

MANUAL DE BOAS PRÁTICAS EM BIOQUÍMICA



Docentes organizadores

Nilce Barril

Andreia de Haro Moreno

Discentes organizadores

Ana Beatriz Quinzani Baptista

Leonardo Watanabe

Tiago Cera de Souza

Entidade

Centro Universitário Padre Albino

Curso de Medicina

Local de publicação

Catanduva –SP

MANUAL DE BOAS PRÁTICAS

EM BIOQUÍMICA

EDUPA – Núcleo de Editorial Centro

Universitário Padre Albino

Ano de publicação 2023

FICHA CATALOGRÁFICA

B275m Barril, Nilce
Manual de boas práticas em bioquímica. / Nilce Barril / Andréia de Haro
Moreno — 2023.
48 f.; 24 cm.

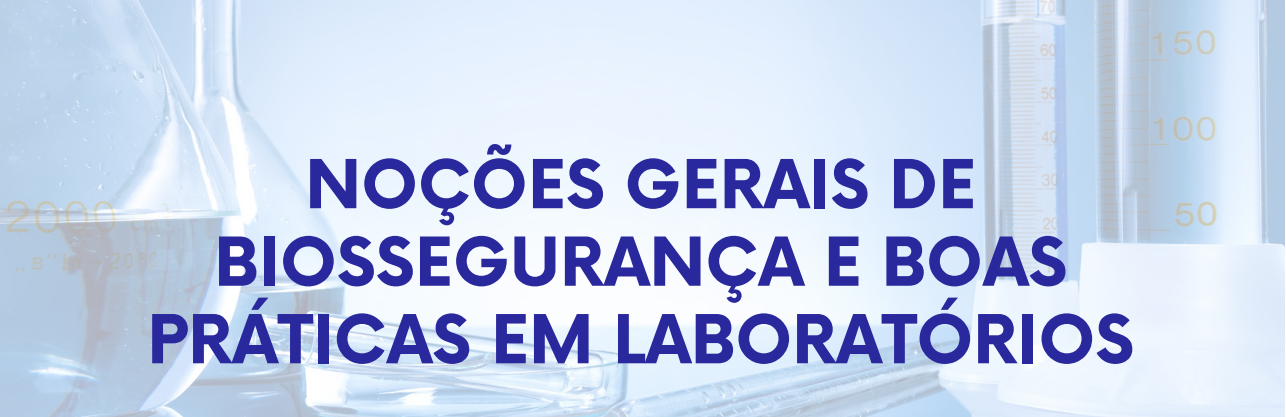
Manual de boas práticas em bioquímica, Centro Universitário Padre
Albino.

1. Manual. 2. Bioquímica. 3. Orientações. I. Título. II. Nilce Barril. III.
Andréia de Haro Moreno.

QU4

SUMÁRIO

1 NOÇÕES GERAIS DE BIOSSEGURANÇA E BOAS PRÁTICAS EM LABORATÓRIOS.....	1
2 ELABORAÇÃO DO RELATÓRIO.....	3
3 INSTRUMENTAÇÃO PARA USO DO LABORATÓRIO.....	5
4 DETERMINAÇÃO SEMI-QUALITATIVA DE AÇÚCARES REDUTORES.....	6
5 DETERMINAÇÃO PLASMÁTICA DA GLICOSE.....	9
6 CURVA DE TOLERÂNCIA À GLICOSE.....	13
7 DOSAGEM DE CREATININA EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	15
8 DETERMINAÇÃO CINÉTICA DA CREATINA QUINASE (CK).....	18
9 DOSAGEM DE PROTEÍNA E CURVA PADRÃO PELO MÉTODO DE BIURETO.....	20
10 DOSAGEM DE HEMOGLOBINA.....	22
11 DOSAGEM ENZIMÁTICA DE TRIGLICÉRIDES.....	24
12 DOSAGEM ENZIMÁTICA DE COLESTEROL.....	30
13 DOSAGEM DE UREIA EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	34
14 ATIVIDADE ENZIMÁTICA, HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E INIBIDORES ENZIMÁTICOS.....	37
15 EXERCÍCIO ANAERÓBICO E EXERCÍCIO AERÓBICO.....	40
BIBLIOGRAFIA.....	42

A background image showing laboratory glassware, including a large Erlenmeyer flask on the left and graduated cylinders on the right, with a blue-tinted overlay.

NOÇÕES GERAIS DE BIOSSEGURANÇA E BOAS PRÁTICAS EM LABORATÓRIOS

FUNDAMENTOS TEÓRICOS:

Esta aula tem por objetivo apresentar noções gerais de biossegurança para que o trabalho realizado em laboratórios da área da saúde, particularmente os de bioquímica, seja realizado com o máximo de segurança.

Define-se biossegurança o conjunto de ações voltadas para a prevenção, minimização ou eliminação de riscos referentes às atividades de pesquisa, produção, ensino, desenvolvimento tecnológico e prestação de serviços, que podem comprometer a integridade do estado geral de saúde normal do homem, dos animais e do meio ambiente, assim como a qualidade dos trabalhos desenvolvidos (Ribeiro, Guimarães, 2017).

O trabalho em laboratórios de saúde expõe os trabalhadores a riscos específicos da sua atividade. Estes riscos são classificados em cinco grupos principais: Risco de Acidente, Ergonômico, Físico, Químico e Biológico (Santos et al, 2013).

As regras gerais de segurança em laboratório envolvem: hábitos de higiene pessoal, proibições na área laboratorial, a utilização de Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico – FISPQ, para cada reagente utilizado nos seus ensaios além do uso de Equipamentos de Proteção Individual (EPI).

HIGIENE PESSOAL:

- Cabelos longos devem ser mantidos presos durante os trabalhos;
- As unhas devem estar limpas e não ultrapassar a ponta dos dedos;
- Deve-se usar exclusivamente calçados fechados;
- Se possível, não usar lentes de contato.

PROIBIÇÕES NA ÁREA LABORATORIAL:

- Pipetar com a boca;
- Comer, beber ou fumar;
- Armazenar alimentos;
- Utilizar equipamentos da área analítica para aquecer alimentos;
- Manter objetos pessoais, bolsas ou roupas;

RISCO QUÍMICO:

Todo laboratório deve manter Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico – FISPQ que deverá informar, para cada reagente utilizado, no mínimo:

- As medidas de proteção: coletiva, individual;

- As características do produto: usos, propriedades físicas e químicas, formas de estocagem;
- Os riscos: toxicologia, incêndio e/ou explosão;
- Informações para o descarte seguro.

EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL (EPI):

- **Avental:** de mangas longas, com elástico na extremidade. O fechamento é frontal, com botões, preferencialmente de pressão. Confeccionado em tecido de algodão, não inflamável com comprimento abaixo dos joelhos. Que deve ser usado permanentemente fechado.
- **Óculos de segurança e/ou escudo facial:** são usados em todas as atividades que possam produzir salpicos, respingos e aerossóis, projeção de estilhaços pela quebra de materiais que envolvam risco químico ou biológico, ou quando há exposição a radiações perigosas (por ex. luz ultra-violeta).
- **Máscaras:** são usadas as do tipo cirúrgico, sem sistema de filtro, para proteção do aparelho respiratório no manuseio de material biológico, dependendo da sua classe de risco, assim como para proteção do produto que está sendo manuseado.
- **Luvas:** são de uso obrigatório na manipulação de qualquer material biológico ou produto químico. São fabricadas em diferentes materiais para atender as diversas atividades laboratoriais.

A background image showing laboratory glassware, including a large Erlenmeyer flask on the left, a graduated cylinder in the center, and a beaker on the right. The glassware is partially filled with a light blue liquid. The background is a soft, out-of-focus blue.

ELABORAÇÃO DO RELATÓRIO

IMPORTÂNCIA:

Após o término de cada aula prática, os alunos deverão elaborar um relatório referente à atividade desenvolvida.

CONSTITUINTES DO RELATÓRIO:

I - Introdução: Elaborada a partir de pesquisa bibliográfica sobre o conteúdo que foi abordado na aula. As buscas devem ser realizadas a partir da consulta de livros, publicações científicas e sites confiáveis na internet.

II - Objetivos: Deve conter o que se pretendeu com a aula desenvolvida.

III - Materiais e métodos: Nesse item, o foco é dado à metodologia aplicada e a todos os equipamentos, reagentes e instrumentos utilizados para a realização da aula.

