



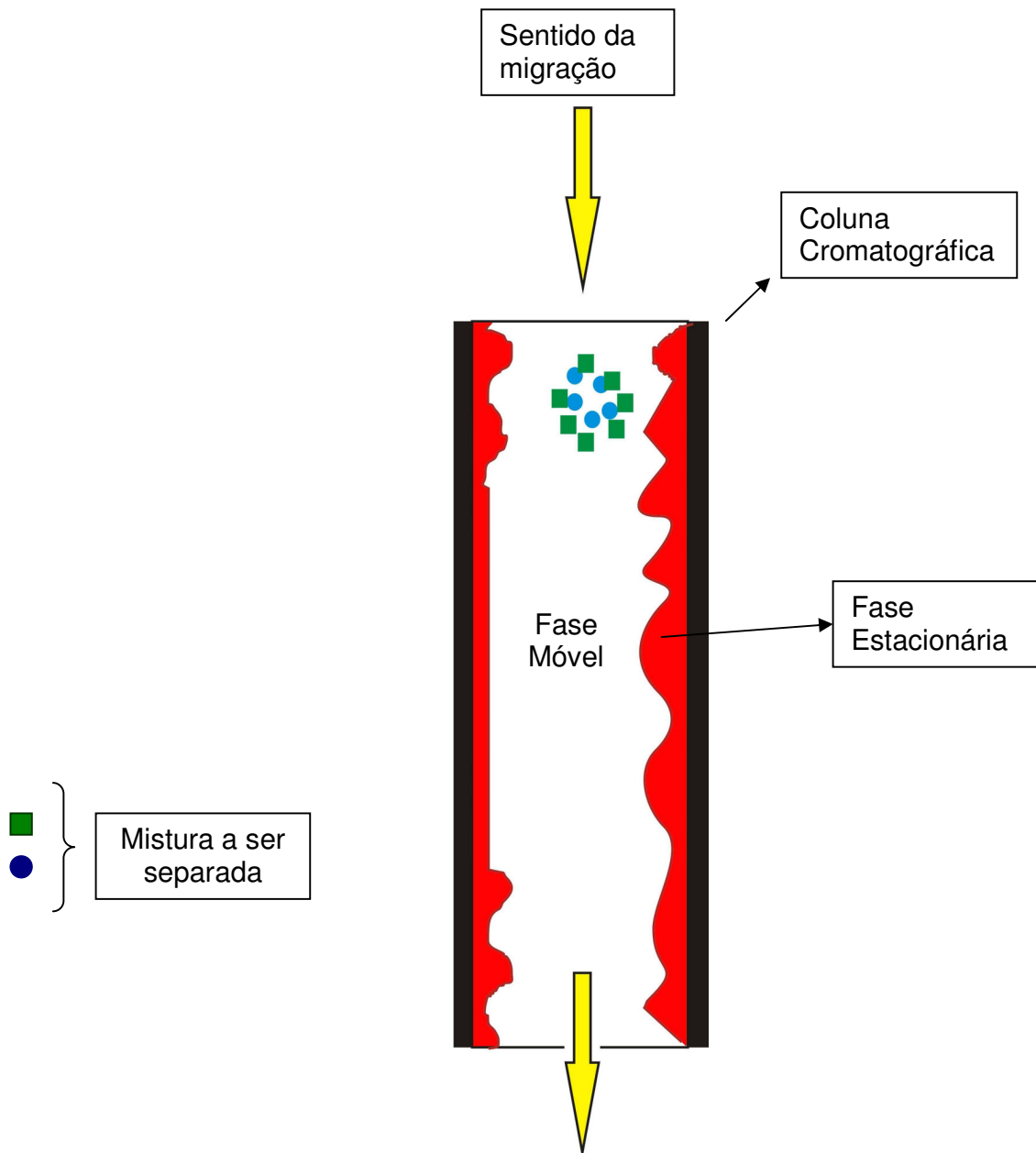
ACADEMIA DE CIÊNCIA  
E TECNOLOGIA

Biólogo Paulo Francisco Naoum

## MÉTODOS DE AVALIAÇÃO LABORATORIAL

### I) Cromatografia

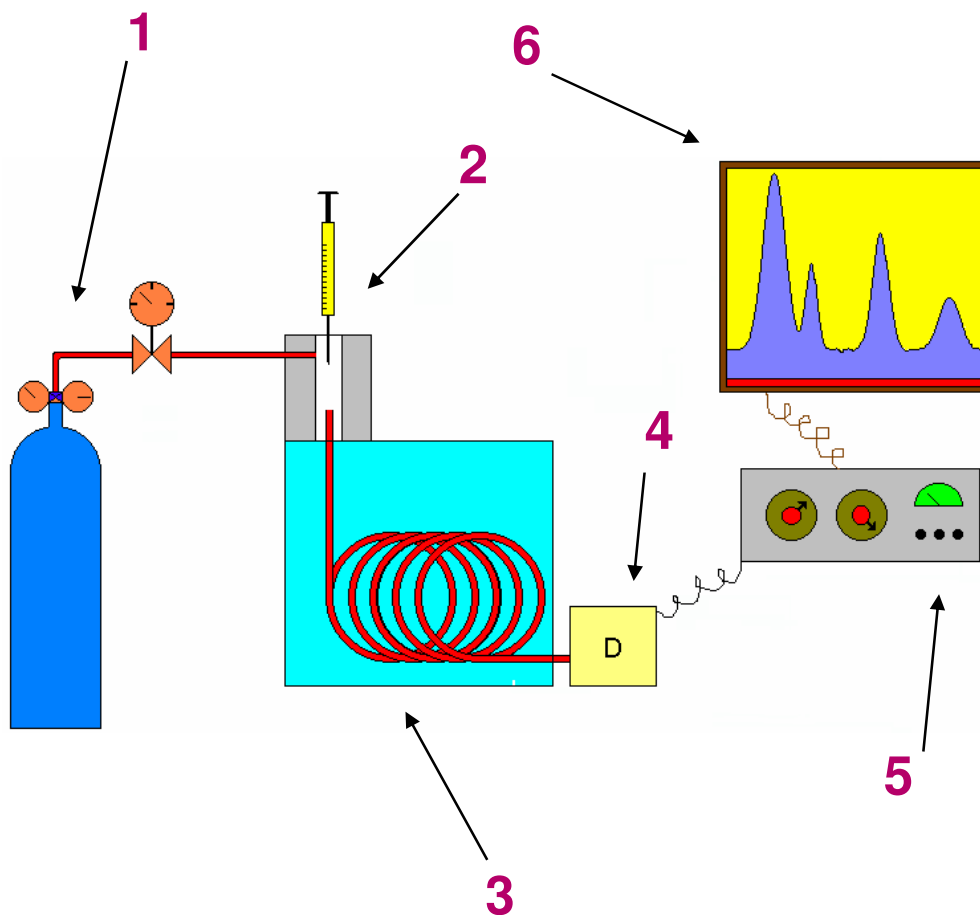
Cromatografia é um método físico-químico de separação. Fundamenta-se na migração diferencial dos componentes de uma mistura. É formada por duas fases imiscíveis: uma fase móvel e uma fase estacionária. De acordo com o tipo de fase móvel e estacionária utilizados as cromatografias podem ser classificadas em Cromatografia Gasosa, Cromatografia de Troca Iônica e HPLC (sigla de High Pressure Liquid Chromatography).



