

PAOLO RUGGERO ERRANTE

*Universidade de São Paulo, USP, São Paulo,
SP, Brasil; Universidade Federal de São
Paulo, UNIFESP, São Paulo, SP, Brasil.*

FRANCISCO SANDRO MENEZES RODRIGUES

*Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP,
São Paulo, SP, Brasil.*

*Recebido em outubro de 2019.
Aprovado em agosto de 2020.*

UTILIZAÇÃO DA FOTOMETRIA E COLORIMETRIA NO LABORATÓRIO DE ANÁLISES CLÍNICAS

RESUMO

Introdução: A fotometria estuda a propriedade que diferentes elementos químicos possuem de absorver radiações eletromagnéticas, específicas para cada elemento, sendo possível obter valores da concentração de soluções de interesse. A colorimetria é um segmento da fotometria capaz de obter a concentração de soluções através da mensuração da absorção da luz em um determinado comprimento de onda. **Método:** A revisão foi realizada utilizando bases de dados bibliográficos obtidos através da pesquisa no LILACS, MEDLINE e PubMed. **Resultados:** No setor de bioquímica clínica, a fotometria e colorimetria são utilizadas com frequência para a quantificação de diferentes moléculas como glicose, lipídios, colesterol e proteínas; produtos nitrogenados como ácido úrico, uréia e amônia; enzimas como amilase, fosfatase alcalina, fosfatase ácida, aminotransferases e lactato desidrogenase; pigmentos endógenos como a bilirrubina; e os íons cálcio, fósforo, magnésio e ferro. **Conclusão:** Por se tratar de métodos simples, rápidos e sensíveis, a colorimetria e fotometria são empregados rotineiramente no setor de análises clínicas para a avaliação de diferentes biomarcadores.

Palavras-Chave: fotometria; colorimetria; absorção; diagnóstico laboratorial; análises clínicas.

USE OF PHOTOMETRY AND COLORIMETRY IN CLINICAL LABORATORY ANALYSIS

ABSTRACT

Introduction: Photometry studies the property that different chemical elements have to absorb electromagnetic radiation, specific to each element, being possible to obtain concentration values of solutions of interest. Colorimetry is a segment of photometry capable of obtaining solution concentration by measuring light absorption at a given wavelength. **Method:** The review was performed using bibliographic databases obtained by searching of LILACS, MEDLINE and PubMed. **Results:** In the clinical biochemistry, photometry and colorimetry are frequently used to quantify different molecules such as glucose, lipids, cholesterol and proteins; nitrogenous products such as uric acid, urea and ammonia; enzymes such as amylase, alkaline phosphatase, acid phosphatase, aminotransferases and lactate dehydrogenase; endogenous pigments such as bilirubin; and ions such as calcium, phosphorus and magnesium. **Conclusion:** Because these are simple, fast and sensitive methods, colorimetry and photometry are routinely used in the clinical analysis sector for the evaluation of different biomarkers.

Keywords: photometry; colorimetry; absorption; laboratorial diagnosis; clinical analysis.

