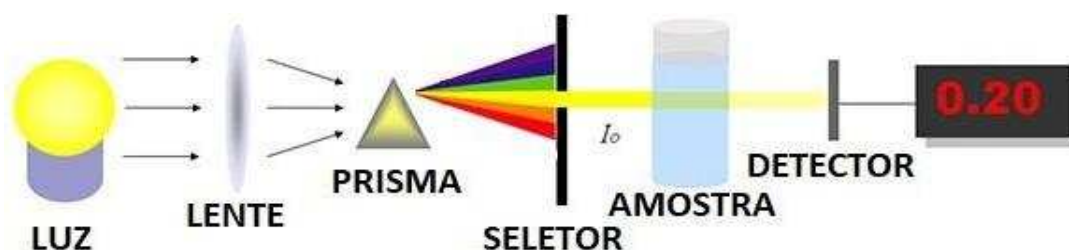


1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em Bioquímica Clínica as dosagens são, na maioria, efetuadas pela medida da quantidade de energia radiante, ou seja, determinações de concentrações de espécies coloridas, baseando-se na absorção da energia radiante. Significa dizer que, quando se usa a espectrofotometria, como processo de medida, basicamente emprega-se as propriedades dos átomos ou moléculas de **absorver e emitir** energia eletromagnética em uma das muitas áreas do espectro eletromagnético.

Fotocolorímetro, Colorímetro fotoelétrico ou Fotômetro de absorção: São aparelhos usados para medir a energia radiante transmitida ou absorvida de uma espécie colorida.

Luz monocromática: A luz branca, natural ou artificial, contém todas as frequências (comprimentos de onda) do espectro visível. É luz policromática ou heterocromática, o que pode ser demonstrado quando essa luz atravessa um prisma de vidro ou quartzo:



Os aparelhos em operação no nosso laboratório possuem tais prismas (monocromadores ou grades de difração) por isso são chamados espectrofotômetros. Há aparelhos que não possuem os referidos prismas. São dotados de filtros especiais que selecionam determinadas faixas espectrais. Por exemplo, o filtro azul, só é transparente às radiações azuis.

As cores fundamentais apresentam as seguintes faixas de comprimento de onda:

Violeta.	400 a 450 nm
Azul.....	450 a 500 nm
Verde.....	500 a 570 nm
Amarelo	570 a 590 nm
Alaranjado.....	590 a 620 nm
Vermelho	620 a 750 nm

Conceitos básicos:

Transmissão: É a relação da intensidade do raio de saída pela entrada de um determinado feixe de luz.

Transmitância: É a relação matemática da transmissão de uma determinada solução pela transmissão de seu branco: $T = \frac{\text{transmissão da solução}}{\text{transmissão do branco}}$.

Absorvância (ou Absorbância): É a propriedade da amostra em absorver a energia radiante, em unidade de absorvância.

Escolha do melhor comprimento de onda (ou do filtro): Escolhe-se o comprimento de onda da luz monocromática, que fique o mais próximo possível da cor complementar da solução a ser lida, observando-se a máxima absorção (absorvância) ou a mínima transmitância:

Com. de onda

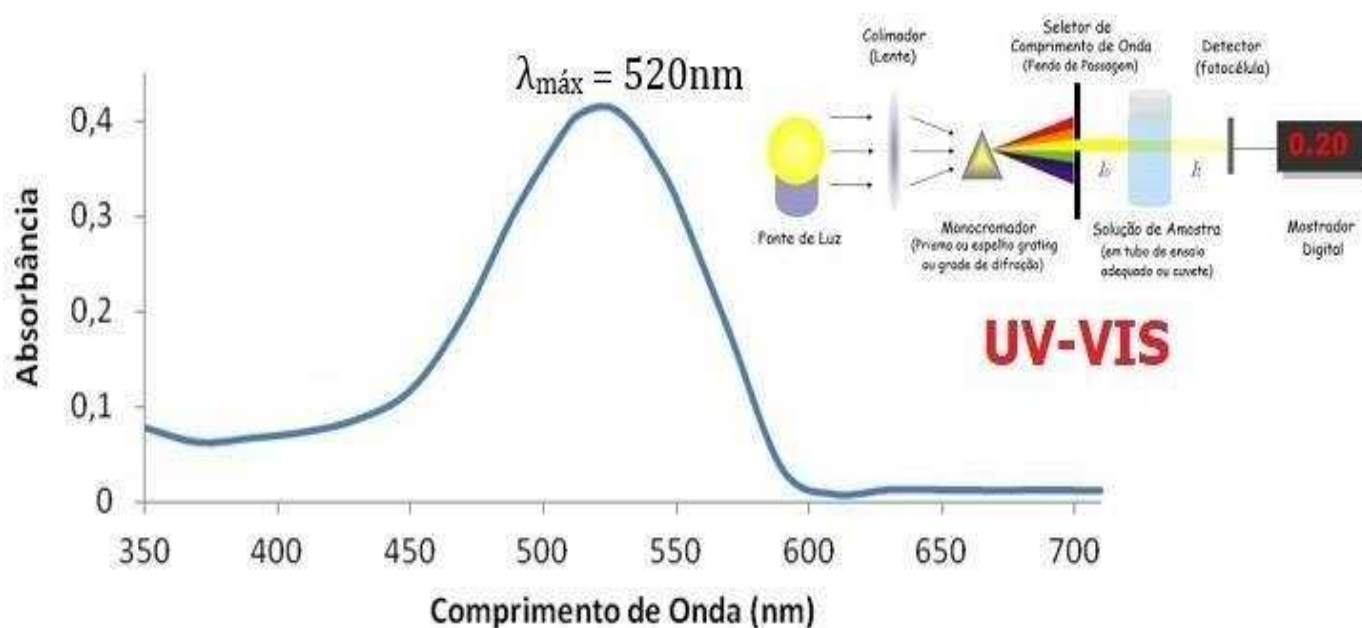
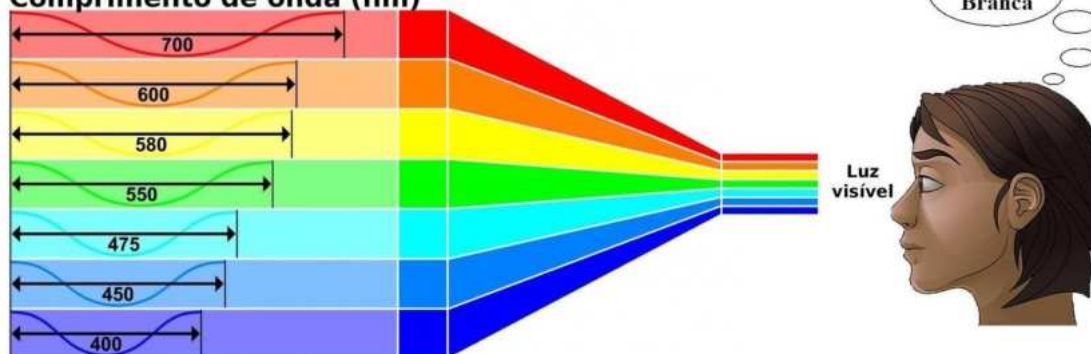
400 a 435 nm
430 a 480nm
480 a 490 nm
490 a 500 nm
500 a 560 nm
560 a 580 nm
580 a 595 nm
595 a 610 nm
610 a 750 nm

cor da luz

violeta
azul
azul esverdeada
verde azulada
verde
verde amarelado
amarelo
laranja
vermelho

cor complementar absorvida

verde-amarelada
amarelo
laranja
vermelho
púrpura
violeta
azul
azul esverdeado
verde azulado

**Informações Extras****Comprimento de onda (nm)**



Relatório Experimental: Colorimetria / Fotometria de Absorção

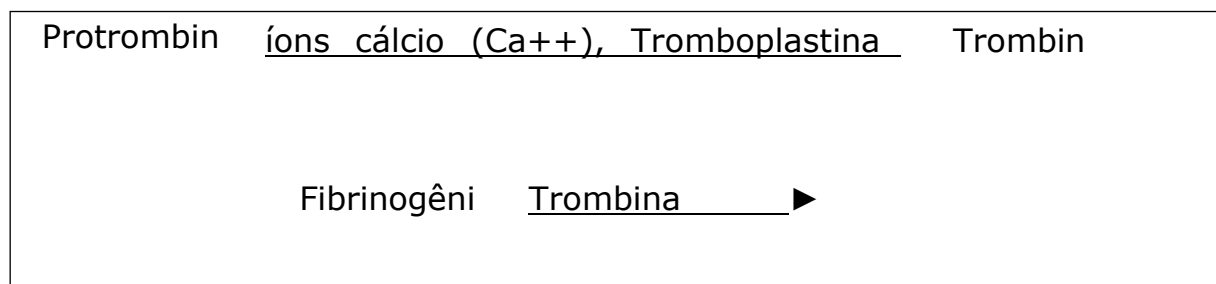
1. O que é um espectrofotômetro?
2. O que é luz monocromática?
3. Em que se fundamenta a colorimetria?
4. Como se acha o melhor comprimento de onda da luz monocromática, ou seja, qual o comprimento de onda ideal para determinada dosagem colorimétrica?
5. O que é absorvância (absorbância)?



ATENÇÃO: Neste experimento utilizaremos material biológico, portanto, **ATENTE-SE** ao passo a passo e manuseie com cuidado e utilizando o EPI durante **TODO O PROCEDIMENTO REALIZADO**. Para a coleta de sangue, **FAVOR PREENCHER E ASSINAR O TERMO LIVRE ESCLARECIDO FORNECIDO PELO PROFESSOR E/OU TÉCNICO DO LABORATÓRIO**.

