

## Método

Colorimétrico – Arsenazo III

## Finalidade

Sistema para a determinação quantitativa do Cálcio no soro, plasma e urina por reação de ponto final.

**Somente para uso diagnóstico in vitro.**

## Princípio

O cálcio presente na amostra reage com o Arsenazo III em meio ácido forma um complexo de cor azul, com o máximo de absorção em 660 nm (600 - 680 nm). A intensidade de cor formada é diretamente proporcional à concentração de cálcio na amostra.

## Significado Clínico

O cálcio encontra-se ligado às proteínas e na forma livre, sendo muito importante na composição óssea, na coagulação sanguínea, no sustento do transporte, integridade e permeabilidade das membranas celulares, na estimulação dos músculos esqueléticos e cardíacos, no controle neuromuscular. A homeostase do cálcio é regulada por diversos hormônios e envolve a participação do intestino, rins e esqueleto.

A hipercalemia aponta a presença de hiperparatireoidismo, mieloma, neoplasias, hipertireoidismo e hepatopatias. Na hipocalcemia são encontrados a osteomalácia, hipomagnesemia, pancreatite, hipervolemia e má absorção do cálcio.

## Reagentes

**Reagente nº 1 - Reagente de Cor** - Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Tampão Fosfato 100 mmol/L (pH 6,5), Arsenazo III 0,2 mmol/L, 8-Hidróxiquinoleína 5 mmol/L, Azida Sódica 0,1%.

**Reagente nº 2 - Padrão** - Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Cálcio 10 mg/dL, Azida Sódica 0,05 %.

## Estabilidade, Condições de Armazenamento e Transporte

Os reagentes são estáveis até a data de validade impressa no rótulo do produto, quando conservados na temperatura recomendada (2 a 8°C), bem vedados e se evitado de contaminação durante o uso. Antes de serem abertos, os reagentes podem ser transportados em temperatura que não exceda 30°C, até um limite de 120 horas. **Não congelar.**

## Cuidados Especiais e Precauções

- As amostras a serem analisadas devem ser tratadas como material potencialmente infectante.
  - Utilizar os EPI's de acordo com as Boas Práticas de Laboratório Clínico.
  - O Reagente de Cor (1) e o Padrão (2) contém azida sódica que é tóxica e irritante para pele e mucosa.
  - As informações de Descarte, Segurança e Primeiros Socorros estão descritas na Ficha Individual de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ) deste produto, disponível em [www.bioanalitica.com.br](http://www.bioanalitica.com.br) ou pelo telefone 0800 006 8111.
  - Reagentes de lotes diferentes não devem ser misturados.
  - Não trocar as tampas dos frascos dos reagentes, a fim de evitar contaminação cruzada.
  - Não utilizar os reagentes quando se apresentarem turvos.
  - Evitar deixar os reagentes fora das condições de armazenamento especificadas, quando os mesmos não estiverem em uso.
  - O tempo de reação, pipetagens e temperatura de trabalho são muito importantes para obtenção de resultados corretos.
- Usar pipetas de vidro e ponteiros descartáveis específicas para cada amostra, controle, padrão/calibrador e reagente.
- O nível de água do banho-maria deve ser superior ao dos tubos de ensaio que contém as reações.

## Materiais Necessários e Não Fornecidos

- Analizador bioquímico automático, semiautomático ou espectrofotômetro;
- Pipetas de vidro e/ou automáticas;
- Ponteiras, estantes;
- Tubos de ensaio;
- Cronômetro;
- Banho-maria.

## Amostra

Soro, plasma (Heparina) e urina. O analito é estável por 14 dias se armazenado entre 2 e 8°C, e 28 dias a -10°C, quando livres de contaminação.

Para urina, o analito é estável por 8 dias armazenada entre 2 e 8°C, quando livres de contaminação. Colher amostra de urina de 24 horas em um frasco contendo 20 mL de HCl 6 mol/L (50% v/v) e homogeneizar bem.

Para descarte dos reagentes e materiais biológicos devem-se seguir as normas locais, estaduais ou federais de proteção ambiental.

## Interferências e Limitações

O cálcio sérico se eleva ligeiramente após a realização da hemodiálise e após a prática de exercício físico. Na gravidez e no alcoolismo crônico, os valores de cálcio estão ligeiramente diminuídos.

Concentrações de triglicérides até 1216 mg/dL e ácido ascórbico até 20 mg/dL não produzem interferências significativas. Valores de hemoglobina maior que 433 mg/dL e bilirrubina maior que 18,0 mg/dl produzem interferências significativas nas amostras.

## Preparação dos Reagentes

Os reagentes estão prontos para uso.

## Procedimento Técnico

### Equipamentos Automáticos

Para uso em analisadores automáticos, verificar o protocolo de automação no site [www.bioanalitica.com.br](http://www.bioanalitica.com.br) ou através do SAC.