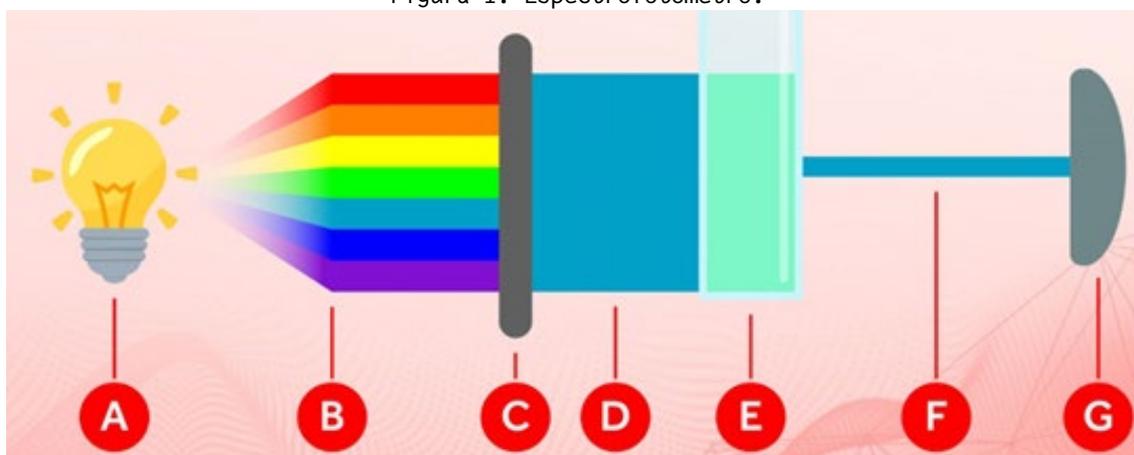
INTRODUÇÃO

A técnica de fotometria avalia a capacidade de diferentes elementos químicos absorverem radiações eletromagnéticas específicas, que auxiliam na identificação e determinação de suas concentrações, quando presentes em diferentes soluções (LOYD, STONE, 2015).

Este fator depende da estrutura molecular de cada elemento químico, e da energia da radiação eletromagnética incidente. Cada molécula possui um espectro de absorção de luz característico, que permite a sua identificação através de um aparelho denominado espectrofotômetro (LOYD, STONE, 2015).

O espectrofotômetro é um aparelho constituído por uma fonte de luz policromática; um monocromador, um prisma ou uma grade de difração para dispersão da luz; uma fenda que permite a passagem do feixe monocromático cujo comprimento de onda depende da posição do prisma; uma cubeta que contém o material em estudo que absorve a luz incidente; um detector ou célula fotoelétrica sensível à radiação luminosa; e um medidor ou galvanômetro que recebe um sinal elétrico da célula fotoelétrica e permite a leitura da intensidade de luz transmitida (Figura 1) (PASCHOAL et al., 2003).

Figura 1. Espectrofotômetro.



A lâmpada (A), emite uma luz (B) que atravessa o monocromador (C), ficando com um comprimento de onda específico (D) direcionado a amostra solubilizada no interior da cubeta (E). A luz que consegue passar pela cubeta é captada pelo detector (G), cujo valor é traduzido em absorbância (quantidade de luz retida pela amostra) e transmitância (quantidade de luz que passou pela amostra).

Fonte: <http://www.ionlab.com.br/site/blog-interna.php?post=6>.

A colorimetria corresponde a um segmento da fotometria, capaz de obter a concentração de soluções através da mensuração da absorção da luz em um determinado comprimento de onda, que varia de 400 nm a 800 nm (faixa de luz visível), ou 200 a 400 nm (faixa de luz ultravioleta) (FABBRI et al., 2004).

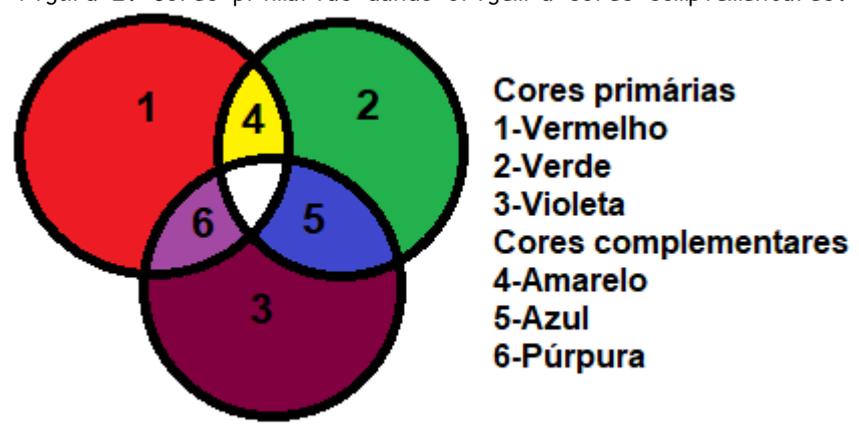
A absorção da luz ocorre quando o campo energético do fóton tem de ser igual a quantidade de energia necessária para um átomo passar do estado fundamental para o excitado, sendo necessária a utilização de um feixe de luz monocromática com determinado comprimento de onda para excitar as moléculas do composto analisado (FABBRI et al., 2004).