1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Entende-se como coagulação o fenômeno que ocorre com o sangue, geralmente quando retirado dos vasos sanguíneos; o sangue perde a sua fluidez e forma uma massa gelatinosa, contendo os glóbulos – o coágulo ou trombo –, que se retrai e se endurece ao cabo de certo tempo, deixando exsudar um líquido amarelado – o soro. O sangue humano, em condições técnicas laboratoriais para verificação dessa propriedade, tem um tempo normal que varia de 5 a 10 minutos. A formação do coágulo constitui o mecanismo químico (bioquímico) de defesa contra a hemorragia, mas quando ocorre de modo anormal leva a um estado patológico que se chama trombose. O esquema mais simples das reações bioquímicas envolvidas na coagulação do sangue foi proposto por Morawitz, em 1903:



Portanto:

SORO SANGUÍNEO é a parte líquida do sangue (exsudato) **sem** o fibrinogênio que foi convertido em fibrina ou coágulo.

PLASMA SANGUÍNEO é a parte líquida do sangue (geralmente sangue deve ser obtida após centrifugação) **contendo** o fibrinogênio. Para sua obtenção o sangue deve ser colhido e colocado em presença de anticoagulante, como heparina, EDTA, oxalato de amônio, etc.

SORO/PLASMA LIPÊMICO: É o soro ou plasma que apresenta aspecto leitoso em decorrência do excesso de lipídios (triglicérides), isto é, com excesso de "*quilomicra*". Quilomicron, grosso modo, é uma gota de lipídios envolvida por uma camada de proteína.

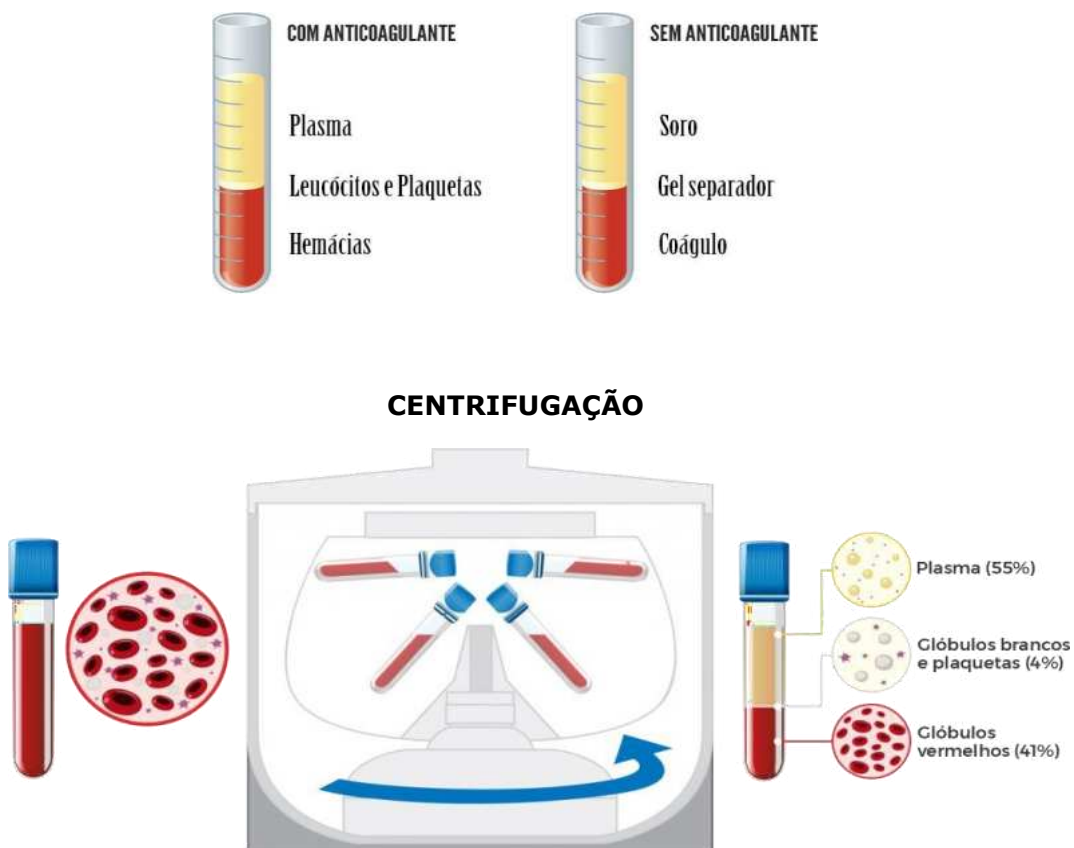
SORO/PLASMA ICTÉRICO: É um estado anormal ou patológico, no qual o soro ou plasma se apresenta de cor amarela intenso em decorrência do excesso de pigmentos biliares (bilirrubina).

SORO/PLASMA HEMOLIZADO: É o soro ou plasma que apresenta cor avermelhada. A hemoglobina é uma proteína intra eritrocitária, portanto não faz parte das proteínas séricas ou plasmáticas. Quando há hemólise, isto é, rompimento das hemácias (ou eritrócitos), a hemoglobina extravasa para o soro ou plasma tornando-o de cor avermelhada. Pode ocorrer dentro do organismo e neste caso indica um estado patológico.

SORO FISIOLÓGICO: É uma solução 0,153 M (molar), equivalente a solução a 0,9 g% de cloreto de sódio (NaCl), isotônico (ou iso osmolar) em relação ao sangue.

2. PROCEDIMENTO

- Marcar três (03) tubos de ensaio (tubos de hemólise) com as letras C, C e S.
- Aos tubos "C", colocar uma (01) gota de anticoagulante (EDTA a 10%).
- Colher, por punção venosa, aproximadamente 3,0 ml de sangue.
- Colocar 1,0 ml de sangue em cada tubo. Os tubos "C" deverão ser homogeneizados suavemente para haver a mistura com o EDTA a 10%.
- Centrifugar todos os tubos, por 05 minutos, a 1500 rpm. Após a centrifugação observar que em todos houve separação do sangue em duas fases, a sólida (corpúscular) e a líquida. No tubo "S" (sem anticoagulante), o sangue está coagulado (não contém fibrinogênio – proteína transformada durante a coagulação), portanto o líquido que começa a exsudar é o ___. Nos tubos "C" (com EDTA 10%) o sangue se mantém líquido, porque o EDTA, um agente quelante, retirou os íons cálcio inibindo as reações enzimáticas da coagulação. O sobrenadante é o _____, pois contém o fibrinogênio.
- Separar os sobrenadantes dos tubos C e juntar em um deles, cerca de 1,5 ml de SORO FISIOLÓGICO e no outro, 1,0 ml de água destilada. Homogeneizar por inversão várias vezes. Centrifugar ambos os tubos a 1500 rpm por 3 a 5 minutos. Observar e explicar o ocorrido.



FIQUE ATENTO

Para aprender a técnica de coleta sanguínea,
consultar a página 65 do Guia de Aulas Práticas



Relatório Experimental: Diferenciação entre Soro e Plásma Sanguíneos

1. Segundo Morawitz (1903), como o sangue se coagula?
2. Qual a característica do sangue coagulado?
3. Quando o sangue pode se coagular?
4. Como explicar a ação anticoagulante do EDTA a 10%?
5. Qual a diferença entre soro e plasma?
6. O que é soro:
Lipêmico? _____
Ictérico? _____
Hemolizado? _____
7. O que é a trombose?
8. No tubo "C" com soro fisiológico, o que aconteceu com as hemácias? Por que?
9. No tubo "C" com água destilada o que aconteceu com as hemácias? Por que?
10. O que ocorre com o sangue após a centrifugação?



ATENÇÃO: Neste experimento utilizaremos material biológico, portanto, **ATENTE-SE** ao passo a passo e manuseie com cuidado e utilizando o EPI durante **TODO O PROCEDIMENTO REALIZADO**. Para a coleta de sangue, **FAVOR PREENCHER E ASSINAR O TERMO LIVRE ESCLARECIDO FORNECIDO PELO PROFESSOR E/OU TÉCNICO DO LABORATÓRIO**.

1) HEMATÓCRITO:

O valor do hematócrito fornece a chamada relação plasma- glóbulos, ou seja, o “quantum” de glóbulos e de plasma existente em determinada quantidade de sangue. Sua determinação é feita, centrifugando- se, em tubo próprio – tubo de Wintrobe – uma amostra de sangue e medindo- se o volume ocupado pela fração globular.

Técnica: Homogeneizar o sangue por inversão. Com auxílio de uma seringa de 3,0 ou 5,0 ml conectada a uma agulha própria para hematócrito, aspirar o sangue. Introduzir a agulha até ao fundo do tubo de Wintrobe. Soltar o sangue lentamente suspendendo a agulha à medida que se solta o sangue. Aferir o menisco na marca zero do tubo. Identifica-lo. Centrifugar a 3.000 rpm por 30 minutos. Após a centrifugação, ler o volume ocupado pelos eritrócitos, expressando o resultado em ml/dl ou porcentagem (%). Quando se faz o **micro- hematócrito**, o procedimento é o seguinte: Homogeneizar o sangue por inversão. Encher, por capilaridade, o tubo capilar de vidro, próprio para microhematócrito. Limpa-lo por fora, com algodão ou gaze. Fechar uma de suas extremidades pelo calor (bico de Bunsen) ou pelo uso de massa. Identifica-lo pela numeração gravada na coroa do centrifugador específico para micro-hematócrito. Colocar adequadamente a tampa da coroa e centrifugar por 5,0 minutos.

Interpretação: Os valores normais para o hematócrito, variam em média, entre 40-54% (ml/dl) no homem e 37-47%(ml/dl) na mulher. Um hematócrito de 45% (ml/dl), significa que, em 100 ml de sangue, 45 são ocupados pelos glóbulos vermelhos (eritrócitos ou hemácias) e 55 pelo plasma. Em hematologia, seus dados são utilizados, entre outros fins, para se calcular os índices hematimétricos, classificando as anemias em macro e microcíticas. É de grande valia também em certas condições, como queimaduras, desidratação, insuficiência cardíaca e pulmonar, além de outras.

2) HEMATIMETRIA:

Será feita em aparelho automático. O sangue é homogeneizado por inversão e sua diluição é feita em aparelho próprio na posição RBC. (Normais: Homens = 4.5 a 6.000.000/mm cúbicos e nas mulheres de 4.0 a 5.500.000/mm cúbicos).

