

## FINALIDADE

Sistema colorimétrico para determinação do ferro sérico.  
**Somente para uso diagnóstico *in vitro*.**

## PRINCÍPIO

Em pH ácido, frente a um agente redutor, o ferro sérico é liberado da transferrina sob a forma de íon ferroso. Nestas condições, reage com a ferrozina formando cor magenta de absorção máxima em 560nm.

## METODOLOGIA

Goodwin modificado.

## REAGENTES

**Solução redutora:** a solução redutora apresenta a seguinte composição por litro: Cloreto de Hidroxilamina 0,36M, Glicina 0,1M, Tiosemicarbazida 0,014M e t-Octilfenoxipolietoxietanol 0,5mmol com pH 2,2 +/- 0,1.

**Ferrozina:** solução 0,0095molar de 3-(2-Piridil)-5-6-bis (4- Ácido Fenil Sulfônico)-1,2,4, Triazina, sal monossódico.

**Solução padrão 200 µg/dL:** solução aquosa contendo 200µg/dL de ferro.

**Reagente A:** solução aquosa contendo 5mg/L de ferro.

**Carbonato de Magnésio:** cada cápsula contém de 75 a 85mg de Carbonato de Magnésio.

## APRESENTAÇÃO

Solução redutora	1 x 70 mL
Ferrozina	1 x 9 mL
Solução padrão 200µg/dL	1 x 6 mL
Reagente A	1 x 12 mL
Carbonato de Magnésio	7 cápsulas

## NÚMERO DE TESTES

45 testes 500µL de soro

## EQUIPAMENTOS E MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS

- Espectrofotômetro ou fotocolorímetro capaz de medir a absorvância em 560nm ou filtro verde.
- Tubos de ensaio.
- Água deionizada.
- Cronômetro.
- Banho maria (37°C).
- Centrífuga.
- Tubos de centrífuga.
- Pipetas graduadas.
- Pipeta semiautomática 500µL.

## ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

**Solução redutora:** armazenar à temperatura de 2-8°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, obedecidas as condições de armazenamento.

**Ferrozina:** armazenar à temperatura de 2-8°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, obedecidas as condições de armazenamento.

**Solução padrão 200µg/dL:** armazenar à temperatura de 2-8°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, obedecidas as condições de armazenamento.

**Reagente A:** armazenar à temperatura de 2-8°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, obedecidas as condições de armazenamento.

**Carbonato de Magnésio:** armazenar à temperatura de (2-30°C). Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, obedecidas as condições de armazenamento.

## CUIDADOS E PRECAUÇÕES COM O USO DOS REAGENTES

Todos os reagentes são somente para **uso diagnóstico *in vitro***. Seu manuseio deve ser cuidadoso, evitando-se contato com pele e mucosas. Em caso de contaminação acidental, lavar a área afetada em água corrente. O descarte do material utilizado deverá ser feito obedecendo-se aos critérios de biossegurança estabelecidos pelo laboratório, de acordo com as normas locais, estaduais ou federais.

Observar ainda a simbologia constante nos rótulos do produto:



Irritante

## AMOSTRA

Soro (sem hemólise) coletado em jejum. Não utilizar plasma, nem amostra lipêmica. O ferro permanece estável no soro por 4 dias entre 20-30°C, ou 7 dias entre 2-8°C.

**Todas as amostras biológicas devem ser consideradas como potencialmente infectantes.**

## PROCEDIMENTO TÉCNICO

### Ferro Sérico

Rotular 3 cubetas do fotocolorímetro de **B (branco)**, **T (teste)** e **P (padrão)**.

Proceder como segue:

	B	T	P
<b>Solução redutora</b>	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL
<b>Água deionizada</b>	500µL	-	-
<b>Soro</b>	-	500µL	-
<b>Solução padrão</b>	-	-	500µL

Homogeneizar. Ler a absorvância de **T**, zerando o aparelho com **água destilada** em **560nm** ou **filtro verde**. Anotar a densidade ótica identificada como **T1**.