Quando a luz passa através de uma cubeta de determinado calibre que contém uma determinada solução, esta incide sobre uma célula fotoelétrica que traduz a intensidade luminosa em um sinal elétrico detectado pelo galvanômetro. A escala do galvanômetro é graduada para indicar a transmitância ou a absorbância da solução, cuja escala varia de 0% (T=0) a 100% (T=1) (FABBRI et al., 2004).

As concentrações dos compostos analisados através da metodologia colorimétrica são determinadas pela absorção da luz quando são utilizados cromóforos (substâncias que absorvem um determinado comprimento de onda de luz) que são obtidos pela reação entre o composto analisado e um cromógeno (uma substância que origina cor) (SALDANHA, ARAÚJO, 1999).

As soluções coloridas absorvem com maior intensidade determinada faixa de comprimento de onda, e a cor de radiação mais absorvida é denominada de cor complementar. Duas cores são chamadas de complementares ao ficarem sobrepostas e promovem a percepção visual de branco. Quando sobrepostas, cores primárias como verde, vermelho e violeta, é obtida a cor branca; e quando elas se sobrepõem em pares dão origem as cores complementares (Figura 2), cada uma com seu comprimento de onda (Tabela 1) (SOUZA et al., 2008).

Figura 2. Cores primárias dando origem a cores complementares.



Fonte: Adaptado de SOUZA et al., 2008.

Tabela 1. Cores fundamentais e complementares.

Comprimento de onda	Cores Fundamentais	Cores Complementares
400 – 435	Violeta	Verde-amarelo
435 – 480	Azul	Amarelo
480 – 490	Azul-esverdeado	Laranja
490 – 500	Verde-azulado	Vermelho
500 – 560	Verde	Púrpura
560 – 580	Verde-amarelo	Violeta
580 – 595	Amarelo	Azul
595 – 610	Laranja	Azul-esverdeado
610 – 750	Vermelho	Verde-azulado

Fonte: Adaptado de SOUZA et al., 2008.

Para proceder à medida da absorvância, introduz-se uma cubeta na câmara de leitura do espectrofotômetro, contendo o solvente (branco), onde é feito o ajuste do aparelho para que a absorvância seja igual a zero (100% de transmitância). A seguir, é substituída a cubeta contendo o solvente (branco) por cubeta contendo a solução teste para a leitura de sua absorvância (LAPA et al., 2002).

Utilização dos princípios da fotometria e colorimetria nas análises clínicas

No setor de bioquímica clínica, diferentes técnicas laboratoriais utilizam a fotometria e colorimetria, uma vez que as mensurações são realizadas por absorção, emissão, dispersão ou luz refletida, e a leitura dos valores finais das reações são expressos em mg/dL, %, U/L, mEq/L ou mmol/L (KUGIMIYA, TAKAMITSU, 2013).

Assim, quando uma determinada substância entra em contato com um reagente específico, este processo leva a produção de uma determinada cor, cuja intensidade é proporcional a concentração da substância na mistura original (ZAIA et al., 1998).

Estas reações são utilizadas para a determinação qualitativa e quantitativa de diferentes moléculas como glicose, lipídios, colesterol, proteínas; produtos nitrogenados como ácido úrico, uréia e amônia; enzimas como amilase, fosfatase alcalina, fosfatase ácida, aminotransferases, lactato desidrogenase; pigmentos endógenos como bilirrubina; e íons como cálcio, fósforo, magnésio e ferro.

Determinação de glicose

A dosagem de glicose pode ser determinada pelo método da o-toluidina, onde a glicose reage com a o-toluidina (orto-toluil) em meio ácido e aquecido, formando glicosamina e base de Schiff, que produz cor azul na solução, proporcional a quantidade de glicose presente na amostra (soro, plasma, urina ou líquido cefalorraquidiano). A leitura espectrofotométrica é feita entre 600 a 650 nm (DOHNAL, KALOUSOVÁ, ZIMA, 2010).

Determinação de lipídios totais

Os lipídios totais incluem triglicerídios, colesterol, ácidos graxos não esterificados, fosfolipídios, hormônios esteroidais e vitaminas lipossolúveis. A determinação de lipídios totais utiliza como amostra, soro aquecido em banho-maria fervente na presença de ácido sulfúrico concentrado. O reativo de fosfo-vanilina reage com uma fração de solução sulfúrica formando um composto de coloração rósea, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de lipídios totais da amostra. A leitura é feita entre 500 a 550 nm (MISHRA et al., 2014).