### a) Cromatografia Gasosa

A cromatografia gasosa consiste na “vaporização” (sem que haja decomposição) da substância em um gás chamado gás de arraste, e posterior migração de uma através da coluna de cromatografia; isto é, a amostra tem que se “dissolver” ao menos em parte, em um gás que participará da composição da fase móvel. Esse gás deve, obrigatoriamente, ser inerte em relação à fase estacionária. Gases como hidrogênio, nitrogênio, argônio e hélio são os mais utilizados. As substâncias saem então da coluna e passam por um detector que gera um sinal proporcional à quantidade de substância eluída no gás em função do tempo (análise quantitativa). Por exemplo, em uma mistura, cada componente terá sua pressão

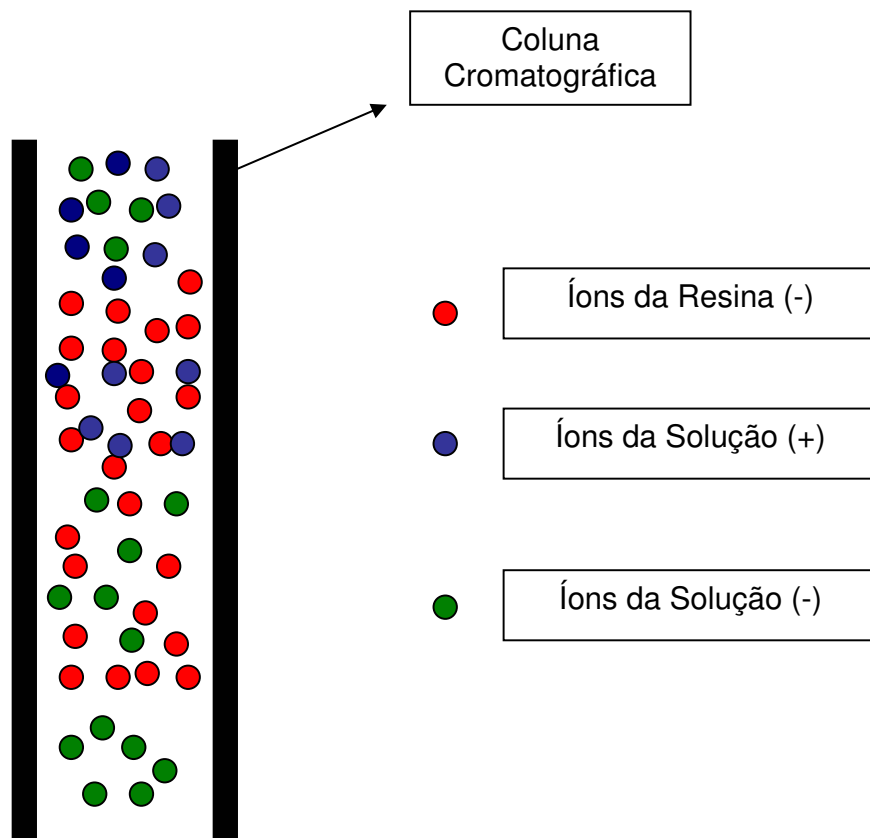
de vapor característica (volatilidade), assim substâncias que forem mais voláteis, ficarão dissolvidas no gás de arraste e passarão mais rapidamente pela coluna cromatográfica. Trata-se de uma técnica muito utilizada pois é capaz de separar substâncias com concentrações de nanogramas e até picogramas. A cromatografia gasosa é usada no fracionamento de proteínas, enzimas, peptídeos e aminoácidos.



- 1 – Reservatório do gás de arraste ( $N_2$  ou  $H_2$  ou He ou Ar)
- 2 – Local onde a amostra será injetada (“vaporização” da amostra)
- 3 – Coluna Cromatográfica
- 4 – Detector
- 5 – Amplificador de sinal
- 6 – Formação do Cromatograma (gráfico concentração de amostra x tempo)