É importante frisar que o roteiro da aula não deve ser copiado na íntegra e deve servir apenas como uma forma de orientação. Outro ponto fundamental é escrever os materiais e métodos de maneira que qualquer pessoa possa realizar a atividade novamente utilizando a explicação como guia.

IV - Resultados e discussão: Nesse item, deverá conter todos os resultados obtidos na aula, fazendo uma relação com o conhecimento teórico adquirido.

Podem ser inseridos gráficos, figuras e esquema para ilustrar os resultados obtidos.

V - Conclusão: Descrição do aprendizado promovido com a realização da aula. As conclusões não devem ser cópias de informações obtidas na bibliografia consultada e sim, elaboradas pelos próprios alunos do grupo.

VI - Bibliografia: Consiste em descrever, a partir de regras determinadas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) com ou sem modificações, todo material bibliográfico usado para a confecção do relatório.

Abaixo, seguem exemplos de como elaborar a bibliografia consultada.

- **Livro:**

NOME DO(S) AUTOR(ES) Título da obra. Edição. Local da Publicação: Nome da Editora, Ano da publicação número de páginas ou volume da obra.

Exemplo:

NELSON, D. L.; COX, M. M.; LEHNINGER, A. Princípios de Bioquímica. 5a Ed. São Paulo: Sarvier, 2011.

- **Artigos de revista:**

AUTOR (ES) DO ARTIGO. Título do artigo. Título do periódico em destaque, Local de publicação (cidade), n.º do volume, n.º do fascículo, páginas inicial-final, mês (abreviado), ano.

Exemplo:

COSTA, M.A.F. Qualidade e Biossegurança: uma necessidade de integração. Revista Biotecnologia, N.4, jan/fev, 32-33, 1998.

- **Documento eletrônico:**

AUTOR (ES) DO ARTIGO. Título do artigo – ano da publicação. Disponível em: Home page da publicação do artigo. Acesso em: data de acesso

Exemplo:

Santos, A.P.S.A.S. (Coord) et al. BIOQUÍMICA PRÁTICA. Protocolos para análise de biomoléculas e exercícios complementares – 2013.
< <http://www.repositorio.ufma.br:8080/jspui/bitstream/1/445> > Acesso em: 06 mar. 2023.

INSTRUMENTAÇÃO PARA USO DO LABORATÓRIO

OBJETIVO:

Treinar transferir pequenos volumes com precisão: técnica de pipetagem.

PROCEDIMENTO:

A) PIPETAGENS:

- Procure identificar as pipetas de diferentes capacidades de graduação (1, 2, 5 e 10 ml).
- Faça então os exercícios seguintes começando com uma pipeta graduada de 10 ml.
- Introduza a extremidade inferior da pipeta num béquer contendo água.
- Aspire até que o nível da solução ultrapasse o traço superior da aferição.
- Diminua a pressão exercida pelo pipetador sobre a pipeta de modo a deixar cair o líquido gota a gota, até que a parte inferior do menisco coincida com o volume desejado, à altura de seus olhos.
- Com pipetas de 10 ml, acertado o zero, comece a escoar lentamente volumes variáveis (10 ml, 8 ml, 7 ml, 4 ml) ajustando cada vez a parte inferior do menisco com o volume desejado.

B) ACURÁCIA

- Meça 100 ml de água em uma proveta, transfira para: um béquer e um erlenmeyer, confira os volumes medidos. Você detectou alguma diferença nas medições?

C) MICROPIPETA



PRÁTICA DE LABORATÓRIO

DETERMINAÇÃO SEMI-QUALITATIVA DE AÇÚCARES REDUTORES

PRINCÍPIO:

Reação de Benedict

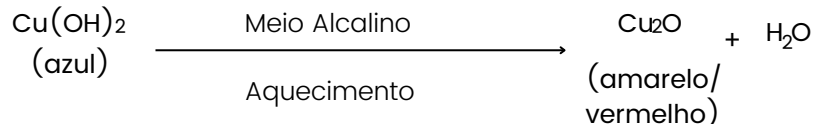
Utilizada para identificação de carboidratos redutores. Íons de metais (Cobre, Prata, Ferro, Mercúrio, entre outros) são reduzidos por grupos aldeídos ou cetônicos livres de vários carboidratos.

Colocando-se Hidróxido de Cobre II - $\text{Cu}(\text{OH})_2$, de cor azul, em meio alcalino, forma-se uma suspensão que, sob aquecimento, se precipita como Óxido de Cobre II - CuO de cor preta. Mas se compostos redutores forem acrescentados à suspensão, o $\text{Cu}(\text{OH})_2$ é reduzido a Cu_2O , que se precipita e cuja cor se situa entre o amarelo e o vermelho. As reações abaixo mostram o que ocorre com o $\text{Cu}(\text{OH})_2$, na presença e na ausência de agentes redutores, em meio alcalino e a quente.

Ausência de composto redutor:



Presença de composto redutor:



Como não é prático utilizar uma suspensão de Cu^{2+} , e também para evitar que o CuO (preto) mascare o resultado da reação, acrescenta-se ao meio da reação um composto orgânico solubilizador que, em meio alcalino adequado, reage com os íons metálicos, formando um complexo iônico solúvel. Este complexo se dissocia em grau suficiente para que haja, no meio da reação, íons metálicos disponíveis para se reduzirem. No caso do Reagente de Fehling, emprega-se CuSO_4 à 2%, solubilizado por Tartarato de Na^+ e de K^+ 10%, dissolvido em NaOH 2M; no caso de Reagente de Benedict (qualitativo), emprega-se CuSO_4 à 2% solubilizado por Citrato de Na^+ 20%, dissolvidos em Na_2CO_3 2M.

Os testes de carboidratos redutores são positivos para compostos com grupamentos -OH glicosídico livre, mas negativos para polímeros de cadeias longas. Assim, amido não dá reação positiva, a não ser após a sua hidrólise, e a reação é tanto mais positiva quanto maior a extensão da hidrólise.

Até alguns anos atrás, o teste de substâncias redutoras, sobretudo da urina, era empregado no diagnóstico de pacientes diabéticos, ou suspeito de sê-lo, de modo rotineiro. Atualmente, há testes mais sensíveis para dosagem rápida de glicose, baseadas em ensaio enzimático (glicofita/glicose-oxidase) e que são muito mais práticos, por não exigirem a disponibilidade dos reagentes mencionados.

OBJETIVO:

Determinação semi-qualitativa de açúcares redutores

PROCEDIMENTO:

Identificação de substâncias redutoras com Reagente de Benedict (qualitativo)

Preparar 9 tubos de ensaio:

Tubo	Amostra	Volume	Reagente Benedict	Resultado
1	Água	1ml		
2	Glicose 0,1M	1ml		
3	Arabinose 0,1M	1ml		
4	Sacarose 0,1M	1ml		
5	Lactose 0,1M	1ml		
6	Sacarose Invertida	1ml		
7	Amido 0,1%	1ml		
8	Urina humana (A)	1ml		
9	Urina humana (B)	1ml		

A Sacarose Invertida do tubo 6 é obtida pela adição de 1,0 mL de HCl concentrado em 1,0 mL de sacarose, aquecidos em chama direta com agitação constante por aproximadamente 1 minuto, tomando todos os cuidados necessários.

1. Colocar o Tubo 1 em banho maria fervente durante 5 minutos. Observar se houve alguma mudança de coloração no BRANCO, o que indica deterioração ou contaminação do reativo por substâncias redutoras. Caso isto ocorra, despreze o produto.
2. Aquecer todos os demais tubos durante 5 minutos.
3. Anotar os resultados obtidos (se positivo, numa escala de 1 a 4 cruces, + a ++++), comparando com o Tubo 1 (controle). Explique os resultados.

INTERPRETAÇÃO:

Caso a urina contenha glicose numa concentração superior a 80 mg/100mL, o reativo mudará de cor. Conforme a coloração obtida pode-se ter uma idéia aproximada do teor de glicose presente na urina:

- Solução azul límpida: zero de glicose
- Solução com precipitado esverdeado: 100 a 500 mg/100mL; (+)
- Solução com precipitado amarelo: 500 a 1.400 mg/100mL; (++)
- Solução com precipitado alaranjado: 1.400 a 2.000 mg/100mL; (+++)
- Solução com precipitado vermelho tijolo: mais de 2.000 mg/100mL; (++++)

PRÁTICA DE LABORATÓRIO

DETERMINAÇÃO PLASMÁTICA DA GLICOSE

IMPORTÂNCIA CLÍNICA:

A concentração plasmática da glicose tem grande importância clínica no manejo do Diabetes Mellitus (DM), haja vista que se trata de uma doença de alta incidência no Brasil, acometendo cerca de 5 milhões de indivíduos, segundo estimativas, e desses, metade desconhece o diagnóstico. (11. PRADO, C. F.; RAMOS, J.; DO VALLE, R. Atualização terapêutica. São Paulo: Liv. Ed. Artes Médicas, p. 1820, 2003.).