Determinação de colesterol total

Para a determinação do colesterol total é realizada previamente a precipitação de proteínas pelo uso de anidro acético, para a remoção da água das proteínas. Com a adição de ácido sulfúrico, ocorre diminuição do pH além do ponto isoelétrico das proteínas, dissolvendo o precipitado. A desidratação do núcleo do colesterol forma um derivado sulfônico de coloração verde, cuja intensidade de cor é diretamente proporcional à concentração de colesterol existente na amostra. A leitura é feita entre 490 a 510 nm (HEUILLET et al., 2013).

Determinação de proteínas totais

A determinação de proteínas totais pode ser realizada pelo método do biureto, onde o biureto é formado pelo aquecimento da uréia a 180°C, com liberação de uma molécula de amônia. Soluções alcalinas de biureto na presença de sulfato de cobre diluído, desenvolvem cor violeta pela formação de um complexo entre o íon cúprico (Cu²⁺) e quatro átomos de nitrogênio. A leitura é feita em 545nm (GOLDRING et al., 2015).

Determinação de albumina sérica

A albumina sérica pode ser determinada utilizando o verde de bromocresol, que possui especificidade para a albumina sem sofrer interferência da bilirrubina e hemoglobina. O verde de bromocresol em pH=4.2 apresenta cor amarela, e quando combinado com a albumina adquire coloração verde, cuja intensidade de cor é diretamente proporcional a concentração de albumina existente na amostra. A leitura é feita entre 600 a 640 nm (TURELL et al., 2009).

Determinação de creatinina

Para a determinação da creatinina sérica, utiliza-se o método cinético colorimétrico de tempo fixo, onde a creatinina sérica reage com o picrato alcalino (pH=12,4) em meio tamponado, obtendo-se o picrato de creatinina que possui cor vermelha, um cromógeno cuja absorvância é proporcional à concentração de creatinina na amostra. A leitura é feita entre 490 a 520 nm (SIANGPROH et al., 2009).

Determinação de uréia

A determinação sérica da uréia pode ser realizada através de método cinético de tempo fixo, onde a ureia é hidrolisada em amônia (NH₃) e dióxido de carbônico (CO₂) pela ação da enzima urease; a seguir, a enzima glutamato desidrogenase na presença de NH₃ e alfa-cetoglutarato, oxida a nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzida (NADH) em nicotinamida-adenina-dinucleotídeo oxidada (NAD⁺). A oxidação da NADH a NAD⁺ é mensurada pela diminuição de absorvância, que é proporcional a concentração de ureia na amostra. A leitura é feita entre 334 a 365 nm (BERGMEYER, 1985).

Determinação de ácido úrico

A dosagem de ácido úrico é realizada através do método enzimático colorimétrico de ponto final (UOD-PAP), onde o ácido úrico, na presença de O₂, duas moléculas de água (H₂O) e da enzima uricase, produz alantoína, CO₂ e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A seguir duas moléculas de H₂O₂, na presença de diclorohidroxibenzeno sulfonato (DHBS), 4-aminoantipirina, e da enzima peroxidase, produz um cromógeno de cor cereja e quatro moléculas de H₂O. A intensidade da cor cereja é diretamente proporcional a concentração de ácido úrico na amostra. A leitura da amostra e do padrão são feitos em 505 nm (490-540 nm) (TRIVEDI et al., 1978; YAMAGUCHI et al., 2007).

Determinação de amônia

Para a determinação da amônia sérica, a uréia é hidrolisada pela enzima urease para a formação de íons amônia e CO₂. Os íons amônia reagem em pH alcalino com salicilato e hipoclorito de sódio, pela ação catalisadora do nitroprussiato de sódio, formando o azul de indofenol, cuja intensidade da cor é proporcional a quantidade de uréia na amostra. A leitura da amostra e do padrão são realizados em 600 nm (580 a 610 nm) (BERGMEYER, 1985; SPACEK et al., 2015).