Ferrozina	4 gotas	4 gotas	4 gotas
-----------	---------	---------	---------

Homogeneizar e incubar por 10 minutos em banho maria a 37°C. Determinar as absorvâncias de **T (teste)** e **P (padrão)** zerando o aparelho com o **B (branco)**, em **560nm** ou **filtro verde**. **A absorvância do teste (T) será identificada como T2.**

## CÁLCULOS

$$\text{Ferro sérico } \mu\text{g/dL} = \frac{T2 - T1}{\text{absorvância de P}} \times 200$$

Exemplo:

Leituras:

T1: 0,207

T2: 0,368

P: 0,232

$$\text{Ferro sérico } \mu\text{g/dL} = \frac{0,368 - 0,207}{0,232} \times 200 = 139$$

Como a reação corada segue estritamente a lei de Beer, basta a determinação de um fator (F) para cálculo dos resultados.

$$\text{Fator F} = \frac{200}{\text{absorvância de P}}$$

Para obtenção do fator (F), recomenda-se dosar em triplicata o padrão, ler as absorvâncias e tirar a média aritmética das mesmas.

Exemplo:

Leituras:

P= 0,232; 0,234; 0,231

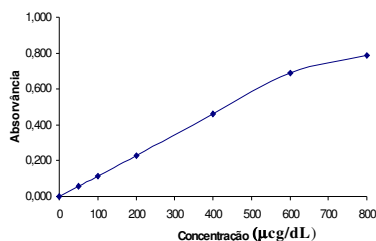
$$\text{Média aritmética} = \frac{0,232 + 0,234 + 0,231}{3} = 0,232$$

$$\text{Fator (F)} = \frac{200}{0,232} = 862$$

$$\text{Ferro sérico } \mu\text{g/dL} = (T2 - T1) \times \text{fator (F)}$$

$$\text{Ferro sérico } \mu\text{g/dL} = (0,368 - 0,207) \times 862 = 139$$

## CURVA DE CALIBRAÇÃO



Padrão	Absorvância	Conc. (µcg/dL)
1	0.000	0
2	0.058	50
3	0.115	100
4	0.230	200
5	0.460	400
6	0.690	600
7	0.790	800

**Obs.: Não utilizar esta curva para determinar o resultado de seu ensaio.**

A curva de calibração é a representação gráfica da relação entre os valores das absorvâncias com os valores das concentrações de um conjunto de soluções padrão. São necessários três passos para confeccioná-la: (1) preparo das soluções padrão; (2) medição dos valores de absorvância das soluções padrão, de acordo com o especificado no procedimento técnico da presente instrução de uso, e (3) montagem de um gráfico, em papel especial, linear, onde são relacionados os valores de absorvância com os de concentração, conforme demonstrado na figura acima.

As dosagens para montagem da curva foram feitas em um espectrofotômetro "Ultrospec III", Pharmacia Biotec, comprimento de onda de 560nm e cubetas com passagem de luz de 10mm.

A curva de calibração demonstra a linearidade da reação até uma determinada concentração, na qual pode ser determinado um fator de calibração (F), de acordo com a Lei de Beer.

**A reação é linear até a concentração de 600 µg/dL (ver curva acima). Valores acima de 600 µg/dL diluir a amostra com solução fisiológica e proceder a nova dosagem. Multiplicar o valor encontrado pelo fator de diluição.**

- O kit de Ferro Doles possui padrão no intervalo de linearidade da metodologia adotada. O laboratório deve realizar o ensaio com o padrão que acompanha o kit e calcular seu fator de calibração (F) de acordo com o exemplo estabelecido nos cálculos.
- O fator deverá ser refeito periodicamente e a cada lote do produto.
- Os padrões utilizados na montagem da curva de calibração foram ajustados contra "Iron Standard Set, cod.565-11, Sigma Chemical Company".

## CAPACIDADE DE FIXAÇÃO TOTAL DO FERRO

A transferrina é uma proteína (β globulina) transportadora de ferro na qual estão parcialmente bloqueados os sítios fixadores desse elemento.

A incubação de soro com solução de ferro em excesso promove a saturação de todos sítios ligadores de ferro na transferrina. É a chamada **capacidade de ligação ou fixação total do ferro (CFTF)**.

A mistura soro/solução de ferro (Reagente A) contém, após saturação dos sítios de ligação, excesso de ferro em solução. Tratando-se a mistura com Carbonato de Magnésio (em pó), o ferro em solução, não fixado pela transferrina, é adsorvido pelo sal. Dosa-se então todo ferro ligado à transferrina, obtendo-se a **capacidade de fixação total do ferro**.