3) HEMOGLOBINEMIA:

Será feita também no aparelho automático, que nos dará também a contagem global de leucócitos (glóbulos brancos). As hemácias (eritrócitos) são hemolizados pela adição de um reagente próprio que acompanha o aparelho (contador automático) dando origem a cianohemoglobina cuja cor é lida colorimétrica e automaticamente pelo referido equipamento. O valores normais são: Homens de 13,00 a 18,00 g/dl e mulheres de 12,00 a 16,00 g/dl.

4) **CÁLCULO DOS INDICES HEMATIMÉTRICOS (Determinações absolutas):**

VCM ou VGM, é o volume corpuscular ou globular médio. Expressa o volume dos eritrócitos em micra cúbicos ou fentolitros (fl):

$$\text{VGM} = \frac{\text{HTC} \times 100}{\text{Htm}}$$

Htm. (Normal: 80 a 94 fl)

HCM ou HGM, hemoglobina corpuscular ou globular média. É o conteúdo hemoglobínico de um eritrócito expresso em micromicrogramas ou picogramas (pg).

$$\text{HGM} = \frac{\text{Hb g/dl} \times 100}{\text{Htm}}$$

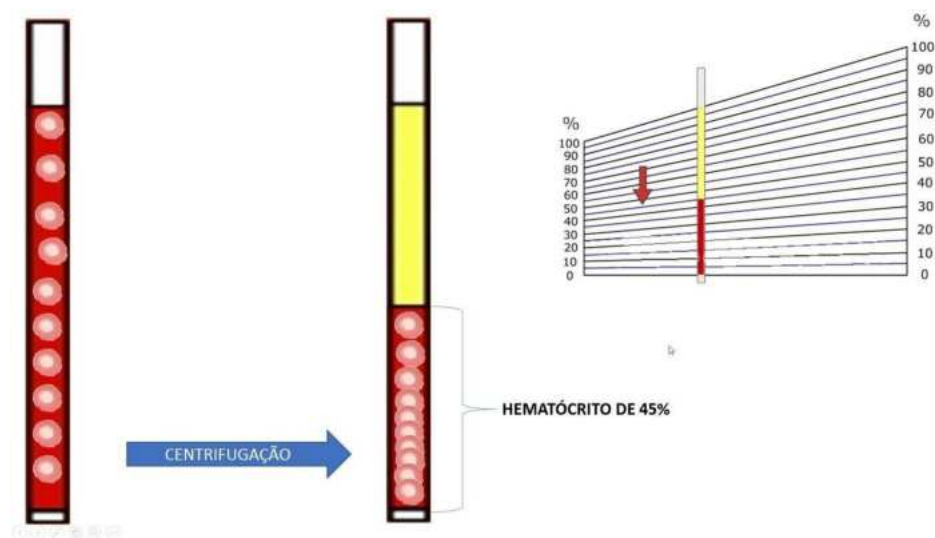
Htm. (Normal : 27 a 32 pg)

CHCM ou CHGM, concentração da hemoglobina corpuscular ou globular média. Expressa a porcentagem (%) de hemoglobina, por unidade de volume.

$$\text{CHGM} = \frac{\text{Hb g/dl} \times 100}{\text{Htc}}$$

Htc. (Normal: 32 a 36%)

Htc = hematócrito, Htm = hematimetria e Hb g/dl = hemoglobinemia em g/dl





Relatório Experimental: Índices Hematimétricos

1. Qual informação nos fornece o hematócrito?
2. O que é a hemoglobina?
3. Qual a localização da hemoglobina no nosso organismo?
4. Podemos fazer a hematimetria (Htm) com sangue hemolizado? Por quê?
5. Para que servem os cálculos dos índices hematimétricos?
6. Como podemos verificar se um paciente está com anemia microcítica ou macrocítica?
7. Por quê o uso de solução de EDTA na colheita do sangue para esta prática?
8. Um paciente apresentou os seguintes resultados: $Htm = 4.500.000/\text{mm}^3$. $Htc = 38\%$ (ml/dl) e Hemoglobinemias = 13,08 g/dl. Calcular seus índices hematimétricos.

EXPERIMENTO 14 Glicemia e Curva Glicêmica



ATENÇÃO: Neste experimento utilizaremos material biológico, portanto, **ATENTE-SE ao passo a passo e manuseie com cuidado e utilizando o EPI durante TODO O PROCEDIMENTO REALIZADO. Para a coleta de sangue, FAVOR PREENCHER E ASSINAR O TERMO LIVRE ESCLARECIDO FORNECIDO PELO PROFESSOR E/OU TÉCNICO DO LABORATÓRIO.**

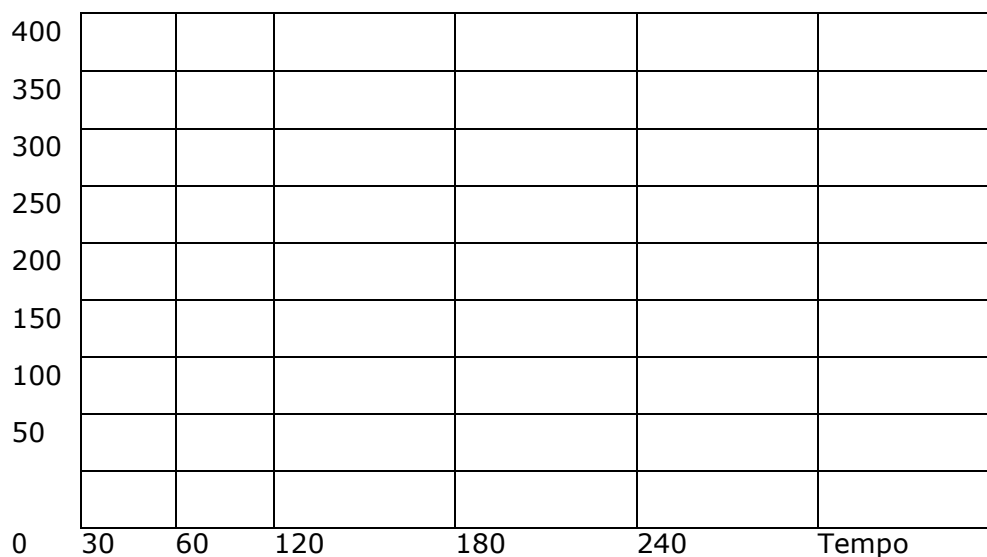
1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A curva glicêmica ou curva de tolerância à glicose é como o próprio nome indica, uma prova de função endócrina do pâncreas, empregando-se a glicose. Durante a prova o paciente deve ficar em repouso total, não fumar, afastar qualquer tipo de emoção e não ingerir alimento algum.

2. PROCEDIMENTO

Pesar o paciente. Colher seu sangue por punção venosa e sua urina de jejum. Administrar-lhe glicose na proporção de 1,5g desta por quilo de peso corporal (1,5g/Kg) dissolvidos em cerca de 250 ml de água filtrada. Marcar o tempo. Após 30 minutos da ingestão da glicose colher novas amostras de sangue e urina. Repetir o mesmo aos 60, 120 e 180 minutos, ou mais se necessário. O sangue deve ser colhido em fluoreto de sódio (NaF) ou qualquer outro inibidor da glicólise eritrocitária para a manutenção da teor real da glicose. Pesquisar a glicosúria (presença de glicose na urina) em todas as amostras de urina pelo reativo de Benedict ou pela glico-fita e dosar a glicose no sangue (glicemia) pelo método indicado no Kit a ser usado. Se optar pela pesquisa da glicosúria pelo reativo de Benedict, proceder da seguinte forma: Colocar num tubo de ensaio 2,0 ml do reativo de Benedict mais 4-5 gotas de urina. Ferver diretamente na chama do bico de Bunsen **observando a técnica**. Se houver glicose presente haverá redução do reativo de Benedict, visualizada pela mudança de sua cor azul para amarelo ou amarelo-tijolo.

Interpretação: Em indivíduos normais a glicosúria é negativa em todas as amostras colhidas (limiar renal) enquanto a glicemia de jejum, segundo o método empregado, deverá estar entre 60 a 110 mg/dl, isto é, nível normal. Elevação rápida e máxima dentro de 30 a 60 minutos. Regressão ao normal dentro de 120 minutos, podendo manter ou cair abaixo da taxa de jejum aos 180 minutos. Pode ser solicitado curva prolongada até 240 minutos. Neste caso a glicemia pode ser igual ou um pouco acima daquela obtida aos 180 minutos. Para melhor visão do conjunto, pode-se dispor os resultados em um gráfico, colocando em abscissa os tempos em minutos e os teores de glicose (glicemias) em ordenada. Os diabéticos apresentam tolerância à glicose **diminuída**, enquanto os hipoglicêmicos apresentam tolerância à glicose **aumentada**.



Trace as curvas conforme os dados abaixo. Use para cada curva uma cor diferente. IDENTIFIQUE CADA CURVA.

Curva A: Glicemia de jejum = 85 mg/dl
Aos 30 minutos = 120 mg/dl
Aos 60 minutos = 150 mg/dl
Aos 120 minutos = 80 mg/dl
Aos 180 minutos = 70 mg/dl
Aos 240 minutos = 90 mg/dl

Curva B: Glicemia de jejum = 120 mg/dl
Aos 30 minutos = 150 mg/dl
Aos 60 minutos = 350 mg/dl
Aos 120 minutos = 300 mg/dl
Aos 180 minutos = 250 mg/dl
Aos 240 minutos = 200 mg/dl

Curva C: Glicemia de jejum = 60 mg/dl
30 minutos = 110 mg/dl
Aos 60 minutos = 80 mg/dl
Aos 120 minutos = 60 mg/dl
Aos 180 minutos = 60 mg/dl
Aos 240 minutos = 50 mg/dl

Curva D: Glicemia de jejum = 90 mg/dl
Aos 30 minutos = 110 mg/dl
Aos 60 minutos = 180 mg/dl
Aos 120 minutos = 200 mg/dl
Aos 180 minutos = 250 mg/dl
Aos 240 minutos = 350 mg/dl

Identifique cada curva:

Curva A

Curva B

Curva C

Curva D

COMO FAZER GLICEMIA CAPILAR?