Determinação de amilase

A técnica de reação com o iodo monitora o desaparecimento do amido após determinado tempo de hidrólise. Esta técnica é baseada na adição de iodo a dois tubos onde o tubo padrão contém amido e o tubo teste contém amido e amilase. A extensão da hidrólise do substrato do amido pela amilase a 37°C é avaliada pela perda da cor azul no teste após a adição de iodo comparado com o padrão, onde a hidrólise enzimática não ocorre. A absorvância em 660 nm é inversamente proporcional a atividade da amilase da amostra (WESTGARD et al., 1981).

Determinação de fosfatase alcalina

Na determinação da fosfatase alcalina, a fosfatase alcalina hidrolisa o substrato de timolftaleína monofosfato, gerando timolftaleína e ácido ortofosfórico (H₃PO₄) na presença de magnésio (Mg⁺) e fosfatase alcalina, cuja atividade enzimática é proporcional a quantidade de timolftaleína formada, avaliada colorimetricamente. Com a adição do reagente de cor, que possui carbonato de sódio 150 mmol/L e hidróxido de

sódio 100 mmol/L, a reação enzimática é inativada e a timolftaleína adquire cor azul. Uma vez que o substrato e o produto da reação apresentam cores diferentes em meio alcalino, a coloração final da reação é constituída por uma mistura de cores. A leitura da amostra e do padrão são realizados em 578 nm (570 a 590), acertando o zero com branco (GROTE-KOSKA et al., 2017).

Determinação de fosfatase ácida

Nesta técnica, a fosfatase ácida do soro atua sobre o substrato de timolftaleína monofosfato, gerando timolftaleína e fosfato, em pH=5,4 a 37°C. A adição de solução alcalina de carbonato de sódio-hidróxido de sódio inibe a ação enzimática e converte a timolftaleína liberada na cor azul, que é medida colorimetricamente. O produto final da reação é constituído por uma mistura da cor azul e a cor do substrato. A leitura da amostra é feita entre 580 a 590 nm (ROY, BROWER, HAYDEN, 1971; LIN et al., 2015).

Determinação de aminotransferases

Para a determinação das aminotransferases, podem ser empregados o método de Karmen e método de Reitman e Frankel. No método de Karmen o soro é incubado com excesso de alfa-cetoglutarato, que se transforma em oxalacetato ou piruvato pela ação da aspartato aminotransferase (AST) ou transaminase glutâmica-oxalacética (TGO); e alanina aminotransferase (ALT) ou transaminase glutâmica-pirúvica (GPT).

Os cetoácidos formados são mensurados indiretamente pela reação de redução, catalisada por desidrogenases específicas e monitorada pela modificação da absorvância a 340 nm dos níveis de NADH. A diminuição da absorvância é proporcional a conversão dos cetoácidos em hidróxiácidos. A leitura é feita a 340 nm, através de metodologia cinética contínua utilizando luz ultravioleta (KOTANI, MAEKAWA, KANNO, 1994; MCALLISTER et al., 2013).

No método de Reitman e Frankel, os produtos formados pela ação das aminotransferases são medidos pela reação com a 2,4-dinitrofenilhidrazina, produzindo dinitrofenil-hidrozonas, que possui cor marrom em solução alcalina. A dinitrofenilhidrazina pode formar hidraxona também com o ácido alfa-cetoglutarato, provocando interferência na leitura. A leitura é feita em 340 nm (WITTER, GRUBBS, 1966; MCALLISTER et al., 2013).

Determinação de lactato desidrogenase

A determinação da enzima lactato desidrogenase (LDH) se baseia na reação do L-lactato com NAD, que na presença da enzima LDH, produz piruvato (C₃H₄O₃), NADH e hidrogênio (H⁺). A velocidade de formação de NADH é diretamente proporcional à atividade catalítica da LDH, cuja leitura é realizada em 340 nm (VASQUEZ et al., 2009; YUM et al., 2016).

Determinação de glutamiltransferase

A metodologia utilizada consiste na cinética contínua de tempo fixo, podendo ser aplicada em analisadores automáticos e semi-automáticos. A gama-glutamiltransferase catalisa a transferência do grupamento gamaglutamil da gamaglutamil-3-carboxi-4-nitroanilida para a glicilglicina, produzindo gamaglutamilglicilglicina e p-nitroanilina. A p-nitroanilina apresenta elevada absorção em 405 nm, cuja quantidade liberada é diretamente proporcional a atividade da gama-gamaglutamiltransferase na amostra (SCHUMANN et al., 2005).