MONTAGEM DA BANCADA:

Disponibilizar em cada bancada:

- 6 tubos de ensaio médio
- 1 suporte para tubos
- Pegador de tubos
- 1 micropipeta de 1000µL (para o reagente de cor)
- 1 micropipeta de até 200µL
- Ponteiras azuis
- Ponteiras amarelas
- Descarte para ponteiras
- 1 tela Amianto
- 1 Tripé
- 2 Béqueres de 250ml (1 para ferver e 1 para esfriar)
- 1 caneta para escrever em vidro
- Luvas
- Papel toalha
- Cronômetro

Disponibilizar para uso comum:

- Fósforo
- Espectrofotômetro
- Amostras de plasma

METODOLOGIA: ORTO-TOLUIDINA

A glicose reage com a Orto-toluidina em meio acético e por ação do calor dá lugar a uma mistura em equilíbrio de glicosil Orto-toluidina e a correspondente base de Schiff.

A intensidade do produto verde formado é medida por espectrofotometria em 630nm e corresponde a concentração de glicose no material dosado.

AMOSTRA DO PLASMA:

O sangue deve ser colhido com anticoagulante, EDTA-fluoretado (10 g/dL-1 gota/5mL de sangue) e com o paciente em jejum.

REAGENTES:

a) Solução Benzóica:

Dissolver 1g de ácido Benzóico em 300 mL de água destilada quente.

b) Solução padrão de Glicose 100 mg/100 mL:

Pesar 1,0 g de glicose pura, anidra e colocar em um balão volumétrico de 1000 mL. Transferir a solução benzóica para o balão volumétrico, adicionar 400 mL de água destilada, esfriar e completar o volume para 1000 mL. Esta solução conserva-se indefinidamente.

c) Reativo Cromogênico:

Ácido acético glacial --- 940 mL

Orto-toluidina ----- 60 mL

Tiouréia ----- 1,5 g

Observação: É importante o emprego de orto-toluidina incolor. A adição de tiouréia como antioxidante confere ao reativo uma cor ligeiramente amarelada.

PROCEDIMENTOS:

Conforme a tabela apresentada abaixo, adicione em 4 tubos de ensaio:

- Misturar bem os tubos de ensaio com as substâncias e colocar em banho de água fervente durante 5 minutos. Após isso, passar para esfriar em banho de água fria durante 3 minutos.
- Determinar as absorbâncias das amostras e do padrão com comprimento de onda em 630 nm (filtro vermelho) acertando o zero com o branco.

	Branco	Amostra 1	Amostra 2	Padrão
Água destilada	25µL	-	-	-
Plasma (Amostra 1)	-	25µL	-	-
Plasma 2 (Amostra 2)	-	-	25µL	-
Padrão	-	-	-	25µL
Reagente de Cor	2,5mL	2,5mL	2,5mL	2,5mL
Valores de Absorbância				

CÁLCULOS:

$$\text{Glicose (mg/100dL)} = \frac{\text{Absorbância da amostra} * 100 (\text{concentração do padrão})}{\text{Absorbância do padrão}}$$

Considerar 100 como a concentração de glicose no padrão

Valores de referência (Fonte: Laboratório Delboni Auriemo):

- Glicose ou glicemia em jejum de 8 a 12 horas: 70 a 99 mg/dL
- Glicemia aleatória ou após sobrecarga (alimentação ou sobrecarga de Glicose): até 200 mg/dL.

Porém, existem faixas intermediárias que são sinais de alerta para que seja possível a mudança de hábitos e controle do açúcar no sangue.

- A glicose de jejum entre 100 e 125 mg/dL é chamada de glicemia de jejum alterada. A partir de 126 mg/dL já temos o diagnóstico de diabetes.
- Na glicose sem jejum, valores acima de 140 mg/dL remetem ao diagnóstico de Intolerância à Glicose e acima de 200mg/dL, também temos o diagnóstico de diabetes.

CASO CLÍNICO:

➡ DIABETES

VBP, 20 anos de idade, sexo feminino, natural e procedente de Catanduva-SP, procurou o pronto atendimento do Hospital Padre Albino, apresentando quadro agudo de polidipsia, poliúria e perda de peso seguida de internação hospitalar em quadro compatível com cetoacidose. No momento da anamnese estava acompanhada pela mãe, CBP, 50 anos, hipertensa desde os 35 anos, que declarou estar sentindo os mesmos sintomas de polidipsia, poliúria e perda de peso. Na história pregressa a jovem apresentava desenvolvimento neuropsicomotor dentro da normalidade, porém com dificuldade de desenvolvimento físico. Nenhum registro de doença familiar. A paciente não fazia uso de nenhuma medicação.

Resultados dos exames laboratoriais:

- Glicemia aleatória = 205 mg/dL
- Glicemia de jejum = 420 mg/dL
- HbA1c = > 8.5%

QUESTÕES:

- 1- Quais os fatores diagnósticos apresentados pela paciente que justificam os exames solicitados?
- 2- Quais diagnósticos diferenciais devem ser considerados?
- 3- Qual o diagnóstico da paciente?
- 4- Quais dados foram conclusivos para o diagnóstico?
- 5- Porque a predisposição genética é considerada um fator de risco fraco?
- 6- Qual tratamento deve ser prescrito para a paciente?
- 7- Quais as complicações esperadas?
- 8- Qual o prognóstico esperado caso as metas do tratamento não sejam atingidas?

Utilizar as Leituras Sugeridas para responder as questões.

LEITURAS SUGERIDAS:

- <https://www.diabetes.org.br/publico/>
- <https://saude.novartis.com.br/diabetes-tipo2/>
- <https://www.abbottbrasil.com.br/homepage.html>

PRÁTICA DE LABORATÓRIO

CURVA DE TOLERÂNCIA À GLICOSE

IMPORTÂNCIA:

O teste de tolerância à glicose, também chamado de curva glicêmica, auxilia o médico a fazer o diagnóstico da Diabetes e consiste na ingestão de glicose ou dextrosol pelo indivíduo através de um líquido açucarado fornecido pelo laboratório.

OBJETIVO:

Determinar experimentalmente o comportamento da curva de absorção de glicose pelo organismo em duas situações: em repouso e após realização de exercício aeróbico:

PROCEDIMENTOS:

A – Em repouso:

- O aluno deve estar em jejum de pelo menos 4 horas;
- Realiza-se a medida de glicose sanguínea inicial (tempo zero);
- Ingerir uma solução de dextrose (1,15 g/Kg) e aguardar 60°;

Realize as medidas indicadas na tabela abaixo

Tempo (em minutos)	Glicose (mg/dL)	Frequência cardíaca (bpm)	Pressão Arterial (mmHg)
Zero			
60 minutos (após)			
90 minutos (após)			

B – Em exercício:

- O aluno deve estar em jejum de pelo menos 4 horas;
- Realiza-se a medida de glicose sanguínea inicial (tempo zero);
- Ingerir uma solução de dextrose (1,15 g/Kg);
- Depois de 60 minutos realizar uma atividade aeróbica (caminhada de 25 minutos).

Realize as medidas indicadas na tabela abaixo

Tempo (em minutos)	Glicose (mg/dL)	Frequência cardíaca (bpm)	Pressão Arterial (mmHg)
Zero			
60 minutos (após)			
Quando retorna da caminhada			

Construa um único gráfico com dados de A e B para a glicose e frequência cardíaca Vs tempo.

QUESTÕES:

- 1- Os níveis de glicose no jejum não são zero. Discuta como é mantida a glicemia no jejum.
- 2- O que ocorreu com a frequência cardíaca no repouso e depois da atividade física?
- 3- Correlacione os resultados da frequência cardíaca com os da pressão arterial.
- 4- Qual o hormônio está relacionado com atividade física como determinante do aumento da frequência cardíaca, do catabolismo?
- 5- Qual hormônio é responsável pela redução dos níveis de glicose observado na curva de tolerância a esse carboidrato?
- 6- Considere a curva de tolerância à glicose observada no repouso e a do exercício físico. Justifique as diferenças observadas entre as duas.
- 7- Quais as células do organismo humano que utilizam glicose como fonte de energia?