**Procedimento técnico:** identificar os tubos como T (teste) e proceder como segue:

	T
Soro	500µL
Reagente A	1mL

Homogeneizar durante 5 minutos

Carbonato de Magnésio Adicionar o conteúdo de 1 cápsula

Agitar intensamente e deixar em repouso durante 10 minutos. Centrifugar por 10 minutos a 3.000 r.p.m. Separar o sobrenadante.

**Colorimetria:** rotular 3 cubetas do fotocolorímetro de **B (branco), T (teste) e P (padrão)**.

**Proceder como segue:**

	B	T	P
Solução redutora	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL
Água deionizada	500µL	-	-
Sobrenadante etapa anterior	-	500µL	-
Solução padrão	-	-	500µL

Homogeneizar. Ler a absorvância de **T** zerando o aparelho com **água destilada** em **560nm** ou **filtro verde**. Anotar a densidade ótica identificada como **T1**.

Ferrozina	4 gotas	4 gotas	4 gotas
-----------	---------	---------	---------

Homogeneizar, e incubar por 10 minutos em banho maria a 37°C e determinar as absorvâncias de **T (teste)** e **P (padrão)**, zerando o aparelho com **B (branco)**, em **560nm** ou **filtro verde**.

A absorvância do teste (**T**) será identificada como **T2**.



## CÁLCULOS

No teste colorimétrico utiliza-se 500µL do sobrenadante da etapa anterior. Esse material contém 500/1500 do volume de soro, ou seja, 1/3 do volume original. Dessa forma, os cálculos para CFTF podem ser simplificados:

$$C.F.T.F. = \frac{(T2 - T1)}{\text{absorvância P}} \times 200 \times 3 = \frac{(T2 - T1)}{\text{absorvância P}} \times 600$$

Exemplo:

Leituras:

T1: 0,020

T2: 0,141

P: 0,232

$$C.F.T.F. = \frac{(0,141 - 0,020)}{0,232} \times 600 = 313$$

A capacidade de fixação total do ferro representa a soma do ferro sérico com a capacidade latente de fixação do ferro. CFTF = ferro sérico + CLFF.

A quantidade de ferro que a transferrina pode absorver para se tornar saturada denomina-se capacidade latente de fixação ou ligação do ferro (CLFF).

O índice de saturação da transferrina (IST) é a relação entre ferro sérico e capacidade total de ligação do ferro.

$$IST (\%) = \frac{\text{Ferro sérico}}{\text{C.F.T.F.}} \times 100$$

## EXPRESSÃO DOS RESULTADOS EM UNIDADES SISTEMA INTERNACIONAL (S.I.)

(mmol/L) = (µg/dL) x 0,179

## LIMITAÇÕES DO SISTEMA

- Para se obter ótimo desempenho do sistema, é necessário que o procedimento técnico seja rigorosamente seguido conforme a instruções de uso. Qualquer alteração poderá levar a resultados errôneos.
- A utilização de água contaminada por ferro aumentará a intensidade da cor do branco, levando a resultados falsamente baixos.
- Algumas drogas elevam os níveis de ferro sérico. Entre elas podemos citar: cloranfenicol, estrógenos, etanol, metotrexate e anovulatórios.
- Outras drogas diminuem os níveis de ferro sérico: alopurinol, anabolitos esteroides, aspirina (em altas doses), cortisona e corticotropin.
- Para aparelhos que exijam um volume maior do que 2mL para leitura, os volumes de reagente e soro podem ser aumentados proporcionalmente.

## CONTROLE DA QUALIDADE DO SISTEMA

- A limpeza e a secagem adequada do material a ser utilizado são de fundamental importância para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.
- Toda a vidraria deve ser previamente lavada em mistura sulfocrômica ou Ácido Clorídrico a 15%. Enxaguar em água deionizada.
- Colunas deionizadoras saturadas liberam íons diversos, amins e agentes oxidantes, que deterioram os reagentes.
- As pipetagens devem ser precisas.
- O nível da água do banho maria deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio e a temperatura de 37°C rigorosamente observada.
- O uso de soro controle de referência deve ser uma prática rotineira do laboratório. Recomenda-se utilizar um soro controle com valor na faixa de normalidade (**soro controle N - Doles**) e outro soro controle de valor elevado (**soro controle P - Doles**).

## VALORES DE REFERÊNCIA

Recomenda-se que cada laboratório estabeleça sua própria faixa de valores de referência na população atendida.