Determinação de creatina quinase

A creatina quinase pode ser avaliada através de metodologia cinética utilizando luz ultravioleta, segundo o princípio da reação da creatina fosfato e ADP, que na presença de creatina quinase, produz creatina, adenosina trifosfato (ATP) e glicose; subsequentemente, na presença de hexoquinase produz glicose-6-fosfato, ADP, glicose-6-fosfato e fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADP⁺); estes, na presença de glicose-6-fosfato-desidrogenase, levam a produção de gluconolactona-6-fosfato, NADPH e H⁺. Nesta metodologia, a velocidade da redução do NADP⁺ a NADPH é proporcional a atividade da creatina quinase na amostra a ser analisada. A leitura é realizada em 340 nm (HORDER et al., 1979).

Determinação de bilirrubina

A determinação da bilirrubina total utiliza o princípio da qual a bilirrubina indireta ou não conjugada, através da reação de acoplamento com o ácido sulfanílico diazotado forma um complexo de cor vermelha (azobilirrubina) na presença de um catalisador (cafeína e benzoato), que permite o desligamento da albumina da bilirrubina indireta, sendo dosada juntamente com a bilirrubina direta pela formação de azobilirrubina na reação com a dicloroanilina diazotada. A intensidade da cor formada é diretamente proporcional a concentração da bilirrubina total da amostra.

Para a dosagem da bilirrubina direta, a amostra é solubilizada em meio ácido, onde a bilirrubina direta reage com a dicloroanilina diazotada gerando azobilirrubina, cuja intensidade de cor é proporcional a concentração de bilirrubina direta na amostra. A dosagem da bilirrubina indireta é obtida pela diferença de valores obtidos entre a bilirrubina total e a bilirrubina direta. A leitura é realizada em 546 nm (530 a 550 nm) (SIMS, HORN, 1958; POON, HINBERG, 1985).

Determinação de cálcio

O princípio da reação para determinação de cálcio baseia-se na formação de um complexo de cor violeta entre o cálcio e a o-cresolftaleína complexona em pH=11,7 e tampão dietanolamina. O reagente contém 8-hidroquinolina que reduz a interferência de cátions como o magnésio, e a uréia para diminuir a turvação das amostras lipêmicas e aumentar a formação do complexo metal-corante. A presença de etanol inibe o desenvolvimento de cor no tubo controle (branco). Após a mensuração da cor, a adição do ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, um quelante de cálcio) corrige a hemólise presente. Esse tratamento dissocia o complexo cálcio-cromogênio sem modificar o complexo hemoglobina-cromogênio. Para a leitura da absorbância do complexo hemoglobina-cromogênio, é subtraída da absorbância total. A leitura é feita em 570 nm (SOLDIN, BRUGNARA, WONG, 2005; HOUMAN et al., 2017).

Determinação de fósforo

Nesta reação, íons fosfato reagem com o molibdato de amônio na presença de ácido sulfúrico formando o complexo fosfomolibdato de amônio. Depois da reação com hidroxilamina em meio alcalino, o complexo é reduzido a azul de molibdênio, cuja absorbância avaliada em 650 nm, é diretamente proporcional à concentração de fósforo na amostra analisada (BAGINSKI, FOA, ZAK, 1967).

Determinação de magnésio

Nesta reação, os íons magnésio reagem com o magon sulfonado (possui cor azul) em pH alcalino, formando um complexo cor de rosa. A absorbância do complexo é avaliada entre 500 e 540 nm, sendo diretamente proporcional a concentração de magnésio na amostra

analisada. A coloração final obtida consiste em uma mistura das cores azul e rosa. Nesta reação, os anticoagulantes EDTA, oxalato, fluoreto e citrato devem ser evitados, pois interferem com a reação, gerando resultados falsamente diminuídos.

A presença de bilirrubina (até 8 mg/dL de sangue) e triglicerídios (até 250 mg/dL de sangue) não geram interferências relevantes. Porém, quando a quantidade de triglicerídios se encontra entre 250-3500 mg/dL de sangue, e de bilirrubina entre 8-32 mg/dL de sangue, produzem resultados falsamente elevados (WESTGARD et al., 1981).