Insira a **tira** no monitor e ele ligará automaticamente



Faça a **punção** no seu dedo com Microlet



Encoste a gotinha de sangue na tira, aguarde **5 segundos** e pronto!



Relatório Experimental: Glicemia e Curva Glicêmica

1. Por que o uso de um inibidor como o fluoreto de sódio (Naf) nas amostras colhidas de sangue?
2. Como fica evidenciada a presença de glicose na urina (glicosúria) pelo reativo de Benedict?
3. Quais as características de uma curva glicêmica de um indivíduo normal ?
4. Por que a curva glicêmica ou de tolerância a glicose é uma prova de função endócrina do pâncreas?
5. O que significa dizer que um paciente apresenta tolerância a glicose diminuída? E aumentada?

EXPERIMENTO 15 Colesterolemia (Dosagem do Colesterol)



ATENÇÃO: Neste experimento utilizaremos material biológico, portanto, **ATENTE-SE** ao passo a passo e manuseie com cuidado e utilizando o EPI durante **TODO O PROCEDIMENTO REALIZADO**. Para a coleta de sangue, **FAVOR PREENCHER E ASSINAR O TERMO LIVRE ESCLARECIDO FORNECIDO PELO PROFESSOR E/OU TÉCNICO DO LABORATÓRIO**.

Método: Bloor modificado.

Material: Soro ou plasma sem hemólise.

Nota: Todo o material a ser utilizado na dosagem, deve estar rigorosamente seco.

1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O colesterol é libertado das proteínas pela adição do reativo de Bloor. A seguir, trata-se o colesterol com anidrido acético e ácido sulfúrico concentrado – Reação de Liebermann-Buchard – dando o desenvolvimento de um complexo de cor verde.

Fases da reação:

COLESTEROL.....▶ 3-5-colestadieno + água

3-5-colestadieno-----▶ 3-5-biscolestadieno-----▶ ácido biscolestadieno
monossulfônico (verde).

2. PROCEDIMENTO

1) DESPROTEINIZAÇÃO: Tomar um béquer de 50,0 ml e colocar: Soro/plasma. 0,1 ml
Reativo de Bloor..... 2,0 ml. Homogeneizar com movimentos circulares, apoiando o béquer na superfície da mesa de trabalho. Com auxílio de uma chapa elétrica ou uma estufa a 70-80°C, evaporar o reativo de Bloor. Depois de **hem seco**, aguardar o béquer resfriar.

2) DISSOLUÇÃO DO COLESTEROL: Ao béquer frio e seco, juntar 5,0 ml de clorofórmio. Homogeneizar bem, com movimentos circulares. Observar que as proteínas desnaturadas ficam aderidas nas paredes do béquer. O colesterol dissolvido não é visualizado.

3) REAÇÃO DE COR: (Reação de Liebermann-Buchard). Ao colesterol dissolvido no clorofórmio, acrescentar:

Anidrido acético - 2,0 ml.

Ácido sulfúrico concentrado - 0,2 ml

Homogeneizar com movimentos circulares como anteriormente.

Levar o béquer para o escuro em banho "maria" frio e aguardar por 10 minutos.

4) LEITURA NO ESPECTROFOTÔMETRO: Fazer as leituras em 650 nm de comprimento de onda (luz vermelha), zerando o aparelho, previamente, com clorofórmio (o mesmo já se encontra na cubeta de cada aparelho).

5) RESULTADO DA CONCENTRAÇÃO EM mg/dl DE COLESTEROL: Multiplicar as leituras em absorvância pelo fator de calibração fornecido pelo Professor.

6) INTERPRETAÇÃO: Está demonstrado que a concentração do colesterol varia com a idade e sexo. Atualmente o preconizado, é uma colesterolemia inferior a 200 mg/dl.

Seu resultado: Leitura em absorvância: _____

Fator de calibração: _____

Colesterolemia: _____ mg/dl.



Relatório Experimental: Colesterolemia (Dosagem do Colesterol)

1. O que é o colesterol?
2. O colesterol é sempre nocivo ao nosso organismo? Explique.
3. Como o colesterol é transportado pelo sangue no nosso organismo?
4. Quais são as três principais classes de lipoproteínas?
5. Qual a importância atribuída a lipoproteína de alta densidade (HDL) e a de baixa densidade (LDL)?
6. O colesterol está presente em todo ser vivo?



ATENÇÃO: Neste experimento utilizaremos material biológico, portanto, **ATENTE-SE** ao passo a passo e manuseie com cuidado e utilizando o EPI durante **TODO O PROCEDIMENTO REALIZADO**. Para a coleta de sangue, **FAVOR PREENCHER E ASSINAR O TERMO LIVRE ESCLARECIDO FORNECIDO PELO PROFESSOR E/OU TÉCNICO DO LABORATÓRIO**.

Material: Soro sanguíneo sem hemólise, onde tem-se a albumina e as globulinas.

1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para a dosagem das proteínas totais (albumina + globulinas), as ligações peptídicas (-HN-CO-) reagem com os íons cúpricos, em meio alcalino, fornecidos pelo Reativo do Biureto, formando um complexo de coloração azul violáceo, cuja absorvância é medida em 540 nm e é diretamente proporcional à concentração de proteínas na amostra. Com base na solubilidade da albumina e globulinas, far-se-á a separação das mesmas pela adição de éter etílico

2. PROCEDIMENTO

No tubo menor, marcado com a letra "D" e provido de rolha de borracha colocar:

Soro sem hemólise 0,2 ml
Sulfato de sódio a 22,6%..... 3,8 ml

Tampar o tubo com a rolha de borracha pressiona-la com o dedo e homogeneizar, lentamente, por inversão, várias vezes. Neste tubo tem-se todas as proteínas séricas precipitadas. A seguir, marcar dois tubos de ensaio com as letras "T" (de totais) e "A" (de albumina). A concentração das globulinas será dada pela diferença entre as proteínas totais e a albumina: $G = T - A$.

No tubo T colocar 1,0 ml da solução de proteínas do tubo D. Deixar o tubo T aguardando. Ao tubo D, juntar 1,5 ml de éter etílico. Tampar como anteriormente e misturar por inversão várias vezes. Destampar o mesmo cuidadosamente e leva-lo para centrifugação a 3000 rpm por 3 a 5 minutos. Com esta operação faz-se a separação das globulinas, que ficaram precipitadas formando um anel sólido entre as camadas de éter e da albumina em solução.

A seguir, pipetar 1,0 ml da fase aquosa (albumina em solução) que está abaixo do anel de globulinas. Para isto, deve-se inclinar o tubo D em mais ou menos 45 graus, até notar o deslocamento do referido anel das paredes do tubo. O anel não deve ser rompido nesta operação. Tampar com o dedo indicar a pipeta de 1,0 ml e introduzi-la rente à parede do tubo passando a mesma por debaixo do anel, sem deixar tocar no fundo do tubo. Retirar o dedo indicador da pipeta e pipetar 1,0 ml da albumina em solução transferindo-o para o tubo que está marcado com a letra A.

Tem-se:

No tubo T – 1,0 ml da solução de proteínas.

No tubo A – 1,0 ml da solução de albumina.

Em cada um destes tubos (T e A), acrescentar 4,0 ml do reativo do biureto.

Homogeneizar bem.

Deixar em repouso por 5 a 10 minutos.

Ler a cor violácea desenvolvida no espectrofotômetro, em 540 nm (luz verde), ajustando o aparelho com tubo "B" (prova em branco) que já se encontra em uma de suas cubetas.

Usar as leituras em absorvância, multiplicando-as pelo fator de correção fornecido pelo Professor, para a conversão em g/dl (gramas por decilitro) de proteínas totais e de albumina.

Lembrar que as globulinas são dadas por diferença.

Valores de referência:

Proteínas Totais.....	6,0 a 8,0 g/dl
Albumina.....	3,5 a 5,0 g/dl
Globulinas	1,4 a 3,2 g/dl
Relação A/G.....	de 1,5 a 3,0

Interpretação: O teste é útil na avaliação diagnóstica das hipoproteinemias, por defeito de síntese protéica (hepatopatias, desnutrição), ou por perda protéica (síndrome nefrótica, enteropatia com perda protéica). As globulinas podem estar elevadas às custas de suas frações alfa-1, alfa-2, beta ou gama, o que pode ser identificado através da eletroforese de proteínas. Por isso, a dosagem isolada da proteína total tem pouco valor clínico, porque a alteração em uma das frações pode ser compensada por alteração de outra fração, como ocorre nas doenças crônicas, em que há diminuição de albumina com aumento de gamaglobulina. Seguindo esse raciocínio, a concentração de proteína total do soro está comumente aumentada em pacientes com desidratação, mieloma múltiplo, macroglobulinemia, lupus eritematoso, artrite reumatóide, infecções crônicas, linfogranuloma, etc. A ALBUMINA, principal componente protéico de um soro humano normal, é uma proteína globular sintetizada pelo fígado. Ela tem diversas funções importantes, como: Transporte de moléculas apolares (hidrofóbicas) como a bilirrubina, ácidos graxos, certos medicamentos, etc. Isto é possível devido à zona hidrofóbica que existe em sua estrutura, sendo essa propriedade utilizada para dosar a albumina pelo método apresentado. Nutrição. Manutenção da pressão osmótica do sangue (pressão oncótica). Havendo lesão hepática ou renal teremos distúrbios que podem levar a quadros de hipoalbuminemia ou hiperalbuminemia. A hiperalbuminemia é mais rara e ocorre quando ocorre perda excessiva de água causando uma hemoconcentração.



Relatório Experimental: Proteínas Totais e Fracionadas (Método Gornall mod.)

1. Pode-se dosar proteínas totais com soro hemolizado? Justifique sua resposta.

2. Por quê a desnutrição pode levar a hipoproteinemia?

3. Por que certas doenças renais e hepáticas podem levar a casos de hipoalbuminemia?

4. É correto dosar proteínas totais e fracionadas usando plasma no lugar de soro? Justifique sua resposta.

5. Por quê na dosagem de proteínas totais foi usado comprimento de onda de 545 nm (luz verde) e para a dosagem da albumina, 630nm (luz vermelha)?