PRÁTICA DE LABORATÓRIO

DOSAGEM DE CREATININA EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

KIT LABSET - REF. 35

IMPORTÂNCIA CLÍNICA:

A creatinina, sintetizada principalmente no fígado e rins, é produzida e excretada em um ritmo constante independente da dieta, grau de hidratação e metabolismo proteico. Sua elevação no plasma sanguíneo se relaciona com insuficiência renal aguda e crônica, obstrução do trato urinário, insuficiência cardíaca congestiva, desidratação e diabetes melitus. Todavia, sua diminuição pode refletir distrofias musculares, desnutrição e diminuição da massa muscular.

OBJETIVO:

Quantificar a creatinina em fluidos biológicos (plasma sanguíneo e urina).

REAGENTES:

- Solução de ácido pícrico 44,4 mmol/L
- Tampão (NaOH 208 mmol/L e tetraborato de sódio 12,7 mmol/L)
- Padrão de creatinina (4 mg/dL)
- Acidificante (ácido acético 11,4 mol/L)
- Soro sanguíneo humano (amostra desconhecida)
- Urina humana (amostra desconhecida) diluída 1:25

PROCEDIMENTOS:

Preparar 4 tubos de ensaio conforme a tabela abaixo:

	Branco	Padrão	Plasma	Urina
Tampão	2,0ml	2,0ml	2,0ml	2,0ml
Padrão	–	250µL	–	–
Plasma	–	–	250µL	–
Urina	–	–	–	250µL
Ácido Pícrico	500µL	500µL	500µL	500µL

- Homogeneizar as soluções e incubar por 10 minutos em banho-maria a 37°C.
- Verificar a absorbância (A1) do padrão e das amostras, em 510 nm.

	Branco	Padrão	Plasma	Urina
Absorbância (A1)				
Acidificante	100µL	100µL	100µL	100µL

- Homogeneizar as soluções e deixar em temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Verificar novamente a absorbância (A2) do padrão e das amostras, em 510 nm.

	Branco	Padrão	Plasma	Urina
Absorbância (A2)				

CÁLCULOS:

$$\text{Concentração de creatinina no plasma (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do Plasma (A1 - A2)} \times \text{Concentração Padrão}}{\text{Absorbância do Padrão (A1 - A2)}}$$

$$\text{Concentração de creatinina na urina (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do Plasma (A1 - A2)} \times \text{Concentração Padrão} \times 10}{\text{Absorbância do Padrão (A1 - A2)}}$$

$$\text{Concentração de creatinina em urina (mg/24h)} = \frac{\text{Creatinina urinária} \times \text{Volume (mL/24h)}}{100}$$

Valores de Referência:

• Soro ou plasma (adulto): 0,53 a 1,00 mg/dL (mulheres) e 0,70 a 1,20 mg/dL (homens).

• Urina (adulto): 900 a 1500 mg/24h (16 a 22 mg/kg/24h mulheres) (21 a 26 mg/kg/24h homens).

RESULTADOS:

Absorbância do Padrão = $A_1 - A_2 =$

Absorbância do Plasma = $A_1 - A_2 =$

Absorbância da Urina = $A_1 - A_2 =$

Concentração de creatinina no plasma (mg/dL) =

Concentração de creatinina na urina (mg/dL) =

Concentração de creatinina em urina (mg/24h) =

1-Quais os valores de creatinina encontrados para as amostras?

2-Os valores encontrados nas amostras estão de acordo com os valores de referência?

3-O que podem indicar?

PRÁTICA DE LABORATÓRIO

DETERMINAÇÃO CINÉTICA DA CREATINA QUINASE (CK)

PRINCÍPIO:

A amostra é incubada com o reagente que contém um anticorpo específico capaz de inibir completamente a atividade enzimática do monômero CK-M. A atividade do monômero CK-B, que não é inibida pelo anticorpo, é medida de acordo com a sequência de reações abaixo.

APLICAÇÃO:

Os valores de CK estão elevados em presença de lesões musculares como no infarto do miocárdio. Em seguida ao infarto, a concentração sérica desta enzima eleva-se rapidamente (3 a 6 horas), alcança um pico máximo após 12 a 24 horas e permanece elevada por um período curto de 2 a 3 dias. Outras fontes potenciais de elevação da CK total são: hipotireoidismo, doença muscular (miopatias, polimiosite), acidente vascular cerebral, convulsões, cateterismo cardíaco, politraumatismo, exercício físico intenso, imobilização prolongada.

PRINCÍPIO DA REAÇÃO:

- Creatina Fosfato + ADP $\rightarrow$ Creatina + ATP
(CK-B)
- ATP + Glicose $\rightarrow$ ADP + Glicose-6-Fosfato
- Glicose-6-Fosfato + NADP $\rightarrow$ 6-PG + NADPH
(G-6-PDH)

COMPONENTES DO KIT:

- Número 1 - Tampão imidazol 125 mmol/L, N-acetilcisteína 25 mmol/L, ADP 2,5 mmol/L, AMP 6,25 mmol/L, Diadenosina pentafofato 12,5 mol/L, acetato de magnésio 12,5 mol/L, NADP 2,5 mmol/L, Hexoquinase 5000 U/L, G-6-PDH 3500 U/L, azida sódica 0,095% e estabilizador.
- Número 2 - Tampão, glicose 100 mmol/L, creatina fosfato 150 mol/L, azida sódica 0,095%, anticorpo anti-CK-MB.

- Número 3 – Tampão 50 mmol/L, cloreto de sódio 154 mol/L, albumina bovina 3,5%, CK-MM e CK-MB humana e estabilizadores.

PREPARO DO REAGENTE DE TRABALHO:

Misturar 4 (1,6 mL) volumes do Reagente 1 e 1 volume (0,4 mL) do reagente 2. Manter em recipiente fechado, 2-8°C (estável 4 dias).

PROCEDIMENTO:

1. Em um tubo contendo 2,0 mL do reagente de Trabalho, adicionar 0,10 mL de amostra, homogeneizar e incubar a 37°C durante 5 minutos.
2. Transferir imediatamente para a cubeta termostatzada a 37°C e esperar 30 segundos.
3. Registrar a absorvância inicial (A_i) e disparar o cronômetro. Após 5 minutos registrar a absorvância (A_2).

CÁLCULOS:

$$\text{Atividade de CK-MB (U/L)} = (A_2 - A_i) \times 1340$$

Valores de Referência:

- Homens: 24-195 U/L.
- Mulheres: 24-170U/L.

PRÁTICA DE LABORATÓRIO

DOSAGEM DE PROTEÍNA E CURVA PADRÃO PELO MÉTODO DE BIURETO

PRINCÍPIO:

Os íons Cu^{2+} presentes no reagente de Biureto formam ligações com o Nitrogênio do grupo amino presente nas ligações peptídicas. Esta ligação dá origem a uma coloração púrpura de intensidade proporcional ao número de ligações peptídicas e, portanto, proporcional à concentração de proteína.

OBJETIVO:

Verificar a finalidade e a utilização na prática laboratorial da determinação do espectro de absorção e estudar o procedimento para confeccionar uma curva de calibração ou referência.

Ensinar a dosar quantitativamente proteínas totais contidas em uma amostra desconhecida. Será utilizado um padrão de concentração conhecida como referência.

REAGENTES:

- Proteína Padrão (40 mg/ml).
- Água destilada.
- Reagente de Biureto.
- Soro sanguíneo humano (amostra desconhecida).

PROCEDIMENTOS:

Preparar 5 tubos de ensaio conforme a tabela abaixo:

Tubo	Biureto	Água	Proteína Padrão	Soro Desconhecido	Concentração final das soluções em mg/ml	Incubar a 37°C por	A545
P1	2000µL	350µL	50µL	-	2mg/ml	10min	
P2	2000µL	300µL	100µL	-	4mg/ml	10min	
P3	2000µL	200µL	200µL	-	8mg/ml	10min	
Amostra	2000µL	300µL	-	100µL		10min	
Branco	2000µL	400µL	-			10min	0,000A

Concentração de Proteína nos tubos P1, P2 e P3 = 2mg, 4mg a 8mg, respectivamente.