## b) Cromatografia Iônica

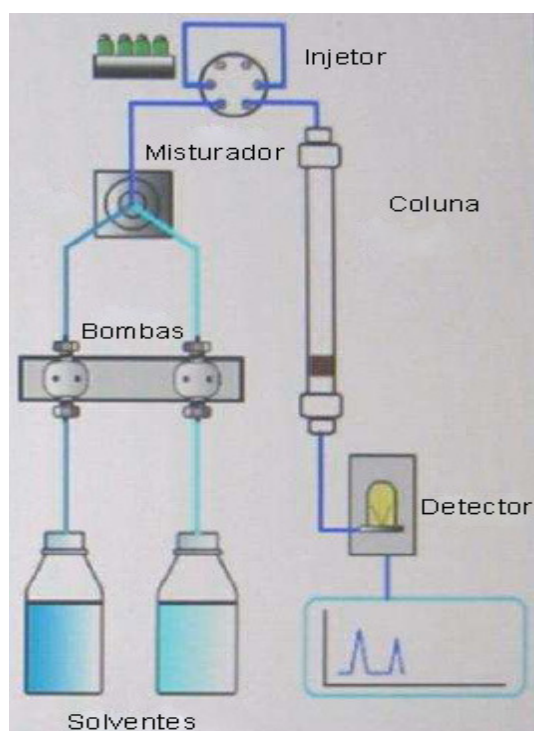
Também conhecida como *cromatografia de troca iônica*. Técnica cromatográfica onde a fase estacionária é representada por uma resina trocadora de íons. Essa resina possui em sua composição íons que irão interagir quimicamente com os íons presentes na solução da fase móvel.



Após a interação dos íons da amostra com a resina, uma solução chamada eluente é passada pela coluna de cromatografia liberando assim os íons que estavam interagindo com a resina. O tempo de retenção/separação das diferentes espécies é que determinará a concentração dos diferentes íons na amostra. Antes de passar pelo detector, as amostras passam por uma segunda coluna cromatográfica, a coluna supressora de eluente, que irá bloquear a detecção de íons que por ventura possam fazer parte da constituição do eluente e que poderiam interferir na concentração iônica real da amostra; ou seja, somente os íons da amostra são encaminhados para análise. Desvantagens: técnica de custo extremamente elevado e que requer mão de obra altamente especializada na operação do sistema e análise de dados. É usada para fracionar peptídeos, aminoácidos, hemoglobinas e hemoglobina glicada.

### c) Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC)

HPLC: sigla do inglês que significa High Pressure (or Performace) Liquid Chromatography. Atualmente chamada de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Possui como características: a elevada sensibilidade, a alta velocidade de reação e o grande desempenho com confiabilidade e rapidez na liberação de resultados. Trata-se de um tipo de cromatografia que utiliza um líquido como fase móvel, que é injetado na coluna cromatográfica a altas pressões e diferentes tipos de fase estacionária, variando de acordo com aquilo que se quer analisar. Os constituintes da fase estacionária, em geral se encontram altamente particionados, o que gera uma separação mais eficiente. Constitui-se de reservatórios para os reagentes, bombas que propulsionam a fase móvel a altas pressões, injetor de amostra, coluna cromatográfica e um detector acoplado a um computador. A técnica de CLAE (HPLC) é a base para o entendimento e realização de outras técnicas como a cromatografia gasosa e de troca iônica. A utilização de partículas ainda mais finas (0,1 nm) e pressões ainda mais elevadas (15.000 psi) tem gerado o que se chama de CLUE (Cromatografia de Ultra Eficiência). É usada principalmente para fracionar hemoglobinas e hemoglobina glicada. Pode ser usada para proteínas, peptídeos e aminoácidos.



Esquema geral de um cromatógrafo.

## II) Quimioluminescência

Tipo de reação química, que ao se processar gera energia luminosa. Durante uma reação química, os reagentes se transformam em estados intermediários eletronicamente excitados, e ao passarem para um estado de menos excitado, liberam a energia absorvida na forma de luz. O composto químico Luminol, é um dos representantes mais conhecidos da quimioluminescência. Quando em contato com o sangue, por exemplo, utiliza o ferro da hemoglobina como catalisador para a reação de liberação de luz. Esse composto é muito usado em perícia criminal, quando se quer investigar a presença de vestígios de sangue em uma cena de crime. Mesmo que o local tenha sido limpo, o luminol evidencia a presença do sangue.

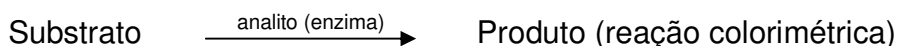
Laboratorialmente, hormônios, drogas e microorganismos podem ser identificados por testes colorimétricos. Tais métodos utilizam-se de anticorpos ligados a um marcador luminescente (cromógeno) que pode ser o próprio luminol ou mais modernamente derivados de acridina, sistema avidina-biotina, entre outros.