6. Como foi feita a dosagem das globulinas?



ATENÇÃO: Neste experimento utilizaremos material biológico, portanto, **ATENTE-SE** ao passo a passo e manuseie com cuidado e utilizando o EPI durante **TODO O PROCEDIMENTO REALIZADO**. Para a coleta de sangue, **FAVOR PREENCHER E ASSINAR O TERMO LIVRE ESCLARECIDO FORNECIDO PELO PROFESSOR E/OU TÉCNICO DO LABORATÓRIO**.

Método: Marsch e cols. Mod.

Material: soro, plasma ou urina.

Reativos: Diacetilmonoxima (2-3-butanodiona-2-2oxima), tiosemicarbazida e reagente ácido.

1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em meio ácido a diacetilmonoxima é hidrolizada a diacetil ácido. Este reage diretamente com a uréia na presença de íons férricos, formando coloração rósea a vermelho-cereja que é intensificada pela tiosemicarbazida.

Reações:

Diacetilmonoxima + água em meio ácido ----- ► Diacetilácido

Diacetilácido + URÉIA + Fé+++ ----- ► Diacetilácido-uréia.

Diacetilácido-uréia + tiosemicarbazida + Fé+++ ---- ► Complexo de cor rósea a vermelho-cereja

2. PROCEDIMENTO

Marcar um tubo de ensaio e nele colocar:

Reagente de cor.....	2,5 ml
Soro ou plasma.....	0,02 ml

Homogeneizar;

Acrescentar:

Reagente ácido.	2,5 ml
----------------------	--------

Misturar bem. Aquecer em banho-maria fervente por 10 minutos. Resfriar em banho-maria frio. Ler em 530 nm (luz verde) ajustando o aparelho com o tubo BRANCO que se encontra na cubeta de cada aparelho. Converter a leitura T% (transmitância por cento) para absorbância e multiplica-la pelo respectivo fator de calibração, obtendo o resultado em mg/dl de uréia.

Leitura em absorbância: _____ Fator de correção: _____

Resultado: _____ mg/dl de uréia. Significa dizer que em _____ ml de soro ou plasma, existem _____ mg de uréia.

Valores de referencia: De 20 a 40 mg/dl. Em jovens, 15 a 40 mg/dl. Em idosos os valores podem chegar até a 50 mg/dl.

Interpretação:

Valores aumentados:

- a) Causas pré-renais. Deficiência na perfusão dos rins como na insuficiência cardíaca congestiva, na desidratação, choque e diminuição do volume sanguíneo (hemorragias internas). Elevações da uréia ocorrem também por catabolismo protéico elevado, febre, septicemia, stress e queimaduras;
- b) Causas renais: Nefrites, pielonefrites e insuficiência renal aguda ou crônica;
- c) Pós-renais: Obstruções no trato urinário (cálculos, carcinomas ou pólipos).

Valores diminuídos:

Está relacionada com a insuficiência renal grave, aumento da diurese, redução do catabolismo protéico, gravidez normal e em indivíduos submetidos a dietas com baixo teor protéico e alto teor glicídico.



Relatório Experimental: Uréia

1. O que é Ureia?
2. Qual a origem da ureia?
3. A uréia é um catabólico ou metabólito?
4. A uréia só está aumentada em casos patológicos? Porque?
5. Quais os aminoácidos não estruturais importantes na formação da uréia?
6. Porque os sanitários mal lavados apresentam odor amoniacal?



ATENÇÃO: Nesta experiência utilizaremos material biológico, portanto, **ATENTE-SE** ao passo a passo e manuseie com cuidado e utilizando o EPI durante **TODO O PROCEDIMENTO REALIZADO**. Para a coleta da urina, **FAVOR PREENCHER E ASSINAR O TERMO LIVRE ESCLARECIDO FORNECIDO PELO PROFESSOR E/OU TÉCNICO DO LABORATÓRIO**.

1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O exame de urina em laboratório é tido como de rotina, dadas às informações clínicas gerais que pode fornecer.

2. PROCEDIMENTO

Exame macroscópico – Caracteres gerais (Propriedades físicas):

a) **VOLUME:** É da maior importância quando se trata de urina de 24 horas que, no adulto normal, varia em média de 1.200 a 1.800 ml. Deve-se levar em conta que estas cifras são grosseiras, pois o volume urinário de 24 horas varia segundo uma série de fatores.

b) **ODOR:** A urina normal e recém emitida tem cheiro característico, “sui generis”. Se exposta muito tempo, há formação de amoníaco por ação de bactérias, com seu odor típico. Odor fétido pode se dever a infecção do trato urinário principalmente quando a infecção é causada por germes do grupo coli. O cheiro de acetona, ou de frutas pode identificar uma cetose diabética. Alguns alimentos e medicamentos também podem emprestar à urina um odor diferente.

c) **COR:** A urina normal e recém-emitida tem uma coloração que varia do amarelo claro (citrino) ao amarelo-dourado (amarelo âmbar). O aumento da eliminação de bilirrubina produz cores que variam do amarelo-marrom ao verde oliva escuro. A hemoglobina, as porfirinas, alguns alimentos, certas drogas, produzem diferentes tons de vermelho. Preparados vitamínicos contêm flavonas que dão uma cor fluorescente amarelo-esverdeado. Urina de cor escura, marrom escuro ou negra, pode se dever à eliminação de ácido homogentísico (alcaptonúria).

d) **ASPECTO:** A urina normal e recente é transparente. Quando se apresenta turva, mesmo recente, apresenta importância clínica, pois que, habitualmente, pode ser devida a presença de pus, bactérias, sangue ou precipitado de cristais. Às vezes na enfermidade degenerativa tubular ou na quilúria, a turvação da urina é devida à presença de corpúsculos graxos. Em urina de mulher poderá surgir, após a emissão, uma nubécula atribuída à presença de mucinas. Decorridas algumas horas após a emissão, a turvação da urina perde seu significado diagnóstico, ocorrendo precipitação dos colóides protetores pela perda de CO₂, e, conseqüentemente, a facilitação para a precipitação de sais, fosfatos, carbonatos e uratos, que poderão surgir com a mudança de pH, formando grandes depósitos.

e) **DENSIDADE:** (Peso específico). A densidade da urina depende da concentração osmolar, isto é, número de partículas dissolvidas, havendo normalmente estreita relação entre o peso específico e a osmolaridade, resultante da ingestão de alimentos e bebidas, por um lado, e da reabsorção da água e das substâncias dissolvidas, por outro. A medição da densidade é feita com auxílio de areômetro, urodensímetros (pesa urina) e também por “química seca” (fitas reativas). A densidade urinária normalmente varia de 1.015 a 1.025 a +15 °C.

Exame químico qualitativo – (Elementos anormais).

a) **Reação e pH:** No indivíduo normal o pH da urina recente pode variar de 5,0 a 6,5, isto é, reação ácida. Determina-se o pH (reação da urina) com fitas de papel de tornassol. Mergulhar a fita na urina, comparar a cor desenvolvida com a escala de cores que acompanha o produto. Normalmente, o pH da urina recente está compreendido entre 5,0 a 6,5.

b) Pesquisa das proteínas (Proteinúria):

Pipetar para um tubo de ensaio, 1,0 ml do reativo de Robert. Inclinar o mesmo a mais ou menos 45° e com a pipeta na vertical, deixar escoar lentamente 1,0 ml de urina de modo a se perceber a separação dos dois líquidos.

Leitura: Sendo o reativo de Robert um precipitante específico de proteínas, as urinas que apresentarem um anel leitoso floculado entre os dois líquidos, são portadoras de proteínas. A quantidade pode ser expressa em cruces (+, ++, +++, +++) ou simplesmente PRESENTE. Quando não surgir o anel leitoso floculado o resultado é dado como AUSENTE.

c) Pesquisa de glicose (glicosúria): Pipetar para um tubo de ensaio, 2,0 ml do reativo de Benedict e juntar quatro gotas de urina. Homogeneizar. Aquecer cuidadosamente na chama, como agitação constante até a fervura.

Leitura: Se houver redução dos íons Cu^{++} para Cu^{+} haverá também mudança da coloração do reativo de Benedict de azul para verde ao amarelo tijolo, podendo expressar o resultado em cruces. Se não houver alteração na cor azul do reativo de Benedict, o resultado negativo ou AUSENTE. Lembrar que esta reação não é específica para glicose. A especificidade só é conseguida quando se faz a pesquisa com fitas reativas.

d) Corpos cetônicos: Pipetar para um tubo de ensaio 2,0 ml de urina. Acrescentar 4 gotas do reativo de IMBERT. Homogeneizar. Inclinar o tubo em 45° e deixar escorrer, lentamente, pelas paredes do tubo, 0,5 a 1,0 ml de amônia, de modo a se obter a separação dos dois líquidos.

Leitura: Positivo ou presença de corpos cetônicos (acetona) se houver desenvolvimento de um anel roxo na separação dos líquidos. Expressar o resultado conforme a intensidade da cor do anel, do mesmo modo que para a glicose. Será negativo ou ausente em caso contrário.

e) Pigmentos biliares (Prova de Kapsinow): Pipetar para um tubo de ensaio, 2,0 ml de urina e juntar 0,5 ml do reativo de Obermayer. Homogeneizar podendo aquecer ligeiramente.

Leitura: Positivo, se houver desenvolvimento de coloração verde (biliverdina). Expressar o resultado do mesmo modo que para os anteriores, de acordo com a intensidade da cor desenvolvida. Normalmente se encontram vestígios de pigmentos biliares na urina, visto que são produtos de excreção.

f) Escatol: Pipetar para um tubo de ensaio, 1,0 ml de urina, acrescentar 1,0 ml de ácido clorídrico concentrado. Homogeneizar.

Leitura: Em caso positivo haverá desenvolvimento de coloração avermelhada proporcional a quantidade de escatol presente.

g) Indican (Indol): Pipetar para um tubo de ensaio 1,0 ml de urina e 1,0 ml de ácido clorídrico concentrado. Homogeneizar. Juntar 2 gotas de água oxigenada e 0,5 a 1,0 ml de clorofórmio. Homogeneizar bem. Deixar em repouso para que a camada de clorofórmio se separe.