- Anote a Absorbância no comprimento de onda de 545 nm (A_{545}) na última coluna. Ela será medida pelo espectrofotômetro e utilizada para calcular a concentração de proteína.

PRÁTICA DE LABORATÓRIO

DOSAGEM DE HEMOGLOBINA

IMPORTÂNCIA CLÍNICA:

A dosagem de hemoglobina é um importante parâmetro na avaliação de anemias, perdas de glóbulos vermelhos e metabolismo da hemoglobina.

OBJETIVO:

Determinação de hemoglobina em amostras de sangue humano.

REAGENTES:

- Reagentes de cor: 19,8ml de água em 200 μ L da solução I.
- Sangue humano heparinizado (amostra desconhecida).

PROCEDIMENTOS:

Preparar 5 tubos conforme a tabela abaixo:

	Branco	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4
Reagente de cor	-	2,5ml	2,5ml	2,5ml	2,5ml
Água destilada	2,5ml	-	-	-	-
Amostra 1	-	10 μ L	-	-	-
Amostra 2	-	-	10 μ L	-	-
Amostra 3	-	-	-	10 μ L	-
Amostra 4	-	-	-	-	10 μ L
Valores de absorbância					

- Misturar e aguardar à temperatura ambiente durante 5 minutos
- Determinar as absorbâncias das amostras e do padrão em 540 nm, acertando o zero com o branco.

CÁLCULOS:

$$\text{Hemoglobina (mg/100dL)} = \frac{\text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do padrão (0,280)}} \times 10$$

PRÁTICA DE LABORATÓRIO

DOSAGEM ENZIMÁTICA DE TRIGLICÉRIDES

KIT LABSET - REF. 87-2/100

IMPORTÂNCIA CLÍNICA:

A determinação dos triglicérides em amostra de sangue é empregada na abordagem laboratorial das hiperlipidemias, e possui um vasto significado clínico, especialmente em se tratando de doenças coronarianas e arterioscleróticas. O doseamento dos triglicérides é de muita importância também para avaliação de quadros que envolvem diabetes mellitus, obstruções biliares, nefroses e vários outros distúrbios do metabolismo endócrino.

OBJETIVO:

Determinação enzimática de triglicérides por reação de ponto final em amostras de plasma humano.

REAGENTES:

- Padrão
- Reagente 1
- Plasma sanguíneo humano (amostra desconhecida)

PROCEDIMENTOS:

Preparar 6 tubos de ensaio conforme a tabela abaixo:

	Branco	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Padrão
Reagente 1	2,0ml	2,0ml	2,0ml	2,0ml	2,0ml	2,0ml
Plasma (Amostra 1)	-	20µL	-	-	-	-
Plasma 2 (Amostra 2)	-	-	20µL	-	-	-
Plasma 3 (Amostra 3)	-	-	-	20µL	-	-
Plasma 4 (Amostra 4)	-	-	-	-	20µL	-
Padrão	-	-	-	-	-	20µL
Valores de absorbância						

- Misturar e colocar em banho maria a 37°C durante 10 minutos.
- Determinar as absorbâncias das amostras e do padrão em 505nm, acertando o zero com o branco.

CÁLCULOS:

$$\text{Triglicérides (mg/100dL)} = \frac{\text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 200$$

RESULTADOS:

- 1- Pesquise na literatura os valores desejáveis ou recomendados para adultos e classifique o valor obtido pela amostra de acordo com os desejáveis.
- 2- Explique o princípio enzimático para a determinação dos triglicérides em amostras de plasma.

CASO CLÍNICO: INTERSECÇÃO COM A AULA DE DOSAGEM ENZIMÁTICA DE COLESTEROL

➡ DISLIPIDEMIA

PRIMEIRA CONSULTA

MRSP, de 62 anos de idade, diabética e hipertensa, queixa tonturas e dor de cabeça frequente, de localização frontal e moderada intensidade, dificuldade para enxergar. Com lesão ulcerada no pé direito, e que não melhora fazendo tratamento com “remédios caseiros”, além disso, sente dormência e câimbras nos pés. Urina várias vezes ao dia e sente ardor, toma muita água, tem sede constante. Realiza tratamento com Metformina (500 mg) no café da manhã e no jantar, Glibenclamida (5mg) 01 no café e no jantar. Losartana (50mg) de 12 em 12 horas.

- **Antecedentes pessoais:** Diabetes Mellitus, Hipertensão arterial.
- **Antecedentes familiares:** Mãe: Morta IAM (Diabetes mellitus), Pai: Vivo (Hipertensão Arterial sistêmica). Vacinas: atualizadas. Moradia: A casa com quatro quartos, boas condições estruturais, de tijolo, telhas e piso de lajota, quintal grande e limpo.
- **Historia psicossocial:** Nascida em 04/5/1954 numa família de lavradores, com sustento da roça e agora vive da aposentadoria devido a sua incapacidade para trabalhar. É a quarta do total de 11 irmãos.

O pai PJN, de 86 anos, tem acompanhamento por hipertensão arterial sistêmica, gosta de tomar cachaça às vezes, a mãe MSN era diabética, morreu de infarto cardíaco a idade de 68 anos em 1995, gostava de fumar tabaco. A paciente é casada com o Senhor RMRP, de 65 anos teve cinco filhos, três filhos homens, FSP de 37, RSP de 30 e CFSP de 19 anos respectivamente, e duas filhas, MJSP de 33 e MASP de 25 anos, todos com o ensino fundamental. Convive com ela o esposo, a filha de 25 anos e o marido dela, JMF de 27 anos, com um filho, LPM de quatro anos; e o filho de 19 anos que é solteiro, não “se dá bem” com o cunhado porque gosta de beber e jogar. Os outros filhos não moram mais na casa.

• **Exame físico:** (PA: 170/107 mmHg. Peso: 90 kg; altura 1,62 metros). IMC: 34.2. Circunferência abdominal: 121 cm. Glicemia capilar no jejum 350 mg/dl. Olhos: Diminuição da visão, com opacidade do cristalino direito. Pulsos pediosos muito fracos. Pé direito Lesão ulcerada de 2 x 1 centímetro com bordes grossos, base avermelhada e fundo com tecido branco-amarelado. Atrofia dos músculos dos dedos dos pés. Diminuição da sensibilidade tátil e dolorosa.

• **Avaliação Diagnóstica:** (Registro Orientado por Problemas).

- ☐ Diabetes mellitus Tipo 2 descontrolada.
- ☐ Hipertensão Arterial Sistêmica estágio 2 descontrolada.
- ☐ Insuficiência arterial.
- ☐ Neuropatia diabética.
- ☐ Úlcera no pé direito.
- ☐ Catarata olho direito.
- ☐ Tabagismo.
- ☐ Obesidade

• **Plano Terapêutico.**

Modificação do tratamento para Hipertensão Arterial Sistêmica e Diabetes Melitus.

- ☐ Losartana 01 comprimido de 12/12 horas.
- ☐ Anlodipino (10 mg) 01 comprimido ao dia.
- ☐ Metformina (850mg) 01 comprimido junto com o café de manhã, almoço e no jantar.
- ☐ Glibenclamida (5mg) 01 comprimido antes do café da manhã e do jantar.
- ☐ Cefalexina 500 mg. 01 caps. Cada 6 horas (10 dias)
- ☐ Curativo diário no posto da lesão ulcerada do pé com Cloreto de sódio 0,9 %, iodo povidona e Nitrofurazona creme.

- **Plano diagnóstico:** Orienta-se para realização de exames complementares: Hemograma completo, glicemia, hemoglobina glicada, creatinina, colesterol total, LDL e HDL colesterol, triglicerídeos, ácido úrico, transaminase glutâmica pirúvica (TGP), transaminase glutâmico oxalacética (TGO), exame das fezes, eletrocardiograma, ultrassom abdominal, Rx de tórax.
- **Plano Educativo:** Orientar em quanto à importância da adesão ao tratamento em geral. Mudanças alimentares e começar a diminuir até eliminar o consumo de cigarros.
- **Acompanhamento:** Agendar consulta para atendimento programado continuado em 15 dias e encaminhamento para Oftalmologista e Angiologia.

SEGUNDA CONSULTA

Diz que tomou as medicações segundo foi indicada, melhorou a dor de cabeça, já não tem ardor na urina, resto igual, trouxe resultados dos exames.