## III) Colorimetria

Método de análise quantitativa que se baseia na comparação da cor produzida por uma reação química com uma cor padrão. De acordo com a intensidade da cor produzida, infere-se a concentração do determinado analito (substância que se quer analisar). O método mais seguro de se verificar a coloração de uma reação é através do uso do espectrofotômetro, que compara a intensidade de cor com uma cor padrão, chamada de “branco” (solução padrão em que o espectrofotômetro é zerado). É o método mais usado em análises laboratoriais de bioquímica clínica.

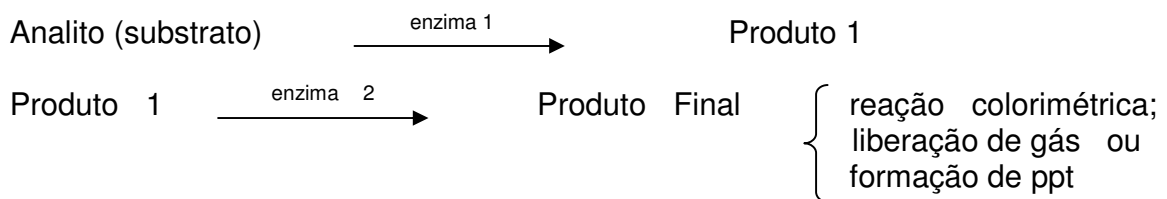
## IV) Cinético

Geralmente utilizado em reações em que o analito é uma enzima. A atividade da enzima é analisada por meio da reação dela com um composto químico denominado substrato. Essa reação gera um produto. Em geral, a reação é acoplada a uma reação colorimétrica: à medida que a conversão enzimática se processa e o produto é gerado, há mudança de cor que deve ser observada em espectrofotômetro. Leituras sucessivas em intervalos de tempos iguais devem ser feitas. Aos valores obtidos na leitura espectrofotométrica deve-se aplicar fatores de correção que variam de acordo com o exame a ser realizado.



## V) Cinético Enzimático:

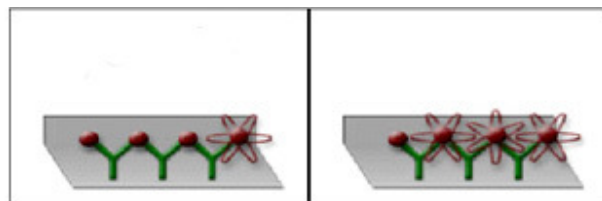
Muito semelhante ao método cinético, porém o analito não é uma enzima e sim o substrato que será utilizado por uma enzima específica. O produto dessa primeira reação enzimática pode então ser captado por outra(s) enzima(s) que está acoplada a uma reação colorimétrica, de liberação de gás ou formação de precipitado.



Obs.: podem haver outras enzimas entre o produto 1 e o produto final.

## VI) Radioimunoensaio (RIA – Radio Imuno Assay)

Baseia-se na competição de um antígeno presente na amostra em análise com um antígeno marcado com isótopo radioativo pelo mesmo anticorpo. A concentração do antígeno em análise será inversamente proporcional à radiação emitida. Trata-se de uma técnica com alta especificidade e sensibilidade, porém com elevado custo e grande risco operacional por manipular material radioativo.