Leitura: Positivo se a camada de clorofórmio adquirir coloração azul, de intensidade proporcional à quantidade de indican presente.

h) Hemoglobina: Pipetar para um tubo de ensaio, 2,0 ml de urina, acrescentar 10 gotas do reagente de Johanessen Mayer. Homogeneizar. Juntar 5 gotas de água oxigenada. Homogeneizar.

Leitura: Positivo, se houver desenvolvimento de cor rósea ao vermelho-cereja. Esta coloração se deve à fenoltaleína, isto é, o reativo de Johanessen Mayer é feito de maneira, que a fenoltaleína nele contida está na forma de anidrido ftálico, incolor em meio alcalino. As oxidases do sangue (intra eritrocíticas) atuam sobre a água oxigenada liberando oxigênio, transformando o anidrido ftálico em fenoltaleína e como o meio está alcalino, há o desenvolvimento da cor típica, proporcional ao teor de hemoglobina.



IMPORTANTE!

A pesquisa destes elementos anormais pode ser feita empregando-se fitas reativas específicas, a chamada “química seca”.

INTERPRETAÇÃO:

Proteínas: Em indivíduo adulto normal, a eliminação protéica é pequena (30 a 50 mg/24 horas) dada à reabsorção provavelmente ao nível do tubo proximal, quantidade que não é revelável pelos reativos habituais. Diversas condições podem ser acompanhadas de proteinúria:

Falsas proteinúrias: mistura com fluxo vaginal, presença de pus ou sangue e proteínas não plasmáticas.

Proteinúrias funcionais: albuminúria ortostática, após exercícios, marchas, emotiva, etc.

Afecções do aparelho renal: a) **Proteinúrias renais:** Glomerulonefrite, nefroses, pielonefrite, tuberculose renal, câncer, hidronefrose, rim policístico, outras.

Proteinúrias extra-renais: Litíase renal (cálculos), processos vesicais, prostáticos e uretrais.

Estados patológicos diversos: Enfermidades metabólicas, queimaduras extensas, febre, afecções circulatórias, intoxicações, cânceres, etc.

Glicose: A presença de glicose na urina (glicosúria), em quantidade suficiente para reduzir o reativo de Benedict, significa condição patológica. Pode ser de origem endócrina (diabete pancreática, hipofisária, supra-renal e tireóidea). Hepatopatias diversas. Stress (emocional, traumatismos, queimaduras, infarto do miocárdio, etc). De origem não hiperglicêmica (gravidez, lactância, diabete renal).

Corpos cetônicos- (cetonúria): A eliminação de corpos cetônicos na urina, acompanha qualquer transtorno em que exista um metabolismo alterado dos carboidratos (glicídios). Quando os lipídios não são totalmente oxidados, (deficiência de glicogênio, diabete, jejum prolongado, doenças crônicas do fígado, etc). Isto se deve, talvez pelo excesso de acetil-CoA e escassez de oxalacetato.

Sais e pigmentos biliares: São encontrados na urina quando há mau funcionamento hepático.

Escatol e Indican: Estão presentes na urina quando há putrefação intestinal intensa, pois neste caso haverá absorção intestinal e conseqüente eliminação urinária. Darão também resultado positivo, na decomposição bacteriana da proteína corpórea (peritonite, febre tifóide, íleo paralítico...).

Hemoglobina: A hemoglobinúria com ausência de hemácias no exame microscópico do sedimento urinário, ocorre quando a hemólise se dá com uma intensidade tal que, a hemoglobina não pode ser transformada totalmente em bilirrubina, como acontece na malária e em certos tipos de envenenamentos. Há casos de hemoglobinúria provocada por hemácias (hematúria) perfeitamente identificáveis na sedimentoscopia. A hematúria pode ocorrer principalmente por: distúrbios renais (pielonefrites, nefrite aguda e crônica, nefrose, tuberculose renal, enfarte renal, cálculos renais, tumores de bexiga, da próstata e outros).



Relatório Experimental: Elementos Anormais e Sedimentoscopia

1. Porque o pH da urina é geralmente ácido?
2. Porque o reativo de Benedict serve para a pesquisa de glicosúria? Esta reação é específica para glicose? Justifique.
3. Na falta do reativo de Robert e da fita, como podemos pesquisar a presença de proteína na urina?
4. Em proteinúria positivas, qual proteína é mais comumente encontrada? Porque?
5. Explicar a formação de cor na pesquisa de hemoglobinúria positiva pelo reativo de Johanessen Mayer
6. Como explicar a presença de indican (indol) e escatol na urina?
7. Porque é normal a presença de vestígio de pigmentos biliares na urina?
8. Por que em jejum prolongado podem-se encontrar corpos cetônicos (acetona) na urina?
9. Por que este exame é de grande importância?

EXPERIMENTO 19 Noções sobre metabolismo e dosagem da Bilirrubina



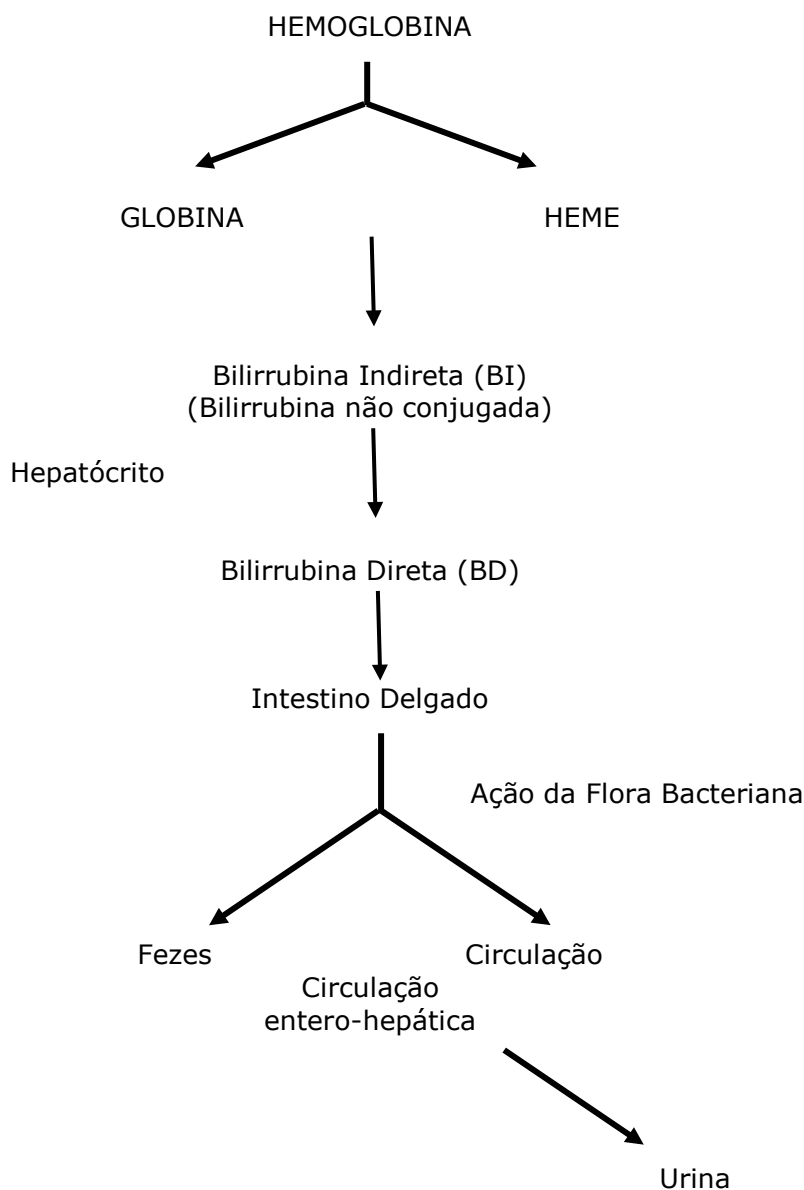
ATENÇÃO: Nesta experimento utilizaremos material biológico, portanto, ATENTE-SE ao passo a passo e manuseie com cuidado e utilizando o EPI durante TODO O PROCEDIMENTO REALIZADO. Para a coleta de sangue, FAVOR PREENCHER E ASSINAR O TERMO LIVRE ESCLARECIDO FORNECIDO PELO PROFESSOR E/OU TÉCNICO DO LABORATÓRIO.

1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A dosagem de bilirrubina faz-se importante, para identificar os diversos tipos de icterícia encontrados no meio clínico, bem como suas possíveis causas.

Icterícia é um estado patológico que se caracteriza por qualquer situação que leve acúmulo ou elevação de pigmentos biliares (bilirrubinas) no organismo.

Síntese da Bilirrubina



Dosagem da Bilirrubina

A bilirrubina é tratada com o reativo de Erlich (nitrito de sódio + ácido sulfanílico em solução aquosa de ácido clorídrico), dando a chamada reação de Van den Berg. Em outras palavras, trata-se da formação da azobilirrubina de cor violeta-avermelhada que pode ser medida colorimetricamente em 525nm, (luz verde). A reação de Van den Berg **direta** é aquela que ocorre com a bilirrubina direta, isto é, a bilirrubina *conjugada* no fígado com o ácido glicurônico, portanto *hidrossolúvel*. A reação de Van den Berg *indireta* ocorre com a bilirrubina indireta (lipossolúvel), por que ainda *não foi conjugada* no fígado com o ácido glicurônico, dando uma reação tardia, isto é, somente depois de solubilizar em metanol.

2. PROCEDIMENTO

Diluir o soro (1,0ml) que já está no tubo marcado com a letra D com 9,0 ml de água destilada. Tampá-lo com a rolha de borracha e misturar por invasão, comprimindo bem a rolha com o dedo indicador. À parte, no tubo de ensaio marcado com a letra R, preparar o Diazo Reagente (Diazo R) da seguinte maneira:

Diazo B – 1 Gota
Diazo A – 5,0 ml

Hemogeneizar bem, agitando levemente o tubo.

Numerar 04 tubos de ensaio de 1 a 4, e em todos eles colocar 2,0 ml de soro diluído 1:10 que esta no tubo.