**Nota:** Recomendamos o uso do Calibrador – Ref. BA052 para calibração. Para avaliar a precisão das dosagens, recomendamos o uso do Controle N – Ref. BA115 e Controle P – Ref. BA118.

## Método de Ponto Final

Identificar 3 tubos de ensaio: B (Branco), T (Teste), P (Padrão) e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Padrão
Amostra	---	0,01 mL	---
Padrão (2)	---	---	0,01 mL
Reagente de Cor (1)	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Homogeneizar bem e colocar em banho-maria 37°C por 2 minutos. Ler a absorbância do Teste e do Padrão em 660 nm (600 - 680 nm), acertando o zero com o Branco. A cor é estável por 60 minutos.

Esta técnica é adequada para fotômetros cujo volume mínimo de solução para leitura é igual ou menor que 1,0 mL. Verificar a necessidade de ajuste do volume, e modificar proporcionalmente para não alterar os cálculos e o desempenho do teste. Volumes de amostra menores que 0,01 mL são críticos em aplicações manuais, pois aumentam a imprecisão da medição.

## Procedimento para eliminar interferência devido a traços de cálcio presentes na vidraria.

- Identificar 2 cubetas do fotômetro com "Teste" e "Padrão" e pipetar em cada uma 1,0 mL de Reagente de Cor (1).
- Selecionar o comprimento de onda no aparelho 660 nm (600 a 680) ou 660 nm 8 (600 a 680).
- Acertar o zero do fotômetro com a cubeta Padrão contendo 1,0 mL de Reagente de Cor (1).
- Adicionar à cubeta Padrão 0,01 mL de Padrão (2).
- Misturar bem e fazer a leitura fotométrica do Padrão ( $A_{\text{padrão}}$ ).
- Acertar o zero do fotômetro com a cubeta teste contendo 1,0 mL de Reagente de Cor (1).
- Adicionar à cubeta teste 0,01 mL de amostra a ser analisada.
- Misturar bem e fazer a leitura fotométrica do Teste ( $A_{\text{teste}}$ ).

## Cálculos

$\text{Cálcio (mg/dL)} = (\text{Absorbância do Teste} \div \text{Absorbância do Padrão}) \times \text{Concentração do Padrão}$

## Exemplo com Padrão

Absorbância do Teste = 0,293  
Absorbância do Padrão = 0,362  
Concentração do Padrão = 10 mg/dL  
Cálcio =  $(0,293 \div 0,362) \times 10 = 8,09 \text{ mg/dL}$

## Exemplo com Fator de Calibração

$F_c = 10 \div 0,362 = 27,6$   
Cálcio =  $0,293 \times 27,6 = 8,10 \text{ mg/dL}$

## Dosagem da Proteína em Urina de 24 horas

Efetuar a análise da urina de 24 horas utilizando uma amostra do volume total.

Multiplicar o resultado obtido pelo volume total urinário (mL) e dividindo o resultado por 100.

$\text{Cálcio (mg/24 h)} = (\text{mg/dL} \times \text{volume urinário em mL}) \div 100$   
Os resultados serão expressos em mg/24h.

## Cálcio Ionizado (Cal)

$$\text{Cal (mg/dL)} = \frac{6x\text{Ca} - [(0,19 \times P) + A]/3]}{(0,19 \times P) + A + 6}$$

Ca = Cálcio sérico (mg/dL)

P = Proteína total (g/dL)

A = Albumina (g/dL)

## Características do Desempenho

### Comparação de Métodos

O método foi comparado com outro produto com metodologia semelhante através de 40 amostras de soro humano. Através de modelos estatísticos, os resultados foram analisados e resultaram na equação de regressão linear onde Método Bioanalítica (y) = 0,511 + 0,728 \* Método comparativo (x) e coeficiente de correlação igual a 0,991.

### Sensibilidade

Uma amostra proteica não contendo Cálcio, foi utilizada para calcular o limite de detecção do ensaio. A média encontrada foi 0,0800 mg/dL equivalente a 20 determinações, com desvio padrão de 0,0171 mg/dL.

A sensibilidade, que indica o limite de detecção do método, corresponde à média mais 3 vezes o desvio padrão, que é igual a 0,1314 mg/dL.

### Linearidade

A reação é linear até 20 mg/dL. Para amostras com valores acima de 20 mg/dL, diluir a amostra 1:2 ou 1:4 com Cloreto de Sódio 150 mmol/L (0,85%), repetir a dosagem e multiplicar o resultado obtido pelo fator de diluição.