- **Exames Complementares:** Hemoglobina 13,7 g/% Leucócitos: 5,400/mm, Diferencial: Segmentados. 64%, Linfócitos.25%, Eosinófilos. 9%, Monócitos.02%. Colesterol total 248 mg/dl; HDL colesterol 38mg/dl, LDL Colesterol 147 mg/dl Triglicerídeos: 246 mg/dl. Glicose de jejum: 158 mg/dl. Hemoglobina Glicada 6,7%. Glicemia média estimada 156 mg/dl. TGP 29 UI/L, TGO 27 UI/L, Creatinina 0,90 mg/dl. Urina. Ligeiramente turvo, amarelo citrino, Densidade 1.019, pH 6.0, Glicose +, Proteínas negativo, Leucócitos negativo, hemácias negativo, bactérias negativo, piócitos 4 p/c. Leveduras raras. Fezes: Ovos de ancilostomídeos. Eletrocardiograma. Ritmo sinusal, G- I. Frequência cardíaca 80 BPM, bloqueio incompleto do ramo esquerdo, e hipertrofia ventricular. Não alterações do ST-T. Ultrassom abdominal: Esteatose hepática leve. Rx de tórax (PA): Sem alterações.
- **Exame físico:** PA: 130/80 mmHg. Peso: 90 kg; altura 1,62 metros). IMC: 34.2. Circunferência abdominal: 121 cm. Lesão ulcerada do pé com fundo limpo.
- **Avaliação diagnóstica:**
 - ☐ Síndrome metabólica.
 - ☐ Hipertensão Arterial Sistêmica compensada.
 - ☐ Diabetes mellitus Tipo 2 descompensada.
 - ☐ Obesidade.
 - ☐ Dislipidemia.
 - ☐ Insuficiência arterial.
 - ☐ Tabagismo.
 - ☐ Úlcera no pé.
 - ☐ Parasitismo Intestinal e Esteatose hepática

- **Plano terapêutico:**

- Loartana 50 mg tomar 01 comprimido de 12/12 horas.

- Anlodipino (10 mg) tomar 01 comprimido ao dia.

- Metformina (850mg) tomar 01 comprimido junto com o café de manhã, almoço e no jantar.

- Glibenclamida (5mg) 01 comprimido antes do café da manhã, almoço e do jantar.

- Ácido acetil salicílico (AAS) (100mg) tomar 01 comprimido no almoço.

- Sinvastatina (40mg) tomar 01 comprimido as 21:00 horas por 3 meses.

- Albendazol (400 mg) tomar 01 comprimido dose diária por três dias.

- Continuar o curativo local da lesão.

- Plano educativo: Informa-lhe sobre a importância:

- Alimentação hipocalórica, com baixo teor de gorduras, não usar manteiga, alimentos fritos, embutidos, ou com açúcar refinado, e incrementar frutas, verdura e ingestão de água. Escolher gorduras não saturadas. Conseguir baixar de 4,8 – 9,6 kg do peso atual (5-10%).

- **Plano Educativo:** Informa-lhe sobre a importância:

- Alimentação hipocalórica, com baixo teor de gorduras, não usar manteiga, alimentos fritos, embutidos, ou com açúcar refinado, e incrementar frutas, verdura e ingestão de água. Escolher gorduras não saturadas. Conseguir baixar de 4,8 – 9,6 kg do peso atual (5-10%).

- De realizar exercícios de resistência muscular, caminhada por 30 minutos e alongamentos três vezes na semana como mínimo. Uma vez que cicatrizes o ferimento do pé.

- Das consequências negativas para a saúde pessoal e dos conviventes pelo uso de cigarros.

- Melhorar sua comunicação com os demais membros da família, aceitar diferenças pessoais e de gerações, incrementar atividades de lazer.

TERCEIRA CONSULTA

Não tem sintomas urinários, sente-se bem. Glicemia 99mg/dl. Colesterol total 185 mg/dl. LDL Colesterol 141 mg/dl, Triglicerídeos 148.0 mg/dl.

- **Exame físico:** Pé direito lesão em fase de cicatrização. Peso corporal da paciente diminuiu (88,0 kg).

- **Plano terapêutico:** Orienta-se a continuar com tudo igual

- **Tratamento em geral:** Recomendou-se começar com caminhadas diárias, estando curada a lesão do pé, observando o uso de sapato confortável e o cuidado dos pés.

- Seguimento: Consulta mensal.

ORIENTAÇÕES:

- O grupo deverá dividir-se em 4 subgrupos designados 1, 2, 3 e 4.
- Os subgrupos 1 e 2 irão descrever o caso e a 1ª consulta. Construir e apresentar o heredograma da família.
- Os subgrupos 3 e 4 irão descrever as 2ª e 3ª consultas.
- As apresentações deverão ser realizadas com a utilização de slides e com duração de 30 minutos cada subgrupo.

PRÁTICA DE LABORATÓRIO

DOSAGEM ENZIMÁTICA DE COLESTEROL

IMPORTÂNCIA CLÍNICA:

O colesterol é um lipídeo que exerce muitas funções essenciais, como atuar na formação de vários hormônios, sais biliares e vitamina D. Além disso, é indispensável na constituição das membranas celulares. Esse lipídeo é absorvido de alimentos, como o leite e gorduras animais, e também é sintetizado pelo fígado. Em níveis elevados, está associado ao aumento de doenças cardiovasculares.

OBJETIVO:

Determinação enzimática de colesterol por reação de ponto final em amostras de soro ou plasma humano.

REAGENTES:

- Padrão
- Reagente 1
- Plasma sanguíneo humano (amostra desconhecida)

PROCEDIMENTOS:

Preparar 6 tubos de ensaio conforme a tabela abaixo:

	Branco	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Padrão
Reagente 1	2,0ml	2,0ml	2,0ml	2,0ml	2,0ml	2,0ml
Plasma (Amostra 1)	-	20µL	-	-	-	-
Plasma 2 (Amostra 2)	-	-	20µL	-	-	-
Plasma 3 (Amostra 3)	-	-	-	20µL	-	-
Plasma 4 (Amostra 4)	-	-	-	-	20µL	-
Padrão	-	-	-	-	-	20µL
Valores de absorbância						

- Misturar e colocar em banho maria a 37°C durante 10 minutos.
- Determinar as absorbâncias das amostras e do padrão em 500nm, acertando o zero com o branco.

CÁLCULOS:

$$\text{Colesterol (mg/100dL)} = \frac{\text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 200$$

RESULTADOS:

- 1- Pesquise na literatura os valores desejáveis ou recomendados para adultos e classifique o valor obtido pela amostra de acordo com os desejados.
- 2- Explique o princípio enzimático para determinação do colesterol em amostras de plasma.

CASOS CLÍNICOS:

➡ HIPERCOLESTEROLEMIA

Siga as instruções abaixo descritas:

- 1- Leia atentamente a história do paciente;
- 2- Grife durante a leitura todos os termos técnicos ou não, mencionados no texto, que você não sabe o significado;
- 3- Procure o significado dos termos do item 2 usando dicionário médico ou da língua portuguesa;
- 4- Use a literatura apropriada a resolução dos casos.

Caso Clínico 1:

Correlação Clínica com Hipercolesterolemia Familiar

Um executivo de 42 anos foi admitido no Pronto Socorro com dor no peito que já durava 45 minutos. A dor irradiava para seu braço esquerdo, estava associada com dispnéia, diaforese e náusea e surgiu quando o indivíduo se dirigia com pressa ao aeroporto. Um eletrocardiograma demonstrou alterações consistentes com enfarte agudo do miocárdio, que foi confirmado por outros exames. O paciente foi adequadamente medicado e a irrigação do miocárdio foi corrigida por uma angioplastia. Entre os exames realizados notou-se significativa alteração nos lipídeos sanguíneos.

O clínico responsável pelo caso solicitou exames mais detalhados sobre o metabolismo lipídico, que são apresentados abaixo. Na pesquisa das possíveis causas destas alterações constatou-se que este indivíduo era heterozigoto para a hipercolesterolemia familiar.