Determinação de ferro sérico

A determinação do ferro sérico tem como princípio a dissociação do ferro da transferrina em meio ácido, reduzindo o seu estado férrico pela ação da hidroxilamina, onde as proteínas séricas são precipitadas na presença de ácido clorídrico, ácido tioglicólico e ácido tricloroacético. Subsequentemente, o ferro reage com a ferrozina, levando a formação de um complexo de cor violeta. A leitura é feita entre 540 a 580 nm (BRITTENHAM, 1979).

CONSIDERAÇÕES

A espectrofotometria é um procedimento que utiliza a luz para medir a concentração química de qualquer espécie. Em conjunto com a colorimetria, são utilizados rotineiramente no laboratório de bioquímica clínica para a determinação e quantificação de diferentes moléculas utilizadas para o monitoramento de diferentes enfermidades.

REFERÊNCIAS

- BAGINSKI, E.S.; FOA, P.P.; ZAK, B. Microdetermination of inorganic phosphate, phospholipids, and total phosphate in biologic materials. *Clin Chem.* v.13, n.4, p.326-332, 1967.
- BERGMEYER, H.U. *Methods of Enzymatic Analysis*, VCH Publishers, Florida, v.9, p. 449-453, 1985.
- BRITTENHAM, G. Spectrophotometric plasma iron determination from finger puncture specimens. *Clin Chim Acta.* v.91, n.2, p.203-211, 1979.
- DOHNAL, L.; KALOUSOVÁ, M.; ZIMA, T. Comparison of three methods for determination of glucose. *Prague Med Rep.* v.111, n.1, p.42-54, 2010.
- FABBRI, F.; et al. Optical measurements of absorption changes in two-layered diffusive media. *Phys Med Biol.* v.49, n.7, p.1183-1201, 2004.
- GOLDRING, J.P. Spectrophotometric methods to determine protein concentration. *Methods Mol Biol.* v.1312, p.41-47, 2015.
- GROTE-KOSKA, D.; KLAUKE, R.; BRAND, K.; SCHUMANN, G. Alkaline phosphatase activity-pH impact on the measurement result. *Clin Chem Lab Med.* v.27, n.7, p.e146-149, 2017.
- HEUILLET, M.; et al. Validation of a reference method for total cholesterol measurement in human serum and assignation of reference values to proficiency testing samples. *Clin Biochem.* v.46, n.4-5, p.359-364, 2013.
- HORDER, M.; et al. Recommended method for the determination of creatine kinase in blood modified by the inclusion of EDTA. The Committee on enzymes of the Scandinavian Society for Clinical Chemistry and Clinical Physiology (SCE). *Scan J Clin Lab Invest.* v.39, n.1, p.1-5, 1979.