### Repetitividade

A repetitividade foi calculada a partir de 20 determinações sucessivas, utilizando 3 amostras com concentrações diferentes, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração Média (mg/dL)	4,48	9,59	17,14
Desvio Padrão (mg/dL)	0,04	0,09	0,31
Coeficiente de Variação (%)	0,94	0,91	1,81

### Reprodutibilidade

A reprodutibilidade foi calculada a partir de 20 determinações sucessivas durante 20 dias consecutivos, utilizando 3 amostras com concentrações diferentes, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração Média (mg/dL)	2,35	9,70	18,43
Desvio Padrão (mg/dL)	0,21	0,37	0,49
Coeficiente de Variação (%)	8,81	3,78	2,65

## Valores de Referência

Estes valores de referência devem ser usados apenas como orientação. Sugere-se que cada laboratório estabeleça seus próprios valores para população atendida. Os resultados dos testes devem ser analisados por um profissional responsável.

Cálcio (soro ou plasma) mg/dL	
Cordão Umbilical	8,2 a 11,2
Prematuros	6,2 a 11,0
0 – 10 dias	7,6 a 10,4
Lactentes	9,0 a 11,0
2 – 12 anos	8,8 a 10,8
Adultos	8,8 a 11,0
Cálcio (urina) 24 horas	
Dieta isenta de cálcio	5 a 40 mg/24h
Dieta restrita de cálcio	200 mg/24h
Dieta sem restrição de cálcio	300 mg/24h
Cálcio Iônico mg/dL	
1 a 18 anos	4,80 a 5,52
Adultos	4,60 a 5,40

## Controle Interno da Qualidade

O laboratório clínico deve possuir um programa interno de controle da qualidade, para assegurar que todos os procedimentos, normas, limites e tolerância para variações sejam claramente definidos. Ressaltamos que todos os sistemas de medição apresentam uma variabilidade analítica, que deve ser monitorada pelos laboratórios. Portanto, é recomendável a utilização de controles, que permitam avaliar a precisão e a exatidão das dosagens. Sugere-se utilizar soluções estabilizadas da linha de controles e calibradores Bioanalítica.

## Observações

- A limpeza e secagem adequadas do material usado são fatores fundamentais para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.
- A água utilizada na limpeza do material deve ser recente e isenta de agentes contaminantes. A limpeza da vidraria deve ser feita com detergente neutro. O enxágue deve ser exaustivo sendo os últimos com água destilada ou deionizada.
- A água utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes e usar nas medições, a água deve ser do Tipo II, com resistividade > 1 megaohms/cm ou condutividade < 1 microsiemens/cm e concentração de silicatos < 0,1 mg/L. Para o enxágue inicial da vidraria, a água pode ser do Tipo III, com resistividade > 0,1 megaohms ou condutividade < 10 microsiemens. No enxágue final, utilizar água do Tipo II. Coluna deionizadora com sua capacidade saturada libera água alcalina, vários íons e também substâncias com grande poder de oxidação ou redução que deterioram os reagentes em poucos dias ou mesmo horas, alterando de maneira imprevisível os resultados. Assim, é fundamental estabelecer um programa de controle da qualidade da água.

## Referências Bibliográficas

- 1 - TIETZ, N.W. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, Burtis CA, Ashwood ER eds, 2a. edição, Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1994.
- 2 - Morgan BR, Artiss JD, Zak B. Clin Chem 1993;39:1608-12.
- 3 - Soldin SJ, Brugnara C, Wong EC: Pediatric Reference Ranges, 5a edição, Washington: AACCPress, 2005: 45-46.
- 4 - JANSEN JW, Helbing AR Eur J Clin Chem Clin Biochem 1991;29:197-201.
- 5 - Westgard JO, Barry PL, Hunt MR, Groth T. Clin Chem 1981; 27:493-501.
- 7 - MORGAN BR, Artiss JD, Zak B. Clin Chem 1993;39:1608-12.
- 8 - TONKS DB. Clin. Chem., 1.963, 9 - 217
- 9 - Bioanalítica: Dados internos de arquivo do P&D.

## Termos e Condições de Garantia

A Bioanalítica Diagnóstica garante o desempenho e a qualidade deste produto, dentro das especificações, até a data de expiração indicada nos rótulos, desde que utilizados, armazenados e transportados nas condições adequadas.

## Apresentações

Ref.	Volume	Reagente 1	Reagente 2
BA046-50	50 mL	1 x 50 mL	1 x 3 mL
BA046-100	100 mL	2 x 50 mL	1 x 3 mL

## Bioanalítica Diagnóstica S/A.

Rua Álvares da Silva, 12 - União  
CEP: 31160-360 – Belo Horizonte MG - Brasil  
Tel. +55 31 3657-0051  
www.bioanalitica.com.br  
E-mail: bioanalitica@bioanalitica.com.br  
CNPJ: 20.264.948/0001-61 – Indústria Brasileira  
SAC: 0800 006 8111  
E-mail: sac@bioanalitica.com.br

Revisão: Outubro / 2022.