**Antígeno Marcado com Isótopo Radioativo**



**Antígeno em Análise**

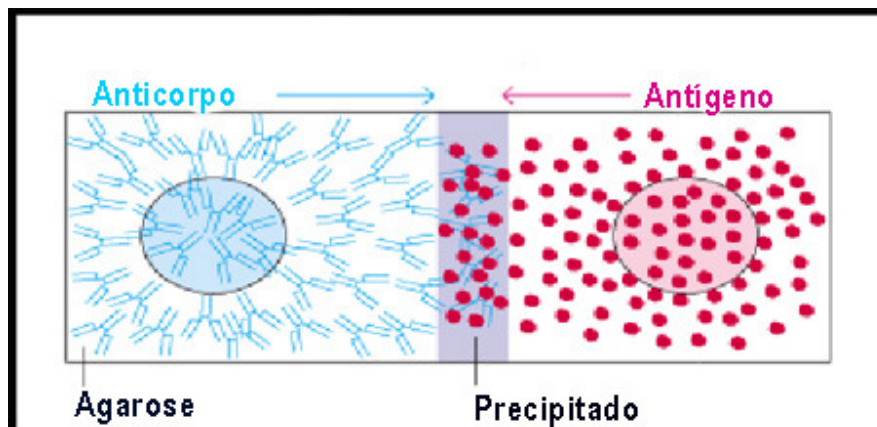
Esquema mostrando como funciona o Radioimunoensaio

## VII) Imunodifusão Radial

Trata-se de uma técnica de difusão de antígeno e anticorpo seguida de precipitação. Ao se adicionar um antígeno solúvel com um anticorpo também solúvel forma-se um agregado antígeno-anticorpo que é insolúvel e sofre precipitação.

### a) Imunodifusão Dupla de Ouchterlony:

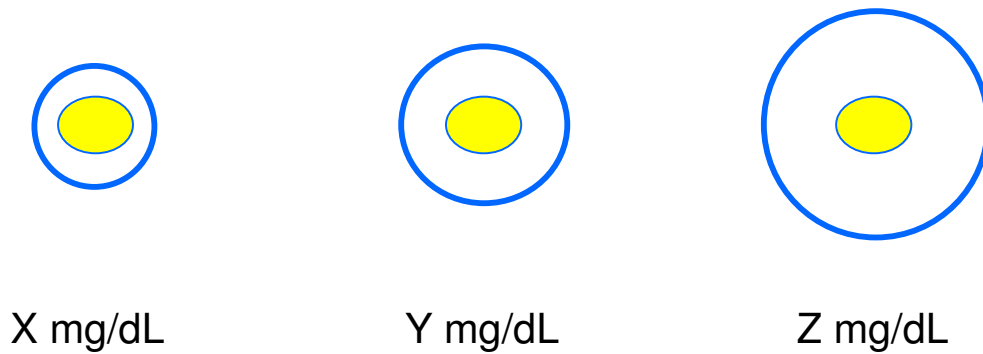
Utiliza como meio de difusão o gel de agarose. Antígeno e anticorpo se difundem em todas as direções. Ao se encontrarem forma-se uma linha de precipitação. É de grande utilidade na identificação de microrganismos patogênicos e auto anticorpos em doenças auto-imunes. Porém somente pode ser utilizada em reações antígeno-anticorpo que formem precipitado, e requer grande tempo para que ocorra a difusão e precipitação (até 24 horas).



### b) Imunodifusão Radial de Mancini:

Método realizado em gel de agarose com anti-soros específicos já incorporados ao gel. As amostras são aplicadas em "poços" circulares já feitos no gel. À medida que a difusão ocorre, a reação antígeno-anticorpo forma anéis de precipitação e a concentração de antígeno é proporcional ao raio do anel de precipitação. Ao medir o diâmetro do círculo de precipitado, utiliza-se com uma tabela contendo os valores de diâmetro relacionados com a concentração de antígeno.





Esquema mostrando os anéis de precipitação (reação antígeno-anticorpo) pelo método de Imunodifusão Radial de Mancini. No caso, as concentrações são  $X < Y < Z$ .

### VIII) Hemaglutinação (HA)

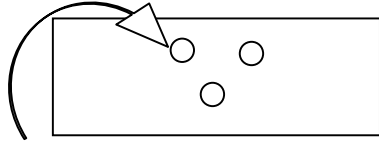
Reação que gera agregação de eritrócitos devido à presença de anticorpos (ou vírus ou lecitinas). Hemácias sensibilizadas por antígenos específicos para um patógeno são usadas para testar o soro do paciente. Quando na ausência de agente hemaglutinante (anticorpo), as hemáceas sedimentam na forma de botão e quando há aglutinação as hemáceas sedimentam na forma de tapete (difusa).