- HOUMAN, T.; et al. Pediatric reference intervals for biochemical markers: gaps and challenges, recente National initiatives and future perspectives. *JIFCC*. v.28, n.1, p.43-63, 2017.
- KOTANI, K.; MAEKAWA, M.; KANNO, T. Reestimation of aspartate aminotransferase (AST)/alanine aminotransferase (ALT) ratio based on JSCC consensus method--changes of criteria for a differential diagnosis of hepatic disorders following the alteration from Karmen method to JSCC method]. *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi*. v.91, n.2, p.154-161, 1994.
- KUGIMIYA, A.; TAKAMITSU, E. Spectrophotometric detection of histidine and lysine using combined enzymatic reactions. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. v.33, n.8, p.4867-4870, 2013.
- LAPA, R.A.S.; et al. Multi-pumping in flow analysis: concepts, instrumentation, potentialities, *Analytica Chimica Acta*. v.466, p.125-32, 2002.
- LIN, Z.; et al. Near-infrared fluorescence probe for the determination of acid phosphatase and imaging of prostate cancer cells. *Analyst*. v.140, n.5, p.1629-1636, 2015.
- LLOYD, G.R.; STONE, N. Method for identification of spectral targets in discrete frequency infrared spectroscopy for clinical diagnostics. *Appl Spectrosc*. v.69, n.9, p.1066-1073, 2015.
- MCALLISTER, C.H.; et al. Analysis of the enzymatic properties of a broad family of alanine aminotransferases. *PLoS One*. v.8, n.2, p.e55032, 2013.
- MISHRA, S.K.; et al. Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresour Technol*. v.155, p.330-333, 2014.
- PASCHOAL, L.R.; et al. Aplicação do método da espectrofotometria de derivadas na identificação e doseamento simultâneo de sistemas multicomponentes. *Rev Bras Ciênc Farma*. v.39, n.1, p.5-13, 2003.
- POON, R.; HINBERG, I.H. Indican interference with six commercial procedures for measuring total bilirubin. *Clin Chem*. v.31, n.1, p.92-94, 1985.
- ROY, A.V.; BROWER, M.E.; HAYDEN, J.E. Sodium thymolphthalein monophosphate: a new acid phosphatase substrate with greater specificity for the prostatic enzyme in serum. *Clin Chem*. v.17, n.11, p.1093-1102, 1971.
- SALDANHA, T.C.B.; ARAÚJO, M.C.U. Análise multicomponente simultânea por espectrofotometria de absorção molecular uv-vis. *Química Nova*. v.22, n.6, p.847-853, 1999.
- SCHUMANN, G.; et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Part 6. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of gamma-glutamyltransferase. *Clin Chem Lab Med*. v.40, n.7, p.734-738, 2002.
- SIANGPROH, W.; et al. Alternative method for measurement of albumin/creatinine ratio using spectrophotometric sequential injection analysis. *Talanta*. v.79, n.4, p.1111-1117, 2009.
- SIMS, F.H.; HORN, C. Some observations on Powell's method for the determination of serum bilirubin. *Am J Clin Pathol*. v.29, n.5, p.412-417, 1958.
- SOLDIN, S.J.; BRUGNARA, C.; WONG, E.C. Pediatric Reference Intervals, 5th edition (formerly Pediatric Reference Ranges). SOLDIN, S.J.; BRUGNARA, C.; WONG, E.D. editors; HICKS, J.M., editor emeritus. Washington, DC: AACC Press, 2005, 257 p.

- SOUZA, N.A.; et al. Entendimento da mistura de cores facilitado pela articulação entre a Química e a Matemática. Rev Iberoamericana de Educación. v.46, p.1-14, 2008.
- SPACEK, L.A.; et al. Clinical utility of breath ammonia for evaluation of ammonia physiology in healthy and cirrhotic adults. J Breath Res. v.9, n.4, p.047109, 2015.
- TRIVEDI, R. C.; REBAR, L.; BERKA, E.; STRONG, L., New enzymatic method for serum uric acid at 500 nm. Clin. Chem., v.24, n.11, p.1908-1911, 1978.
- TURELL, L.; et al. Oxidation of the albumin thiol to sulfenic acid and its implications in the intravascular compartment. Braz J Med Biol Res. v.42, n.4, p.305-311, 2009.
- VASQUEZ, J.A.; et al. Lactic dehydrogenase in cerebrospinal fluid may differentiate between structural and non-structural central system lesions in patients with diminished levels of consciousness. J Emerg Med. v.37, n.1, p.93-97, 2009.
- WESTGARD, J.O. et al. A multi-rule Shewhart chart for Quality control in clinical chemistry. Clin Chem. v.27, n.3, p.493-501, 1981.
- WITTER, R.F.; GRUBBS, L.M. An evaluation of the Reitman-Frankel method for the determination of serum glutamic oxalacetic transaminase. Clin Chim Acta. v.13, n.4, p.524-527, 1966.
- YAMAGUCHI, T.; et al. Spectrophotometric determination of uric acid based on fading of o-hydroxyhydroquinonephthalein-palladium(II)-hexadecyltrimethyl-ammonium complex. Anal Sci. v.23, n.2, p.223-226, 2007.
- YUM, S.K.; et al. Changes in lactate dehydrogenase are associated with central gray matter lesions in newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy. J Matern Fetal Neonatal Med. v.21, p.1-5, 2016.
- ZAIA, D.A.M.; et al. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. Química Nova, v.21, n.6, p.787-793, 1998.