Como orientação, sugerimos os seguintes valores:

Ferro sérico	60 - 160 µg/dL
Capacidade de fixação total do ferro (CFTF)	240 - 410 µg/dL
Capacidade latente de fixação do ferro (CLFF)	140 - 280 µg/dL
Índice de saturação da transferrina (IST)	20 - 45%

## SIGNIFICADO CLÍNICO

O ferro é essencial para a maioria dos organismos vivos, participando de grande número de processos vitais. A anemia por perda de ferro representa um dos transtornos orgânicos mais frequentes encontrados na clínica médica. A diminuição do ferro sérico pode ocorrer nas grandes hemorragias, na gestação, na menstruação, nas neoplasias, nas doenças do colágeno em atividade e nas infecções. O aumento do ferro sérico ocorre por diversas causas, entre as quais: tratamento com ferro, transfusão maciça de sangue, uso de drogas mielossupressivas, neoplasia da medula óssea, uso de anovulatórios, anemia hemolítica e perniciososa, anemia aplástica, hepatite aguda e moléstias crônicas do fígado (ver quadro abaixo).

## Capacidade de fixação total do ferro

Em nosso organismo, o ferro circula como Fe (III), unido a uma proteína transportadora específica: a transferrina. A função dessa proteína é captar o ferro do sítio de absorção e levá-lo para os órgãos hematopáticos. A atividade fisiológica da transferrina pode ser determinada através da capacidade total de fixação do ferro (CFTF).

Em geral, a CFTF encontra-se aumentada nas anemias pós-hemorragias e ferroprivas, assim como no uso de anovulatórios e no aumento da liberação de ferritina sérica. Sua diminuição está ligada a disproteinemias, hepatopatas crônicas, hemocromatose e deficiência de ferritina.

A transferrina (TRF) pode ser dosada por métodos imunológicos. As metodologias por nefelometria são as mais utilizadas.

Pode-se quantificar a transferrina utilizando-se a seguinte fórmula:

$$TRF = 0,70 \times CFTF \mu\text{g/dL}$$

Com a utilização dessa fórmula, observamos uma hiperestimulação da transferrina, em valores que variam entre 12 e 17%, mas os resultados são perfeitamente aplicáveis para fins clínicos.

TRF - valores de referência (nefelometria)

Recém nato

130 - 275µg/dL

Adultos

220 - 400µg/dL

Doenças	Ferro Sérico	CFTF	IST	Transferrina
Deficiência de ferro (não complicada)	↓	↑	N ou ↓	↑
Anemia secundária a doenças crônicas	↓	N ou ↓	N ou ↓	N ou ↓
Anemia hemolítica	↑	N ou ↓	↑	N ou ↓
Anemias sideroblásticas	N ou ↑	N ou ↓	↑	N ou ↓
Hemocromatose	↑	Lig. ↓	↑	Lig. ↓
Hipoproteinemias	N ou ↓	N ou ↓	N ou ↓	N ou ↓
Hepatopatas	↑	Var. ou ↑	Var. ou ↑	↑

## CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

### FERRO

O ferro foi dosado em 38 soros com teor de ferro sérico situado no intervalo de 50 a 193µg/dL.

A comparação do kit de Ferro Doles (Y) com um método de referência (X) deu origem à seguinte equação de regressão linear: Y=0,34X - 2,68, sendo o coeficiente de correlação 0,99.

A recuperação de ferro foi de 99 ± 3% em soros cujos teores de ferro oscilaram entre 52 e 158µg/dL e aos quais se adicionou íon ferrico correspondente a uma concentração de 50µg/100mL de soro.

### CAPACIDADE DE FIXAÇÃO TOTAL DO FERRO

Foram realizados testes em 40 amostras cujo nível de capacidade de fixação total do ferro (CFTF) oscilava entre 169 e 320µg/dL. A comparação do kit de Ferro Doles (Y) com um método de referência (X) deu origem à seguinte equação de regressão linear: Y= 30,20 + 0,87X, sendo o coeficiente de correlação 0,90.