Aos tubos 1 e 3, acrescentar 0,5 ml de DIAZO BRANCO

Aos tubos 2 e 4, acrescentar 0,5 de DIAZO R

Aos tubos 1 e 2 acrescentar água destilada

Aos tubos 3 e 4, acrescentar 2,5 ml de metanol

TUBOS	SORO 1:10	DIAZO R	DIAZO BRANCO	AGUA	METANOL
1	2,0		0,5 ml	2,5 ml	
2	2,0	0,5 ml		2,5 ml	
3	2,0		0,5 ml		2,5 ml
4	2,0	0,5 ml			2,5 ml

Homogeneizar bem, agitando levemente cada tubo. Deixar em repouso por 10 minutos. Após este tempo ler no espectrofotometro, em 525nm, ajustando o aparelho com o tubo numero 01 e ler a cor desenvolvida no tubo 02. Ajustar novamente o aparelho com o tubo numero 03 e ler a cor desenvolvida no tubo 04. As leituras, em absorvancia, dos tubos 02 e 04 são convertidas em mg/dl (miligramas por decilitro) de bilirubina, quando multiplicadas pelo fato de calibração:

_____ (fornecido pelo professor). A bilirrubina indireta é dada pela diferença entre a total e a direta.

Valores de Referência:

Bilirrubina direta.....	até 0,4 mg/dl
Bilirrubina indireta.....	0,1 a 0,6 mg/dl
Bilirrubina Total.....	0,2 a 1,0 mg/dl

TIPOS DE ICTERÍCIA:

1) Icterícia hepatocelular (aumento da BD – Bilirrubina Direta) – Neste tipo de icterícia, o hepatócito não está em seu estado normal, está “doente”. O primeiro a ser lesado é o polo biliar (polo que comunica o hepatócito com o canalículo biliar), com isto, o hepatócito não consegue eliminar a BD que acaba refluindo para a corrente sanguínea. Por isso, neste tipo de icterícia há um aumento da BD do sangue. É o que ocorre na hepatite. Há também excreção de bilirrubina pela urina, pois a BD sendo conjugada com o ácido glicurônico torna-se hidrossolúvel (consegue passar pelos rins, conferindo à urina cor escura (cor de coca-cola) situação que é chamada colúria. A BI (Bilirrubina Indireta) não é excretada pela urina, pois ainda não foi conjugada, ficando portanto lipossolúvel, com afinidade pelo sistema nervoso central. Seu transporte na circulação é feito pela ligação com proteínas séricas, como é o caso da albumina até os sinusóides hepáticos, onde é captada pelos hepatócitos para a conjugação (glicuronidase). Neste tipo de icterícia duas enzimas são também liberadas pelo hepatócito, além da BD: são as transaminases (TGP – Transaminase Glutâmico – pirúvica ou ALT – Alanina aminotransferase e a TGO – transaminase glutâmico-oxalacética ou AST – aspartato aminotransferase).

2) Icterícia hemolítica (aumento da BI – Bilirrubina Indireta) – Neste tipo, há uma hemólise acentuada, consequentemente o aumento de hemoglobina livre que será convertida em bilirrubina indireta numa quantidade bem acima da capacidade de conjugação pelo fígado. Exemplo: eritoblastose fetal, anemia falciforme, malária e etc.

3) Icterícia obstrutiva (Colestase – aumento da BD, bilirrubina direta) – Divide-se em dois tipos, de acordo com o local da obstrução: **Obstrutiva intra-hepática** onde a obstrução ocorre em nível de canalículos biliares. **Obstrutiva extra-hepática**, onde a obstrução está nos grandes ductos. Em todas as duas situações o hepatócito consegue conjugar a bilirrubina indireta para bilirrubina direta. Consegue também excretar a BD, porém esta não chega ao intestino delgado devido à obstrução existente. Esta BD acaba por ser absorvida pela corrente sanguínea. Por isso, neste tipo de icterícia há um aumento da BD na circulação, além de duas enzimas importantes: a fosfatase alcalina e a gama glutamil transferase.

4) Outras formas de descrição de causas de icterícia – aumento da oferta; alteração no transporte; alteração na captação; alteração na conjugação; deficiência de excreção e outros mecanismos.



Relatório Experimental: Noções sobre metabolismo e dosagem da Bilirrubina

1. A bilirrubina é um metabólito ou um catabólito?
2. Qual é a sua origem?
3. Qual a função do fígado no metabolismo da bilirrubina?
4. O que é icterícia?
5. O que é bilirrubina direta e indireta?
6. Por que a bilirrubina direta consegue passar pelo rim e ser excretada pela urina (colúria)?
7. Na icterícia obstrutiva como deve estar a concentração das bilirrubinas:
 - a) Bilirrubina total? _____
 - b) Bilirrubina direta? _____
 - c) Bilirrubina indireta? _____

Justifique as suas respostas.

8. Quais são os valores de referência para as bilirrubinas (valores normais)?

- a) Bilirrubina direta: _____mg/dl
- b) Bilirrubina indireta: _____mg/dl
- c) Bilirrubina total: _____mg/dl

9. O que é icterícia hepatocelular e qual bilirrubina está elevada?

10. O que é icterícia hemolítica e em que condição pode ocorrer? Qual bilirrubina está mais elevada?

Técnica de Coleta Sanguínea



ATENÇÃO: Neste experimento utilizaremos material biológico, portanto, **ATENTE-SE** ao passo a passo e manuseie com cuidado e utilizando o EPI durante **TODO O PROCEDIMENTO REALIZADO**. Para a coleta de sangue, **FAVOR PREENCHER E ASSINAR O TERMO LIVRE ESCLARECIDO FORNECIDO PELO PROFESSOR E/OU TÉCNICO DO LABORATÓRIO**.

Procedimentos de Coleta Sanguínea - Manual do Ministério da Saúde

1. Preparar o formulário ou solicitação de coleta – A solicitação deve conter as seguintes informações:
 - Nome completo do paciente e data de nascimento / idade.
 - Nome do médico solicitante.
 - Número de identificação.
 - Data e hora da coleta.
 - Testes solicitados.
2. Identificar o paciente. Higienizar as mãos.
 - O flebotomista deve identificar-se ao paciente.
 - Perguntar o nome do paciente conferindo com a solicitação. No caso de crianças ou pacientes inconscientes, perguntar ao acompanhante ou verificar o bracelete de identificação.
 - Se o paciente estiver dormindo, deve ser acordado para a coleta. Atentar para movimentos involuntários em pacientes inconscientes ou semi-comatosos. Aconselha-se alguma contenção para a coleta.
3. Verificar a condição de jejum, restrições alimentares, hipersensibilidade ao látex ou ao antisséptico.
 - Verificar se o paciente está em jejum e/ou obedeceu às restrições alimentares necessárias aos testes.
 - Certifique-se que o paciente entenda suas perguntas.
4. Selecionar os tubos, agulhas e demais materiais necessários à coleta.
 - Examinar tubos e agulhas para possíveis defeitos verificando o prazo de validade.
 - Selecionar o calibre da agulha para a coleta de acordo com a necessidade.
 - Selecionar o sistema de coleta. Tubos a vácuo ou seringa.
 - Os sistemas a vácuo são preferíveis pois dispensam a transferência do sangue para os recipientes e garantem a relação aditivo / amostra.
5. Identificar os tubos ou conferir a identificação.
6. Posicionar o paciente corretamente.
 - Para segurança do paciente a coleta deve ser realizada com o paciente sentado confortavelmente ou deitado.
 - A cadeira de coleta deve conter braços para apoio em ambos os lados para facilitar a coleta e prevenir quedas no caso do paciente perder a consciência.

7. Aplicar o torniquete, pedir ao paciente que feche a mão e examinar o local de coleta para selecionar o local de punção.

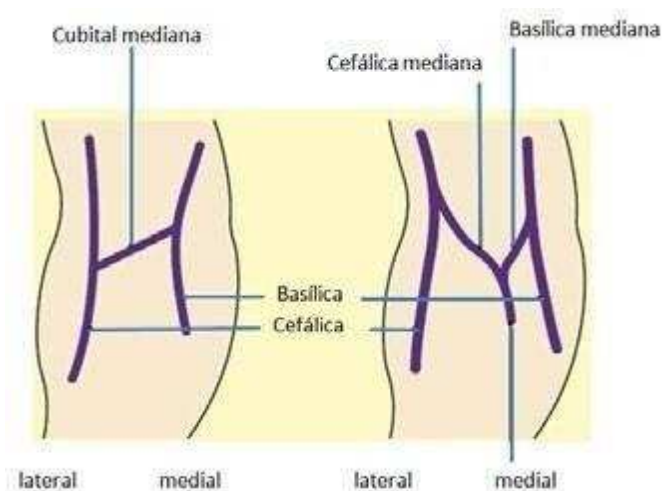
- A aplicação do torniquete não deve ultrapassar a 1 minuto com o risco de provocar estase vascular. Isto pode resultar no aumento dos níveis séricos de todos os analitos ligados a proteínas, hematócrito e outros elementos celulares.

- Evitar áreas queimadas ou feridas.

Pacientes submetidas à mastectomia não devem ter amostras coletadas no mesmo lado da cirurgia devido a linfo-estase.

- Deve-se evitar a coleta no mesmo braço de qualquer acesso venoso para soro ou medicamentos.
- O local mais indicado para a punção é a fossa antecubital onde os vasos são mais superficiais e apresentam calibre adequado. Quando este sítio não for acessível, é aceitável que se utilize as veias localizadas nas costas das mãos.

- A fossa antecubital apresenta dois formatos anatômicos mais comuns: o formato em H ou formato em M. O formato em H apresenta de modo mais proeminente as veias cefálica, mediana cubital e basílica. O formato em M exibe as veias cefálica, cefálica mediana, basílica mediana e basílica.



- As coletas devem ser preferencialmente realizadas nas veias cubital mediana (formato em H) e mediana (formato em M), pois são vasos superficiais, com pouca mobilidade, menos dolorosos e menos sujeitos a injúrias a nervos no caso de posicionamento inadequado da agulha.