### IX) Fluorescência e Imunofluorescência (IF)

Fluorescência é um processo onde um elemento chamado fluorocromo absorve energia na forma de espectro luminoso, tornando-se eletricamente “excitado”; ao liberar essa energia emitem luz num comprimento de onda específico. A imunofluorescência é uma técnica baseada na ligação de anticorpos com fluorocromos. A imunofluorescência pode ser direta ou indireta. Na IF direta detecta-se o antígeno pesquisado propriamente dito: coloca-se a amostra a ser analisada numa placa específica para fluorescência, a seguir, adiciona-se o conjugado (anticorpo específico marcado com fluorocromo). Na IF indireta a placa de fluorescência já vem com antígenos específicos, testa-se o soro do paciente e depois adiciona-se um anti-anticorpo marcado com fluorocromo.

Ex.:

IFD

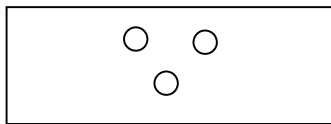


Amostra a ser pesquisada  
(biópsia de tumor por exemplo)

adição do anticorpo marcado  
→

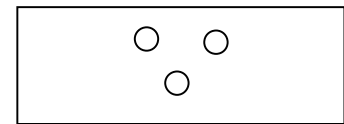
Revelação

IFI



Placa contendo antígenos específicos

adição do soro contendo  
anticorpos do paciente  
→



Adição do  
anti-anticorpo

Revelação

## X) Nefelometria e Imunoturbidimetria

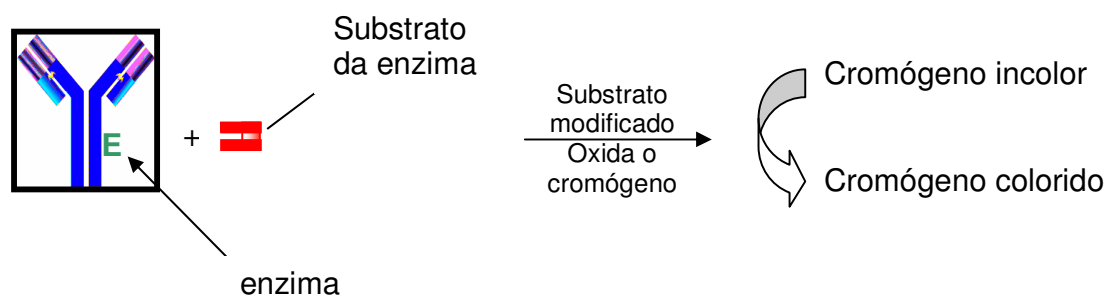
A Nefelometria é uma técnica para medir as concentrações de Ig A, Ig M e Ig G e outras proteínas plasmáticas de uma amostra. Um aparelho específico que mede a turbidez é utilizado e mede a difração (desvio) da luz ao passar por uma solução contendo complexos imunológicos.

Já a Imunoturbidimetria mede a diminuição da luz ao passar por um complexo antígeno-anticorpo, em outras palavras, a turbidimetria mede o quanto a solução antígeno-anticorpo absorve da luz e o quanto ela deixa passar. Essa técnica, assim como a nefelometria, é usada para medir a concentração plasmática de diversas proteínas.

A principal diferença entre nefelometria e turbidimetria é que na nefelometria a luz difundida ou seja aquela que atravessa a solução é medida, enquanto que na turbidimetria a luz não difundida (a absorvida) é medida.

## XI) ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

Também chamado teste ou ensaio imunoenzimático. Consiste num anticorpo conjugado a uma enzima capaz de modificar um cromógeno, através da reação com seu substrato específico, gerando colorações diferentes de acordo com o cromógeno:



Existem vários tipos de ELISA: os para pesquisa de antígenos, onde as placas contêm anticorpos específicos; o ELISA para pesquisa de anticorpos, em que as placas estão sensibilizadas por antígenos, a pesquisa é feita através da amostra contendo anticorpos e evidenciada pela adição de um anti-anticorpo marcado (anticorpo 2<sup>ário</sup>); os testes por competição dentre outros.