SAC: (62) 3269 0000 (Grande Goiânia)

SAC: 0800 644 6433 (Demais localidades)

[www.doles.com.br](http://www.doles.com.br)

doles

## FERRO

**Repetitividade:** foram realizadas 20 dosagens sucessivas em duas amostras, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2
<b>Média (µg/dL)</b>	55,39	148,50
<b>Desvio padrão</b>	2,93	3,77
<b>Coefficiente de variação (%)</b>	5,29	2,54

**Reprodutibilidade:** foram realizadas 20 dosagens, durante 20 dias consecutivos, em duas amostras, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2
<b>Média (µg/dL)</b>	70,02	160,97
<b>Desvio padrão</b>	4,05	4,19
<b>Coefficiente de variação (%)</b>	5,78	2,60

## CAPACIDADE DE FIXAÇÃO DO FERRO

**Repetitividade:** foram realizadas 20 dosagens sucessivas em uma amostra, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra
<b>Média (µg/dL)</b>	261,55
<b>Desvio padrão</b>	13,95
<b>Coefficiente de variação (%)</b>	5,33

**Reprodutibilidade:** foram realizadas 20 dosagens, durante 20 dias consecutivos, em uma amostra, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra
<b>Média (µg/dL)</b>	280,05
<b>Desvio padrão</b>	15,38
<b>Coefficiente de variação (%)</b>	5,49

**Especificidade:** a presente metodologia é específica para determinação do ferro sérico e da capacidade de fixação total do ferro. A Tiosemicarbazida forma um complexo com os íons cobre, impedindo a interferência dos mesmos na reação corada formada com íon ferroso. A reação se desenvolve a 2,2 de pH, distante do ponto isoelétrico das proteínas, não ocorrendo a turvação.

**Sensibilidade:** a absorvância encontrada, de 0,015, corresponde a 10µg/dL de concentração de Ferro, quando os testes são realizados em espectrofotômetro, a 560nm. A sensibilidade do sistema está diretamente relacionada com a do aparelho utilizado no laboratório.

**Diluição da matriz:** estudos sucessivos de diluição da matriz mostraram que não há interferência na sensibilidade diagnóstica da presente metodologia.

**Substâncias interferentes:** amostras hemolisadas interferem decisivamente nos resultados, pois a presença de ferro nos eritrócitos provoca resultados falsamente elevados. Vidraria e água contaminadas com ferro também podem gerar resultados errôneos.

Soros com teor de triglicérides superior a 800mg/dL podem apresentar resultados falsamente elevados, em decorrência da turvação secundária à hiperlipidemia.

Certas drogas podem interferir nos níveis de ferro (ver em limitações do sistema). Para controle de tal interferência, recomenda-se que o paciente seja questionado quanto ao uso de medicamentos.

## BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- Stookey, L.L.: *Ferrozine. A new spectrophotometric reagent for iron. Anal. Chem.* 42, 779 - 781, 1970.
- Ceriotti, LF e Ceriotti, G.: *Improved direct specific determination of serum iron and total ironbinding capacity. Clin. Chem.* 26/2, 327 - 331, 1980.
- Goodwin, J., Murphy, B., Guiliemette, M.: *Clin. Chem.*, 12:47, 1966.
- Kaplan L.A., Pesce A. J.: *Química Clínica*, 1266-1269, 1990.
- Tietz N. W.: *Clinical Guide To Laboratory Tests*, 2ª edição, 340-344, 1990.
- Tibúrcio, H.M.: *Controle Interno da Qualidade Analítica*, 1aed. março/1995.
- Doles: dados de arquivo

## TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA DA QUALIDADE DO PRODUTO

As garantias do fabricante ao consumidor seguem estritamente as relacionadas na Lei no 8.078, de 11 de setembro de 1.990 - **Código de Defesa do Consumidor**.

Todos os reagentes que compõem este sistema para diagnóstico são garantidos na sua performance, reprodutibilidade e qualidade até a data de vencimento dos mesmos, se obedecidas as condições abaixo:

1. O usuário do sistema seguir, rigorosamente, o procedimento técnico.
2. As condições de armazenamento deverão estar de acordo com o estabelecido nas instruções de uso.
3. Os materiais necessários e não fornecidos deverão estar em boas condições técnicas.

**Todos os produtos que apresentarem problemas técnicos comprovados serão substituídos, sem ônus para o consumidor.**

Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratórios Ltda  
CNPJ: 01.085.513/0001-05  
Rodovia BR 153, Km 1273, Lt.07 Chácara Retiro  
CEP: 74001-970 Goiânia - GO - Brasil  
Caixa Postal 1051  
e-mail: doles@doles.com.br

M.S.: nº 10231810049

Revisão: 13 (08/2009)

## NBR ISO 9001

**Sistema da Qualidade certificado desde 1999**