	Resultados	Referência
Triglicéides	133 mg/dL	53-266 mg/dL
Colesterol total	347 mg/dL	154-200 mg/dL
Colesterol-HDL	39 mg/dL	35-65 mg/dL
Colesterol-LDL	282 mg/dL	80-160 mg/dL
Apolipoproteína A-I	105 mg/dL	125-155 mg/dL
Apolipoproteína B	213 mg/dL	70-120 mg/dL
Lipoproteína A	86 mg/dL	< 30 mg/dL

Questões para o Caso Clínico 1:

- Qual a relação entre lipídios sanguíneos e enfarto cardíaco?
- Quais são as alterações observadas no exame laboratorial? Como ocorreram estas variações?
- Qual (is) a(s) alteração (es) celulares que caracterizam a hipercolesterolemia familiar? Qual a sua relação com o caso acima descrito?
- Quais os outros aspectos apresentados pelo paciente que sugerem a predisposição para o infarto?
- Qual seria a sua proposta de mudança de estilo de vida para este jovem executivo?

Caso Clínico 2:

Um homem de 36 anos apresentava hipercolesterolemia. Após jejum noturno, sua concentração plasmática de colesterol em duas ocasiões distintas atingiu 330 mg/dL. Este indivíduo foi submetido a uma dieta livre de colesterol por 3 meses, mas seu nível plasmático em jejum pouco foi reduzido (cerca de 300 mg/dL). Subseqüentemente ele foi tratado com colestiramina, uma resina com afinidade por ácidos biliares. Esta resina não é absorvida no intestino e portanto pode ligar-se a ácidos biliares e aumentar sua excreção com as fezes.

O tratamento com colestiramina foi efetivo no controle da taxa de colesterol plasmático entre 230 e 250 mg/dL, valores considerados aceitáveis para este paciente.

Questões para o Caso Clínico 2:

- a) Por que as determinações da concentração plasmática de colesterol eram feitas após jejum noturno?
- b) Como é possível o paciente continuar apresentando colesterol circulante após 3 meses de uma dieta livre deste composto?
- c) Qual a relação entre sais biliares e colesterol? Por que, em alguns casos, a excreção aumentada de sais biliares leva à diminuição da concentração plasmática de colesterol?
- d) Como a diminuição da concentração plasmática de colesterol pode ser benéfica para o paciente?

OUTRAS QUESTÕES:

1- Faça uma análise comparativa das diferentes classes de lipoproteínas plasmáticas (quilomícrons, VLDL, LDL, HDL) sob os seguintes aspectos:

- a) Características estruturais (tamanho e densidade)
- b) Principais lipídeos constituintes
- c) Origem dos lipídeos transportados
- d) Função das principais apolipoproteínas constituintes
- e) Mecanismo de liberação dos lipídeos para os tecidos

2- A intolerância ao leite é uma deficiência parcial ou total de lactase intestinal, relativamente frequente em adultos. Estes indivíduos apresentam desconforto com a ingestão de leite, no entanto a ingestão de iogurte é bem tolerada. Explique.

3- Embora a celulose e amido sejam polímeros de glicose, os seres humanos apenas digerem o amido. Explique.

4- Indivíduos diabéticos apresentam alterações importantes no metabolismo de carboidratos e por este motivo sua dieta deve ser controlada. Para estes indivíduos, a ingestão de alimentos ricos em polissacarídeos é preferível a alimentos ricos em mono ou dissacarídeos. Explique.

PRÁTICA DE LABORATÓRIO

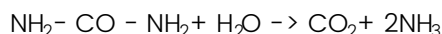
DOSAGEM DE UREIA EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

KIT LABSET - REF. 27

PRINCÍPIO:

A ureia é o principal produto metabólico nitrogenado do catabolismo de aminoácidos nos seres humanos. A síntese de ureia ocorre a partir da amônia derivada do nitrogênio dos aminoácidos, em reações catalisadas por enzimas hepáticas. A excreção adequada da ureia está relacionada com a função renal. Na técnica utilizada, a ureia é hidrolisada enzimaticamente pela urease e a amônia liberada é analisada espectrofotometricamente, através da formação de um cromógeno azul esverdeado (azul de indofenol) que se desenvolve em meio alcalino, na presença de nitroprussiato de sódio e hipoclorito. A intensidade da cor formada é diretamente proporcional à concentração de ureia na amostra analisada.

Valores elevados no plasma: desidratação, diabetes, infarto do miocárdio, insuficiência renal. Valores baixos: doença hepática severa, balanço de nitrogênio negativo, dieta hipoproteica.



OBJETIVO:

Quantificar a ureia em fluidos biológicos (plasma sanguíneo e urina).

REAGENTES:

- Reagente nº1: Padrão de Urease 268 KU/L
- Reagente nº2: Tampão fosfato pH 6,9
- Reagente nº3: Oxidante (hipoclorito de sódio 121 mmol/L)
- Reagente nº4: Padrão 70 mg/dL
- Soro sanguíneo humano (amostra desconhecida)
- Urina humana (amostra desconhecida) diluída 1:50
- Volume urina/24h: 1250 mL

PROCEDIMENTOS:

Preparar 4 tubos de ensaio conforme a tabela abaixo:

	Branco	Padrão	Plasma	Urina
Tampão	1ml	1ml	1ml	1ml
Padrão	-	10µL	-	-
Plasma	-	-	10µL	-
Urina 1:50	-	-	-	10µL

Homogeneizar as soluções e incubar por 5 minutos em banho-maria a 37°C.

	Branco	Padrão	Plasma	Urina
Oxidante	1ml	1ml	1ml	1ml

Homogeneizar as soluções e incubar por 5 minutos em banho-maria a 37°C.
Verificar novamente as absorvâncias do padrão e amostras, em 600 nm.

	Branco	Padrão	Plasma	Urina
Absorvância (A)				

CÁLCULOS:

$$\text{Concentração de ureia no plasma (mg/dL)} = \frac{\text{Absorvância da Amostra} \times \text{Concentração Padrão}}{\text{Absorvância do Padrão}}$$

$$\text{Concentração de ureia na urina (mg/dL)} = \frac{\text{Absorvância da Urina} \times \text{Concentração Padrão} \times 50}{\text{Absorvância do Padrão}}$$

$$\text{Concentração de ureia em urina (mg/24h)} = \frac{\text{Ureia urinária} \times \text{Volume (mL/24h)}}{100}$$

RESULTADOS:

Concentração de ureia no plasma (mg/dL) =

Concentração de ureia na urina (mg/dL) =

Concentração de ureia em urina (mg/24h) =

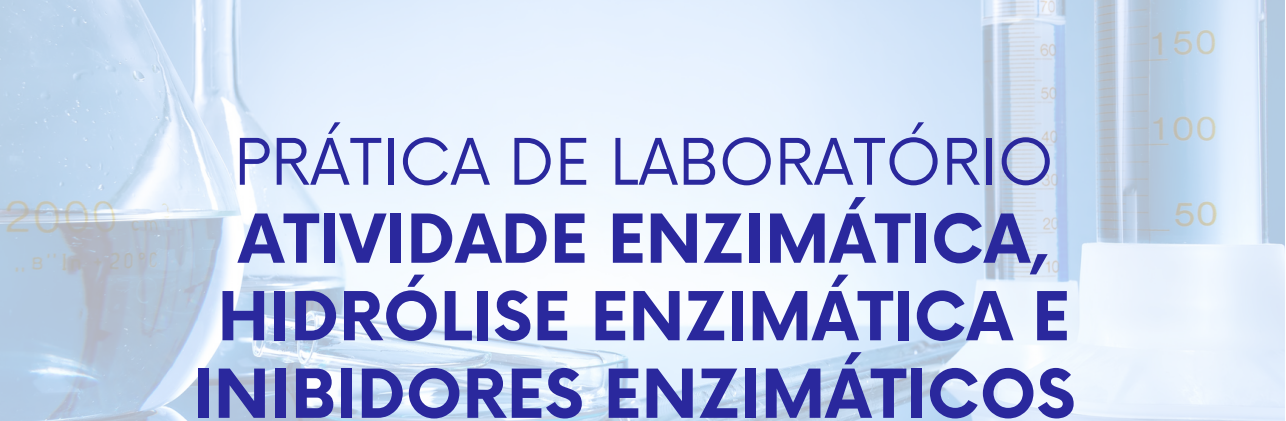
1-Quais os valores de creatinina encontrados para as amostras?

2-Os valores encontrados nas amostras estão de acordo com os valores de referência?

3-O que podem indicar?

Valores de Referência:

- Soro ou plasma (adulto): 10,0 a 50,0 mg/dL.
- Urina (adulto): 15 a 30 g/24h.

A background image showing laboratory glassware, including a large Erlenmeyer flask on the left and several graduated cylinders on the right, all containing liquids. The text is overlaid on this image.

PRÁTICA DE LABORATÓRIO

ATIVIDADE ENZIMÁTICA, HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E INIBIDORES ENZIMÁTICOS

PRINCÍPIO:

As enzimas possuem geralmente estrutura proteica, atuando como catalisadores biológicos nas reações bioquímicas que ocorrem nos seres vivos. Elas possuem a propriedade de acelerar a velocidade das reações, no entanto, diversos fatores influenciam a velocidade de uma reação enzimática. Por terem estrutura proteica, alterações no pH, na temperatura, compostos orgânicos como a ureia e força iônica do meio reacional podem modificá-las.

OBJETIVO:

Evidenciar o comportamento enzimático como catalisador biológico, tanto nas condições ideais como sob as mais variadas mudanças de temperatura, pH, substratos (especificidade enzimática) e concentração do substrato.

SOLUÇÕES E REAGENTES:

- Solução de amido 1% (Falcon 1 e Falcon 2)
- Solução de Lugol
- Solução de HCl 1:2
- Solução salina 0,95%
- Solução salina de amilase 1:10
- Solução de ácido clorídrico 1%
- Solução de hidróxido de sódio 1%
- Solução de sulfato de cobre 1%
- Água destilada
- Banho-maria
- Banho de gelo

PROCEDIMENTO PARA AVALIAR HIDRÓLISE QUÍMICA:

- a) Falcon 1: acrescentar 3 mL de HCl 1:2 na solução de amido 1%. Fechar e agitar bem.
- b) Rotular 3 tubos de ensaio A1, A2 e A3.
- c) Adicionar 5 mL de água destilada a cada tubo
- d) Tubo A1: pipetar 5 mL da solução do falcon 1 e deixar em banho de gelo por 10'.

- e) Tubo A2: pipetar 5 mL da solução do falcon 1, levar ao banho fervente por 10' e depois levar ao banho de gelo por 10'.
- f) Tubo A3: pipetar 5 mL da solução do falcon 1, levar ao banho fervente por 20' e depois levar ao banho de gelo por 10'.
- g) Retirar os tubos do banho de gelo e aguardar atingirem temperatura ambiente.
- h) Adicionar 5 gotas de solução de Lugol aos 3 tubos.

RESULTADOS:

Tubo A1:

Tubo A2:

Tubo A3:

PROCEDIMENTO PARA AVALIAR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA:

- a) Falcon 2: acrescentar 1 mL de solução salina de amilase na solução de amido 1%. Fechar e agitar bem.
- b) Rotular 3 tubos de ensaio B1, B2 e B3.
- c) Adicionar 5 mL de água destilada a cada tubo
- d) Tubo B1: pipetar 5 mL da solução do Falcon 2 e deixar em banho de gelo por 10'.
- e) Tubo B2: pipetar 5 mL da solução do Falcon 2 e deixar em temperatura ambiente por 10' e depois levar ao banho de gelo por 10'.
- f) Tubo B3: pipetar 5 mL da solução do Falcon 2 e deixar em temperatura ambiente por 20' e depois levar ao banho de gelo por 10'.
- g) Retirar os tubos do banho de gelo e aguardar atingirem temperatura ambiente.
- h) Adicionar 5 gotas de solução de Lugol aos 3 tubos.

RESULTADOS:

Tubo B1:

Tubo B2:

Tubo B3:

PROCEDIMENTO PARA AVALIAR A AÇÃO DE INDUTORES E INIBIDORES NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA:

- a) Rotular 4 tubos de ensaio C1, C2, C3 e C4.
- b) Tubo C1: adicionar 2 mL de água destilada.
- c) Tubo C2: adicionar 2 mL de solução de ácido clorídrico 1%
- d) Tubo C3: adicionar 2 mL de solução de sulfato de cobre 1%
- e) Tubo C4: adicionar 2 mL de solução de hidróxido de sódio 1%
- f) Adicionar aos 4 tubos 2 mL da solução do Falcon 2.

- g) Aguardar o tempo de 1 minuto.
h) Adicionar 5 gotas de solução de Lugol aos 4 tubos.

RESULTADOS:

Tubo C1:

Tubo C2:

Tubo C3:

Tubo C4:

QUESTÕES:

- 1- Explique como a concentração de substrato pode interferir na velocidade da reação.
- 2- Faça um gráfico que evidencie o efeito da temperatura na atividade enzimática.
- 3- Comente sobre a ação do pH na atividade enzimática observada in vitro.
- 4- Explique por que a desnaturação implica em perda da atividade enzimática.
- 5- Comente sobre indutores e inibidores enzimáticos.

PRÁTICA DE LABORATÓRIO

EXERCÍCIO ANAERÓBICO E EXERCÍCIO AERÓBICO

PRINCÍPIO:

Exercícios aeróbicos são aqueles em que predominam o oxigênio como fonte de energia. São em geral atividades de longa duração. Os exercícios anaeróbicos não contam com a presença de oxigênio, sendo de alta intensidade e curta duração.

OBJETIVO:

Mostrar experimentalmente as diferenças desses dois tipos de exercício quanto às vias metabólicas utilizadas.

PROCEDIMENTOS:

Exercício Anaeróbico: 1 aluno fará um "Sprint" de 100 metros.

Serão realizadas medidas de lactato sanguíneo, frequência cardíaca e pressão arterial nos tempos:

- Zero: antes da realização do exercício.
- Imediatamente após a realização do exercício.
- 20 minutos após a realização do exercício

Realize as medidas indicadas na tabela abaixo

Tempo (em minutos)	Concentração de Lactato sanguíneo (mmol/L)	Frequência cardíaca	Pressão Arterial (mmHg)
Zero			
Imediatamente após			
20 minutos (após)			

Exercício Aeróbico: 1 aluno fará uma caminhada de 25 minutos.
Serão realizadas medidas de lactato sanguíneo, frequência cardíaca e pressão arterial nos tempos:

- Zero: antes da realização do exercício.
- Imediatamente após a realização do exercício.
- 20 minutos após a realização do exercício

Realize as medidas indicadas na tabela abaixo

Tempo (em minutos)	Concentração de Lactato sanguíneo (mmol/L)	Frequência cardíaca	Pressão Arterial (mmHg)
Zero			
Imediatamente após			
20 minutos (após)			

Construa um gráfico da situação anaeróbica e um outro da situação aeróbica considerando os valores de lactato e frequência cardíaca X tempo.

*Os tempos são somativos

A background image showing laboratory glassware, including a large Erlenmeyer flask on the left, a graduated cylinder on the right, and a petri dish in the center, all containing liquids. The scene is set against a light blue background.

BIBLIOGRAFIA

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. *Biologia Molecular da Célula*. 3a Ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR ISO/IEC 17025: Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2001.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. *Bioquímica*. 5a Ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Normas e Manuais Técnicos: Lavar as Mãos – Informações para Profissionais de Saúde. Série A. Brasília, Centro de Documentação, 1989.

COSTA, M.A.F. *Biossegurança: segurança química básica para ambientes biotecnológicos e hospitalares*. São Paulo: Ed. Santos, 1996.

COSTA, M.A..F. *Qualidade e Biossegurança: uma necessidade de integração*. Revista Biotecnologia, N.4, jan/fev, 32-33, 1998.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. L.; MATSUDAIRA, D. B.; DARNELL, J. *Biologia Celular e Molecular*. 4a Ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2002.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. *Bioquímica Básica*. 3a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

NELSON, D. L.; COX, M. M.; LEHNINGER, A. *Princípios de Bioquímica*. 5a Ed. São Paulo: Sarvier, 2011.

RIBEIRO ALC; GUIMARÃES SCK. *Manual de Biossegurança*. Governo do Estado do Espírito Santo Secretaria Estadual de Saúde. Laboratório central de saúde pública – LACEN, 2017.

REMÃO, José Oscar dos Reis; SIQUEIRA, Antonio João Sá; AZEVEDO, Ana Maria Ponzio. *Bioquímica: Guia de Aulas práticas*. PUCRS: Porto Alegre, 2003.

SANTOS, A.P.S.A.S. (Coord) et al. *BIOQUÍMICA PRÁTICA. Protocolos para análise de biomoléculas e exercícios complementares* - 2013.
< <http://www.repositorio.ufma.br:8080/jspui/bitstream/1/445> >. Acesso em: 06 mar. 2023.

VALIM, Yara Maria Lucisano (Coord). *Práticas de Bioquímica- Conceitos Gerais*. USP: Ribeirão Preto, 2008.