## XII) Eletroquimioluminescência

Utiliza a emissão de luz através da aplicação de potenciais de oxidação ou redução a um eletrodo imerso em soluções que emitem radiação (em geral compostos de rutênio). Dentre os métodos automatizados mais utilizados encontra-se o Elecsys da Roche Diagnóstica que utiliza micropartículas revestidas de estreptavidina, anticorpo monoclonal específico biotilado e um anticorpo monoclonal específico para cada analito. Essa mistura é fixada magneticamente na superfície do eletrodo e o que não se fixar é removido. Por fim, há uma aplicação de corrente elétrica no eletrodo que induz uma emissão quimioluminescente, medida por um fotomultiplicador.

### **XIII) Imunofluorimetria**

Técnica basicamente automatizada que utiliza, em geral, anticorpo marcado com fluorocromo (rodamina, fluoresceína e európio são os mais utilizados). Caso a reação seja positiva ocorre a associação do fluorocromo (após lavagens sucessivas) com uma solução amplificadora de fluorescência e conseqüente emissão de luz fluorescente, que é intensa porém pouco duradoura, daí a necessidade de automação.

### **XIV) Espectrofotometria de Absorção Atômica**

Técnica analítica que se baseia na absorção de radiação eletromagnética por átomos gasosos no estado fundamental. É um método de análise usado para determinar qualitativamente e quantitativamente a presença de metais.

O método consiste em determinar a presença e quantidade de um determinado metal em uma amostra qualquer, usando como princípio a absorção de radiação ultravioleta por parte dos elétrons que, ao sofrerem um salto quântico depois de devidamente excitados por uma chama de gás acetileno a 3000 graus celsius, esses devolvem a energia recebida para o meio, voltando assim para a sua camada orbital de origem. A energia devolvida na forma de um fóton de luz, por sua vez, absorve a radiação ultravioleta emitida pela fonte específica (cátodo oco) do elemento químico em questão. Dessa forma, elétrons que estão contidos na amostra, e que sofrem também um salto quântico e que não pertencem ao mesmo elemento que constitui o cátodo oco que está sendo usado no momento, não serão capazes de causar uma interferência, isso porque eles absorverão apenas radiação com comprimento de onda referente ao elemento químico do qual fazem parte.

### **XV) Íon Seletivo ou Potenciometria**

Um eletrodo de íon seletivo é um sensor (ou um transdutor) capaz de converter a atividade de um íon presente numa solução em um potencial elétrico que é então captado por um voltímetro ou medidor de pH. São necessários um eletrodo específico para o íon que se quer testar (Ca, K, Na...) e um eletrodo de referência; ambos são imersos na solução a ser analisada e a atividade do íon é diretamente proporcional à voltagem medida pelo voltímetro. A partir da atividade do íon, por meio de cálculos matemáticos, pode-se obter a concentração do íon na amostra.

## **XVI) Química Seca**

Processo em que não existe despejo de resíduos contaminados no meio ambiente, pois não utiliza água na execução dos exames. Os reagentes ficam dispostos em 6 camadas numa placa de vidro e à medida que a amostra vai passando por elas, as reações químicas vão se procedendo. Os dejetos produzidos ficam contidos nas placas de vidro que podem ser autoclavados pós uso. Requer pequena quantidade de amostra (cerca de 10  $\mu\text{L}$ ), calibragem reduzida (apenas 2 por ano), alta taxa de precisão e rapidez e cobre cerca de 95% dos testes laboratoriais em bioquímica. A análise se dá por reflectância (processo luminoso): os reagentes são dispostos em multicamadas nas lâminas de vidro e à medida que a amostra entra em contato com as lâminas, ocorrem reações em multicamadas e a luz incidida é transformada em voltagem que gera o resultado solicitado. O Sistema Vitros da Johnson & Johnson Produtos Profissionais é um dos mais utilizados no processo.