- Se o paciente relatar a sensação de choque elétrico, o procedimento deve ser interrompido imediatamente. No caso de formação de hematomas, a coleta também deve ser interrompida e o local da punção deve ser pressionado vigorosamente por pelo menos 5 minutos.

8. Calçar as luvas.

- As luvas devem ser trocadas a cada coleta.

9. Aplicar o antisséptico no local de punção e deixar secar.

- Utilizar preferencialmente uma compressa de gaze embebida em álcool 70% ou compressas industrializadas.

- Utilizar movimentos circulares do centro para a periferia

- Deixar secar para evitar a hemólise na amostra e a sensação de queimação durante a punção.

- Para coleta de hemocultura a região deve ser higienizada por cerca de 30 segundos abrangendo uma área maior do que em coletas normais. Os antissépticos a base de iodo são os recomendados neste caso.

- Limpar a tampa do vidro de cultura com solução antisséptica. Assegure-se de que a tampa esteja seca antes de introduzir a agulha para transferir o material.

10. Realizar a punção.

10.1. Coleta com sistemas a vácuo.

- Se possível posicionar o braço do paciente na posição descendente para evitar refluxo do tubo para a veia.
- Atarraxar a agulha ao adaptador de acordo com as instruções do fabricante.
- Segurar o braço com firmeza abaixo do local escolhido para a punção. O polegar pode ser utilizado para puxar a pele firmando a veia escolhida.
- Comunicar ao paciente que a punção está pronta para ser realizada. Esteja atento a qualquer movimento involuntário e/ou perda de consciência.
- Com o bisel voltado para cima puncionar a veia formando um ângulo de 30° entre a agulha e o antebraço do paciente.
- Uma vez que o sangue comece a fluir para o tubo solicitar ao paciente para abrir a mão.
- A recomendação técnica indica que o garrote seja retirado assim que o sangue comece a fluir para o tubo. Entretanto, em algumas situações este procedimento pode interromper o fluxo sanguíneo.
- Permitir que o tubo seja preenchido completamente. Para tubos com aditivos, este procedimento assegura a correta relação entre a amostra e o aditivo.
- Durante a coleta, o tubo deve estar inclinado para que o sangue escorra para o fundo.



- Quando o sangue parar de fluir, desconecte o tubo cheio e insira o próximo tubo. Sempre remova o último tubo antes de retirar a agulha da veia do paciente.
- O profissional deve segurar o tubo durante a coleta. O tubo de borracha que cobre a agulha de coleta múltipla é tracionado quando da inserção do tubo fazendo com que exerça uma reação no sentido de expulsar o tubo. Isso normalmente não acontece pois a rolha do tubo exerce uma pressão que impede que isso aconteça. Em casos raros isso pode acontecer e por isso o profissional deve estar alerta e apoiar sua mão no fundo do tubo durante a coleta para evitar que isso aconteça.
- Os tubos contendo aditivos devem ser homogeneizados imediatamente após a coleta. Inverta o tubo gentilmente por 5 a 10 vezes assegurando-se de realizar movimentos suaves para evitar a hemólise.
- Use o adaptador da agulha de coleta múltipla oferecido pelo fabricante do tubo pois os adaptadores não são universais e, em alguns casos, a tampa do tubo pode prender na lateral interna do adaptador provocando a perda de sangue durante a coleta.

10.2. Coleta com seringa e agulha.

- Certificar-se de que a agulha esteja corretamente conectada a seringa.
- Empurrar o êmbolo para frente e para trás conferindo se o movimento é realizado sem qualquer problema.
- Empurrar o êmbolo para frente até que todo o ar seja expelido da seringa.
- Segurar o braço com firmeza abaixo do local escolhido para a punção. O polegar pode ser utilizado para puxar a pele firmando a veia escolhida.
- Comunicar ao paciente que a punção está pronta para ser realizada.
- Com o bisel voltado para cima puncionar a veia formando um ângulo de 30° entre a agulha e o antebraço do paciente.

- Manter a agulha o mais estável possível, aspirando lentamente a quantidade de sangue necessária.
- Retirar o torniquete assim que o sangue começar a fluir.
- Para transferir o sangue para os tubos de coleta, colocar os tubos em uma estante sobre a bancada. Jamais realize a transferência segurando o tubo com as mãos.
- Puncionar a rolha do tubo permitindo que o tubo seja preenchido sem aplicar nenhuma pressão no êmbolo.
- As rolhas não devem ser removidas para a transferência do sangue para os tubos.
- Homogeneizar os tubos que contenham aditivos.

11. Os tubos devem ser trocados ou preenchidos de acordo com a necessidade obedecendo a ordem de coleta.

1º Frascos para hemocultura

2º Tubos para coagulação (tampa azul)

3º Tubos para soro com ou sem aditivo (tampa vermelha) 4º Tubos com heparina com ou sem gel separador (tampa verde) 5º Tubos com EDTA com ou sem gel separador (tampa lilás) 6º Tubos com fluoreto de sódio (tampa cinza)

Nota: Os tubos de vidro ou plástico contendo gel separador podem causar interferência nos testes de coagulação. Tubos sem aditivos devem ser usados antes dos tubos destinados aos testes de coagulação.

Nota: Quando o escalpe for utilizado para a coleta e o tubo de coagulação for o primeiro a ser colhido deve-se usar um tubo sem aditivo como "primer". A função deste tubo é preencher totalmente o tubo do escalpe garantindo a relação sangue / aditivo no tubo de coleta. Este tubo não precisa ser totalmente preenchido.

Nota: Os testes de tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) não tem seus resultados alterados quando realizados no primeiro tubo colhido. Entretanto, para os demais testes de coagulação recomenda-se o uso de amostras colhidas em um segundo tubo.

12. Remover o torniquete.

13. Posicionar a gaze sobre o local de punção.

14. Remover a agulha e proceder ao descarte.

- Descarte a agulha em um recipiente para material perfuro-cortante, de fácil acesso que atenda à legislação sanitária.
- As agulhas não devem ser recapeadas, amassadas, quebradas ou cortadas nem devem ser removidas das seringas a menos que seja utilizado um dispositivo de segurança.

15. Pressionar o local de punção até que o sangramento tenha cessado, aplique uma bandagem adesiva.

- Posicionar a compressa de gaze sobre o local de punção e aplicar pressão suave.
- Não permitir que o paciente dobre o braço.
- O próprio paciente pode manter o local pressionado até que o flebotomista verifique que o sangramento tenha cessado.
- Aplicar bandagem adesiva.
- Recomendar que a bandagem não seja retirada antes de 15 minutos.

16. Anotar a hora da coleta.

17. Observar necessidades especiais de manuseio.

- Algumas dosagens exigem que a amostra seja resfriada imediatamente para que o metabolismo celular seja diminuído ou que seja mantida a 37° C para evitar aglutinação ou mesmo proteger a amostra da luz.
- Exemplos de dosagens que requerem cuidados especiais.

Resfriamento	Temperatura de 37°C	Abrigo da luz
Gastrina Amônia Ácido láctico Catecolaminas Piruvato Paratormônio (PTH)	Aglutininas frias Criglobulinas Crioibrinogênio	Bilirrubina Vitamina A Vitamina B6 Beta caroteno Porfirinas

18. Encaminhar o material devidamente identificado para processamento.

CONHECENDO AS PARTE DE UMA SERINGA



HIGIENIZAÇÃO DAS MÃOS

COM ÁLCOOL GEL

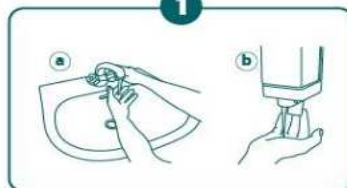
1



Aplique uma quantidade suficiente de preparação alcoólica em uma mão em forma de concha para cobrir toda a superfície das mãos

COM ÁGUA E SABONETE

1



a) Molhe as mãos com sabão
b) Aplique na palma da mão quantidade suficiente de sabonete líquido para cobrir toda a superfície das mãos

2



Fricção as palmas das mãos

3



Fricção a palma direita contra o dorso da mão esquerda entrelaçando os dedos e vice-versa

4



Entrelace os dedos e fricção os espaços interdigitais

5



Fricção o dorso dos dedos de uma mão com a palma da mão oposta (e vice-versa), segurando os dedos

6



Fricção o polegar esquerdo com o dorso da palma da mão direita, utilizando-se de movimento circular e vice-versa

7



Fricção as polpas digitais e unhas da mão direita contra a palma da mão esquerda, fazendo movimento circular e vice-versa

8



Enxágue bem as mãos com água



Seque as mãos com papel toalha descartável

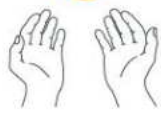


Neste caso de torneiras com contato manual para fechamento, sempre utilizar papel toalha

20 - 30 segundos

40 - 60 segundos

9



Quando estiverem secas, suas mãos estarão seguras

COLETA POR SISTEMA A VÁCUO

Apalpar a veia.



Colocar o garrote.
(Por 1 minuto no máximo).



Desinfetar o
local da punção.



Montar o sistema
de coleta.



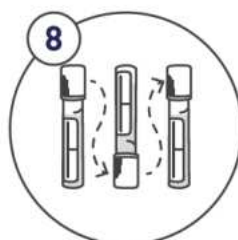
Realizar a
punção venosa.



Inserir o Tubo de Coleta
de Sangue a Vácuo Olen
no adaptador.



Retirar o garrote assim
que o sangue fluir para
dentro do tubo.



Inverter o tubo
gentilmente
de 8 a 10 vezes.



As amostras estão
prontas para análise.

ANOTAÇÕES

ANOTAÇÕES

ANOTAÇÕES

ANOTAÇÕES

Laboratório de Bioquímica e Farmacologia

Telefone: (32) 2101-5034

E-mail: bioquímica@suprema.edu.br

www.suprema.edu.br

Técnicos Responsáveis: Paula Fontes

Gestor Laboratorial: Gilson Rodrigues Ferreira

Revisão gramatical, ortográfica: Moema Rodrigues Brandão Mendes



SUPREMA

Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora