



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FARMÁCIA

INTERFERÊNCIA DO ÁCIDO ASCÓRBICO EM DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

Flávia Martinello

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz da Silva

FLORIANÓPOLIS

2001

**“INTERFERÊNCIA DO ÁCIDO ASCÓRBICO EM
DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS”**

POR

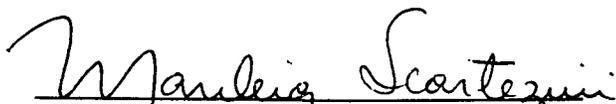
FLÁVIA MARTINELLO

**Dissertação julgada e aprovada em
sua forma final pelo Orientador e
membros da Banca Examinadora,
composta pelos Professores Doutores:**

Banca Examinadora:



Edson Luiz da Silva (ACL/CCS/UFSC – Membro Titular)



Mariléia Scartezini (UFPr – Membro Titular)



Miriam de Barcellos Falkenberg (CIF/CCS/UFSC Membro Titular)

**Prof^ª. Dra. Miriam de Barcellos Falkenberg
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC**

Florianópolis, 07 de maio de 2001.

*Ao amigo, professor e orientador
Edson Luiz da Silva, pela dedicação na
minha formação e na concretização deste trabalho .*

O que desejaria eu aos jovens de minha Pátria, consagrados à ciência?

Antes de tudo - constância. Nunca posso falar sem emoção sobre essa importante condição para o trabalho científico. Constância, constância, constância! Desde o início de seus trabalhos habituem-se a uma rigorosa constância na acumulação do conhecimento.

Aprendam o ABC da ciência antes de tentar galgar seu cume. Nunca acreditem no que se segue sem assimilar o que vem antes. Nunca tentem dissimular sua falta de conhecimento, ainda que com suposições e hipóteses audaciosas. Como se alegra nossa vista com o jogo de cores dessa bolha de sabão - no entanto ela, inevitavelmente, arrebenta e nada fica além da confusão.

Acostumem-se à descrição e à paciência. Aprendam o trabalho árduo da ciência. Estudem, comparem, acumulem fatos.

Ao contrário das asas perfeitas dos pássaros, a ciência nunca conseguirá alçar vôo, nem sustentar-se no espaço. Fatos - essa é a atmosfera do cientista. Sem eles nunca poderemos voar. Sem eles a nossa teoria não passa de um esforço vazio.

Porém, estudem, experimentem, observem, esforcem-se para não abandonar os fatos à superfície. Não se transformem em arquivistas de fatos., tentem penetrar no mistério de sua origem e, com perseverança, procurem as leis que os governam.

Em segundo lugar sejam modestos, nunca pensem que sabem tudo. E não se tenham em alta conta, possam ter sempre a coragem de dizer: sou ignorante.

Não deixem que o orgulho os domine. Por causa dele poderão obstinar-se, quando for necessário concordar; por causa dele renunciarão ao conselho saudável e ao auxílio amigo, por causa dele perderão a medida da objetividade.

No grupo que me foi dado dirigir, todos formavam uma mesma atmosfera. Estávamos todos atrelados a uma única tarefa e cada um agia segundo sua capacidade e possibilidades. Dificilmente era possível distinguir você próprio do resto do grupo. Mas dessa nossa comunidade tirávamos proveito.

Em terceiro lugar - a paixão. Lembrem-se de que a ciência exige que as pessoas se dediquem a ela durante a vida inteira. E se tivessem duas vidas, ainda assim não seria suficiente. A ciência demanda dos indivíduos grande tensão e forte paixão.

Sejam apaixonados por sua ciência e por suas pesquisas.

Nossa Pátria abre um vasto horizonte para os cientistas e é preciso reconhecer - a ciência generosamente nos introduz na vida de nosso país. Prossigam com o máximo de generosidade!

O que dizer sobre a situação de nossos jovens cientistas? Eis que aqui tudo é claro. A vocês muito foi dado, mas de vocês muito se exige. E para os jovens, assim como para nós, a questão de honra é ser digno de uma esperança maior, aquela que é depositada na ciência de nossa Pátria.

I. Pavlov

AGRADECIMENTOS

*Impossível agradecer, ou melhor, mencionar o nome de todas as pessoas que contribuíram para que eu chegasse até aqui. Dentre tantos aqueles que ajudaram diretamente, como funcionários (técnicos e farmacêutico-bioquímicos) de todos os laboratórios que utilizei, professores que conviveram com este trabalho e, principalmente, aos colaboradores do experimento *ex vivo*. Também agradeço àqueles que indireta, mas fundamentalmente, me auxiliaram, como colegas de aula, amigos, professores e, principalmente, meu noivo e meus pais que suportaram minha ausência.*

Flávia Martinello

SUMÁRIO

Resumo	x
Abstract	xii
Abreviaturas	xiv
Lista de Tabelas	xv
Lista de Figuras	xvii
1. Introdução.....	19
1.1. Ácido Ascórbico.....	20
1.2. Interferência do ácido ascórbico nas determinações bioquímicas.....	25
2. Justificativa e Objetivos.....	29
3. Materiais e Métodos.....	31
3.1. Materiais.....	32
3.2. Métodos.....	32
3.2.1. Protocolo Experimental para o Estudo <i>in vivo</i>	32
3.2.1.1. Determinações Bioquímicas Séricas.....	33
3.2.1.2. Determinações Bioquímicas Urinárias.....	33
3.2.1.3. Determinação do Ácido Ascórbico no Soro e na Urina.....	33
3.2.2. Protocolo Experimental para o Estudo <i>in vitro</i>	34
3.2.2.1. Análise dos parâmetros bioquímicos séricos	34
3.2.2.2. Análise dos parâmetros bioquímicos urinários.....	35
3.3. Estabilidade do Ácido Ascórbico em Amostras de Soro.....	37
3.3.1. Determinação do Ácido Ascórbico por CLAE (HPLC)	37
3.4. Verificação do Mecanismo de Interferência do Ácido Ascórbico.....	37
3.4.1. Reagentes e Instrumentos.....	37
3.4.2. Oxidação do ácido ascórbico pelo H ₂ O ₂ /peroxidase.....	38
3.4.3. Interferência com o peróxido de hidrogênio.....	38
3.4.4. Efeito dos constituintes da reação.....	38
3.4.5. Redução do composto colorido formado.....	38
3.5. Análise Estatística.....	39

4. Resultados.....	40
4.1. Interferência na Determinação de Parâmetros Bioquímicos Séricos.....	41
4.2. Interferência nas Reações para a Detecção de Glicose e Hemoglobina Urinárias	43
4.2.1. Interferência nas reações de glicose.....	44
4.2.2. Interferência nas reações de hemoglobina.....	45
4.3. Efeito Interferente do Ácido Ascórbico <i>in vitro</i>	46
4.3.1. Determinações Séricas.....	46
4.3.2. Determinações Urinárias.....	50
4.4. Mecanismo de interferência do ácido ascórbico na reação de Trinder.....	52
4.4.1. Consumo de peróxido de hidrogênio.....	52
4.4.2. Efeito da variação da quantidade dos componentes da reação.....	54
4.4.3. Redução do composto colorido formado.....	56
5. Tabelas e Figuras.....	57
6. Discussão.....	94
7. Conclusões.....	111
8. Referências Bibliográficas.....	113
9. Anexo I	122
10. Anexo II	124

RESUMO

O ácido ascórbico (AA), quando presente em amostras biológicas, pode interferir nos ensaios laboratoriais modificando o diagnóstico clínico-laboratorial. Os objetivos desse estudo foram: *i)* avaliar o grau de interferência de várias doses de AA nos ensaios bioquímicos séricos e urinários que utilizam reações de óxido-redução, em amostras coletadas em diferentes períodos de tempo após a ingestão de vitamina C; *ii)* comparar o nível de interferência do AA em diferentes "kits" e tiras reativas para urinálise após a adição do AA; *iii)* verificar o tempo de oxidação do AA em amostras de soro necessário para diminuir o efeito interferente e; *iv)* estudar os possíveis mecanismos da interferência do AA em ensaios baseados no sistema de reação oxidase/peroxidase com 4-aminofenazona e compostos fenólicos (Trinder). Após a ingestão de 0,15 a 4 g/d de vitamina C por uma semana, os níveis séricos de AA elevaram-se significativamente provocando inibição até 12 e 24 h após a ingestão nas determinações séricas de bilirrubina total e ácido úrico, respectivamente ($p < 0,05$). Colesterol total, glicose e creatinina não sofreram interferências, enquanto que os triglicérides apresentaram uma inibição 12 h após a ingestão de 4 g/d de vitamina C. Os níveis urinários de AA foram suficientemente elevados para provocar uma inibição significativa nas reações para a detecção de glicose e hemoglobina urinárias, inclusive em amostras coletadas após 48 h a ingestão. A adição ao soro de AA, em concentrações semelhantes às aquelas encontradas após a suplementação vitamínica, causou interferências significativas nas reações para a determinação de ácido úrico, enquanto doses maiores de AA, encontradas após a administração endovenosa, também interferiram nas reações para triglicérides, colesterol, glicose e bilirrubina. A comparação dos níveis de interferência *ex vivo* e *in vitro* demonstraram que o AA parece interferir no metabolismo da bilirrubina, enquanto que para os demais analitos a interferência foi somente analítica. O AA adicionado em diferentes concentrações às amostras de urina também provocou inibição nas reações para a detecção de glicose, hemoglobina, nitrito, bilirrubina e, em menor extensão, para leucócitos. Em geral, o grau de interferência foi diretamente proporcional à concentração de AA e inversamente proporcional à quantidade de analito na amostra. As diferentes marcas de "kits" e tiras reativas estudadas não apresentaram diferenças importantes em relação ao efeito interferente do AA. Dependendo da concentração de AA, o mesmo continuou a interferir nas reações de Trinder, principalmente para ácido úrico, até 72 h após a adição do AA. Os resultados dos estudos *in vitro* demonstraram que o ácido dehidroascórbico não interferiu nas reações. A quantificação do AA nas amostras de soro demonstrou uma estabilidade elevada se comparada com a sua meia-vida em solução aquosa, sendo este o responsável pela prolongada interferência. O estudo do mecanismo de interferência demonstrou que o AA interfere nas reações de Trinder com 4-aminofenazona e compostos fenólicos através do consumo do peróxido de hidrogênio, responsável pela formação do cromógeno oxidado. O AA não interferiu, portanto, com os constituintes da reação nem tampouco na redução do cromógeno oxidado. Baseados nesses resultados, podemos concluir que mesmo pequenas doses de AA provocaram importantes interferências nos ensaios laboratoriais, dependendo do tempo em que as amostras foram coletadas após a ingestão. Assim, para evitar resultados falso-negativos sugerimos a suspensão da ingestão de altas doses de vitamina C (2-4g), 48 e 72 h antes das coletas de sangue e de urina, respectivamente. Devido à alta estabilidade do AA no soro, para evitar o efeito interferente é necessário esperar um tempo superior ao recomendado para a realização dos ensaios. Finalmente, baseado no mecanismo de interferência, podemos sugerir que substâncias redutoras do AA deveriam ser acrescentadas aos reagentes para aumentar a resistência contra o efeito interferente do AA, tendo em vista que a 4-aminofenazona e os compostos fenólicos não reagiram com o AA.

ABSTRACT

Ascorbic acid (AA), when present in biological samples, can interfere in the laboratory tests. The aims of this study were: *i)* to evaluate the interference level of several doses of AA in the serum and urinary biochemical tests that use redox reactions, in samples collected after ingestion of vitamin C at different period of time; *ii)* to compare the degree of interference by AA *in vitro* by using different reagent kits and dipsticks; *iii)* to verify the time of AA autoxidation in serum samples and the subsequent interference decrease; *iv)* to study the possible mechanisms of interference by AA in laboratory tests based on oxidase/peroxidase systems that use 4-aminophenazone and phenolic compounds (Trinder-reaction). After ingestion of 0,15 to 4 g/d of vitamin C during one week, serum AA levels increased significantly and inhibited serum bilirubin and urate assays including 12 and 24 h after ingestion, respectively ($p < 0,05$). Triglyceride assay was also inhibited in samples collected 12 h after ingestion of 4 g/d vitamin C, while total cholesterol, glucose and creatinine tests did not had interference. Urinary AA levels were high enough to interfere in urinary glucose and hemoglobin reactions until 48 h after ingestion. AA addition to serum *in vitro*, at similar concentration of that obtained after oral vitamin supplementation, interferes significantly in urate test, whereas higher amount of AA, commonly observed after intravenous administration, interferes also in the triglyceride, total cholesterol, glucose and total bilirubin. Comparison of interference level between *ex vivo* and *in vitro* data showed that AA may interfere in the bilirubin metabolism, while for the other biochemical analytes there was analytical interference only. Different amounts of AA added to urine samples also inhibited reaction for detection of urinary glucose, hemoglobin, nitrite, bilirubin, and in lesser extension, for leucocyte. In general, the level of interference was proportional to AA concentration and inversely proportional to analyte amount in the samples. Important interference levels by AA were not observed among different kits and reagent-strips studied. Based on the AA concentration there was an interference in the Trinder reaction, mainly for urate assay, including 72 h after AA addition. The results of the *in vitro* studies showed that dehydroascorbic acid did not interfere in the reactions. Stability of AA in serum samples was higher than in aqueous solution, thus it is the probable cause of prolonged interference. The mechanism of interference of AA in the Trinder reaction, that use 4-aminophenazone and phenolic compounds, showed that AA was oxidized by hydrogen peroxide in the presence of peroxidase, thus depleting the peroxide necessary to generate chromophore. AA did not interfere with 4-aminophenazone and phenolic compounds, neither destroyed chromophore. Based on our results, we can conclude that ingestion of small doses of AA can interfere in the laboratory assays and that interference is dependent of the time period of sample collection after vitamin C ingestion. Therefore, to avoid false-negative results we suggest that consumption of high doses of vitamin C (2-4 g) should be suppressed 48 and 72 h before collection of blood and urine samples, respectively. To eliminated interference by AA *in vitro* it is necessary standing samples for a longer time than that commonly recommended, due to the higher stability of AA in serum. Finally, based on the mechanism of interference by AA, it is suggested that AA inhibitors should be include in the reagent kits and dipsticks to improve resistance against AA interference, because 4-aminophenazone and phenolic compounds in the Trinder systems studied do not react with AA.

PRINCIPAIS ABREVIATURAS

4-AF - 4-aminofenazona (4-aminoantipirina)

CLAE - (HPLC) - Cromatografia líquida de alta eficiência

COD - Colesterol oxidase

DHBS - Ácido 3,5-dicloro-hidroxibenzenosulfônico

DNPH - 2,4-dinitrofenilhidrazina

EDTA - Ácido etileno-diamino-tetra-acético

GOD - Glicose oxidase

HEPES - (N-[2-hidroxietyl]piperazina-N'-[2-ácido etanosulfônico])

"Kit" - Conjunto de reagentes comerciais para uso diagnóstico *in vitro*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros bioquímicos séricos (mg/dL) determinados antes e 4 h após a ingestão de vitamina C.....	58
Tabela 2. Parâmetros bioquímicos séricos (mg/dL) determinados antes e 12 h após a ingestão de vitamina C.....	59
Tabela 3. Parâmetros bioquímicos séricos (mg/dL) determinados antes e 24 h após a ingestão de vitamina C.....	60
Tabela 4. Interferência negativa do ácido ascórbico nas determinações bioquímicas (% de inibição \pm DP).....	61
Tabela 5. Detecção de glicose urinária na presença de várias concentrações de ácido ascórbico, 4 h após a ingestão de doses crescentes de vitamina C.....	62
Tabela 6. Detecção de glicose urinária na presença de várias concentrações de ácido ascórbico, 12 h após a ingestão de doses crescentes de vitamina C.....	63
Tabela 7. Detecção de glicose urinária na presença de várias concentrações de ácido ascórbico, 24 h após a ingestão de doses crescentes de vitamina C.....	64
Tabela 8. Detecção de hemoglobina urinária na presença de várias concentrações de ácido ascórbico, 4 h após a ingestão de doses crescentes de vitamina C.....	65
Tabela 9. Detecção de hemoglobina urinária na presença de várias concentrações de ácido ascórbico, 12 h após a ingestão de doses crescentes de vitamina C.....	66
Tabela 10. Detecção de hemoglobina urinária na presença de várias concentrações de ácido ascórbico, 24 h após a ingestão de doses crescentes de vitamina C.....	67
Tabela 11. Detecção de hemoglobina urinária na presença de várias concentrações de ácido ascórbico, 48 h após a ingestão de doses crescentes de vitamina C.....	68
Tabela 12. Detecção de glicose e hemoglobina urinárias na presença de várias concentrações de ácido ascórbico, 6 h após a permanência das amostras a 4° C.....	69
Tabela 13. Interferência negativa do ácido ascórbico (% do controle) na determinação do ácido úrico sérico.....	70
Tabela 14. Interferência negativa do ácido ascórbico (% do controle) na determinação de colesterol, glicose, triglicérides e bilirrubina.....	71
Tabela 15. Interferência do ácido ascórbico nas reações para detecção de glicose urinária utilizando-se as tiras reativas de diferentes marcas comerciais.....	72

Tabela 16. Interferência do ácido ascórbico nas reações para detecção de hemoglobina urinária utilizando-se as tiras reativas de diferentes marcas comerciais.....	73
Tabela 17. Interferência do ácido ascórbico nas reações para detecção de nitrito urinário utilizando-se as tiras reativas de diferentes marcas comerciais.....	74
Tabela 18. Interferência do ácido ascórbico nas reações para detecção de leucócitos urinários utilizando-se as tiras reativas de diferentes marcas comerciais.....	75
Tabela 19. Interferência do ácido ascórbico nas reações para detecção de bilirrubina urinária utilizando-se as tiras reativas de diferentes marcas comerciais.....	75
Tabela 20. Efeito dos componentes da reação no grau de interferência causado pelo ácido ascórbico.....	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do ácido ascórbico e seus produtos de oxidação, ácidos dehidroascórbico e dicetogulônico.....	20
Figura 2. Possíveis mecanismos de interferência do ácido ascórbico.....	27
Figura 3. Níveis séricos de ácido ascórbico após a ingestão de vitamina C.....	77
Figura 4. Níveis urinários de ácido ascórbico após a ingestão de vitamina C.....	78
Figura 5. Efeito interferente do ácido ascórbico (mg/dL) na determinação de ácido úrico, colesterol, glicose e triglicerídeos pelo sistema oxidase/peroxidase.....	79
Figura 6. Interferência do ácido ascórbico na determinação de ácido úrico.....	80
Figura 7. Estabilidade do ácido ascórbico em soro.....	81
Figura 8. Efeito interferente do ácido ascórbico nas determinações de ácido úrico, colesterol, glicose e triglicerídeos (comparação entre as diferentes marcas de reagentes utilizados).....	82
Figura 9. Interferência <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> do ácido ascórbico na determinação de bilirrubina total e ácido úrico.....	83
Figura 10. Oxidação do ácido ascórbico pelo peróxido de hidrogênio/peroxidase.....	84
Figura 11. Efeito interferente do ácido ascórbico na cinética de reação da peroxidase para a formação do cromógeno oxidado.....	85
Figura 12. Espectro de absorvância do ácido ascórbico, 4-aminofenazona, fenol e DHBS.....	86

Tabela 16. Interferência do ácido ascórbico nas reações para detecção de hemoglobina urinária utilizando-se as tiras reativas de diferentes marcas comerciais.....	73
Tabela 17. Interferência do ácido ascórbico nas reações para detecção de nitrito urinário utilizando-se as tiras reativas de diferentes marcas comerciais.....	74
Tabela 18. Interferência do ácido ascórbico nas reações para detecção de leucócitos urinários utilizando-se as tiras reativas de diferentes marcas comerciais.....	75
Tabela 19. Interferência do ácido ascórbico nas reações para detecção de bilirrubina urinária utilizando-se as tiras reativas de diferentes marcas comerciais.....	75
Tabela 20. Efeito dos componentes da reação no grau de interferência causado pelo ácido ascórbico.....	76

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ácido Ascórbico

O ácido ascórbico, normalmente conhecido como vitamina C, é uma vitamina hidrossolúvel essencial para o funcionamento do organismo. O ácido ascórbico é a forma enólica do 2-oxo-L-gulofuranolactona (Orten e Neuhaus, 1982). A dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 do anel lactona de 4 carbonos é facilmente oxidada, sendo que a oxidação desta ligação enediólica produz o ácido dehidroascórbico. Este último pode ser irreversivelmente degradado pela abertura hidrolítica do anel lactona para formar o ácido 2,3-dicetogulônico, que não é biologicamente ativo (Fig. 1). Essas reações ocorrem na presença de oxigênio, traços de íons metálicos, e são aceleradas pelo calor e condições de pH neutro a alcalino (Combs, 1998).

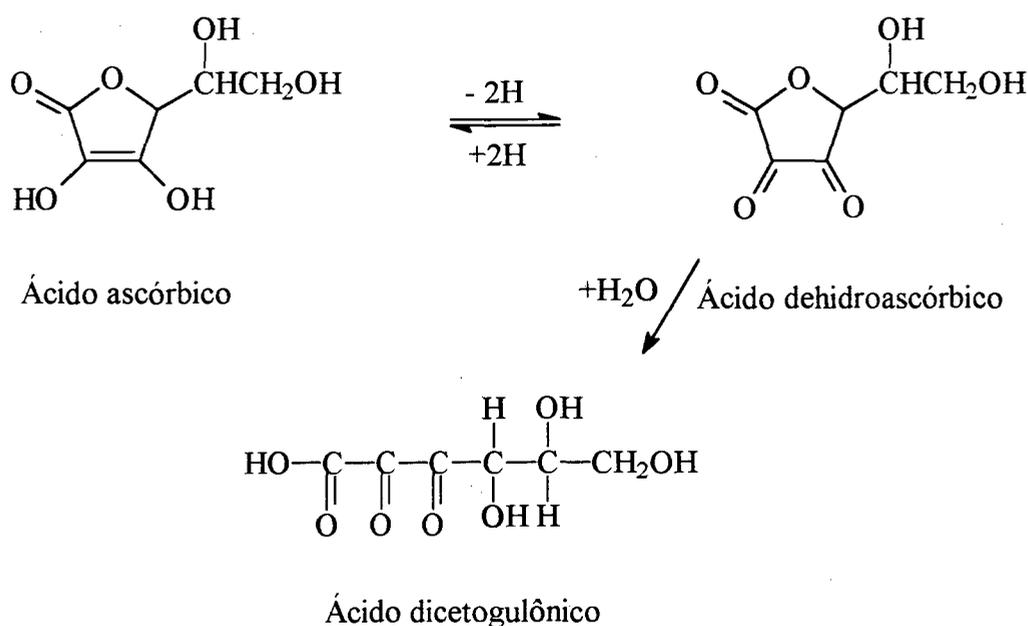


Figura 1. Estrutura química do ácido ascórbico e seus produtos de oxidação, ácidos dehidroascórbico e dicetogulônico.

Os ácidos ascórbico e dehidroascórbico são as únicas formas biologicamente ativas da vitamina C, ambos são efetivos no tratamento do escorbuto, doença caracterizada pela deficiência da vitamina C. Aproximadamente 90% da vitamina C presente nos tecidos animais encontra-se na forma de ácido ascórbico. As plantas e a maioria dos animais sintetizam o ácido L-ascórbico a partir da glicose ou galactose. Os animais incapazes de sintetizar o ácido ascórbico, como os humanos, não possuem a gulonolactona oxidase, enzima final da via

biossintética que catalisa a formação de 2-ceto-gulonolactona, a qual tautomeriza espontaneamente a ácido ascórbico (Basu e Schorah, 1982).

A vitamina C é abundante em frutas e na maioria dos vegetais, particularmente naqueles compostos de folhas verdes. Infelizmente, a vitamina C é a mais lábil vitamina nos alimentos e parte de sua atividade é perdida através da auto-oxidação durante a preparação, cozimento e armazenamento dos alimentos. O conteúdo de vitamina C da maioria dos alimentos diminui drasticamente durante o armazenamento devido aos efeitos conjuntos de vários processos pelos quais a vitamina pode ser destruída. As melhores fontes animais são fígado e rins, somente pequenas quantidades são encontradas no tecido muscular (Combs, 1998).

As espécies que não podem sintetizar o ácido ascórbico adquirem a vitamina através da dieta, e absorvem-na por um mecanismo de transporte ativo saturável, mediado por um carreador que é dependente de sódio e inibido pelo ácido acetilsalicílico (Combs, 1998). A concentração plasmática de ácido ascórbico apresenta uma relação sigmóide com o nível de vitamina C ingerido, com saturação alcançada por doses diárias de, no mínimo, 1 g. A absorção da vitamina C ocorre, predominantemente, na porção distal do intestino delgado. A eficiência da absorção de doses fisiológicas de vitamina C (≤ 180 mg/d para humanos adultos) é alta, entre 80-90%. A absorção diminui drasticamente com doses de vitamina C maiores do que 1g. Assim, a absorção de aproximadamente 75% de uma dose de 1 g de vitamina C, diminui para 40% com a dose de 3 g e cerca de 24% com 5 g; apresentando uma absorção máxima de 1-1,2 g com a ingestão de 3 g da vitamina (Combs, 1998). A vitamina C é encontrada na maioria dos tecidos, mas os tecidos glandulares, como a pituitária, o córtex adrenal, o corpo lúteo e o timo possuem as mais altas quantidades. A retina possui 20-30 vezes a concentração encontrada no plasma (Harper, 1979). Os leucócitos, em particular, também contêm altos níveis de vitamina C. A difusão passiva é responsável por grande parte da entrada da vitamina C para o interior de células como leucócitos e eritrócitos, mas um mecanismo de transporte ativo pode também operar, especialmente em plaquetas, adrenais e células da retina. A livre difusão do ácido dehidroascórbico para dentro das células, seguida pela redução intracelular até a forma menos difusível do íon ascorbato, poderia explicar a ocorrência de concentrações maiores de ascorbato nos leucócitos do que no plasma (Combs, 1998).

Quando os níveis teciduais de ácido ascórbico encontram-se saturados, o nível plasmático eleva-se e o excesso de vitamina é excretado através dos rins. Um nível continuamente baixo de ácido ascórbico no plasma ($<0,1$ mg/dL) pode levar ao escorbuto. Em humanos um nível plasmático de 0,4-1,4 mg/dL corresponde à ingestão diária de cerca de 40 mg de vitamina C (Combs, 1998). Níveis plasmáticos de vitamina C superiores a 1 mg/dL refletem um “pool” corpóreo máximo, enquanto que níveis inferiores a 0,2 mg/dL (0,011 mmol/L), ou uma concentração nos leucócitos inferior a 7 mg/dL, indicam um alto risco de deficiência da vitamina C (Jacob e Milne, 1993; Sauberlich, 1986). Os níveis leucocitários, enquanto tecnicamente mais difíceis de se determinar, encontram-se mais próximos dos níveis corpóreos e do “pool” tecidual do que os valores plasmáticos. Estes últimos estão mais relacionados à ingestão da vitamina C (Driskell, 1986). No entanto, dois estudos estimaram que a ingestão de vitamina C foi responsável por apenas 25-27% da variação de ácido ascórbico no plasma (Jacob e cols., 1988; Jacques e cols., 1987).

O requerimento de vitamina C encontra-se aumentado em patologias e em condições de prolongado estresse fisiológico, como no alcoolismo, no câncer, em fumantes e usuários de contraceptivos orais esteroidais (Statland, 1992; Roe, 1981). O fato de que os fumantes possuem um baixo nível corpóreo de ácido ascórbico já é conhecido desde a década de 1960 (Hornig e cols., 1988). O provável mecanismo nesta situação é uma aumentada taxa de consumo da vitamina C (Kallner e cols., 1981). Estudos também demonstraram que pacientes diabéticos possuem uma baixa concentração de ácido ascórbico no plasma e nos leucócitos (Kallner e cols., 1981; Stankova e cols., 1984). Sugere-se que o carreador para o transporte do ácido ascórbico serve também como carreador para a glicose, o qual está inibido pela hiperglicemia nos pacientes diabéticos (Kapeghian e Verlangieri, 1984). O número de carreadores pode também ser aumentado pela ação da insulina que está diminuída nos diabéticos (Stankova e cols., 1984).

A excreção da vitamina C ocorre, primariamente, como metabólitos urinários: 20-25% como ácido ascórbico e ácido dehidroascórbico, cerca de 20% como ácido dicetogulônico, 40-45% como oxalato e somente pequenas quantidades como ascorbato-2-sulfato. O ascorbato atravessa os glomérulos sem ser transformado, sendo ativamente reabsorvido nos túbulos por

um mecanismo saturável mediado por transportador (Combs, 1998). Com o consumo de doses maiores do que 500 mg por dia (isto é, quando a concentração plasmática de ácido ascórbico excede 1,2-1,8 mg/dL), todo o ácido ascórbico acima desse nível é excretado sem transformação, não provocando assim, aumento no conteúdo armazenado nos tecidos. Desta forma, quando o ácido ascórbico não é captado pelas células em uma taxa normal após a ingestão da vitamina, o excedente será excretado na urina. A excreção urinária do ácido ascórbico pode ser promovida também pelo uso de certos medicamentos, como o ácido acetilsalicílico e os barbituratos (Combs, 1998).

O ácido ascórbico, como potente agente redutor, é capaz de doar elétrons para aceptores nas reações de óxido/redução do metabolismo básico, por exemplo, para íons cúpricos e férricos, íons metálicos ligados a vários citocromos e para o oxigênio (Orten e Neuhaus, 1982). A vitamina C é necessária para a atividade ótima de várias enzimas e tem a função de manter os íons metálicos do grupo prostético na forma reduzida (Padh, 1991). O ascorbato é também um excelente seqüestrador de agentes oxidantes e radicais livres, incluindo o peróxido de hidrogênio, o ânion radical superóxido e os radicais hidroxila e peroxila. A vitamina funciona como um antioxidante em micro-compartimentos aquosos, como no citoplasma e no fluido extracelular, através da doação de um de seus elétrons para estes radicais livres. O elétron desemparelhado é responsável pela alta reatividade química dos radicais livres, o que lhes confere a habilidade de danificar outros constituintes celulares (Lunec, 1992; Moster e Bendish, 1991). Aproximadamente um quarto dos radicais peroxilas circulantes são eliminados pela vitamina C (Bankson e cols., 1993). O ácido ascórbico pode também afetar o balanço entre os produtos oxidativos e os mecanismos de defesa antioxidantes através da regeneração do radical tocoferoxila, o mais importante antioxidante lipossolúvel, a vitamina E.

O ácido ascórbico possui, também, um importante papel nas reações de hidroxilação, sendo essencial para a formação do colágeno protéico (Moster e Bendish, 1991). Os aminoácidos prolina e lisina devem ser hidroxilados após a incorporação dos mesmos no polipeptídeo pró-colágeno. Se isto não ocorrer, a estrutura final em tripla hélice do colágeno não pode ser formada. Esta estrutura única do colágeno fornece a integridade estrutural

característica do tecido conjuntivo. A vitamina C também é identificada como um promotor ou facilitador para o metabolismo do colesterol, da histamina e da tirosina, proliferação linfocítica e transformação de linfócitos B e T, funcionamento dos macrófagos, quimiotaxia neutrofilica, redução de folato e absorção, distribuição e armazenamento do ferro dietético (Basu e Schorah, 1982). O ácido ascórbico diminuiu ainda os níveis séricos de colesterol total, colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL-colesterol) e triglicerídeos em alguns indivíduos (Driskell, 1986; Jacques e cols., 1994). A hipovitaminose C pode assim, aumentar o risco de hipercolesterolemia (Simon e cols., 1993). Portanto, o ácido ascórbico tem inúmeras e variadas funções no organismo pelo seu importante papel no sistema bioquímico de óxido-redução, envolvendo o transporte de elétrons; ação antioxidante; co-substrato de enzimas; metabolismo de íons metálicos; função imune; em doenças cardiovasculares, diabetes, catarata, câncer, gripe, herpes labial, hipercolesterolemia, infecções e estresse (Combs, 1998).

A vitamina C, quando em excesso, é facilmente excretada pela urina e, é de aceitação geral que os efeitos colaterais oriundos de mega-doses são mínimos. No entanto, existem relatos de distúrbios gastrointestinais, aumentada hemólise em indivíduos com deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase, interação com o anticoagulante warfarina, aumentada destruição da vitamina B₁₂, excessiva absorção do ferro da dieta e uricosúria ou oxalúria com relativo potencial para a formação de cálculos renais. Em doses farmacológicas ou em mega-doses na presença de ferro, a vitamina C é um dos mais potentes oxidantes conhecidos e provoca a geração de radicais livres catalisados pelo ferro (Herbert, 1994). Em relação à urolitíase, os estudos são controversos. A ingestão de 8 g/d provocou a conversão normal de ácido ascórbico a oxalato (Wilson e Liedtke, 1991). Esta conversão é acelerada em certas pessoas e pode resultar em precipitação de cálculos de oxalato (Stein e cols., 1976). No entanto, em estudos com animais, a administração de até 600 mg de ácido ascórbico/kg de peso não induziu cristalúria, calcificação ou formação de cálculos (Singh e cols., 1993).

O ácido ascórbico atua, mediado pelo citocromo P450, no sistema microsomal hepático de função mista. Uma de suas funções é a 7- α -hidroxilação do colesterol, a qual é o passo inicial na formação dos ácidos biliares. Assim, sugere-se que o ácido ascórbico tem um efeito hipocolesterolêmico influenciando na eliminação do colesterol no organismo (Aro e

cols., 1988). Como um seqüestrador de radicais livres, a vitamina C pode inibir a modificação oxidativa da lipoproteína de baixa densidade, diminuindo, assim, o risco aterogênico dessa lipoproteína (Bankson e cols., 1993). Alguns estudos de correlação reportam uma alta associação inversa entre a ingestão de vitamina C e o risco para o desenvolvimento de doenças cardíacas isquêmicas, mortalidade devido às doenças cardíacas ou mortalidade em geral (Enstrom e cols., 1992; Steinberg, 1993; Russell e Suter, 1993). Além da utilização em casos de hipercolesterolemia, a vitamina C tem sido usada terapêuticamente, ainda, no tratamento da síndrome de Chediak-Higashi (Brin, 1982). Apesar disso, as vantagens e desvantagens da terapia megavitamínica estão atualmente em debate. Pesquisas científicas e estudos clínicos estão ainda em progresso e as respostas definitivas sobre este assunto não estão disponíveis neste momento.

1.2. Interferência do Ácido Ascórbico nas Determinações Bioquímicas

Vários relatos na literatura indicam que grandes quantidades de ácido ascórbico afetam a determinação de vários parâmetros bioquímicos (Siest e cols., 1978; Badrick e Campbell, 1992; Freemantle e cols., 1994; Russell e Suter, 1993; Zoppi e Fenili, 1980; Young, 1983; Zweig e Jackson, 1986). Em termos metodológicos, a natureza e a extensão da interferência variam com o procedimento analítico e com o equipamento utilizado (Freemantle e cols., 1994). Badrick e Campbell (1992) relataram um caso em que a administração endovenosa de 30 g de ascorbato de sódio em um paciente provocou significantes alterações nos níveis de vários parâmetros bioquímicos plasmáticos, analisados pouco tempo após a injeção. Este estudo demonstrou uma sensível diminuição nos valores de colesterol, triglicerídeos e ácido úrico e, ao contrário, um aumento nos níveis de creatinina e sódio. Outros autores também descreveram a interferência provocada pelo ácido ascórbico *in vitro*. As principais alterações, observadas após a adição do ácido ascórbico às amostras de plasma, foram uma significativa diminuição nos valores de glicose, colesterol, triglicerídeos, bilirrubina e uratos e um aumento nos níveis de fosfato (Freemantle e cols., 1994; Young, 1983).

A alta incidência de significantes concentrações de ácido ascórbico na urina, como uma consequência da suplementação vitamínica, apresenta sérias implicações também para a rotina

de urinálise. Concentrações superiores a 41 mg/dL (2,3 mmol/L) de ácido ascórbico já foram encontradas na urina de indivíduos ingerindo doses de 100-250 mg de vitamina C por dia (Bridgen e cols., 1992). O limiar de excreção renal é igual a 1,5 mg/dL (0,085 mmol/L), sendo que tal nível sérico é obtido pela ingestão de apenas 100 mg de ácido ascórbico (Gilman, 1990). Assim, os testes urinários utilizando tiras reativas que envolvem sistemas indicadores com reações de óxido-redução por peroxidases, como por exemplo, para a glicose e hemoglobina, estão sujeitos a sofrer interferência pelo ácido ascórbico (Brandy e cols., 1977; Berg, 1986). Zweig e Jackson (1986) demonstraram que uma suplementação de vitamina C considerada modesta (350 a 1000 mg/d) resultou no aparecimento de ácido ascórbico na urina em concentrações suficientemente altas para inibir, de forma significativa, as determinações de hemoglobina e de glicose, realizadas em amostras coletadas 1 a 3 h após a ingestão da vitamina. Bridgen e cols. (1992) também demonstraram que a suplementação oral com doses de 100, 250, 500 e 1000 mg de vitamina C ou suco de frutas contendo a vitamina, resultou em uma concentração de ácido ascórbico urinário suficiente para produzir resultados falso-negativos para glicose e hemoglobina, inclusive com a menor dose estudada. Berg (1986) e Rice e Galt (1985) verificaram a interferência negativa causada pelo ácido ascórbico *in vitro* na determinação de glicose urinária e sérica, respectivamente. A comparação das marcas de reagentes para determinação de glicose mostrou uma interferência altamente variada, sendo maior na presença de pequenas concentrações de glicose (Berg, 1986).

As determinações de vários parâmetros bioquímicos podem ser realizadas utilizando-se oxidases específicas que produzem peróxido de hidrogênio, cuja concentração é proporcional à concentração do analito a ser determinado. Na presença de peroxidase, o peróxido de hidrogênio resultante oxida compostos que não absorvem luz no visível em compostos coloridos, isto é, gera um cromógeno. Assim, a intensidade de cor formada é diretamente proporcional à concentração do substrato inicial e pode ser determinada espectrofotometricamente. Em muitos métodos para a determinação de analitos bioquímicos como glicose, ácido úrico, colesterol e triglicerídeos, o peróxido de hidrogênio oxida a 4-aminofenazona, a qual combina-se com um composto fenólico para formar uma quinonaimina colorida com alto coeficiente de absorvidade molar. Este método, largamente utilizado em bioquímica clínica, foi descrito por Trinder (1969). O ácido ascórbico pode interferir com esta

seqüência de reações através de uma ou mais formas: *i*) consumo do peróxido de hidrogênio necessário para oxidar o cromógeno (Fig. 2A); *ii*) interferindo na formação do cromógeno colorido, isto é, reagindo com os constituintes da reação de Trinder (Fig. 2B) e/ou; *iii*) afetando a estabilidade do cromógeno formado, ou seja, reduzindo-o (Fig. 2C).

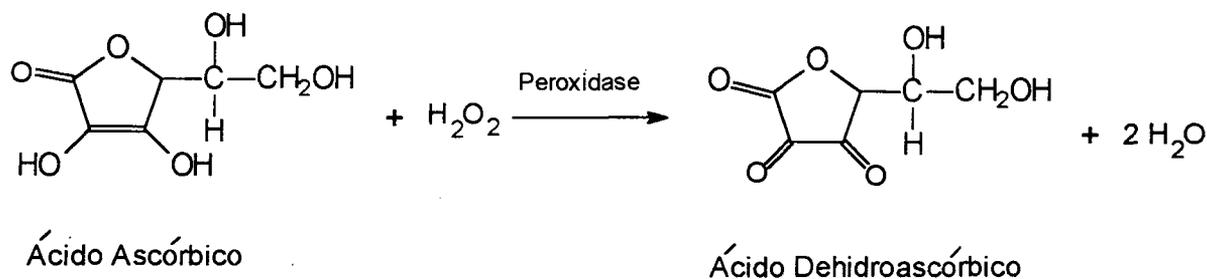
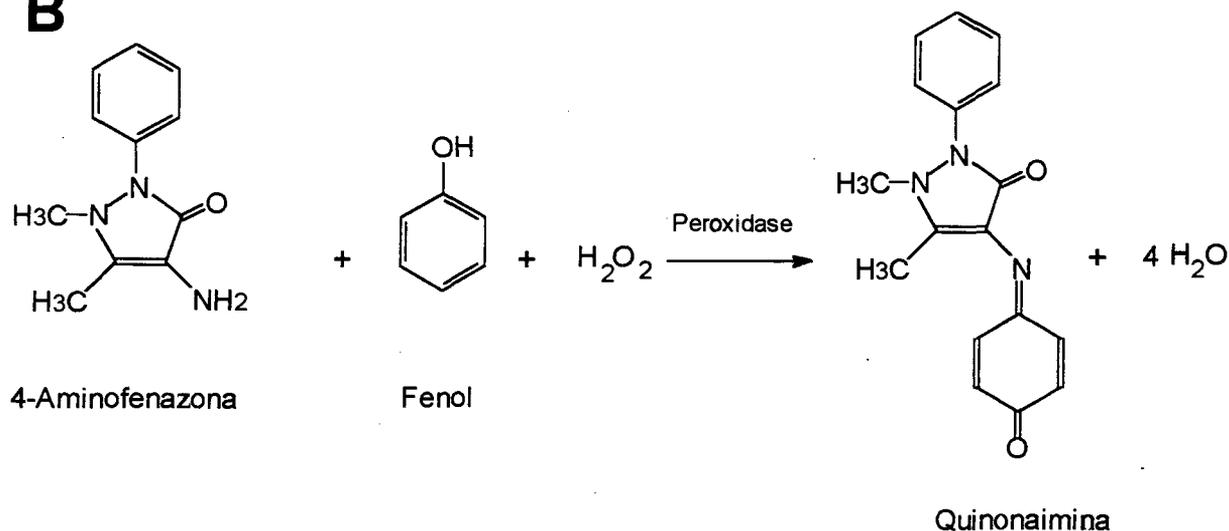
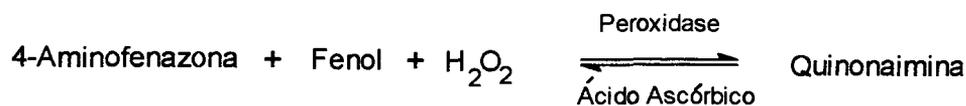
A**B****C**

Figura 2. Possíveis mecanismos de interferência do ácido ascórbico. A) Oxidação do ácido ascórbico pelo peróxido; B) Reação de Trinder, com cujos componentes o ácido ascórbico pode interferir; C) Redução da quinonaimina (cromógeno formado) pelo ácido ascórbico.

O ácido ascórbico poderia, ainda, interferir na reação das oxidases, mas segundo White-Stevens (1982), este mecanismo parece improvável por causa do potencial elétrico de óxido-redução para a maioria das flavoproteínas permanecer abaixo do potencial do dehidroascorbato/ácido ascórbico (0,08 V em pH 6,4) (White e cols., 1976). Realmente, na literatura consultada não foi encontrada qualquer indicação para a possibilidade de reação entre as oxidases e o ácido ascórbico. Uma outra possibilidade de interferência seria pela produção de radicais livres a partir da oxidação espontânea do ácido ascórbico em solução gerando o ânion radical superóxido (Hirata e Hayaishi, 1975), ou pela reação entre a peroxidase/peróxido de hidrogênio (composto I) e o ácido ascórbico, formando o "composto II" e o radical ascorbila (Yamazaki e cols., 1960). O radical superóxido pode dismutar o peróxido de hidrogênio, via reação de Haber-Weiss, em oxigênio e água (Haber e Weiss, 1934) e o radical ascorbila pode oxidar certos cromógenos (Johnson e Overby, 1969). No entanto, esse mecanismo é de difícil demonstração, além do fato da baixa reatividade do radical ascorbil (Yamazaki e Piette, 1963).

O mecanismo de interferência do ácido ascórbico na reação de Trinder, utilizando a 4-aminofenazona e os compostos fenólicos, não está totalmente esclarecido. Alguns autores têm especulado que o mecanismo de interferência envolve a oxidação do ácido ascórbico pelo peróxido/peroxidase, consumindo, assim, o peróxido de hidrogênio necessário para produzir o cromógeno colorido, ou então, o ácido ascórbico poderia reduzir o cromógeno colorido formado (Sharp, 1972; Maguire e Price, 1983; Fossati e cols., 1980). No entanto, até o momento não se sabe qual das possibilidades, descritas acima, predomina.

A reação da creatinina pelo método de Jaffé modificado também pode sofrer interferência pelo ácido ascórbico. A creatinina e outros componentes do soro reagem com a solução de picrato em meio alcalino, formando um complexo de cor vermelha. O ácido ascórbico interfere por reagir com a solução de picrato alcalino, originando resultados falsamente positivos (Kaplan e Pesce, 1996). Além disso, o ácido ascórbico também é capaz de destruir o reagente diazo, utilizado na reação de diazotação usada para a detecção de bilirrubina sérica e urinária, nitrito e leucócitos urinários, podendo desta forma interferir nos resultados (Bishop e cols., 1996).

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O crescente consumo de ácido ascórbico, como uma forma de combater ou prevenir resfriados, doenças cardiovasculares, cânceres e outras patologias (provavelmente pelo seu alto poder antioxidante) torna-se um agravante adicional para os profissionais da área de análises clínicas. O ácido ascórbico, quando presente nas amostras biológicas, pode alterar significativamente os resultados das análises bioquímicas, levando a um falso diagnóstico clínico laboratorial. Vários estudos *in vitro* já demonstraram esse efeito pela adição do ácido ascórbico às amostras biológicas antes da realização dos ensaios bioquímicos. No entanto, resta estabelecer se o mesmo nível de alteração ocorre também em amostras de sangue e de urina coletadas após a ingestão de ácido ascórbico, pois deve ser considerada a velocidade de eliminação plasmática e a pequena meia-vida do ácido ascórbico em solução. Portanto, os objetivos deste estudo são:

1) avaliar a interferência do ácido ascórbico nas determinações de parâmetros bioquímicos que utilizam a reação de Trinder ou outras reações de óxido-redução, em amostras de soro e de urina obtidas de indivíduos saudáveis após a ingestão de diferentes doses de vitamina C e coletadas em diferentes períodos de tempo;

2) Tendo em vista que a interferência causada pelo ácido ascórbico pode ser dependente do tipo e da concentração dos reagentes químicos, estudos complementares foram realizados *in vitro* para comparar as diferentes marcas comerciais de “kits” e tiras reativas, adicionando-se várias concentrações de ácido ascórbico em amostras de soro e de urina;

3) Devido à pequena meia-vida do ácido ascórbico em solução, verificamos o tempo necessário para a diminuição da interferência em amostras de soro. Para tal foram realizadas determinações em diferentes períodos de tempo após a adição do ácido ascórbico;

4) Por fim, tivemos como objetivo estudar possíveis mecanismos de interferência do ácido ascórbico nas reações baseadas no sistema oxidase/peroxidase.

A quantificação da interferência provocada pela ingestão de vitamina C e o conhecimento do mecanismo de interferência serão de grande utilidade para possíveis medidas de intervenção a serem tomadas, particularmente em relação ao tempo de suspensão da ingestão a ser seguido antes da coleta de amostras de indivíduos que consomem a vitamina C, em relação à escolha de reagentes ou à adição de possíveis inibidores da vitamina C aos reagentes de ensaios.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Os "kits" para as determinações séricas foram obtidos dos laboratórios Labtest (Lagoa Santa, MG), Bioclin (Belo Horizonte, MG), Celm (Barueri, SP), BioSystems (Barcelona, Espanha) e Biodiagnóstica (Pinhais, PR). As tiras reagentes para as determinações urinárias foram das marcas Rapignost Total-Screen (Behring, Alemanha), Multistix (Bayer Diagnósticos, Argentina), Medi-Test (Macherey-Nagel, Alemanha) e Combur Test M (Boehringer Mannheim, Alemanha). O ácido ascórbico, comercializado na forma de gotas e comprimidos efervescentes, foi da marca Roche (Redoxon®). O ácido ascórbico grau HPLC, o ácido dehidroascórbico, a peroxidase tipo II, de rabanete, (EC 1.11.1.7), a 4-aminofenazona (4-aminoantipirina), o fenol, o ácido dicloro-hidroxibenzenosulfônico (DHBS) e o tampão HEPES foram obtidos da Sigma Co. (Estados Unidos). Os demais reagentes foram provenientes de diversas fontes e todos foram reagentes analíticos.

3.2. Métodos

3.2.1. Protocolo Experimental para o Estudo *in vivo*

Foram selecionados 18 indivíduos considerados saudáveis pela equipe médica do HU-UFSC, não fumantes, previamente informados e estando de comum acordo com o protocolo experimental (aprovado pelo Comitê de Bioética da UFSC - Anexo I). Os participantes consumiram por via oral doses crescentes e sucessivas de ácido ascórbico durante 6 semanas. As doses de vitamina C foram de 0,15, 0,25, 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 gramas por dia, com intervalo de 3-4 dias entre as doses. Cada dose foi ingerida de forma única após a última refeição do dia durante uma semana. As amostras de sangue e de urina foram coletadas na manhã do 8º dia de cada semana, 12 h após a ingestão da vitamina C, sendo que os indivíduos permaneceram em jejum durante este tempo. Após a coleta de sangue e de urina, os indivíduos tomaram o desjejum e mais uma dose de vitamina C. Amostras subsequentes de sangue e de urina foram coletadas 4, 24 e 48 h após essa ingestão.

Antes de iniciar o estudo com a vitamina C, amostras semanais de sangue foram coletadas de cada indivíduo, após jejum de 4 e 12 h durante 3 semanas, para se estabelecer os níveis basais dos parâmetros bioquímicos séricos e a variação biológica (Marcovina e cols., 1994). Assim cada indivíduo foi o seu próprio controle.

Considerando-se que os participantes foram indivíduos saudáveis, para as determinações urinárias foram adicionadas às amostras de urina soluções de glicose (20 g/dL) e hemoglobina (1-2 g/dL) para obter amostras com 25-1000 mg/dL de glicose e 0,06-6,0 mg/dL de hemoglobina. Amostras de urina obtidas de indivíduos saudáveis que não receberam suplementação de vitamina C foram utilizadas como controle.

3.2.1.1. Determinações Bioquímicas Séricas

O sangue foi coletado em tubos a vácuo com gel separador (Vacuette®, Greiner Labortechnik, Áustria). O soro foi obtido por centrifugação do sangue durante 15 min a 750 x g e analisado imediatamente. As determinações dos parâmetros bioquímicos glicose, colesterol total, triglicérides, creatinina, ácido úrico e bilirrubina, foram realizadas por métodos colorimétricos, enzimáticos ou não, segundo as instruções do fabricante Labtest. As leituras das absorbâncias foram realizadas no espectrofotômetro MicroLab 200 (Merck). Para a garantia do controle de qualidade das determinações utilizou-se o soro controle Control-Lab.

3.2.1.2. Determinações Bioquímicas Urinárias

Os parâmetros bioquímicos glicose e hemoglobina foram analisados utilizando-se tiras reativas Rapignost Total Screen e Multistix 10SG. Antes da realização dos ensaios, concentrações crescentes de glicose (concentração final: 25, 50, 150, 350, 500, 750 e 1000 mg/dL) e hemoglobina (0,06, 0,12, 0,60, 2,0, 4,0 e 6,0 mg/dL) foram adicionadas às amostras de urina. A hemoglobina foi obtida de hemácias humanas lisadas com solução hipotônica. Os parâmetros foram analisados dentro de 120 min e, quando se observaram interferências, uma segunda análise foi realizada após 6 h de repouso das amostras a 4°C.

3.2.1.3. Determinação do Ácido Ascórbico no Soro e na Urina

O ácido ascórbico foi determinado utilizando-se o método espectrofotométrico da 2,4-dinitro-fenil-hidrazina que forma o complexo bis-hidrazona de cor vermelha (McCormick e Greene, 1994). O ácido ascórbico, presente nas amostras de soro e de urina, é oxidado pelo cobre (Cu^{2+}) para formar o ácido dehidroascórbico, o qual reage com a 2,4-dinitro-fenil-hidrazina ácida para formar a bis-hidrazona de coloração vermelha, cuja absorbância foi medida em 520 nm.

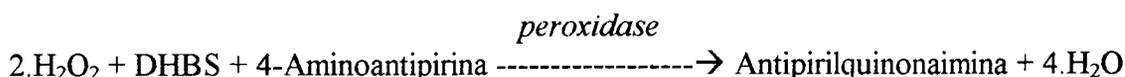
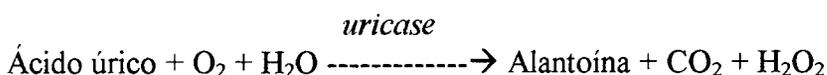
3.2.2. Protocolo Experimental para o Estudo *in vitro*

Baseado nos níveis de ácido ascórbico encontrados nas amostras de soro e de urina após a ingestão das várias doses de vitamina C, quantidades crescentes de ácido ascórbico foram adicionadas ao “pool” de soro e de urina e as várias determinações foram realizadas de acordo com as instruções dos diferentes fabricantes. Foram utilizados os “kits” para ensaios séricos dos laboratórios Labtest, Bioclin, Celm, BioSystems e Biodiagnóstica (composição dos “kits” – Anexo II) e para as análises urinárias foram utilizadas as tiras reagentes das marcas Rapignost Total Screen, Multistix, Medi-Test e Combur Test.

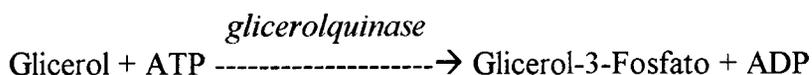
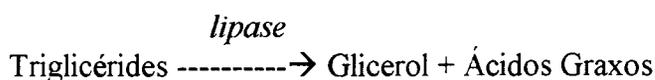
3.2.2.1. Análise dos parâmetros bioquímicos séricos

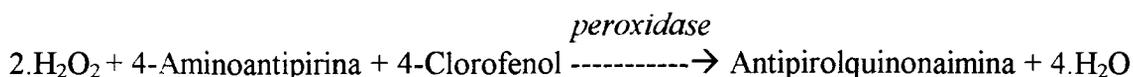
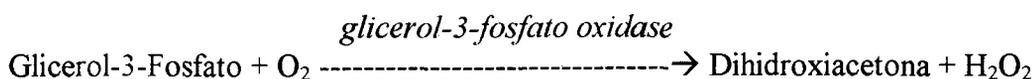
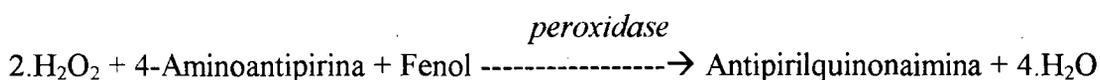
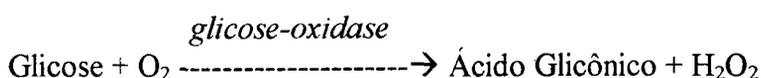
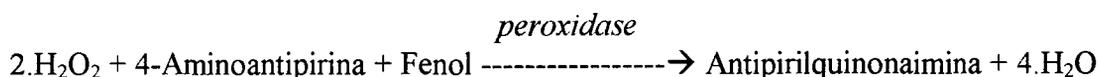
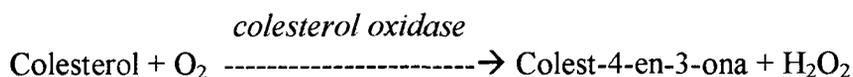
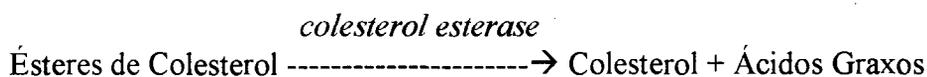
As determinações dos parâmetros bioquímicos glicose, colesterol total, triglicérides, creatinina, ácido úrico e bilirrubina total foram realizadas nas 2 primeiras horas após a adição do ácido ascórbico. Determinações subseqüentes foram realizadas com as mesmas amostras após 6, 12, 24, 48 e 72 h, segundo as instruções dos diferentes fabricantes. As amostras foram armazenadas e protegidas da luz a 4°C. O laboratório Biodiagnóstica não disponibilizou o “kit” para bilirrubina e o laboratório Celm não utiliza o sistema oxidase/peroxidase para a determinação de triglicérides, portanto, não constam resultados destes analitos para as respectivas marcas. Encontram-se abaixo as reações de Trinder utilizadas:

Ácido Úrico



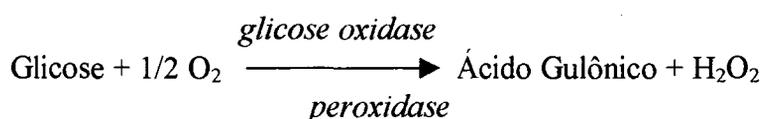
Triglicérides

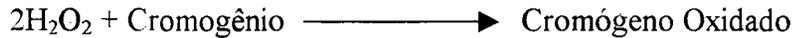


**Glicose****Colesterol total****3.2.2.2. Análise dos parâmetros bioquímicos urinários**

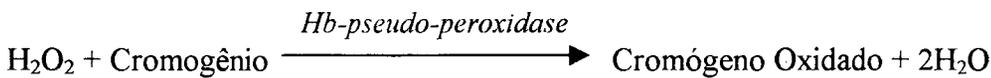
Os analitos estudados foram adicionados em concentrações crescentes às amostras de urina (concentração final): glicose (50, 150, 350 e 500 mg/dl); hemoglobina (0,12, 0,60, 2,0 e 4,0 mg/dL); nitrito de sódio (0,1 a 0,5 mg/dL) leucócitos (1×10^5 a 1×10^6 células/mL) e; bilirrubina (1,0 a 3,5 mg/dL; obtida de soro icterico). Os ensaios foram realizados nas 2 primeiras horas após a adição do ácido ascórbico utilizando-se as várias marcas de tiras reagentes. As tiras reativas Medi-Test e Rapignost não possuem reação para detecção de leucócitos. A tira Rapignost também não possui reação para a detecção de bilirrubina.

A determinação de glicose foi baseada na reação de Trinder, abaixo:

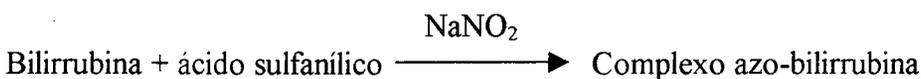




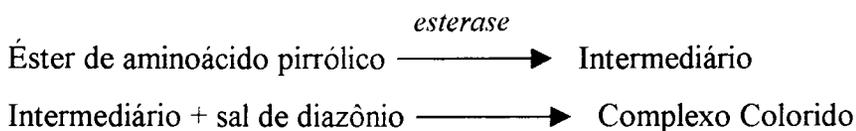
As análises químicas para a detecção de sangue na urina utilizam a atividade da pseudo-peroxidase da hemoglobina para catalisar uma reação entre o peróxido de hidrogênio e o cromogênio tetrametilbenzidina, produzindo o cromógeno oxidado de coloração azul, conforme descrito abaixo (Strasinger, 1996).



A bilirrubina reage com o diazo-reagente (ácido sulfanílico e nitrito de sódio) e forma o complexo azo-bilirrubina de coloração vermelha (Bishop e cols., 1996).



Para a detecção de leucócitos urinários as tiras reativas fazem uso de uma reação enzimática que utiliza as esterases presentes nos granulócitos para hidrolisar o éster derivado de aminoácido pirrólico e produzir um intermediário que reage com o sal de diazônio originando um complexo colorido (Strasinger, 1996).



A detecção do nitrito urinário é feita pela reação de Greiss, na qual o nitrito reage em pH ácido com uma amina aromática (ácido *p*-arsanílico ou sulfanilamida), formando um sal de diazônio que, em seguida, reage com a 3-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidrobenzil-(h)-quinolina e produz coloração rosa.

Os testes para a detecção de ácido ascórbico presentes em algumas tiras são baseados na propriedade redutora do ácido. A reação mais utilizada é a de Tillmann, na qual ocorre a descoloração do azul de indofenol pelo ácido ascórbico formando o 2,6-dicloro-fenol-indofenol de cor alaranjada.

3.3. Estabilidade do Ácido Ascórbico em Amostras de Soro

Os níveis de ácido ascórbico foram determinados pelo método da 2,4-dinitrofenilhidrazina (descrito no item 3.2.1.3) e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de fase reversa (Frei e cols., 1989), 1, 6, 12, 24, 48 e 72 h após a adição de 5 mg/dL de ácido ascórbico ao “pool” de soro.

3.3.1. Determinação do Ácido Ascórbico por CLAE (HPLC)

Ácido perclórico 0,75% (1,29 M) foi adicionado às amostras de soro. Após vigorosa homogeneização em agitador tipo “vortex” por 1 min, as amostras foram centrifugadas a 3000 x g por 5 min a 4°C. Aliquotas do sobrenadante foram diluídas com a fase móvel e filtradas em membrana com poros de 0,45 µm. Foram injetados 20 µl da amostra na coluna cromatográfica C₁₈ CG-Nucleosil (CG do Brasil). A fase móvel foi constituída de acetato de sódio trihidratado (40,0 mM), decilamina (1,5 mM) e EDTA (0,54 mM), utilizando-se água de alta pureza (Milli-Q plus, Millipore, França). O pH foi ajustado em 5 utilizando-se ácido acético glacial. O fluxo foi de 1,0 mL/min com detecção eletroquímica. O potencial eletroquímico utilizado foi de +600 mV. A quantificação foi realizada através da utilização de uma curva-padrão de ácido ascórbico recém preparado (Frei e cols., 1989).

3.4. Verificação do Mecanismo de Interferência do Ácido Ascórbico

3.4.1. Reagentes e Instrumentos

O *pool* de soro foi preparado de amostras não ictericas e não hemolisadas do laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário/UFSC. Foram utilizados os “kits” de ensaios laboratoriais baseados no sistema de reação de oxidase/peroxidase das marcas Bioclin, Biodiagnóstica, Bio-Systems, Celm e Labtest. Os ensaios para a determinação de ácido úrico, colesterol total, glicose e triglicérides, na ausência ou na presença de diferentes concentrações de ácido ascórbico, foram realizados de acordo com as instruções dos fabricantes e utilizou-se o espectrofotômetro Hewlett-Packard 8452A Diode Array (Estados Unidos) para o monitoramento das leituras de absorbância (cinética), a 37°C, por 10 a 15 min.

3.4.2. Oxidação do ácido ascórbico pelo H₂O₂/peroxidase

A velocidade de oxidação do ácido ascórbico pelo peróxido de hidrogênio na presença de diferentes quantidades de peroxidase foi determinada em tampão HEPES ou tampão fosfato 100 mmol/L, pH 7,0. Ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio, ambos a 120 µM e recém preparados, foram incubados em 1 mL de tampão na presença de 500, 1000 e 5000 U/L de peroxidase e a cinética da reação foi monitorada em 268 nm, a 37°C.

3.4.3. Interferência com o peróxido de hidrogênio

Peróxido de hidrogênio, na ausência e na presença de diferentes concentrações de ácido ascórbico, foi adicionado aos reagentes de ácido úrico, colesterol total, triglicerídeos e glicose e a cinética da reação foi monitorada em 505 nm, a 37°C. Todos os reagentes contêm 4-AF e DHBS, fenol, clorofenol ou fenol, respectivamente. Para verificar a cinética da reação envolvendo a primeira fase da reação de Trinder, alguns ensaios foram realizados adicionando-se soro humano aos reagentes, conforme indicação dos fabricantes. Foram determinados, ainda, os espectros de absorvância dessas reações.

3.4.4. Efeito dos constituintes da reação ou competição com o substrato para a peroxidase

Foram preparados os sistemas de reação em tampão fosfato 100 mM, pH 7,0 com diferentes concentrações dos constituintes: Fenol 2,0 a 100 mM; DHBS 1,0 a 25 mM; 4-AF 0,1 a 5,0 mM, peroxidase 500 a 10.000 U/L e peróxido de hidrogênio 6 a 24 µM ou 60 a 240 µM, na presença e na ausência de ácido ascórbico (controle). As leituras de absorvância foram realizadas em 505 nm e o percentual de interferência foi calculado em relação aos controles.

3.4.5. Redução do composto colorido formado

Os reagentes para ácido úrico, colesterol total, glicose e triglicérides foram incubados por 10 min a 37°C na presença de peróxido de hidrogênio ou soro humano. Após a formação do cromógeno, diferentes concentrações de ácido ascórbico foram adicionadas e a cinética de redução do cromógeno foi verificada nos 10 min seguintes, em 505 nm.

3.5. Análise Estatística

Foram utilizados o teste *t* pareado de Student, a Análise de Variância (ANOVA) com o teste complementar de Tukey e a Correlação de Pearson. Foram considerados níveis de significância correspondentes a $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Interferência do Ácido Ascórbico na Determinação de Parâmetros Bioquímicos Séricos

Para verificar o efeito interferente do ácido ascórbico nos ensaios laboratoriais foram realizadas coletas de sangue 4, 12, 24 e 48 h após o uso prolongado de diferentes doses de vitamina C. A determinação dos parâmetros bioquímicos após esses diferentes tempos teve como finalidade observar o grau de interferência do ácido ascórbico em momentos distintos do seu metabolismo no organismo, ou seja, momentos que apresentam diferentes níveis plasmáticos de ácido ascórbico, considerando um *pool* corpóreo máximo.

A Figura 3A mostra os níveis de ácido ascórbico encontrados no soro de indivíduos saudáveis, antes e após a ingestão das diferentes doses de vitamina C. A concentração de ácido ascórbico aumentou significativamente 4 h após a ingestão de apenas 250 mg de vitamina C em relação aos valores basais (2,21 vs 1,13 mg/dL, respectivamente, $p < 0,05$). Com a ingestão de doses maiores de vitamina C ocorreu um aumento crescente nos níveis de ácido ascórbico sérico ($r = 0,91$; $p < 0,01$; Fig. 3B), atingindo um máximo de $3,28 \pm 0,5$ mg/dL ($0,21 \pm 0,03$ mmol/L) com a dose de 4 g. A quantidade de ácido ascórbico presente no soro obtido 12 h após a ingestão de 1, 2 e 4 g de vitamina C foi significativamente maior do que os níveis basais ($p < 0,05$), correlacionando-se ainda, com a dose ingerida ($r = 0,98$; $p < 0,001$). As amostras obtidas 24 h após a ingestão de 4 g de vitamina C ainda apresentaram níveis de ácido ascórbico 60 % maiores do que os basais ($p < 0,05$; Fig. 3A).

Foram analisados ensaios laboratoriais que envolvem reações de óxido-redução, como os parâmetros bioquímicos ácido úrico, bilirrubina total, colesterol total total, creatinina, glicose e triglicerídeos. Sofreram interferência apenas os parâmetros bilirrubina, determinada pelo método de diazotização e ácido úrico, determinado pela reação de oxidase-peroxidase (Trinder).

A Tabela 1 mostra os resultados dos analitos em amostras de sangue coletadas 4 h após a ingestão de diferentes doses de vitamina C. Durante todo o período experimental, os indivíduos mantiveram suas dietas normais, mas evitaram a ingestão de alimentos ricos em vitamina C quando a dose suplementar de vitamina C foi menor que 1 g/d. Antes da ingestão

da vitamina C, foram realizadas 3 determinações de cada parâmetro, com intervalos de uma semana. Esses valores foram utilizados como controles (níveis basais) e a média deles foi considerada 100% para efetuar o cálculo do percentual de interferência do ácido ascórbico. A variação biológica intra-individual encontrada para o ácido úrico foi de 5,1-6,5% e para a bilirrubina foi de 5,0-18,4%.

Pode-se observar nas Tabelas 1 a 4 que os níveis séricos de ácido úrico sofreram interferência crescente à medida que os indivíduos consumiram doses maiores de vitamina C. O percentual de interferência nas determinações de ácido úrico, e também para os demais parâmetros bioquímicos, diminuiu com o decorrer do tempo após a última dose ingerida. A análise de regressão mostrou uma relação positiva entre os níveis séricos de ácido ascórbico e a percentagem de interferência negativa na reação de ácido úrico 4 h após a ingestão de vitamina C ($r=0,75$; $p=0,05$). Com a ingestão da menor dose de vitamina C (0,25 g/d) houve uma diminuição de aproximadamente 18% nos valores de ácido úrico sérico ($p<0,01$). A interferência aumentou para 29, 44, 58 e 62% com a ingestão de 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 g/d de vitamina C, respectivamente. É interessante notar que a determinação de ácido úrico pelo método UV, o qual não forma peróxido de hidrogênio, não sofreu interferência significativa pela ingestão crônica de 4 g/d de vitamina C (Tabelas 1 e 2). Para o analito bilirrubina total (Tabelas 1 a 4), observou-se uma diminuição significativa de 34, 27, 28 e 27% ($p<0,01$ e $p<0,05$) 4 h após a ingestão de 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 g/d de vitamina C, respectivamente. Apesar de ocorrer interferência, não houve correlação com as doses de vitamina C ingeridas ($r=0,56$; $p=0,25$).

A Tabela 2 mostra os resultados dos parâmetros bioquímicos séricos obtidos de amostras coletadas 12 h após a ingestão de vitamina C. Ainda ocorreram interferências significativas nas determinações de ácido úrico, porém em menor grau se comparadas com as amostras de 4 h. Níveis significativos de inibição na determinação de ácido úrico foram observados somente após a ingestão de doses $\geq 1,0$ g/d de vitamina C (20-30%, $p<0,001$; Tabelas 2 e 4). Em relação aos valores de bilirrubina, o nível de interferência foi semelhante ao de 4 h, 20 a 28% ($p<0,001$ e $p<0,05$; Tabelas 2 e 4). Os níveis de triglicérides diminuíram cerca de 34% ($p<0,05$) 12 h após a ingestão de 4 g/d de vitamina C (Tabelas 2 e 4).

Os resultados obtidos 24 h após a suplementação vitamínica estão mostrados na Tabela 3. O grau de interferência diminuiu sensivelmente em relação às amostras coletadas 4 e 12 h após a ingestão, no entanto, ainda foi possível observar uma inibição de 28% ($p < 0,01$) na reação de ácido úrico com as amostras coletadas após a ingestão de 4 g/d de vitamina C (Tabela 4).

Os demais analitos bioquímicos estudados, creatinina, glicose e colesterol total, não sofreram interferências significativas pelo ácido ascórbico.

Níveis de significância semelhantes àqueles encontrados com o teste *t* de Student foram obtidos pela análise de variância (ANOVA) e teste complementar de Tukey, utilizando-se os 3 valores basais como controles.

4.2. Interferência do Ácido Ascórbico nas Reações para a Detecção de Glicose e Hemoglobina Urinárias

Devido ao baixo limiar renal do ácido ascórbico, o mesmo é facilmente eliminado pela urina. Para verificar o efeito interferente da vitamina C nos parâmetros bioquímicos urinários glicose e hemoglobina detectáveis pelas tiras reativas, amostras de urina foram coletadas 4, 12, 24 e 48 h após a ingestão de diferentes doses de vitamina C.

Quantidades crescentes de solução de glicose e de hemoglobina (preparadas na hora do uso) foram adicionadas às amostras de urina. Como controles foram utilizadas urinas de indivíduos antes do consumo da vitamina C, ou que não estavam consumindo suplemento vitamínico. Ensaio preliminares realizados com estas amostras demonstraram resultados negativos para glicose, hemoglobina e ácido ascórbico pela tira reativa. As concentrações de glicose e hemoglobina adicionadas às amostras controles resultaram na detecção desses componentes em nível de traços (Tr), 1+, 2+, 3+ e 4+ pela tira reativa Rapignost Total Screen e Multistix 10SG. Quantidades semelhantes de glicose e hemoglobina foram adicionadas às

amostras de urina obtidas após a ingestão de vitamina C e os resultados expressos nas tabelas 5 a 12 são representativos da média de 6-13 indivíduos.

A Figura 4A mostra os níveis de ácido ascórbico urinário encontrados em amostras coletadas 4, 12, 24 e 48 h após a ingestão de vitamina C. Houve uma correlação positiva entre a dose ingerida e a concentração de ácido ascórbico nas amostras de urina de 4 e 12 h ($r = 0,72$ e $0,85$, respectivamente, $p = 0,01$; Fig. 4B). Os níveis de ácido ascórbico encontrados na urina de indivíduos não suplementados ou nas amostras coletadas antes da suplementação com vitamina C foram de aproximadamente 5 e 10 mg/dL (0,28 e 0,57 mmol/L), após jejum de 12 e 4 h, respectivamente. Esses valores aumentaram significativamente (aproximadamente 3,6 vezes) 4 h após a suplementação com apenas 150 mg de vitamina C ($p < 0,01$; Fig. 4A). Os valores diminuíram nas amostras de 12 h, mas ainda assim, permaneceram elevados em relação aos níveis basais ($p < 0,01$). Houve um aumento crescente nos níveis de ácido ascórbico urinário após a ingestão de doses maiores de vitamina C, atingindo um máximo de $58,4 \pm 19$ mg/dL ($3,3 \pm 1,1$ mmol/L) com a dose de 4 g de vitamina C nas amostras de 4 h ($p < 0,01$). Com o consumo de 0,5 a 4,0 g de vitamina C foram encontrados valores significativamente elevados de ácido ascórbico inclusive 24 h após a ingestão ($p < 0,05$ e $p < 0,01$). No entanto, todos os valores de ácido ascórbico urinário diminuíram aos níveis basais 48 h após a ingestão, inclusive com a maior dose de vitamina C analisada (Fig. 4A).

4.2.1. Interferência nas reações de glicose

A ação interferente do ácido ascórbico na determinação de glicose urinária está evidenciada nas tabelas 5, 6 e 7, respectivamente, 4, 12 e 24 h após a ingestão das várias doses de vitamina C. As urinas controles, coletadas após jejum de 12 h, apresentaram ausência de ácido ascórbico pela tira reagente Rapignost T-S e $5,3 \pm 3$ mg/dL ($0,33 \pm 0,17$ mmol/L) pelo método espectrofotométrico. As quantidades de glicose adicionadas nessas amostras foram detectadas em nível de traço, 1+, 2+, 3+ e 4+. Quando as determinações de glicose foram realizadas com as amostras obtidas 4 h após a ingestão de 150 mg de vitamina C observou-se uma inibição nas reações correspondentes a traço e 1+ (Tabela 5). Com a ingestão de doses maiores de vitamina C, e a conseqüente elevação nos níveis de ácido ascórbico urinário, o grau de interferência aumentou, chegando a um máximo de completa inibição da reação

correspondente a 4+ de glicose pela tira Rapignost T-S, após a ingestão de 2 ou 4 g de vitamina C. Com a tira reagente Multistix 10SG a detecção foi completamente abolida somente quando baixas concentrações de glicose estavam presentes (traço e 1+) e uma reação correspondente a 3+ foi detectada como 1+ em até 50% das amostras após a ingestão de 2 g de vitamina C (separação por barra representa dois diferentes resultados como maioria).

A Tabela 6 mostra os resultados obtidos com as amostras de 12 h. A inibição das reações para a detecção de glicose foi inferior àquela observada nas amostras obtidas após 4 h, em decorrência dos menores níveis de ácido ascórbico urinário. No entanto, ainda ocorreram interferências importantes. Reações correspondentes a traço e 1+ de glicose foram completamente inibidas, mesmo com as menores doses de vitamina C ingeridas (150 e 250 mg). Interferência máxima foi observada com as amostras obtidas após a ingestão de 4 g de vitamina C, onde uma quantidade de glicose correspondente a 2+ não foi detectada e concentrações equivalentes a 3 e 4+ resultaram em traços pela tira Rapignost e 2 e 3+ pela tira Multistix. As amostras de urina obtidas 24 h após a ingestão de 0,5-4,0 g/d de vitamina C ainda apresentaram níveis de ácido ascórbico suficientemente elevados para inibir parcialmente as reações com baixa concentração de glicose (Tabela 7).

4.2.2. Interferência nas reações de hemoglobina

Os resultados referentes à detecção de hemoglobina nas amostras contendo diferentes níveis de ácido ascórbico urinário estão expostos nas tabelas 8, 9 e 10. As concentrações de hemoglobina adicionadas às amostras controles foram equivalentes a traço, 1+, 2+ e 3+ (0,06 mg/dL de hemoglobina (traço) corresponde a aproximadamente 20 eritrócitos/ μ L de urina). Na presença de 19 mg/dL de ácido ascórbico urinário (amostra obtida 4 h após a ingestão de 150 mg de vitamina C), as tiras reagentes Rapignost T-S e Multistix 10SG mostraram uma sensível diminuição na detecção de hemoglobina (0,06, 0,09 e 0,12 mg/dL) correspondente a traço, 1+ e 2+, respectivamente (Tabela 8). A interferência do ácido ascórbico ficou mais evidente com a ingestão de doses maiores de vitamina C. Nas doses de 2 e 4 g, a tira Rapignost T-S sofreu inibição da capacidade de resposta à hemoglobina urinária, apresentando apenas reação em nível de traço para a concentração de 6,0 mg/dL de hemoglobina (3+ na amostra controle). A tira reagente Multistix foi ligeiramente mais resistente ao efeito inibitório

do ácido ascórbico. Com as doses de 2 e 4 g de vitamina C ocorreu completa inibição da reação com 0,12 mg/dL de hemoglobina (2+ no controle) e apresentou resultado de 1+ para 2,0 mg/dL (3+).

A Tabela 9 mostra os resultados da interferência do ácido ascórbico nas amostras de urina coletadas 12 h após a ingestão de vitamina C. O grau de inibição nas reações foi semelhante ao observado para as amostras de 4 h, com exceção das urinas contendo concentrações elevadas de hemoglobina (2+ e 3+), onde se observou uma menor interferência do ácido ascórbico. Com as urinas coletadas 24 h após a ingestão de vitamina C ocorreu inibição significativa somente nas amostras contendo baixos níveis de hemoglobina (traço e 1+), principalmente com a tira Rapignost T-S (Tabela 10). Essa interferência persistiu inclusive nas amostras coletadas 48 h após a ingestão de doses iguais ou maiores que 1,0 g de vitamina C (Tabela 11).

O ácido ascórbico em solução aquosa possui meia-vida de aproximadamente 2-3 horas (White-Stevens, 1982). Para verificar se ocorreria diminuição no grau de interferência após a auto-oxidação do ácido ascórbico, os ensaios foram repetidos com as amostras de 12 h após a permanência das mesmas a 4°C por 6 h. A Tabela 12 mostra que os resultados foram praticamente idênticos aos anteriormente obtidos pela determinação efetuada 1-2 h após a coleta das amostras, com exceção das amostras coletadas após a ingestão de 500 mg de vitamina C com glicose ≥ 500 mg/dL (Tabela 12 *versus* tabela 6).

4.3. Efeito Interferente do Ácido Ascórbico *in vitro*

4.3.1. Determinações Séricas

Os experimentos *in vitro* foram realizados com o objetivo de comparar o grau de interferência entre diferentes "kits" e verificar o tempo necessário para a oxidação do ácido ascórbico e a conseqüente diminuição da interferência. As concentrações de ácido ascórbico adicionadas ao soro foram semelhantes às aquelas encontradas no soro de voluntários saudáveis após a suplementação oral com vitamina C. No entanto, níveis séricos superiores aos valores observados podem ser encontrados após terapias com mega-doses de vitamina C injetável.

Assim, foram também adicionadas ao soro as concentrações de 10 e 40 mg/dL de ácido ascórbico. Foram analisados vários ensaios bioquímicos que envolvem reações de óxido-redução como ácido úrico, colesterol total, glicose, triglicerídeos (oxidase/peroxidase – Trinder), bilirrubina (diazotação) e creatinina (Jaffé modificado/Lustosa-Basques) de várias marcas comerciais comumente utilizadas na rotina laboratorial.

A reação para a creatinina não sofreu interferência, inclusive com a maior concentração de ácido ascórbico estudada (resultados não mostrados). Os resultados das determinações bioquímicas séricas pelo método de Trinder e da bilirrubina realizadas em *pool* de soro antes e após a adição das várias concentrações de ácido ascórbico estão demonstrados nas Tabelas 13 e 14 e Figura 5 e estão expressos como média \pm desvio padrão de 2-3 determinações realizadas em diferentes *pools* de soro.

Os resultados mostraram que o ácido ascórbico provocou inibição das reações de oxidase/peroxidase de todos os analitos. O grau de inibição foi diretamente proporcional à concentração de ácido ascórbico adicionadas às amostras. Assim, baseado nas determinações realizadas nas duas primeiras horas após a adição do ácido ascórbico, observou-se que, de forma geral, os "kits" utilizados para a quantificação do ácido úrico foram os que mais sofreram interferência pelo ácido ascórbico, seguido pelos ensaios para triglicerídeos, colesterol total, glicose e bilirrubina, embora interferências significativas para estes últimos tenham ocorrido apenas com grandes concentrações de ácido ascórbico (Fig. 5; Tabelas 13 e 14).

Com concentrações de ácido ascórbico normalmente encontradas no plasma após uma suplementação de vitamina C de até 4 g/d a determinação de ácido úrico sofreu maior inibição do que os demais analitos (Tabelas 13 e 14; Fig. 5). Por exemplo, com concentração de 5 mg/dL de ácido ascórbico na amostra, o ácido úrico sofreu 84% de interferência (média dos kits/reagentes) contra 34, 12 e 11% de interferência nas determinações de triglicerídeos, colesterol total e glicose, respectivamente (Fig. 5). Para a determinação de bilirrubina ocorreu, em média, 57% de interferência somente quando 40 mg/dL de ácido ascórbico foi adicionado (Tabela 14).

Muitos fabricantes de reagentes preconizam em seus manuais de instrução que havendo suspeita da presença de ácido ascórbico os ensaios laboratoriais devem ser repetidos 1,5-3,0 h após repouso da amostra, para evitar o efeito interferente do ácido. Hipotetizamos que esse tempo é dependente da quantidade de ácido ascórbico presente na amostra. Assim, realizamos determinações em diferentes períodos de tempos após a adição de várias concentrações de ácido ascórbico.

As determinações realizadas 6, 12, 24, 48 e 72 h após a adição do ácido ascórbico demonstraram que, dependendo da concentração de ácido ascórbico na amostra, ocorreram, ainda, importantes níveis de interferência (Tabelas 13 e 14). A reação para a determinação de ácido úrico foi a mais sensível ao efeito interferente do ácido ascórbico. Por exemplo, com a concentração de 5,0 mg/dL de ácido ascórbico no soro, ocorreu ainda, em média, 42% de interferência negativa nas reações de ácido úrico 48 h após a adição do ácido ascórbico (Tabela 13 e Fig. 6). Com a adição de 40 mg/dL de ácido ascórbico a interferência na determinação de ácido úrico permaneceu praticamente inalterada, e próxima de 100%, até 72 h depois. Mesmo com pequenas concentrações de ácido ascórbico adicionado (1,5 mg/dL) a interferência persistiu, na maioria das marcas, até 24 h depois (Tabela 13 e Fig. 6). Para os demais analitos a interferência permaneceu até 48 h somente quando 40 mg/dL de ácido ascórbico foi adicionado. Com concentrações de ácido ascórbico de até 5 mg/dL ocorreu interferência, em geral, durante 6 h (Tabela 14).

Baseados nesses resultados realizamos ensaios para verificar a estabilidade do ácido ascórbico nas amostras de soro. Determinamos, então, os níveis de ácido ascórbico adicionado ao soro após diferentes períodos de tempo, por CLAE e pelo método espectrofotométrico da 2,4-dinitro-fenil-hidrazina (DNPH), o qual detecta os ácidos ascórbico, dehidroascórbico e dicitogulônico. As amostras de soro permaneceram a 4-8°C e protegidas da luz durante o período analisado. A Figura 7 mostra a quantidade residual de ácido ascórbico após sua auto-oxidação em amostras de soro contendo inicialmente de 0,5 a 40,0 mg/dL de ácido ascórbico (média \pm desvio padrão das diferentes concentrações de ácido ascórbico adicionado). A meia-vida do ácido ascórbico nas amostras de soro foi de aproximadamente 15 h, por CLAE,

enquanto que a determinação do ácido ascórbico e seus produtos de oxidação pela 2,4-DNPH demonstrou uma meia-vida maior, aproximadamente 48 h (Fig. 7). A indicação da presença de produtos de oxidação do ácido ascórbico ainda presentes nas amostras de soro levou-nos a investigar o efeito do ácido dehidroascórbico nas reações de Trinder. Concentrações crescentes de ácido dehidroascórbico, semelhantes àsquelas de ácido ascórbico, foram adicionadas ao soro e as determinações dos vários analitos bioquímicos foram realizadas. Os resultados demonstraram que o ácido dehidroascórbico não interfere nas reações de Trinder (não mostrados).

Comparando-se os resultados dos diferentes "kits" para as determinações dos parâmetros bioquímicos, provenientes de vários laboratórios fabricantes, podemos verificar que os mesmos apresentaram pequenas diferenças na sensibilidade ao efeito interferente do ácido ascórbico (Fig. 8). A Figura 8A mostra o efeito interferente do ácido ascórbico na determinação de ácido úrico para todas as marcas analisadas. Observa-se que somente a marca CELM foi ligeiramente mais resistente ao efeito interferente do ácido ascórbico em relação à marca Bioclin, apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) somente com a adição de 1 e 2 mg/dL de ácido ascórbico. Em relação ao efeito interferente do ácido ascórbico na reação para a glicose com a adição de 25 mg/dL de ácido ascórbico, apesar da marca LabTest ter sofrido 15,8% de interferência e a marca Bioclin 39,9%, estas diferenças não foram estatisticamente significativas (Fig. 8C; $p = 0,06$). Para os demais analitos não houve diferença significativa entre as marcas estudadas (Figs. 8B e 8D).

Para a determinação da bilirrubina total também não houve diferença entre as marcas de reagentes, com exceção da BioSystems que mostrou ser completamente resistente ao efeito interferente do ácido ascórbico, inclusive com a maior dose de ácido ascórbico estudada (resultados não mostrados). A determinação da bilirrubina total *in vitro* sofreu interferência importante apenas quando 40 mg/dL de ácido ascórbico foi adicionado ao soro (Tabela 14). Esta concentração é fisiologicamente alcançada no plasma somente quando mega-doses de vitamina C são administradas via endovenosa. Porém, comparando-se estes resultados de interferência com aqueles obtidos nos experimentos *in vivo* (Tabela 4), verificamos que a interferência *in vivo* foi maior que aquela *in vitro* (Fig. 9A). Por exemplo, para uma relação

molar ácido ascórbico:bilirrubina de 3,4 a interferência na determinação de bilirrubina *in vitro* foi de aproximadamente 10% enquanto que *in vivo* foi em torno de 35%.

Considerando a possibilidade de interferência do ácido ascórbico no metabolismo do ácido úrico, análise semelhante foi realizada com os resultados dos níveis de interferência *in vivo* e *in vitro* para o ácido úrico. A Figura 9B mostra que o grau de interferência do ácido ascórbico foi semelhante nas duas situações.

4.3.2. Determinações Urinárias

Com o objetivo de comparar o grau de interferência do ácido ascórbico em diferentes tiras reativas, delineamos um protocolo para verificar o efeito interferente do ácido ascórbico na determinação de diferentes parâmetros urinários, baseando-se nas concentrações de ácido ascórbico encontradas anteriormente na urina após a ingestão de diferentes doses de vitamina C.

Quantidades crescentes de glicose, hemoglobina, nitrito de sódio, bilirrubina (obtida de soro icterico) e leucócitos (isolados por centrifugação de urinas de pacientes com infecções urinárias) foram adicionadas às amostras de urina que não continham níveis detectáveis de ácido ascórbico (controles). As reações observadas com as diferentes tiras reativas frente a essas concentrações foram detectadas em nível de traços (Tr), positivos 1, 2 e 3 cruces (1, 2, e 3+), conforme as escalas de cores fornecidas pelos fabricantes. Após a adição de 20, 40, 60 e 80 mg/dL de ácido ascórbico, observaram-se diferentes graus de inibição nas reações para a detecção daqueles analitos com as várias tiras reagentes para urinálise, os quais foram diretamente proporcionais à concentração de ácido ascórbico e inversamente proporcionais à concentração dos analitos. Em geral, as reações dos analitos de todas as marcas de tiras reagentes analisadas foram inibidas pela presença de altas concentrações de ácido ascórbico.

Comparando-se as diferentes marcas de tiras reativas para a determinação de glicose urinária (Tabela 15), as tiras reativas Combur e Rapignost mostraram-se mais resistentes ao efeito inibitório do ácido ascórbico. No entanto, com as demais tiras, reações positivas para glicose em nível de traços e 1+ (correspondente a 50-150 mg/dL de glicose) foram

completamente inibidas por 40 mg/dL de ácido ascórbico. Esta concentração de ácido ascórbico urinário é obtida 12 h após a ingestão de aproximadamente 1,5 g de vitamina C (Fig. 4A). Concentrações de 80 mg/dL inibiram sensivelmente as reações para detecção de 500 mg/dL de glicose (Tabela 15) com as tiras Multistix e Rapignost. Esta reação resultou em 3+ nas urinas controles e 1+ nas urinas com ácido ascórbico.

A Tabela 16 mostra os resultados da interferência pelo ácido ascórbico em reações de hemoglobina urinária. A detecção da hemoglobina urinária, baseada na reação de pseudo-peroxidase da hemoglobina, sofreu mais interferência pelo ácido ascórbico do que a glicose. A tira reagente Medi-Test foi mais sensível ao efeito inibitório do ácido ascórbico. Com concentrações ≥ 40 mg/dL de ácido ascórbico todas as tiras mostraram alteração nos resultados de hemoglobina, quando baixas concentrações do analito (0,12 e 0,6 mg/dL) estavam presentes. A concentração de ácido ascórbico de 80 mg/dL foi suficiente para inibir a sensibilidade de detecção de 0,12 mg/dL de hemoglobina de todas as tiras. Esta concentração inibiu completamente a detecção de 0,60 mg/dL de hemoglobina e parcialmente a detecção de 4,0 mg/dL pelas tiras reativas Rapignost e Medi-Test, respectivamente.

O ácido ascórbico também inibiu a reação para a detecção de nitrito urinário. As tiras Multistix e Combur mostraram-se mais resistentes à interferência do que as tiras Medi-Test e Rapignost (Tabela 17). Enquanto 40 e 60 mg/dL de ácido ascórbico tornaram negativa uma reação de traço e 1+ com as tiras Medi-Test e Rapignost, somente uma inibição parcial foi observada para as demais tiras, inclusive com a maior concentração de ácido ascórbico estudada (80 mg/dL). A presença de 60 e 80 mg/dL de ácido ascórbico diminuiu a leitura de 1+ (correspondente a 0,2 mg/dL de nitrito) para traço e traço/1+, com as tiras Combur e Multistix, respectivamente. Para as marcas Medi-Test e Rapignost houve inibição da leitura de traço/1+ para negativo.

Para a detecção de leucócitos urinários (Tabela 18) foram utilizadas as tiras Combur e Multistix. As tiras reagentes Rapignost e Medi-Test não apresentam local para reação e detecção de leucocitúria. Ambas as marcas apresentaram o mesmo grau de inibição pelo ácido ascórbico. Uma pequena interferência foi observada apenas com baixas concentrações de

leucócitos (traço/1+) na presença de altas concentrações de ácido ascórbico (60 e 80 mg/dL). Concentrações iguais ou superiores a 730.000 leucócitos/mL foram praticamente resistentes ao ácido ascórbico, inclusive com a maior concentração de ácido ascórbico adicionada.

A Tabela 19 mostra os resultados de interferência na detecção de bilirrubina urinária. As três tiras reativas estudadas mostraram praticamente a mesma sensibilidade ao efeito interferente do ácido ascórbico. Concentrações de ácido ascórbico de 20 e 40 mg/dL tornaram negativa ou diminuíram para o nível de traço reações originalmente de traço e 1+, respectivamente. Na presença de concentrações de ácido ascórbico ainda maiores (60 e 80 mg/dL) a detecção de bilirrubina correspondente a 2 e 3+ foi totalmente inibida ou reduzida para traço.

4.4. Mecanismo de interferência do ácido ascórbico na reação de Trinder

4.4.1. Consumo de peróxido de hidrogênio

A velocidade de oxidação do ácido ascórbico pelo peróxido de hidrogênio, catalisada pela peroxidase, foi verificada em tampão fosfato, pH 7, a 37°C, monitorando-se a reação em 268 nm, absorção máxima do ácido ascórbico. A Figura 10 mostra que, numa relação equimolar de ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio (120 µM) e na presença de 1000 U/L de peroxidase (concentração normalmente usada nos "kits" comerciais), o ácido ascórbico foi totalmente oxidado em aproximadamente 100 seg. Considerando uma estequiometria de 1:1 entre ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio, este seria também o tempo necessário para o consumo do peróxido de hidrogênio. O tempo de oxidação do ácido ascórbico foi dependente da concentração de peroxidase no sistema de reação (Fig. 10).

Para verificar a velocidade de reação dos compostos fenólicos e da 4-AF com o peróxido de hidrogênio/peroxidase, formando o cromógeno oxidado com absorvância máxima em 505 nm, bem como o efeito do ácido ascórbico nesta reação, 12 ou 120 µM de peróxido de hidrogênio foi adicionado aos reagentes de ácido úrico, colesterol total, glicose e triglicérides, os quais utilizam DHBS, fenol ou clorofenol como compostos fenólicos, na ausência e na presença de ácido ascórbico. Os resultados mostraram que, na ausência de ácido ascórbico, o

cromógeno oxidado foi totalmente formado em aproximadamente 25-50 seg, independente do tipo de composto fenólico presente no sistema de reação (Fig. 11). Quando 16 ou 160 μM de ácido ascórbico (relação ácido ascórbico: peróxido de hidrogênio = 0,75) foi adicionado previamente ao sistema, ocorreu uma inibição da quantidade de cromógeno formado, inclusive com grau semelhante de inibição para os diferentes compostos fenólicos, sem alterar a velocidade de formação dos cromógenos (Fig. 11). Isto sugere que o ácido ascórbico apresentou uma afinidade maior pelo peróxido de hidrogênio/peroxidase do que os demais componentes da reação (compostos fenólicos e 4-AF), consumindo o peróxido de hidrogênio necessário para a formação do cromógeno oxidado. Estes resultados demonstraram ainda, que neste sistema de reação, o ácido ascórbico pode ser oxidado mais rapidamente (reduzindo o peróxido) que naquele sistema mostrado anteriormente na Figura 10. Por exemplo, enquanto a oxidação do ácido ascórbico ocorreu dentro de 100 seg em tampão fosfato e peróxido de hidrogênio/peroxidase (Fig. 10), junto com todos os componentes da reação de Trinder a oxidação do ácido ascórbico foi de 25-50 seg (Fig. 11). No entanto, o monitoramento da oxidação do ácido ascórbico no sistema de reação completo não foi possível de ser realizado devido à considerável sobreposição dos espectros de absorbância em 268 nm, conforme mostra a Figura 12.

Em seguida, foram analisadas as cinéticas das reações envolvendo, também, a primeira fase da reação de Trinder, ou seja, a geração do peróxido de hidrogênio a partir das oxidases específicas sobre os substratos. As Figuras 13 a 16 mostram as cinéticas das reações após a adição de soro humano aos reagentes de ácido úrico, colesterol total, glicose e triglicerídeos, na ausência e na presença de diferentes concentrações de ácido ascórbico. Pode-se observar que o perfil da cinética de reação para o ácido úrico foi semelhante ao sistema com apenas a adição de peróxido de hidrogênio em lugar do soro, mostrada na Figura 11. Ou seja, o ácido ascórbico provocou inibição da formação do cromógeno, proporcionalmente à sua concentração, sem alterar a velocidade da reação de formação do cromógeno (Fig. 13A e B). No entanto, as cinéticas de reação para a glicose, colesterol total e triglicerídeos foram sensivelmente diferentes (Figs. 14, 15 e 16). Inicialmente, na ausência do ácido ascórbico, o tempo para a formação máxima do cromógeno oxidado foi de 300-600 seg, maior portanto, que para o ácido úrico (100-200 seg). Em segundo lugar, na presença de ácido ascórbico

ocorreu uma fase “lag” antes da formação do cromógeno e uma diminuição na quantidade total do mesmo. A extensão da fase “lag” e a inibição do cromógeno formado foram proporcionais à concentração de ácido ascórbico no sistema. É interessante notar que para a reação da glicose o aumento da fase “lag” esteve diretamente associado à velocidade inicial da formação do cromógeno nas reações controles (Fig. 14A, B e C). Por exemplo, quando a formação do cromógeno na reação controle (ausência de ácido ascórbico) não foi totalmente completa dentro de 600 seg, o tempo da fase “lag” existente na presença de ácido ascórbico foi de aproximadamente 80, 220 e 380 seg nas relações molares ácido ascórbico:glicose 0,25, 0,50 e 0,75, respectivamente (Fig. 14A). Por outro lado, quando o cromógeno foi totalmente formado em aproximadamente 300 seg, verificado pela constância da absorbância (Fig. 14C), os tempos de fase “lag” provocados pela adição de concentrações crescentes de ácido ascórbico foram apenas de 10, 55 e 100 seg, aproximadamente. O tempo para a formação do cromógeno na ausência de ácido ascórbico, por sua vez, se relacionou positivamente com a quantidade de glicose oxidase presente nos reagentes. Com 5000, 8000 e 10000 U/L de glicose oxidase nos sistemas o tempo de formação do cromógeno foi de > 600, ~ 600 e ~ 300 seg, respectivamente (Fig. 14A, B e C). Em relação à cinética de reação do colesterol total, em alguns "kits" a extensão da fase “lag” não foi tão pronunciada, ou evidente, como no caso da glicose, e também não esteve relacionada à quantidade de colesterol total oxidase (Fig. 15). A interferência na cinética de reação de triglicerídeos, demonstrada na Figura 16, também apresentou uma fase “lag” proporcional à quantidade de ácido ascórbico. Em geral, a fase “lag” para a formação do cromógeno também esteve relacionada à quantidade de amostra no sistema. Quanto maior o volume de soro adicionado aos sistemas de reações com concentrações fixas de ácido ascórbico, menor a extensão da fase “lag” (Fig. 17).

4.4.2. Efeito da variação da quantidade dos componentes da reação

O ácido úrico, determinado pela reação de Trinder com 3,5-dicloro-2-hidroxibenzenosulfonato (DHBS), sofreu maior interferência pelo ácido ascórbico do que o colesterol total, a glicose e os triglicerídeos, que são determinados utilizando-se fenol ou clorofenol como compostos fenólicos (Fig. 5). Na tentativa de demonstrar se estes compostos fenólicos apresentam algum efeito no grau de interferência, foram montados sistemas de reação em tampão fosfato pH 7, variando-se as concentrações destes constituintes. Foi

utilizado diretamente peróxido de hidrogênio, em lugar de soro, na ausência (controles) e na presença de ácido ascórbico. Os resultados expressos na Tabela 20 demonstram que as diferentes concentrações dos compostos fenólicos não influenciaram no grau de interferência pelo ácido ascórbico. Numa reação que utiliza 2 mM de fenol o percentual de interferência foi semelhante a uma reação com 100 mM. Com DHBS ocorreu o mesmo, ou seja, não houve modificação no percentual de interferência aumentando-se 25 vezes a concentração de DHBS. A Tabela 20 também mostra os resultados referentes às modificações na concentração dos demais constituintes. A variação em 50 vezes na concentração da 4-aminofenazona não modificou a interferência causada pelo ácido ascórbico. Quantidades de peroxidase normalmente utilizadas nos "kits" também não modificaram o nível de interferência. No entanto, o grau de interferência foi inversamente proporcional à quantidade de peróxido de hidrogênio adicionado ao sistema de reação.

Os espectros de absorvância das reações confirmaram que o ácido ascórbico interferiu na formação do cromógeno oxidado com absorvância máxima em 490-520 nm, sem formar nenhum outro produto com os demais componentes da reação, ou seja, com os compostos fenólicos e 4-AF, conforme pode ser observado na figura 18 onde estão demonstrados os espectros de absorvância com o reagente de ácido úrico. Resultados semelhantes foram obtidos com os reagentes para colesterol total, glicose e triglicerídeos (não mostrados). Confirmação adicional foi conseguida remodelando-se os resultados da figura 5, pela normalização numa mesma base molar entre ácido ascórbico e analitos presentes nos sistemas de reação. Pode-se observar que nessas condições o grau de interferência causado pelo ácido ascórbico foi praticamente o mesmo para todos os analitos, independente do composto fenólico utilizado (Fig. 19A). A interferência do ácido ascórbico nas reações para ácido úrico, colesterol total, glicose e triglicerídeos foi consistente com uma estequiometria de 1:1. Por exemplo, uma relação molar de ácido ascórbico:analito de 0,5:1 resultou em aproximadamente 50% de interferência negativa (Fig. 19A). Além disso, a figura 19B mostra que o volume de soro (10 vs 20 μ L) não influenciou a interferência causada pelo ácido ascórbico nas reações para a determinação de ácido úrico.

4.4.3. Redução do composto colorido formado

Uma das possibilidades de interferência do ácido ascórbico na reação de Trinder é pela redução do cromógeno oxidado formado. Após a formação do cromógeno colorido pela adição de peróxido de hidrogênio, ou soro humano, aos reagentes para ácido úrico, colesterol total, glicose e triglicérides, adicionou-se ácido ascórbico em diferentes relações estequiométricas ao peróxido, ou soro, e verificou-se a cinética de redução em 505 nm. Os resultados mostraram que o ácido ascórbico reduziu os cromógenos formados, porém, numa velocidade relativamente pequena (27-49% em 15 min; Fig. 20). A redução foi proporcional à concentração de ácido ascórbico adicionado. Os percentuais de redução foram semelhantes para os sistemas de reação contendo fenol e clorofenol e ligeiramente menores com DHBS. Por exemplo, com uma relação estequiométrica ácido ascórbico:peróxido de hidrogênio de 0,75 houve redução em 27% quando o cromógeno foi formado com DHBS (Fig. 20A) e 49 e 40% quando foi formado com clorofenol e fenol, respectivamente (Fig. 20B e C).

5. TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Parâmetros bioquímicos séricos (mg/dL) determinados antes e 4 h após a ingestão de vitamina C

	Vitamina C Suplementar (g/d)					
	0	0,25	0,50	1,0	2,0	4,0
Ác. Ascórbico (mg/dL)	1,13±0,30	2,21±0,46*	2,32±0,56*	2,48±0,34**	3,07±0,52***	3,28±0,50***
Ácido Úrico (Trinder)	4,5±1,6	3,7±1,5**	3,2±1,2***	2,5±0,8**	1,9±0,9***	1,7±0,9**
Ácido Úrico UV	5,8±2,0	ND	ND	ND	ND	5,0±2,6
Bilirrubina Total	0,67±0,19	0,69±0,22	0,44±0,17**	0,49±0,11*	0,48±0,22*	0,49±0,12**
Colesterol total	153±15,1	171,8±34,1	161,7±20,6	166,2±34,5	163,4±34,8	171,9±25,5
Creatinina	1,00±0,13	1,08±0,17	1,18±0,10	0,93±0,09	1,01±0,12	1,13±0,10
Glicose	89,0±6,3	84,5±11,8	91,7±13,4	86,5±10,1	82,2±5,5	93,7±6,1
Triglicérides	91,1±34,5	99,8±39,1	85,5±6,6	101,2±37,5	67,9±36,8	71,0±27,7

Voluntários saudáveis (n = 18) ingeriram doses crescentes de vitamina C, sendo que cada dose foi consumida por uma semana, e as determinações dos analitos foram realizadas 4 h após a ingestão da última dose de vitamina C; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001, teste t pareado de Student comparado ao respectivo controle (0 Vit. C). ND = Não Determinado.

Tabela 2. Parâmetros bioquímicos séricos (mg/dL) determinados antes e 12 h após a ingestão de vitamina C

	Vitamina C Suplementar (g/d)					
	0	0,25	0,50	1,0	2,0	4,0
Ác. Ascórbico (mg/dL)	1,16±0,28	1,64±0,75	1,79±0,64	1,92±0,39*	2,14±0,35***	2,74±0,59***
Ácido Úrico (Trinder)	4,1±1,53	4,2±1,36	4,2±1,65	3,3±1,36***	3,0±1,36***	2,8±1,05***
Ácido Úrico UV	4,7±1,7	ND	ND	ND	ND	4,5±1,6
Bilirrubina Total	0,72±0,20	0,72±0,13	0,57±0,26***	0,56±0,15***	0,55±0,20*	0,52±0,18*
Colesterol total	159±18,3	166,8±33,2	166,8±24,2	169,8±22,7	160,6±33,9	157,2±21,3
Creatinina	0,94±0,13	1,10±0,15	1,05±0,19	1,10±0,15	1,03±0,10	0,86±0,17
Glicose	85,9±6,6	92,4±12,5	87,5±16,2	78,5±13,8	82,2±8,2	89,5±10,9
Triglicérides	81,9±39,1	79,2±38,0	86,4±28,6	75,8±26,4	61,9±20,3	53,8±19,7*

Voluntários saudáveis (n = 18) ingeriram doses crescentes de vitamina C, sendo que cada dose foi consumida por uma semana, e as determinações dos analitos foram realizadas 12 h após a ingestão da última dose de vitamina C; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001, teste t pareado de Student comparado ao respectivo controle (0 Vit. C). ND = Não Determinado.

Tabela 3. Parâmetros bioquímicos séricos (mg/dL) determinados antes e 24 h após a ingestão de vitamina C

	Vitamina C Suplementar (g/d)				
	0	0,50	1,0	2,0	4,0
Ác. Ascórbico (mg/dL)	1,16±0,28	1,35±0,25	1,10±0,24	1,61±0,40	1,88±0,42*
Ácido Úrico (Trinder)	3,8±1,37	3,6±1,59	3,4±1,32	3,25±1,35	2,72±1,30**
Bilirrubina	0,66±0,20	0,63±0,15	0,74±0,15	0,69±0,23	0,58±0,24

Voluntários saudáveis (n = 10) ingeriram doses crescentes de vitamina C, sendo que cada dose foi consumida por uma semana, e as determinações dos analitos foram realizadas 24 h após a ingestão da última dose de vitamina C; *p<0,05; **p<0,01, teste t pareado de Student comparado ao respectivo controle (0 Vit. C).

Tabela 4. Interferência negativa do ácido ascórbico nas determinações bioquímicas (% de inibição \pm DP)

	Vitamina C Suplementar (g/d)			
	0,25	0,50	1,0	2,0
4 horas				4,0
Ácido Úrico	17,8 \pm 7,1 ^b	28,9 \pm 10,7 ^c	44,4 \pm 14,2 ^b	57,8 \pm 27,2 ^c
Bilirrubina	0	34,3 \pm 13,2 ^b	26,9 \pm 10,3 ^a	28,3 \pm 12,6 ^a
12 horas				
Ácido Úrico	0	0	19,5 \pm 7,6 ^c	26,8 \pm 12,1 ^c
Bilirrubina	ND	20,8 \pm 9,4 ^c	22,2 \pm 5,7 ^c	23,6 \pm 8,3 ^a
Triglicérides	0	0	7,45 \pm 2,6	27,8 \pm 8,9
24 horas				
Ácido Úrico	ND	ND	9,9 \pm 3,8	13,1 \pm 5,2
Bilirrubina	ND	ND	0	0

Os valores foram obtidos pelo cálculo do percentual de interferência dos valores expressos nas tabelas 1, 2 e 3, considerando como controles a média de 3 valores basais, antes da ingestão da vitamina C. ^a p<0,05; ^b p<0,01; ^c p<0,001, comparado ao controle (Teste t Pareado de Student). ND = Não Determinado

Tabela 5. Detecção de glicose urinária na presença de várias concentrações de ácido ascórbico, 4 h após a ingestão de doses crescentes de vitamina C^a

		Vitamina C ingerida (g/d)						
		0	0,15	0,25	0,50	1,0	2,0	4,0
		Ácido ascórbico urinário (mg/dL)						
		9,8±3,0	25,0±5,4	30,5±12,2	29,9±10,4	31,4±11,2	59,0±18,1	58,4±19,1
Rapignost Total-Screen								
Glicose^b								
50	Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
150	+	Tr	(-) / Tr	(-) / Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
350	++	++	+	(-) / Tr	(-) / Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
500	++	++	+	Tr	(-) / Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
750	+++	++	++	Tr / +	Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
1000	++++	++++	+++	++	+	(-) / Tr	(-) / Tr	(-) / Tr
Multistix 10SG								
Glicose^b								
50	Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
150	Tr / +	(-) / Tr	(-) / Tr	(-) / Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
350	+	Tr / +	Tr / +	Tr	(-) / Tr	(-) / Tr	(-) / Tr	(-) / Tr
500	++	++	++	++	Tr / +	Tr / +	Tr / +	Tr / +
750	+++	+++	+++	+++	+ / +++	+ / +++	+ / +++	+ / +++
1000	++++	++++	++++	++++	+++	+ / +++	++	++

^aOs resultados são médias de valores obtidos em amostras de 10 indivíduos.

^bGlicose adicionada (concentração final em mg/dL). Tr, traço.

Tabela 6. Detecção de glicose urinária na presença de várias concentrações de ácido ascórbico, 12 h após a ingestão de doses crescentes de vitamina C^a

		Vitamina C ingerida (g/d)						
		0	0,15	0,25	0,50	1,0	2,0	4,0
		Ácido ascórbico urinário (mg/dL)						
		5,3±2,6	13,0±4,7	19,4±5,0	20,3±5,5	23,6±6,0	30,9±4,7	39,0±3,9
Rapignost Total-Screen								
Glicose^b								
50	Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
150	+	Tr	Tr	Neg (-)				
350	++	+ / ++	Tr / +	Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
500	++	++	++	+ / ++	(-) / Tr	Tr	Neg (-)	Neg (-)
750	+++	+++	++ / +++	++	Tr / +	(-) / Tr	Tr	Tr
1000	++++	++++	++++	++ / +++	+ / ++	Tr	Tr	Tr
Multistix 10SG								
Glicose^b								
50	Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
150	Tr / +	Tr	Tr	(-) / Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
350	+	+	+	Tr / +	(-) / Tr	(-) / Tr	Neg (-)	Neg (-)
500	++	++	++	+	+	Tr / +	(-) / Tr	(-) / Tr
750	+++	+++	+++	++	+ / ++	++	++	++
1000	++++	++++	++++	+++	++ / +++	+++	+++	+++

^aOs resultados são médias de valores obtidos em amostras de 13 indivíduos.

^bGlicose adicionada (concentração final em mg/dL). Tr, traço.

Tabela 7. Detecção de glicose urinária na presença de várias concentrações de ácido ascórbico, 24 h após a ingestão de doses crescentes de vitamina C^a

		Vitamina C ingerida (g/d)						
		0	0,15	0,25	0,50	1,0	2,0	4,0
		Ácido ascórbico urinário (mg/dL)						
		5,3±2,6	5,4±3,6	5,1±2,5	11,2±4,4	9,8±3,2	12,6±6,5	12,0±4,4
Rapignost Total-Screen								
Glicose^b								
50	Tr	Tr	Tr	(-)/ Tr	(-)/ Tr	(-)/ Tr	(-)/ Tr	(-)/ Tr
150	+	+	+	Tr	Tr / +	Tr / +	Tr / +	Tr / +
350	++	++	++	+	++	+	+/ ++	+/ ++
500	++	++	++	++	++	++	++	++
750	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Multistix 10SG								
Glicose^b								
50	Tr	Tr	Tr	(-)/ Tr	(-)/ Tr	(-)/ Tr	(-)/ Tr	(-)/ Tr
150	Tr / +	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr
350	+	+	+	+	+ / +++	+	Tr	Tr
500	++	++	++	++	++	++	++	++
750	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

^aOs resultados são médias de valores obtidos em amostras de 6 indivíduos.

^bGlicose adicionada (concentração final em mg/dL). Tr, traço.

Tabela 8. Detecção de hemoglobina urinária na presença de várias concentrações de ácido ascórbico, 4 h após a ingestão de doses crescentes de vitamina C^a

		Vitamina C ingerida (g/d)						
		0	0,15	0,25	0,50	1,0	2,0	4,0
		Ácido ascórbico urinário (mg/dL)						
		9,8±3,0	25,0±5,4	30,5±12,2	29,9±10,4	31,4±11,2	59,0±18,1	58,4±19,1
Rapignost Total-Screen								
Hemoglobina^b								
0,06	Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
0,12	+	(-) / Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
0,60	++	Tr / +	(-) / Tr	Neg (-)				
2,0	++	+	Tr	Tr	(-) / Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
4,0	++	+ / ++	+	Tr / +	Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
6,0	+++	++	+ / ++	+	Tr	Tr	Tr	Tr
Multistix 10SG								
Hemoglobina^b								
0,06	Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
0,09	+ / ++	Tr	Tr	(-) / Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
0,12	++	+	+	Tr / +	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
0,6	++	++	++	+ / ++	(-) / Tr	Tr / +	Tr / +	Tr / +
2,0	+++	+++	+++	++	+	+	+	+
4,0	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++

^aOs resultados são médias de valores obtidos em amostras de 10 indivíduos.

^bHemoglobina adicionada (concentração final em mg/dL). Tr, traço.

Tabela 9. Detecção de hemoglobina urinária na presença de várias concentrações de ácido ascórbico, 12 h após a ingestão de doses crescentes de vitamina C^a

		Vitamina C ingerida (g/d)						
		0	0,15	0,25	0,50	1,0	2,0	4,0
		Ácido ascórbico urinário (mg/dL)						
		5,3±2,6	13,0±4,7	19,4±5,0	20,3±5,5	23,6±6,0	30,9±4,7	39,0±3,9
Rapignost Total-Screen								
Hemoglobina^b								
0,06	Traço	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
0,12	+	(-) / Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
0,60	++	Tr	(-) / Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
2,0	++	+ / ++	+	Tr / +	(-) / Tr	Tr	Tr	Neg (-)
4,0	++	++	++	+	Tr	Tr	Tr	Tr
6,0	+++	+ / +++	+ / +++	+ / +++	+	+	+	Tr
Multistix 10SG								
Hemoglobina^b								
0,06	Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
0,09	+ / ++	Tr / +	Tr / +	Tr / +	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
0,12	++	+	+	+	Tr / +	Tr / +	Neg (-)	Neg (-)
0,6	+++ / +++	++	++	++	+	Tr / +	Tr / +	Tr / +
2,0	+++	+++	+++	+++	+++ / +++	+++ / +++	+++	+++
4,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

^aOs resultados são médias de valores obtidos em amostras de 13 indivíduos.

^bHemoglobina adicionada (concentração final em mg/dL). Tr, traço.

Tabela 10. Detecção de hemoglobina urinária na presença de várias concentrações de ácido ascórbico, 24 h após a ingestão de doses crescentes de vitamina C^a

		Vitamina C ingerida (g/d)						
		0	0,15	0,25	0,50	1,0	2,0	4,0
		Ácido ascórbico urinário (mg/dL)						
		5,3±2,6	5,4±3,6	5,1±2,5	11,2±4,4	9,8±3,2	12,6±6,5	12,0±4,4
Rapignost Total-Screen								
Hemoglobina^b								
0,06	Traço	Tr	Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
0,12	+	Tr	Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
0,60	++	+	+	Tr / +	Tr / +	Tr / +	Tr / +	Tr / +
2,0	++	++	++	+ / ++	++	++	++	++
4,0	++	++	++	++	++	++	++	++
Multistix 10SG								
Hemoglobina^b								
0,06	Tr	Tr	Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
0,09	+ / ++	Tr / +	Tr / +	Tr	Tr	Tr	(-) / Tr	(-) / Tr
0,12	++	+	+ / ++	Tr	Tr	Tr / +	Tr	Tr
0,6	+++ / ++++	++	++	++	++	++	++	++
2,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

^aOs resultados são médias de valores obtidos em amostras de 6 indivíduos.

^bHemoglobina adicionada (concentração final em mg/dL). Tr, traço.

Tabela 11. Detecção de hemoglobina urinária na presença de várias concentrações de ácido ascórbico, 48 h após a ingestão de doses crescentes de vitamina C^a

		Vitamina C ingerida (g/d)						
		0	0,15	0,25	0,50	1,0	2,0	4,0
		Ácido ascórbico urinário (mg/dL)						
		5,3±2,6	4,7±3,0	5,0±2,8	7,0±3,3	6,5±2,3	6,2±2,9	7,5±3,3
Rapignost Total-Screen								
Hemoglobina^b								
0,06	Traço	Tr	Tr	(-) / Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
0,12	+	+	+	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr
0,60	++	++	++	++	+	+	+	Tr
2,0	++	++	++	++	++	++	++	++
Multistix 10SG								
Hemoglobina^b								
0,06	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
0,09	+ / ++	+	++	+ / ++	+ / ++	Tr	(-) / Tr	(-) / Tr
0,12	++	++	++	++	++	++	++	Tr / +
0,6	++ / +++	+++	+++	+++	+++	++ / +++	++	++

^aOs resultados são médias de valores obtidos em amostras de 6 indivíduos.

^bHemoglobina adicionada (concentração final em mg/dL). Tr, traço.

Tabela 12. Detecção de glicose e hemoglobina urinárias na presença de várias concentrações de ácido ascórbico, 6 h após a permanência das amostras a 4°C^a

		Vitamina C ingerida (g/d)						
		0	0,15	0,25	0,50	1,0	2,0	4,0
<i>Glicose^b</i>								
50	Traço	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
150	+	Tr	Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
350	++	++	+	Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
500	++	++	++	++	Tr	Tr	Tr	Neg (-)
750	+++	+++	+++	+++	+	Tr	Tr	Tr
1000	++++	++++	++++	++++	++	+	+	+
<i>Hemoglobina^b</i>								
0,06	Traço	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
0,12	+	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
0,60	++	Tr	(-) / Tr	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
2,0	++	+ / +++	+	+	(-) / Tr	Tr	Tr	Neg (-)
4,0	++	++	++	++	+	+	+	Tr
6,0	+++	+++	+++	++	+	+	+	+

^aOs resultados são médias de valores obtidos em amostras de 13 indivíduos.

^bGlicose e hemoglobina adicionadas (concentração final em mg/dL). As determinações foram realizadas com a tira reagente Rapignost Total-Screen. Tr, traço.

Tabela 13. Interferência negativa do ácido ascórbico (% do controle) na determinação do ácido úrico sérico.

Tempo (h)	Ácido Ascórbico Adicionado (mg/dL)							
	0.5	1.0	1.5	2.0	3.0	5.0	10.0	40.0
<i>Bioclin</i>								
1-2	28,4±1,8	33,6±6,3	41,9±7,6	68,5±1,6	84,2±4,6	89,4±2,5	90,1±3,5	93,0±3,3
6	14,1±2,8	24,6±3,2	32,8±0,6	62,4±7,5	51,4±1,9	83,7±1,6	88,2±2,5	87,6±8,5
12	11,2±0,1	16,0±2,5	19,9±3,2	25,4±1,9	43,5±8,1	65,2±13,6	80,6±7,2	86,4±5,9
24	0	17,3±2,8	19,9±3,3	24,7±1,0	36,2±0,4	68,0±17,6	72,0±5,4	84,3±6,1
48	ND	0	0	0	0	53,±2,3	74,8±0,3	88,3±0,6
72	ND	ND	ND	ND	ND	53,2	71,0	74,2
<i>Biodiagnóstica</i>								
1-2	14,0±2,3	35,4±1,5	43,7±5,7	60,9±5,7	73,3±7,2	84,6±2,8	90,1±1,8	99,3±1,0
6	19,0±0,6	29,6±0,1	38,8±1,5	53,4±10,5	66,0±12,6	66,4±7,1	83,1±3,5	97,1±2,5
12	15,7±1,6	26,6±3,3	26,4±0,1	51,6±6,0	65,3±3,0	66,4±4,4	86,0±2,1	96,5±4,5
24	0	18,6±6,1	26,0±0,5	38,0±2,5	53,7±4,7	67,4±2,9	84,3±3,1	94,1±2,2
48	ND	0	0	0	34,9±8,8	29,5±3,7	75,5±8,1	90,0±1,0
72	ND	ND	ND	ND	0	0	41,9±6,2	88,7±6,5
<i>Bio-Systems</i>								
1-2	19,2±1,4	28,8±4,0	36,4±3,2	46,2±2,1	71,6±1,9	87,8±1,3	91,2±0,8	100±0,1
6	15,8±2,6	27,8±0,5	29,4±3,3	40,7±4,5	60,8±7,8	76,6±1,8	93,3±9,5	100±0,1
12	0	13,4±1,2	21,0±4,4	41,6±2,5	57,8±1,7	89,0±3,8	99,5±0,7	100±0,1
24	ND	0	14,8±3,0	27,6±0,9	43,3±1,8	66,9±1,4	90,4±0,3	100±0,1
48	ND	ND	0	12,3±1,4	40,0±5,4	54,2±1,3	89,3±3,0	100±0,1
72	ND	ND	ND	0	37,9±6,5	37,4±1,3	89,8±1,3	100±0,1
<i>CELM</i>								
1-2	0	15,0±1,8	27,8±0,4	35,2±1,5	44,3±2,6	73,8±7,0	84,4±4,0	96,4±5,1
6	ND	13,8±0,5	20,9±2,5	23,3±2,8	50,3±4,4	79,0±5,3	89,4±0,5	94,2±3,0
12	ND	11,1±0,6	20,0±0,3	29,5±3,3	45,5±2,7	75,3±0,3	78,6±5,5	93,5±6,2
24	ND	7,6±1,3	16,5±0,8	24,6±2,5	23,4±0,7	62,0±4,0	62,4±7,2	95,8±4,4
48	ND	0	3,2±0,5	12,4±0,8	14,3±1,8	40,2±3,3	55,4±3,9	88,7±4,8
72	ND	ND	0	3,0±0,3	5,5±0,8	12,6±1,6	16,6±2,0	82,6±4,6
<i>Lab Test</i>								
1-2	27,4±4,0	32,7±3,5	52,9±3,8	54,1±4,8	67,1±0,6	81,8±3,5	91,4±0,8	99,0±0,9
6	21,9±2,0	24,0±2,9	36,0±1,6	49,0±2,8	59,7±2,2	62,4±4,4	82,0±8,3	89,5±3,2
12	5,3±0,1	10,7±1,7	16,1±0,6	31,9±3,5	37,9±2,4	68,2±1,7	88,5±3,3	92,0±1,6
24	0	0	7,8±1,5	22,1±0,8	32,5±2,0	40,4±2,3	46,2±3,1	84,8±0,2
48	ND	ND	0	19,2±2,4	23,0±2,1	33,9±2,0	68,9±1,7	70,6±1,6
72	ND	ND	ND	8,9	10,4	21,3	45,7	59,9

O ensaios foram realizados em diferentes períodos de tempo, utilizando-se reagentes de diferentes marcas comerciais, antes (controle) e após a adição de várias concentrações de ácido ascórbico ao soro. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão de 2-3 experimentos com diferentes pools de soro. ND = Não Determinado.

Tabela 14. Interferência negativa do ácido ascórbico (% do controle) na determinação de colesterol total, glicose, triglicérides e bilirrubina.

Tempo (h)	Ácido Ascórbico Adicionado (mg/dL)				
	2,0	3,0	5,0	10,0	40,0
Colesterol total					
1-2	11,2 ± 0,8	12,3 ± 0,75	15,8 ± 5,2	21,1 ± 4,6	69,9 ± 7,2
6	ND	9,8 ± 1,5	10,5 ± 3,7	15,7 ± 4,6	60,8 ± 5,5
12	ND	0	0	12,6 ± 3,1	56,8 ± 6,8
24	ND	ND	ND	10,8 ± 2,2	51,1 ± 7,5
48	ND	ND	ND	0	44,5 ± 4,1
Glicose					
1-2	5,4 ± 0,6	9,2 ± 1,2	11,5 ± 2,7	16,4 ± 1,3	54,5 ± 4,4
6	ND	ND	7,3 ± 1,1	11,7 ± 1,9	51,9 ± 6,4
12	ND	ND	0	9,5 ± 2,5	47,5 ± 5,5
24	ND	ND	ND	0	41,7 ± 4,2
48	ND	ND	ND	ND	28,9 ± 1,9
Triglicérides					
1-2	20,5 ± 5,1	24,3 ± 6,8	33,6 ± 5,2	60,6 ± 3,3	97,7 ± 1,2
6	15,3 ± 1,2	20,3 ± 8,1	31,0 ± 6,3	57,1 ± 3,2	94,5 ± 4,1
12	7,6 ± 1,1	14,8 ± 2,5	25,7 ± 2,9	41,3 ± 2,5	95,3 ± 5,2
24	0	0	10,1 ± 3,1	31,1 ± 2,1	80,2 ± 8,6
48	ND	ND	0	30,1 ± 2,1	80,0 ± 7,0
Bilirrubina					
1-2	5,9 ± 0,8	6,5 ± 0,5	9,4 ± 1,7	11,5 ± 2,5	56,9 ± 3,1
6	ND	ND	ND	8,9 ± 1,8	54,8 ± 2,5
12	ND	ND	ND	4,1 ± 1,9	51,6 ± 4,1
24	ND	ND	ND	ND	ND
48	ND	ND	ND	ND	ND

Os ensaios foram realizados em diferentes períodos de tempo, utilizando-se reagentes de diferentes marcas comerciais, antes (controle) e após a adição de várias concentrações de ácido ascórbico ao soro. Os resultados das diferentes marcas de reagentes foram combinados e estão expressos como média ± desvio padrão de 2-3 experimentos realizados com diferentes pools de soro. ND = Não Determinado.

Tabela 15. Interferência do ácido ascórbico nas reações para a detecção de glicose urinária utilizando-se tiras reativas de diferentes marcas comerciais.

Glicose*	Ácido Ascórbico adicionado (mg/dL)			
	0	40	60	80
<i>Combur¹⁰</i>				
50	+	Tr/+	Tr	-
150	++	+ / ++	+	Tr / +
350	+++	++ / +++	++	++
500	+++	+++	++ / +++	++ / +++
<i>Multistix</i>				
50	Tr	-	-	-
150	+	- / Tr	-	-
350	++	+	Tr	- / Tr
500	++ / +++	++	+ / ++	+
<i>Medi-Test</i>				
50	+	-	-	-
150	++	+ / ++	Tr	- / Tr
350	++	++	++	+ / ++
500	+++ / ++++	+++	+++	++ / +++
<i>Rapignost</i>				
50	Tr	-	-	-
150	+	+	-	-
350	+++	++	+	Tr
500	+++ / ++++	+ / ++	+	+

*Glicose adicionada (concentração final em mg/dL); Tr = traços; (-) = Negativo. Os resultados são médias de 2-3 experimentos.

Tabela 16. Interferência do ácido ascórbico nas reações para a detecção de Hemoglobina urinária utilizando-se tiras reativas de diferentes marcas comerciais.

Hemoglobina*	Ácido Ascórbico adicionado (mg/dL)			
	0	40	60	80
<i>Combur¹⁰</i>				
0,12	+	-	-	-
0,60	++	Tr/+	+	Tr
2,0	+++	++/+++	++	++
4,0	+++	+++	+++	+++
<i>Multistix</i>				
0,12	Tr	Tr	-	-
0,60	++	+	+	+
2,0	++/+++	++/+++	++	++
4,0	+++	++	++	++/+++
<i>Medi-Test</i>				
0,12	+	-	-	-
0,60	++	-	-	-
2,0	+++	Tr	-	-
4,0	+++/++++	Tr/+	Tr	Tr/+
<i>Rapignost</i>				
0,12	Tr	-	-	-
0,60	+ / ++	- / Tr	-	-
2,0	++	+	+	Tr
4,0	++ / +++	++	+ / ++	+

*Hemoglobina adicionada (concentração final em mg/dL); Tr = traços; (-) = Negativo. Os resultados são médias de 2-3 experimentos.

Tabela 17. Interferência do ácido ascórbico nas reações para a detecção de Nitrito urinário utilizando-se tiras reativas de diferentes marcas comerciais.

Nitrito*	Ácido Ascórbico adicionado (mg/dL)			
	0	40	60	80
Combur¹⁰				
0,1	+	+	+	Tr
0,2	+	+	+	Tr
0,3	+	+	+	Tr
0,5	+	+	+	Tr/+
Multistix				
0,1	+	Tr/+	-/Tr	Tr
0,2	+/+++	+	+	Tr/+
0,3	++	+	+	Tr/+
0,5	++/++++	++	++	+
Medi-Test				
0,1	Tr	-	-	-
0,2	Tr/+	Tr	-	-
0,3	+	Tr/+	Tr	Tr
0,5	++	+	Tr/+	+
Rapignost				
0,1	-/Tr	-	-	-
0,2	Tr/+	-/Tr	-/Tr	-
0,3	+	Tr/+	Tr	-/Tr
0,5	+/+++	+	Tr/+	Tr/+

*Nitrito de sódio adicionado (concentração final em mg/dL); Tr = traços; (-) = Negativo. Os resultados são médias de 2-3 experimentos.

Tabela 18. Interferência do ácido ascórbico nas reações para a detecção de Leucócitos urinários utilizando-se as tiras reativas de diferentes marcas comerciais.

	Ácido Ascórbico adicionado (mg/dL)				
	0	20	40	60	80
Leucócitos*					
<i>Combur¹⁰</i>					
1,0 - 2,5x10 ⁵	+	+	Tr/+	Tr	Tr
4,0 - 4,7x10 ⁵	++	+ / ++	+	+	Tr/+
>7,3x10 ⁵	++	++	+ / ++	+ / ++	+ / ++
<i>Multistix</i>					
1,0 - 2,5x10 ⁵	Tr/+	Tr	Tr	- / Tr	- / Tr
4,0 - 4,7x10 ⁵	++	+ / ++	+ / ++	+	+
>7,3x10 ⁵	++	++	++	+ / ++	+ / ++

*Leucócitos adicionados (concentração final em células/ml); Tr = traços; (-) = Negativo. Os resultados são médias de 2-3 experimentos.

Tabela 19. Interferência do ácido ascórbico nas reações para a detecção de Bilirrubina urinária utilizando-se as tiras reativas de diferentes marcas comerciais.

	Ácido Ascórbico adicionado (mg/dL)				
	0	20	40	60	80
Bilirrubina*					
<i>Combur¹⁰</i>					
1,0	Tr	- / Tr	-	-	-
1,5	+	- / Tr	-	-	-
2,0	+ / ++	Tr	- / Tr	-	-
3,5	++	+	Tr/+	Tr	Tr
<i>Multistix</i>					
1,0	+	Tr	-	-	-
1,5	+ / ++	Tr/+	Tr	- / Tr	-
2,0	++	Tr/+	- / Tr	-	-
3,5	+ / +++	+ / +++	+	+	- / Tr
<i>Medi-Test</i>					
1,0	Tr	- / Tr	-	-	-
1,5	+	Tr/+	Tr	-	-
2,0	+ / ++	Tr/+	- / Tr	-	-
3,5	+ / +++	+	+	- / Tr	- / Tr

*Bilirrubina adicionada (concentração final em mg/dL); Tr = traços; (-) = Negativo. Os resultados são médias de 2-3 experimentos.

Tabela 20. Efeito dos componentes da reação no grau de interferência causado pelo ácido ascórbico (12 μ M com DHBS ou 120 μ M com fenol) em tampão fosfato ou HEPES pH 7,0.

Componentes (concentração final)	Interferência Negativa (% do controle)
Fenol (mM)	
2,0	66,4 \pm 4,1
10,0	66,7 \pm 3,8
100,0	65,2 \pm 3,9
DHBS (mM)	
1,0	69,5 \pm 4,0
2,0	70,2 \pm 2,8
4,0	73,6 \pm 3,9
25,0	73,1 \pm 4,1
4-AF (mM)	
0,1	73,5 \pm 2,8
0,5	76,3 \pm 2,7
1,0	74,8 \pm 1,6
5,0	71,5 \pm 3,2
Peroxidase (U/L)	
500	82,8 \pm 6,8
1000	84,4 \pm 7,1
5000	89,6 \pm 7,0
H₂O₂ (μM) + DHBS	
6	84,2 \pm 6,0
9	74,2 \pm 4,5
12	66,4 \pm 3,6
24	60,6 \pm 3,3
H₂O₂ (μM) + Fenol	
60	99,1 \pm 1,0
90	94,8 \pm 3,5
120	54,8 \pm 2,8
240	47,3 \pm 3,4

Condições dos ensaios controles na ausência de ácido ascórbico: Fenol ou Ácido Dicloro-hidroxi-benzeno-sulfônico (DHBS), 2,0 mM; 4-Aminofenazona (4-AF), 1,0 mM; Peroxidase, 1000 U/L; Peróxido de hidrogênio, 12 μ M com DHBS ou 120 μ M com fenol; Tempo de reação, 10 min após a adição da peroxidase, a 37°C; Absorbância, 505 nm. Os resultados são média \pm desvio-padrão de 2-3 experimentos para cada variável.

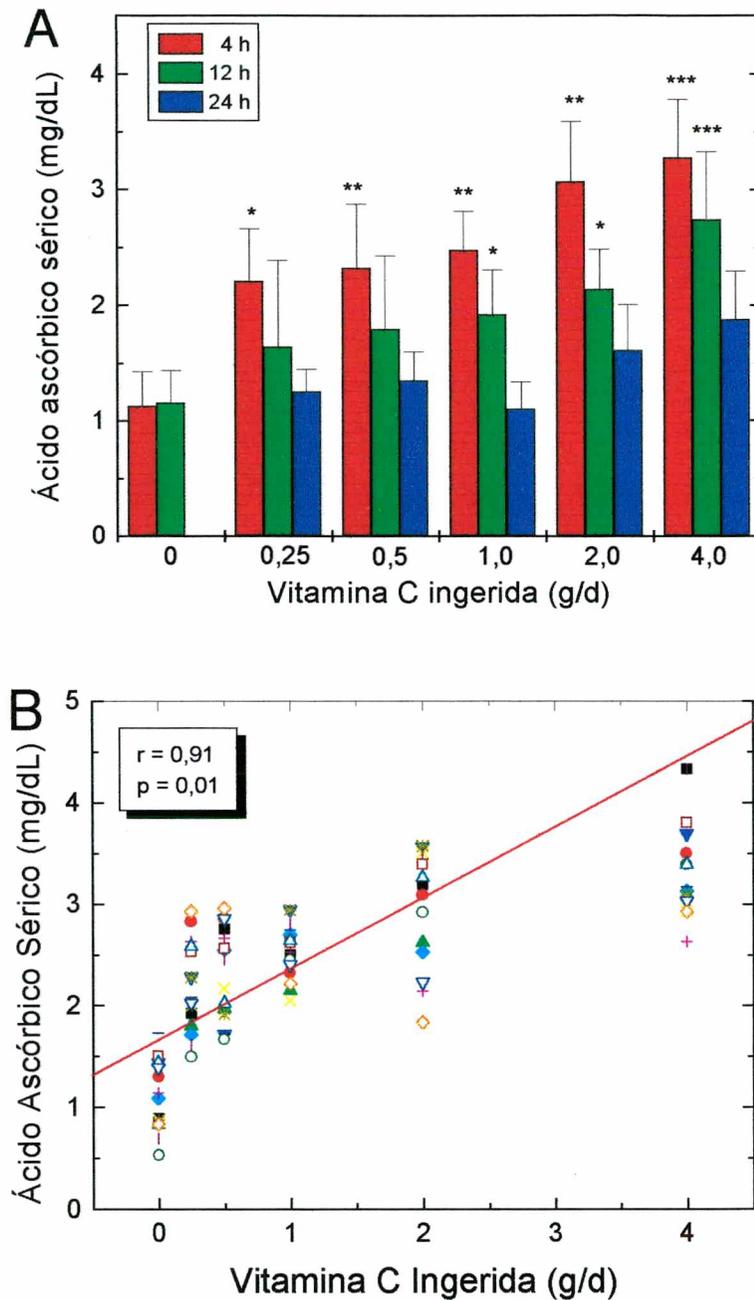


FIGURA 3. Níveis séricos de ácido ascórbico após a ingestão de vitamina C. **A)** Concentração sérica do ácido ascórbico determinada pelo método espectrofotométrico da 2,4-Dinitrofenilhidrazina. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparado aos valores basais (0 g/d de vitamina C suplementar), teste t pareado de Student. Os resultados são média \pm desvio padrão de 18 determinações. **B)** Correlação de Pearson dos níveis de ácido ascórbico sérico, 4 h após a ingestão das várias doses de vitamina C.

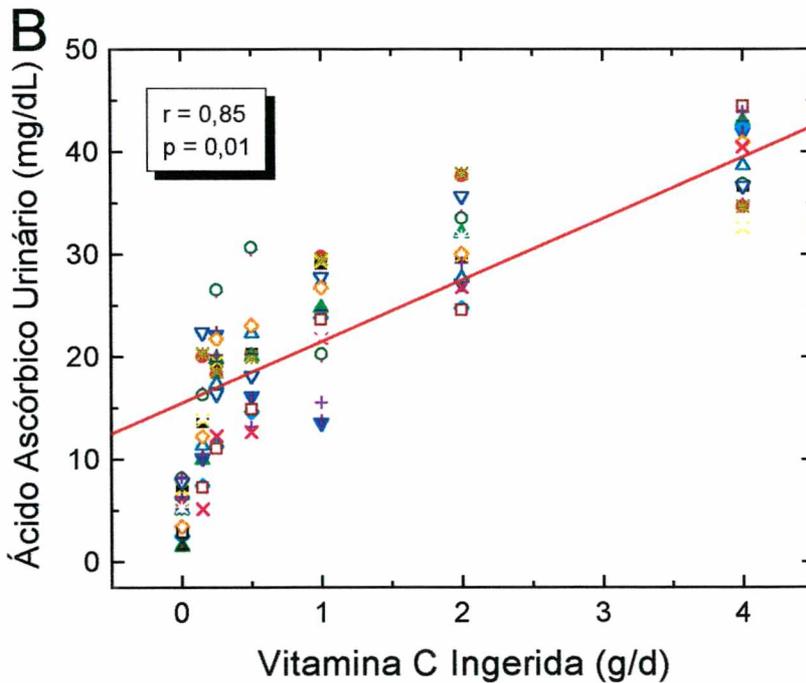
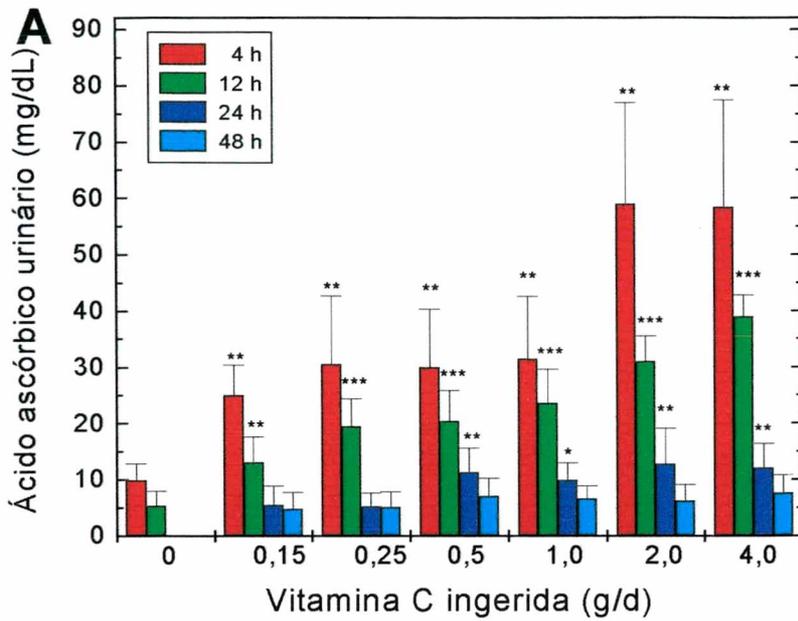


FIGURA 4. Níveis urinários de ácido ascórbico após a ingestão de vitamina C.

A) Concentração urinária do ácido ascórbico determinada pelo método espectrofotométrico da 2,4-Dinitrofenilhidrazina. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparado aos valores basais (0 g/d de vitamina C suplementar), teste t pareado de Student. Os resultados são média \pm desvio padrão de 18 determinações. **B)** Correlação de Pearson dos níveis de ácido ascórbico urinário, 12 h após a ingestão das várias doses de vitamina C.

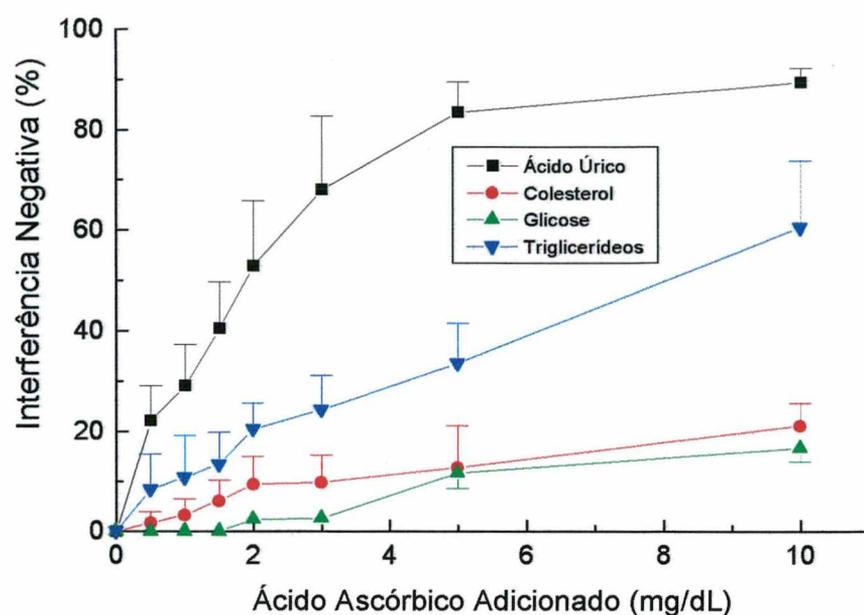


FIGURA 5. Efeito interferente do ácido ascórbico na determinação de ácido úrico, colesterol, glicose e triglicerídeos pelo sistema oxidase/peroxidase. Diferentes concentrações de ácido ascórbico foram adicionadas em "pool" de soro humano e as determinações dos analitos foram realizadas antes (controle) e 1-2 horas após a adição. Os resultados são média \pm desvio padrão de 2-3 ensaios para cada analito bioquímico realizados com "kits" de diferentes marcas comerciais, conforme descrito na seção Materiais e Métodos.

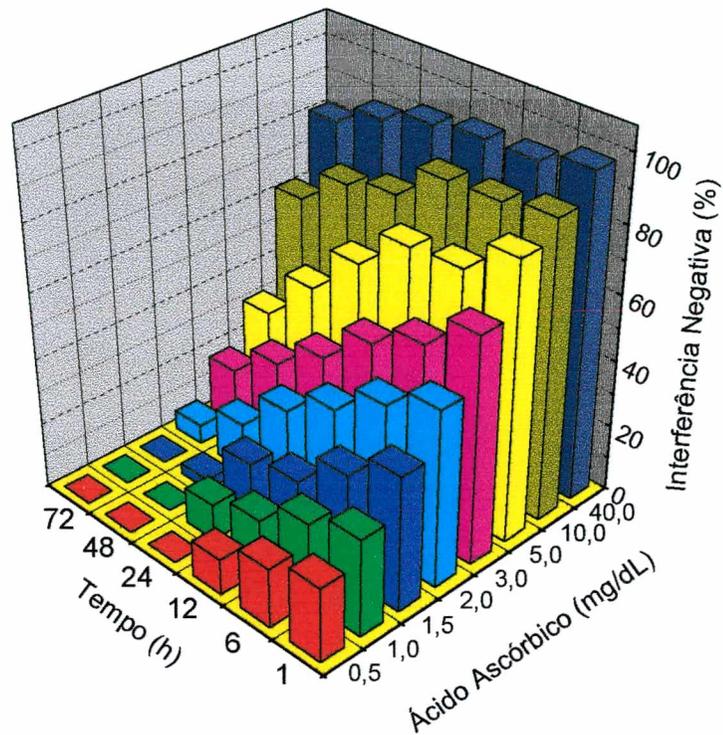


FIGURA 6. Interferência do ácido ascórbico na determinação de ácido úrico. Concentrações crescentes de ácido ascórbico foram adicionadas em "pool" de soro e as determinações foram realizadas após diferentes períodos de tempo a 4° C. Os resultados são médias dos valores obtidos com os "kits" das marcas Bioclin, Biodiagnóstica, BioSystems, Celm e LabTest pelo sistema oxidase/peroxidase. Foram realizadas 2-3 determinações com cada "kit". O desvio padrão foi de 5-20%.

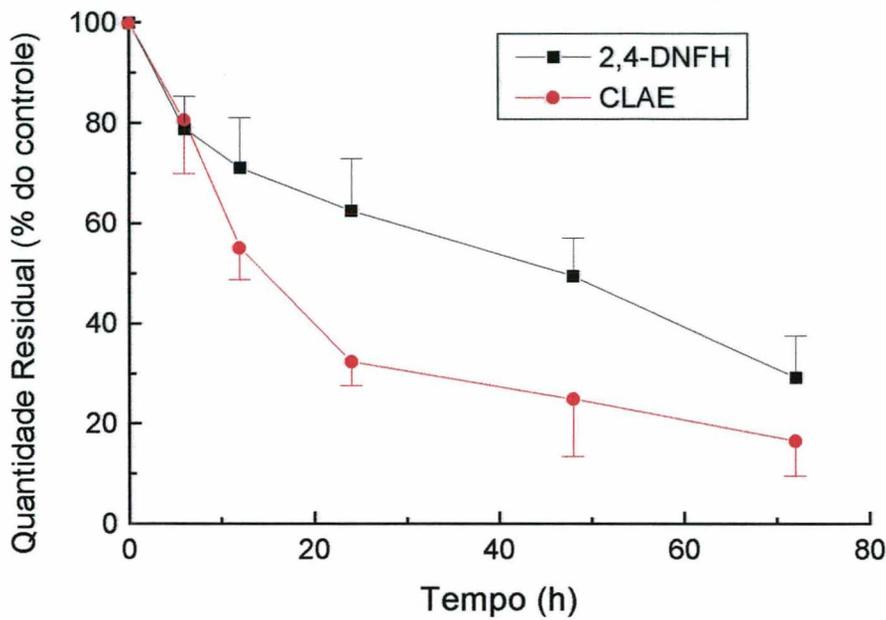


FIGURA 7. Estabilidade do ácido ascórbico em soro. Quantidades crescentes de ácido ascórbico (0,5 a 40,0 mg/dL) foram adicionadas em “pool” de soro e as determinações foram realizadas pelo método espectrofotométrico da 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNFH) e por CLAE com detecção eletroquímica, conforme descrito na seção Materiais e Métodos. As amostras de soro permaneceram a 4°C durante os diferentes períodos de tempo. Os níveis de ácido ascórbico quantificados na primeira hora após a adição ao soro foram considerados 100% (controles). Os resultados são média \pm desvio padrão de duas determinações com diferentes “pools” de soro para cada concentração.

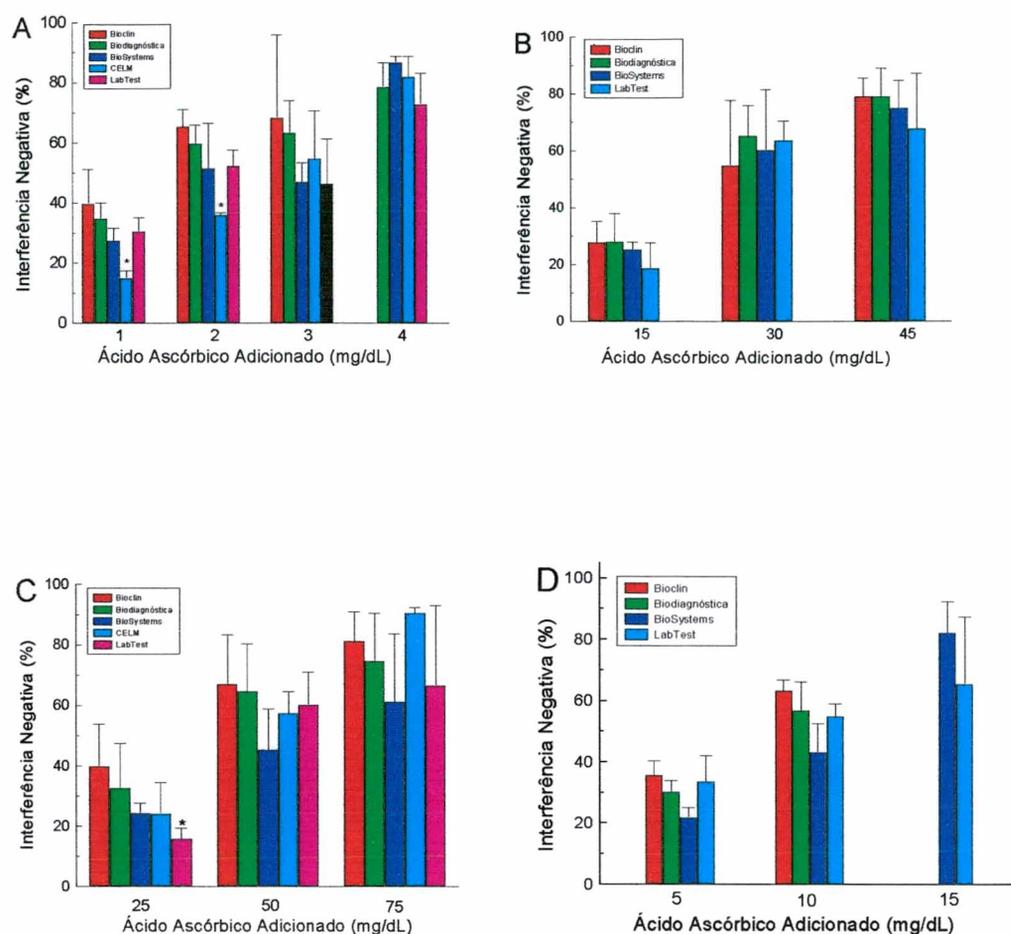


FIGURA 8. Efeito interferente do ácido ascórbico nas determinações de **A**, ácido úrico; **B**, colesterol; **C**, glicose e; **D**, triglicerídeos. As determinações foram realizadas utilizando-se “kits” de reagentes de diferentes marcas comerciais, 1-2 horas após a adição de várias concentrações de ácido ascórbico em “pool” de soro. Os resultados são média \pm desvio-padrão de 6-8 ensaios. Valores dos analitos encontrados na ausência de ácido ascórbico adicionado foram considerados como controles (0% de interferência). * $p < 0,05$ comparado aos resultados obtidos com a marca Bioclin, teste *t* de Student.

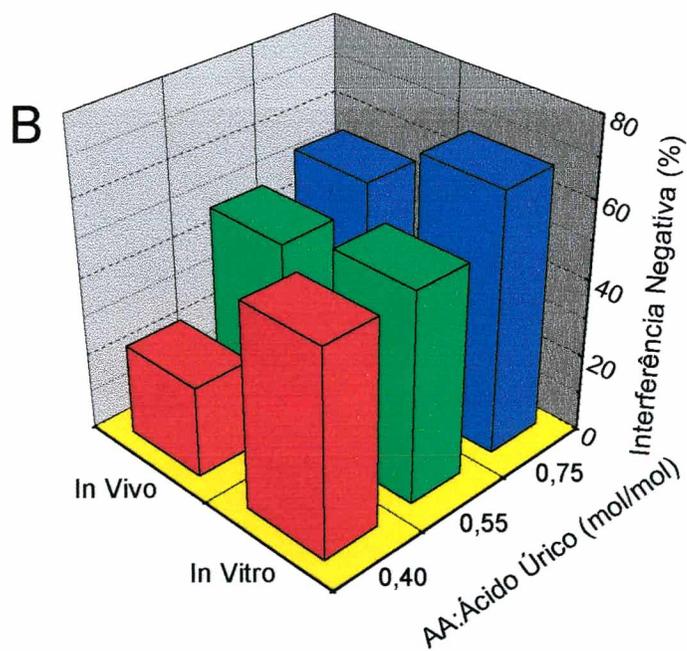
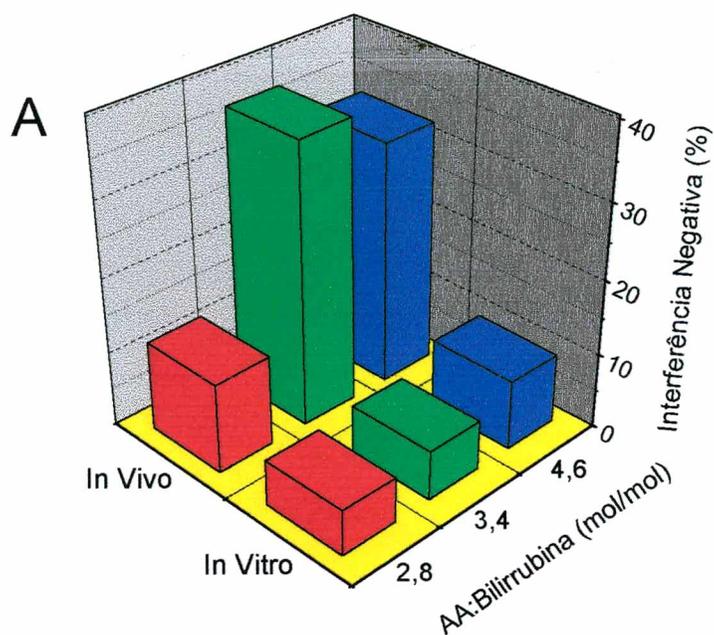


FIGURA 9. Interferência *in vivo* e *in vitro* do ácido ascórbico na determinação de **A**, bilirrubina total e **B**, ácido úrico. Para efeito de comparação, os resultados obtidos anteriormente 4 ou 12 h após a ingestão de vitamina C e após a adição de ácido ascórbico ao “pool” de soro foram normalizados em termos molares de ácido ascórbico:analito.

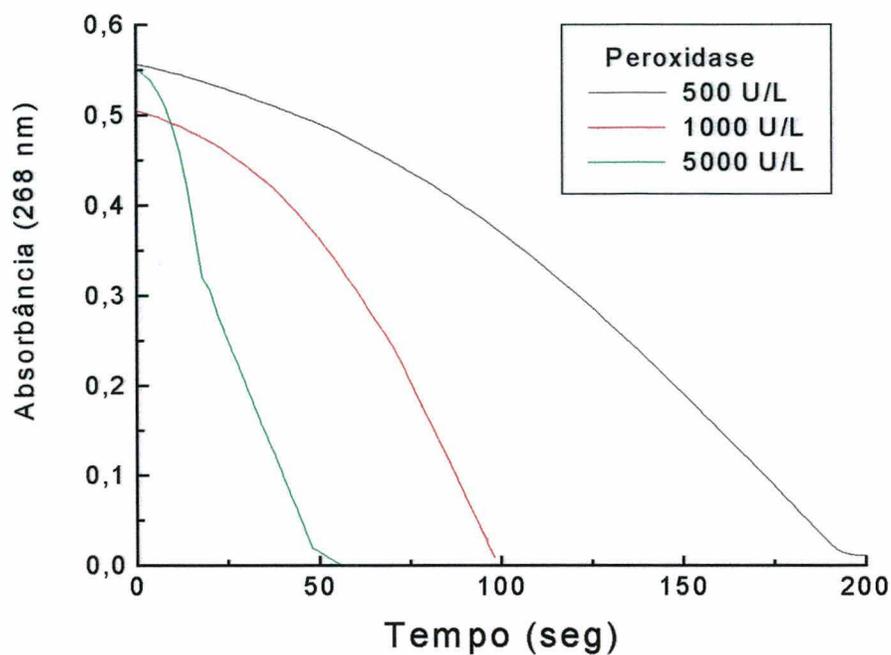


FIGURA 10. Oxidação do ácido ascórbico pelo peróxido de hidrogênio/peroxidase. Ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio, ambos a 120 μM , foram incubados em tampão fosfato 100 mM, pH 7,0. A reação foi iniciada pela adição de diferentes concentrações de peroxidase.

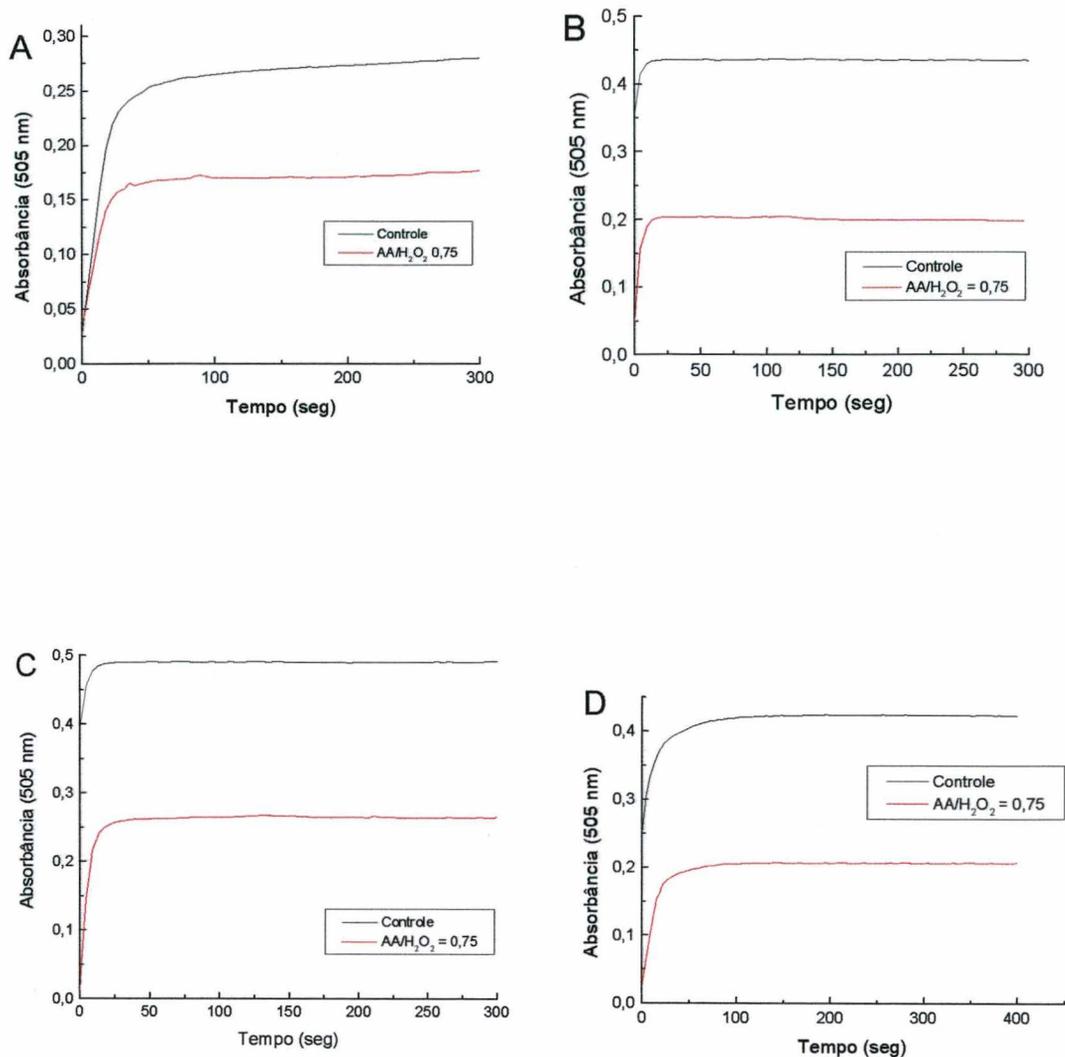


FIGURA 11. Efeito interferente do ácido ascórbico na cinética de reação da peroxidase para a formação do cromógeno oxidado, a 37°C. Peróxido de hidrogênio (12 ou 120 μM) foi adicionado aos diferentes reagentes de “kits” comerciais, na ausência (controle) e na presença de ácido ascórbico. **A)** ácido úrico (DHBS); **B)** colesterol (fenol); **C)** glicose (fenol) e; **D)** triglicerídeos (clorofenol). Os resultados são representativos de 2-3 ensaios para cada reagente.

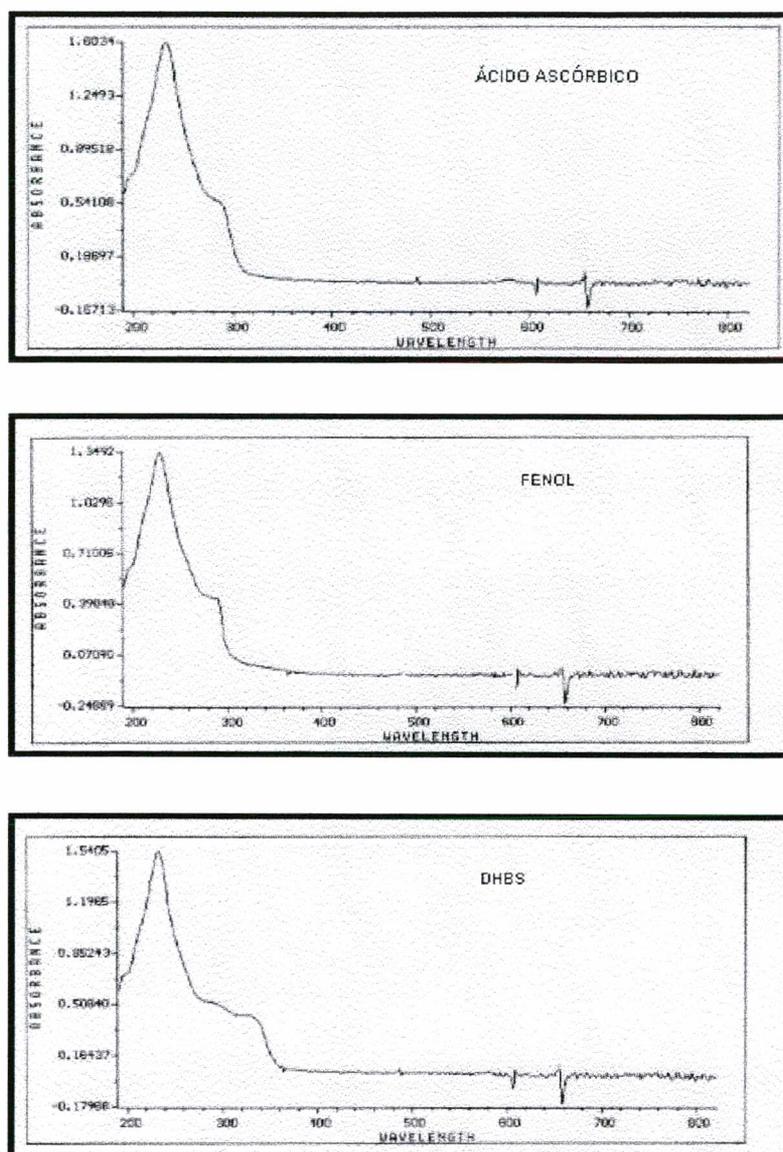


FIGURA 12. Espectros de absorvância do ácido ascórbico, 4-aminofenazona e dois compostos fenólicos (fenol e DHBS). As soluções destas substâncias foram preparadas em água deionizada nas concentrações utilizadas nos sistemas de reações dos experimentos.

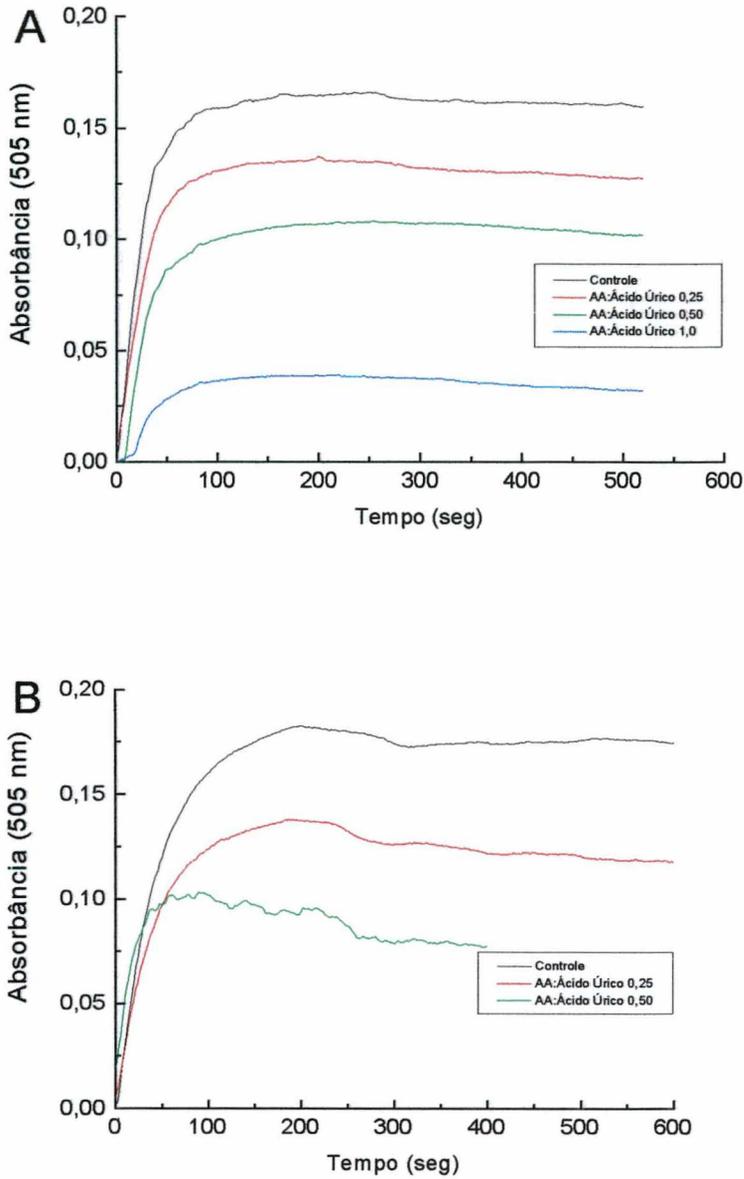


FIGURA 13. Efeito interferente do ácido ascórbico na cinética de reação de ácido úrico. Soro humano (pool) foi adicionado aos reagentes **A)** BioSystems e **B)** LabTest, na ausência (controle) e na presença de ácido ascórbico, a 37°C. A concentração de ácido úrico na amostra de soro representada foi de 8,4 mg/dL (9,9 μ M). Os resultados são representativos de 2-3 ensaios para cada reagente.

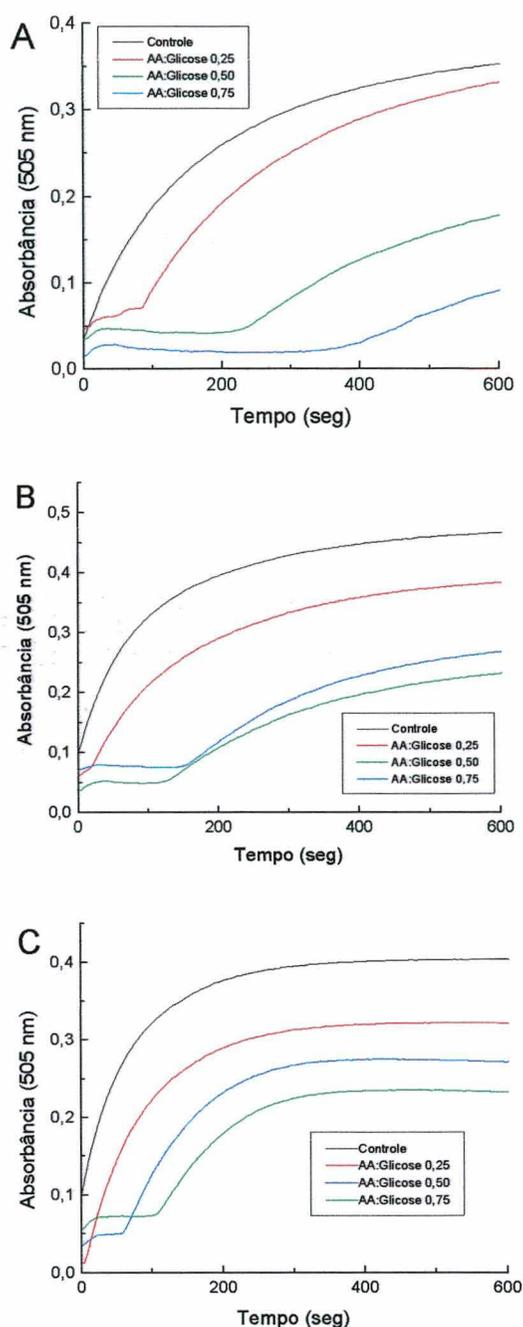


FIGURA 14. Efeito interferente do ácido ascórbico na cinética de reação da glicose. Soro humano (pool) foi adicionado aos reagentes **A)** Biodiagnóstica (5000 U/L GOD), **B)** LabTest (8000 U/L GOD) e **C)** BioSystems (10000 U/L GOD), na ausência (controle) e na presença de ácido ascórbico, a 37°C. A concentração de glicose na amostra de soro representada foi de 256 mg/dL (142 μ M). Os resultados são representativos de 2-3 ensaios para cada reagente. GOD, glicose oxidase.

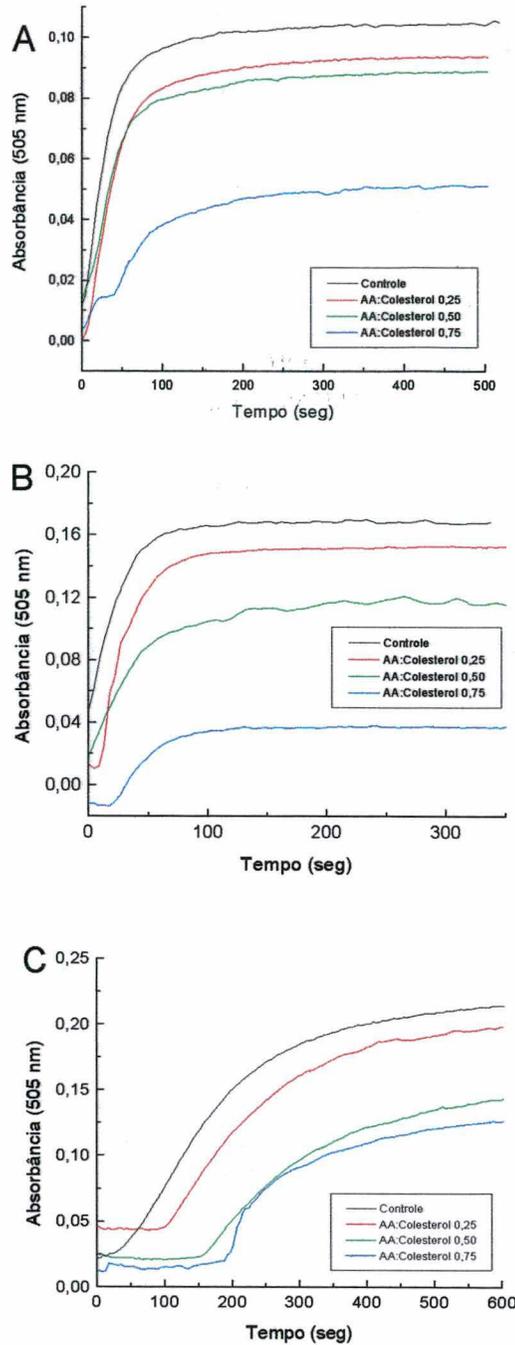


FIGURA 15. Efeito interferente do ácido ascórbico na cinética de reação do colesterol. Soro humano (pool) foi adicionado aos reagentes **A)** LabTest (> 250 U/L COD), **B)** BioSystems (> 100 U/L COD), e **C)** Bioclin (> 500 U/L COD) na ausência (controle) e na presença de ácido ascórbico, a 37°C . A concentração de colesterol na amostra de soro representada foi de 99 mg/dL ($25,8$ μM). Os resultados são representativos de 2-3 ensaios para cada reagente. COD, colesterol oxidase.

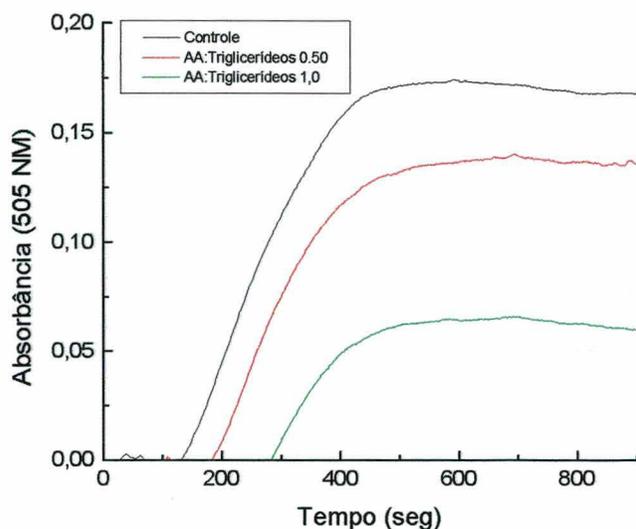


FIGURA 16. Efeito interferente do ácido ascórbico na cinética de reação dos triglicerídeos com o reagente da BioSystems. A concentração de triglicerídeos na amostra de soro representada foi de 153 mg/dL ($35 \mu\text{M}$). Os resultados são representativos de 2 ensaios.

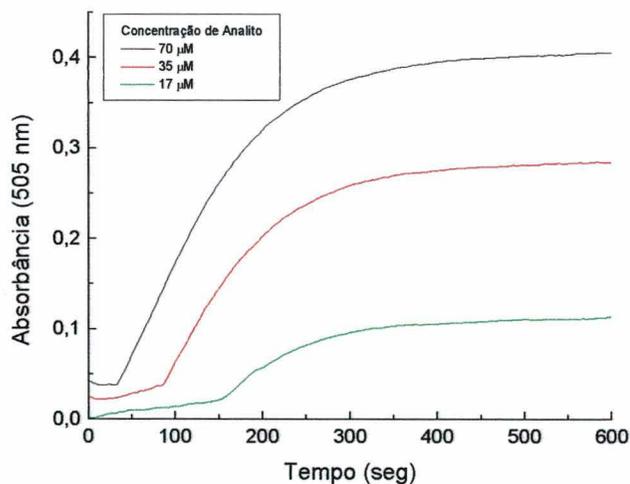


FIGURA 17. Efeito da variação da concentração do analito na fase "lag" provocada pelo ácido ascórbico. Diferentes volumes de soro (5, 10 e 20 μL) foram adicionados ao reagente de triglicerídeos da LabTest na presença de 35 μM de ácido ascórbico (relação 0,25 ácido ascórbico:amostra com volume de 10 μL).

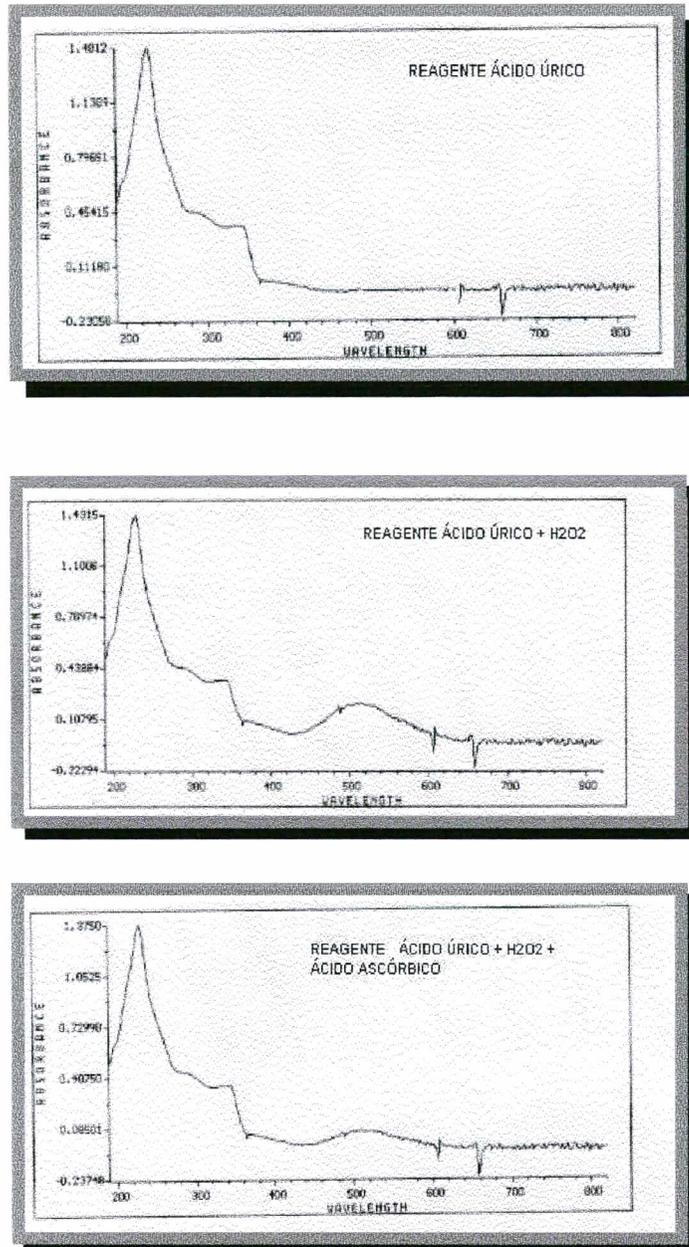


FIGURA 18. Espectro de absorvância do reagente de ácido úrico após 5 min de incubação, a 37°C, na ausência (figura superior), na presença de peróxido de hidrogênio 12 μ M (figura intermediária) e na presença de peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico com relação molar de 1:1 (figura inferior).

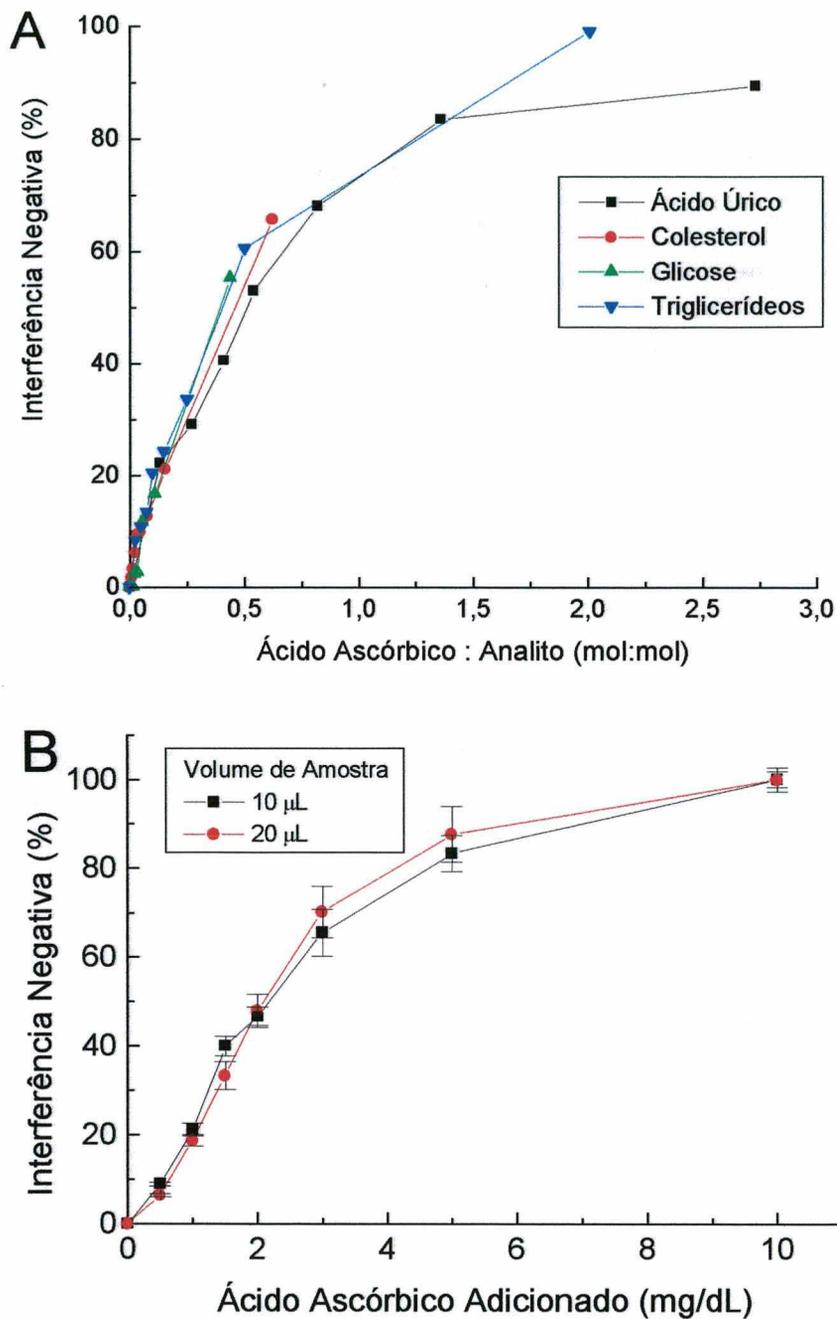


FIGURA 19. A) Efeito interferente do ácido ascórbico nas determinações bioquímicas baseadas no sistema de reação oxidase/peroxidase (Trinder). Os resultados foram obtidos a partir dos valores da figura 5 normalizados em termos molares ácido ascórbico:analitos.

B) Efeito do volume de amostra na interferência causada pelo ácido ascórbico na determinação de ácido úrico. Os resultados são média \pm desvio padrão de 2 ensaios.

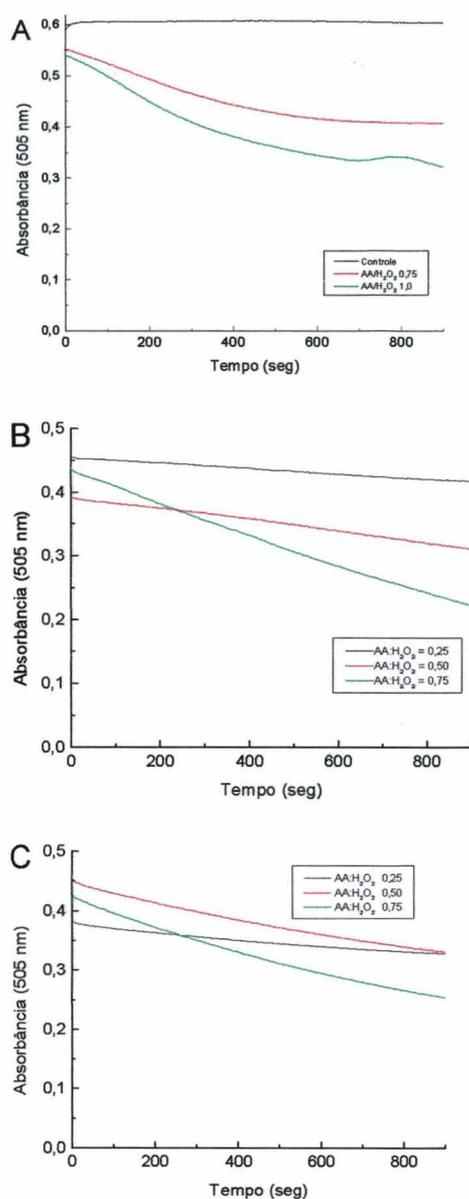


FIGURA 20. Efeito do ácido ascórbico na redução do cromógeno formado. Peróxido de hidrogênio (12 ou 120 μM) foi adicionado aos reagentes **A)** ácido úrico LabTest (DHBS), **B)** triglicerídeos BioSystems (clorofenol) e **C)** glicose LabTest (fenol). Após a formação do cromógeno por 5 min de incubação, diferentes concentrações de ácido ascórbico foram adicionadas e a cinética de redução foi monitorada a 37°C. Os resultados são representativos de 2-3 experimentos para cada diferente reagente.

6. DISCUSSÃO

Além do crescente emprego do ácido ascórbico como conservante de alimentos, o consumo de vitamina C tem aumentado pela população em geral, pois é comum o uso de tratamentos alternativos baseados na ingestão de vitaminas. A vitamina C tem sido indicada para pacientes com câncer (Cameron e cols., 1979; Cameron, 1991; Bridgen, 1987), e também para pessoas saudáveis com a finalidade preventiva de várias patologias (Carr e Frei, 1999). Em particular, a opinião de Linus Pauling fez promover a automedicação com vitamina C para a prevenção ou tratamento dos resfriados comuns.

A interferência do ácido ascórbico nos ensaios laboratoriais é conhecida há longo tempo e, para minimizar o problema, algumas modificações nas formulações dos "kits" foram introduzidas pelos fabricantes. No entanto, com o crescente consumo de elevadas doses de vitamina C pela população, tornou-se importante analisar o efeito interferente do ácido ascórbico considerando o seu metabolismo. Assim, os resultados desse estudo demonstraram que a vitamina C, em doses normalmente consumidas de forma prolongada (uma semana) por pessoas saudáveis, interferiu significativamente em alguns ensaios laboratoriais, dependendo da dose de vitamina C ingerida e do tempo em que as amostras foram coletadas após o consumo da vitamina.

A concentração de ácido ascórbico sérico nos indivíduos antes da suplementação foi em média 1,0 a 1,2 mg/dL (Fig. 3A), portanto, dentro dos valores de referência que são de 0,3 a 2,0 mg/dL (McCormick e Greene, 1994). Os resultados demonstraram que os níveis de ácido ascórbico sérico de indivíduos normais aumentaram 2 vezes (1,13 vs 2,21 mg/dL; $p < 0,05$) 4 h após a ingestão de uma pequena dose de vitamina C (250 mg) (Fig. 3A). Esse aumento de ácido ascórbico foi suficiente para provocar uma inibição de 17,8% ($p < 0,01$) na reação para a determinação de ácido úrico sérico (uricase/peroxidase) (Tabelas 1 e 4). Podmore e cols. (1998) demonstraram um aumento de 60 % nos níveis de ácido ascórbico sérico após a ingestão de 500 mg/d de vitamina C. Naturalmente, a concentração sérica de ácido ascórbico aumentou significativamente com a ingestão de doses maiores de vitamina C ($r = 0,91$; $p < 0,01$; Fig. 3B), causando uma interferência máxima de 62% na determinação de ácido úrico 4 h após a ingestão de 4g/d de vitamina C (Tabela 4).

O tempo necessário para a eliminação plasmática do excesso de ácido ascórbico, após a interrupção da suplementação vitamínica, foi dependente da dose ingerida (Fig. 3A). Assim, as doses $\leq 0,5$ g/d foram praticamente eliminadas nas primeiras 12 h após a ingestão, enquanto que com as doses de 1,0 e 2,0 g/d foram necessárias pelo menos 24 h para a completa eliminação do excesso e pelo menos 48 h para a dose de 4 g/d de vitamina C (Fig. 3A). Conseqüentemente, o grau de inibição observado nos ensaios de ácido úrico foi progressivamente menor nas amostras coletadas 12 e 24 h após a ingestão de vitamina C em comparação com as amostras de 4 h (Tabela 4). Vale a pena ser destacado o fato de que uma dose moderada de vitamina C (1,0 g/d) provocou interferência significativa na determinação de ácido úrico em amostras de sangue coletadas 12 h após a ingestão e no caso de 4 g/d, inclusive 24 h após (Tabelas 2 e 3).

As interferências observadas nas reações para a determinação da bilirrubina total (diazotização) foram significativas nas amostras coletadas 4 e 12 h após a ingestão de doses $\geq 0,5$ g/d de vitamina C. No entanto, o grau de inibição não apresentou correlação com os níveis séricos de ácido ascórbico ($r=0,56$; $p>0,05$), ou seja, os percentuais de interferência foram semelhantes nas amostras coletadas 4 e 12 h após a ingestão de 0,5, 1,0, 2,0 ou 4,0 g/d de vitamina C. Os níveis de triglicerídeos diminuíram em média 22,7% 4 h após a ingestão de 4 g de vitamina C, porém essa variação não foi estatisticamente significativa a nível de 5% (Tabela 1) e também encontra-se abaixo dos valores de variação biológica preconizados por Marcovina e cols. (1994). No entanto, após jejum de 12 h houve uma inibição significativa de 34% ($p<0,05$) após a ingestão de 4 g de vitamina C, provavelmente devido à menor quantidade de triglicerídeos na amostra (Tabelas 2 e 4).

É interessante notar que, mesmo com a maior dose de vitamina C estudada (4 g/d), não ocorreram interferências significativas nas reações para a determinação de glicose, colesterol total e creatinina (Tabelas 1 e 2). Utilizando concentrações mais elevadas de ácido ascórbico em experimentos *in vitro*, sem considerar, portanto, a variação biológica dos parâmetros bioquímicos, outros pesquisadores têm demonstrado uma inibição significativa para a maioria dos ensaios que utilizam reações de óxido-redução (Pesce e Bodourian, 1977; Zoppi e Fenili, 1980; Freemantle e cols., 1994; Rodrigues e cols., 1997; Pedrazzi e cols., 1998). Certamente,

concentrações elevadas de ácido ascórbico podem ser encontradas no soro de pacientes que estão recebendo tratamento com mega-doses de vitamina C. Badrick e Campbell (1992) encontraram até 30 mmol/L (528 mg/dL) de ácido ascórbico no plasma após a infusão de 30 g de ascorbato e Freemantle e cols. (1994) observaram concentrações de ácido ascórbico plasmático maiores que 0,4 mmol/L em indivíduos consumindo vitamina C por via oral. Significativas interferências analíticas em vários parâmetros bioquímicos séricos foram relatadas por esses autores.

Tendo em vista que as diferentes composições dos reagentes podem modificar o grau de interferência, realizamos estudos *in vitro* pela adição do ácido ascórbico às amostras de soro antes da realização dos ensaios bioquímicos utilizando várias marcas de "kits" normalmente comercializadas. A quantidade de ácido ascórbico adicionado foi baseada naquelas concentrações encontradas no soro dos indivíduos após a ingestão de diferentes doses de vitamina C. Foram adicionadas, também, as concentrações de 10,0 e 40,0 mg/dL considerando que essas concentrações são atingidas no soro nos casos de administração intravenosa de vitamina C para o tratamento de cânceres (Badrick e Campbell, 1992; Cameron, 1991). Ensaios adicionais foram realizados em diferentes tempos após a adição de ácido ascórbico para verificar o tempo de auto-oxidação necessário para diminuir a interferência.

Os resultados das determinações realizadas nas duas primeiras horas após a adição do ácido ascórbico mostraram que os ensaios para a quantificação de ácido úrico foram os que mais sofreram interferência pelo ácido ascórbico, seguida pelos ensaios de triglicerídeos, colesterol total, glicose e bilirrubina (Tabelas 13 e 14). No entanto, estes últimos sofreram interferência somente com as maiores doses de ácido ascórbico adicionado. A creatinina determinada pelo método de Jaffé modificado (picrato alcalino com duplo pH), não sofreu interferência, nem mesmo na presença de 40,0 mg/dL de ácido ascórbico. Em geral, esses dados confirmaram os resultados de interferência previamente encontrados por nós nas determinações realizadas após a ingestão de vitamina C, e por outros autores em estudos *in vitro* (Pesce e Bodourian, 1977; Zoppi e Fenili, 1980; Freemantle e cols., 1994; Rodrigues e Cols., 1997; Pedrazzi e cols., 1998). No entanto, a interferência analítica observada para a reação da bilirrubina total após a adição do ácido ascórbico *in vitro* foi menor que aquela

observada após a ingestão de vitamina C por uma semana (Fig. 9A). Esses resultados sugerem que o ácido ascórbico interfere, também, no metabolismo da bilirrubina. Outros autores demonstraram apenas o efeito interferente *in vitro* do ácido ascórbico na reação para a bilirrubina (Freemantle e cols., 1994; Vinet e Letellier, 1977). Assim, ensaios adicionais foram realizados determinando-se a bilirrubina total 2 e 4 h após a ingestão de uma única dose de 4 g de vitamina C. Os resultados demonstraram que nesta situação o ácido ascórbico não provocou interferência (não mostrados). Uma possível explicação para a interferência do ácido ascórbico no metabolismo da bilirrubina são os achados de Yamaguchi e cols. (1997), os quais mostraram que a suplementação com ácido ascórbico diminuiu os níveis de mRNA da enzima heme-oxigenase-1, enzima limitante da biossíntese da bilirrubina.

Em relação à interferência do ácido ascórbico no metabolismo do ácido úrico os estudos são controversos. Segundo Wilson e Liedtke (1991), a administração crônica de 4 e 8 g de vitamina C resultou em uma substancial uricosúria e diminuição do ácido úrico sérico. Recentemente, levantou-se a hipótese de que o ácido ascórbico ativa a formação de glicocorticóides e estes, talvez, reduzam os níveis séricos de ácido úrico (Sumbaev e Iasinskaia, 1997). Por outro lado, a suplementação com 4, 8 ou 12 g de vitamina C por dia não alterou os níveis séricos ou a excreção urinária de ácido úrico (Mitch e cols., 1981; Stein e cols., 1976; Menne e cols., 1975; Fituri e cols., 1983). Nossos resultados das determinações do ácido úrico após a suplementação vitamínica realizadas pelo método UV, o qual não sofre interferência, indicaram que as variações nos níveis de ácido úrico foram realmente devidas à interferência analítica do ácido ascórbico e não à biológica (Tabelas 1 e 2). Confirmação adicional foi conseguida observando-se que o grau de interferência das determinações realizadas após a ingestão de vitamina C foram semelhantes aqueles obtidos após a adição do ácido ascórbico *in vitro* (Fig. 9B).

De acordo com o nosso protocolo experimental, a dose de vitamina C ingerida e o tempo de consumo não foram suficientes para provocar alterações significativas nos níveis de colesterol total (Tabela 1 e 2). A reação para triglicerídeos sofreu interferência analítica apenas 12 h após a ingestão de 4 g/d de vitamina C (Tabela 2). Os estudos *in vitro* confirmaram que a interferência nesses analitos ocorreu apenas quando grandes concentrações de ácido ascórbico

estavam presentes nas amostras (Tabela 14 e Fig. 5). Outros autores, utilizando doses de vitamina C e períodos de consumo variados, têm demonstrado interferências analíticas e biológicas. Por exemplo, Badrick e Campbell (1992) observaram inibição analítica nos ensaios de colesterol total e triglicerídeos após a ingestão de 5 g/d de vitamina C. A ingestão diária de 0,5 g de vitamina C por um período de 1 mês foi suficiente para acarretar significativa redução nos níveis de colesterol total plasmático, porém não causou efeito nos triglicerídeos (Beser, 1991). No entanto, Aro e cols. (1988) relataram que a suplementação por 6 semanas com 0,2 e 2 g/d de vitamina C ou a ingestão de 4 g/d de vitamina C por 4 meses (Menne e cols., 1975) não afetou os níveis dos lipídeos séricos.

Comparando-se as diferentes marcas de reagentes, não se observaram diferenças importantes para as determinações dos analitos baseados na reação de Trinder (Figuras 5 a 8). As pequenas diferenças encontradas não puderam ser explicadas pela constituição dos diferentes "kits", provavelmente porque todos utilizam a 4-aminofenazona e compostos fenólicos como, DHBS, fenol e clorofenol (Anexo II). Outros autores têm encontrado uma certa variação no grau de interferência causada pelo ácido ascórbico quando utilizam reações baseadas no sistema oxidase/peroxidase com outros cromógenos (Tang e cols., 2000; Kabasakalian e cols., 1973; Lever e cols., 1973; Gochman e Schmitz, 1971 e 1972). É interessante notar que o fabricante Bio-Systems utiliza na formulação do "kit" para ácido úrico a enzima ascorbato oxidase (concentração final ≥ 5 U/L), a qual serve justamente para oxidar o ácido ascórbico que esteja presente na amostra biológica, diminuindo assim, o seu efeito interferente. No entanto, nossos resultados mostraram que a interferência analítica foi semelhante aos outros "kits" que não utilizam a enzima. Baseando-se em nossos resultados podemos sugerir que a quantidade dessa enzima utilizada no sistema de reação da BioSystems não foi suficiente para inibir a ação do ácido ascórbico na determinação de ácido úrico sérico. Fossati e cols. (1980) conseguiram um efeito satisfatório utilizando concentrações ≥ 200 U/L.

Há vários estudos demonstrando algumas medidas adotadas para eliminar a interferência provocada pelo ácido ascórbico quando presente em amostras biológicas. Atualmente, a enzima ascorbato oxidase é comumente utilizada para eliminar a interferência do ácido ascórbico na reação de óxido-redução. Comparando-se com outros tipos de tratamentos

para eliminar a interferência causada pelo ácido ascórbico, como o cloreto férrico, nitrato de sódio, periodato de sódio, ácido bórico e íon férrico, somente a enzima ascorbato oxidase mostrou completa eficiência (Inamdar e cols., 1991; Petrarulho e cols., 1990; Rolton e cols., 1989). No entanto, Kayamori e cols. (2000) relataram que o uso desta enzima tem várias desvantagens, tais como elevado custo, variação de lote para lote e baixa estabilidade e sugeriu que seqüestradores de radicais livres foram mais eficientes à neutralização do ácido ascórbico em amostras clínicas. Assim, enquanto não surge no mercado uma formulação mais resistente ao efeito interferente do ácido ascórbico para a determinação de ácido úrico e bilirrubina, sugerimos que o consumo de vitamina C seja interrompido 48 a 72 h antes da coleta de sangue para a realização dos exames quando doses $\geq 0,5$ g forem ingeridas.

Com base na meia-vida do ácido ascórbico e na informação descrita por Fossati e cols. (1980), muitos laboratórios fabricantes de reagentes preconizam um tempo de 90 min para que ocorra a oxidação do ácido ascórbico presente nas amostras, e os ensaios possam ser repetidos em segurança. Demonstramos, pelas sucessivas determinações realizadas 6, 12, 24, 48 e 72 h após a adição do ácido às amostras, que o tempo de repouso necessário foi dependente da quantidade de ácido ascórbico presente na amostra. Verificamos que um significativo nível de interferência ainda persistiu, inclusive por 72 h na determinação de ácido úrico, quando 40,0 mg/dL de ácido ascórbico foi adicionado (Tabela 13 e Figura 6). Os parâmetros colesterol total, glicose e triglicerídeos também mostraram importantes níveis de interferência até 48 h após a adição do ácido. Assim, enquanto alguns autores sugerem o repouso das amostras por um determinado período de tempo para eliminar a interferência do ácido ascórbico, nossos resultados mostraram que a interferência persiste por longo tempo, sendo diretamente proporcional à concentração de ácido ascórbico presente na amostra.

Esses resultados nos levaram a investigar a possível interferência pelo ácido dehidroascórbico, primeiro produto de oxidação do ácido ascórbico, e a estabilidade do ácido ascórbico em amostras de soro. Realizamos, então, experimentos *in vitro* adicionando-se o ácido dehidroascórbico às amostras antes das determinações bioquímicas. Verificou-se que o ácido dehidroascórbico não interferiu nas reações de Trinder em concentrações fisiologicamente possíveis de serem encontradas (resultados não mostrados). No entanto, não

podemos desconsiderar que outros sub-produtos da oxidação do ácido ascórbico, que ainda apresentam potencial redutor, possam causar interferência negativa (Kimoto e cols., 1993). Esses resultados sugerem que o ácido ascórbico parece ser mais estável no soro do que em solução aquosa e, assim, ser a causa da interferência. Realmente, nossos resultados mostraram que o ácido ascórbico no soro apresenta uma meia-vida de aproximadamente 15 h, determinado por CLAE, e de aproximadamente 48 h juntamente com outros produtos de oxidação, determinado por método colorimétrico (Fig. 7), muito superior, portanto, à meia-vida do ácido ascórbico em solução aquosa. Sevanian e cols. (1985) demonstraram que o ácido úrico, em concentração fisiológica, aumentou a estabilidade do ácido ascórbico no soro humano em aproximadamente 5 vezes. *In vitro* o ácido úrico protegeu o ácido ascórbico da oxidação induzida pelo ferro e, em menor extensão, da oxidação induzida pelo pH. Em ambas as situações, no soro e em tampão, o ácido úrico exerceu seu efeito protetor sem que ocorresse a sua própria oxidação. Isto sugere um importante papel fisiológico do ácido úrico na preservação do ácido ascórbico no sangue e em outros fluidos biológicos (Sevanian e cols., 1985).

A estimativa em países industrializados é de que aproximadamente 25 a 40% da população faça uso de suplemento vitamínico (Bridgen e cols., 1992; Simon e cols., 1993; Subar e Block, 1990), sendo a vitamina C o principal componente nestes suplementos. Quando os níveis teciduais de ácido ascórbico encontram-se saturados, o nível plasmático eleva-se e o excesso de vitamina é facilmente excretado através dos rins, devido ao seu baixo limiar de excreção renal. Como consequência, é elevada a incidência de amostras de urina com grande quantidade de ácido ascórbico, o qual interfere de forma significativa na detecção de glicose e hemoglobina urinárias mediadas por reações de óxido-redução (Dae e Juell, 1983; Zweig e Jackson, 1986; Bridgen e cols., 1992; Rodrigues e cols., 1997). O ácido ascórbico, uma vez presente em amostras de urina, também pode interferir na determinação de leucócitos, bilirrubina e nitrato urinários (Kaplan e Pesce, 1996).

Bridgen e cols. (1992) relataram uma incidência de 22,8% de amostras de urina positivas para ácido ascórbico. Esta incidência foi considerada como resultado de suplementação vitamínica e não pela dieta normal dos indivíduos. Um estudo realizado com

516 pacientes atendidos no Laboratório de Análises Clínicas do HU-UFSC demonstrou, também, uma elevada incidência de amostras com vitamina C (36,5%). No entanto, não foi identificada a origem, alimentar ou pela suplementação, dos níveis urinários superiores a 20 mg/dL de ácido ascórbico detectados pela tira Rapignost Total Screen (Martinello e cols., 2000). Diante desses resultados, é importante verificar o verdadeiro grau de interferência do ácido ascórbico em amostras coletadas após a ingestão de diferentes doses de vitamina C.

Avaliamos, então, o grau de interferência urinária do ácido ascórbico considerando o tempo de eliminação e a quantidade de vitamina C ingerida. A vitamina C suplementar foi consumida durante 7 dias consecutivos. Após esse período de tempo consideramos que o “pool” corpóreo máximo tenha sido atingido e a conseqüente eliminação do excesso pela urina. Após a interrupção da ingestão suplementar de 0,15 e 0,25 g/d de vitamina C, o excesso de ácido ascórbico absorvido e acumulado foi eliminado nas primeiras 24 h, enquanto que para doses maiores, como 0,5 a 4,0 g/d, o retorno aos níveis basais ocorreu somente após 48 h (Fig.4A). Zweig e Jackson (1986) relataram concentrações semelhantes de ácido ascórbico urinário em amostras de indivíduos que consumiram 350 e 1000 mg/d, inclusive com uma grande variação intra-individual.

As concentrações de ácido ascórbico nas amostras de urina foram suficientemente elevadas para inibir as reações para detecção de glicose e hemoglobina (Tabelas 5 a 12). O grau de interferência foi dependente das quantidades de ácido ascórbico e glicose presentes, como já fora previamente descrito por outros autores (Bridgen e cols., 1992; Rodrigues e cols., 1997; Zweig e Jackson, 1986). A quantidade de ácido ascórbico na urina foi dependente, por sua vez, da dose de vitamina C consumida e do tempo em que a amostra foi coletada após a ingestão. Assim, amostras de urina adicionadas de pequenas quantidades de glicose e hemoglobina sofreram importantes interferências mesmo quando baixas doses de vitamina C foram ingeridas, sendo que a inibição das reações ocorreu mais intensamente, e principalmente, nas amostras coletadas 4 e 12 h após a ingestão de vitamina C (Tabelas 5, 6, 8 e 9). As amostras de urina obtidas 4 h após a ingestão de uma dose de vitamina C são representativas de amostras coletadas aleatoriamente ao longo do dia e aquelas obtidas 12, 24 e 48 horas representam a primeira urina da manhã, a qual é normalmente utilizada na rotina de urinálise. É

interessante observar que houve apenas uma pequena diferença no grau de interferência entre as amostras de 4 e 12 h, possivelmente por se tratar de amostras mais concentradas que acumularam todo o ácido ascórbico urinário eliminado nesses períodos de tempo.

Doses de vitamina C tão baixas quanto 0,15 e 0,25 g/d provocaram importantes interferências nas reações de glicose e hemoglobina, inclusive 12 h após a ingestão (Tabela 6). Naturalmente, as doses de vitamina C maiores (0,5 a 4 g/d) inibiram ainda mais efetivamente essas reações, tanto em relação à inibição de reações com grande quantidade dos analitos, como também em relação à inibição em amostras coletadas 24 e 48 h após a ingestão da vitamina, devido ao maior tempo necessário para a eliminação de grandes doses de ácido ascórbico. As amostras de urina coletadas 24 h após a ingestão de vitamina C ainda continham ácido ascórbico suficiente para tornar negativas as reações em nível de traço e 1+ de glicose e hemoglobina, respectivamente (Tabela 7 e 10).

A reação de pseudo-peroxidase da hemoglobina foi mais sensível ao efeito inibitório do ácido ascórbico do que a reação de oxidase/peroxidase (Trinder) da glicose, provavelmente por estar em menor quantidade na amostra ou porque a reação de glicose contém iodeto de potássio. Pela maior sensibilidade e devido à eliminação mais lenta do ácido em alguns indivíduos, algumas amostras de urina ainda apresentaram interferência inclusive 48 h após a ingestão de altas doses de vitamina C, principalmente quando pequenas concentrações de hemoglobina estavam presentes nas amostras de urina (Tabela 11).

Procuramos verificar se o efeito interferente do ácido ascórbico diminuiria pela auto-oxidação com o decorrer do tempo após a coleta das amostras. Ensaio realizado 6 h após a coleta das amostras de urina, que permaneceram a 4°C, demonstraram que os resultados relativos à detecção de glicose e hemoglobina foram semelhantes aos obtidos 1-2 h após a coleta (Tabelas 6, 9 e 12), sugerindo assim, a necessidade de se esperar um tempo superior a 6 h para evitar o efeito inibitório do ácido ascórbico. Portanto, essa parece ser uma medida inadequada para contornar o problema da interferência na rotina de urinálise.

Apesar de se conhecer há longo tempo a capacidade do ácido ascórbico de inibir as

reações de glicose e hemoglobina urinárias e de que algumas formulações de tiras reagentes podem ser modificadas para diminuir a interferência (Bridgen e cols., 1992; Daae e Juell, 1983; Smalley e Bradley, 1985; Zweig e Jackson, 1986), nosso trabalho demonstrou que o problema ainda persiste, principalmente em amostras de indivíduos e pacientes que fazem uso de suplemento oral de vitamina C e que apresentam níveis de ácido ascórbico iguais ou maiores do que 10 mg/dL (0,57 mmol/L). A tira reagente Multistix 10SG foi mais resistente do que a tira Rapignost T-S (Tabelas 5 a 11), possivelmente pelo fato dessa última indicar a presença do ácido ascórbico (1+ equivale a 0,57 mmol/L), e assim, não utilizar uma formulação de reagentes mais resistentes ao efeito inibitório do ácido. Como por exemplo, a tira Multistix apresenta em sua composição o iodeto de potássio, que tem a função de oxidar o ácido ascórbico diminuindo assim, o seu efeito interferente. Apesar disso, essa tira ainda mostrou ser sensível ao efeito interferente do ácido ascórbico. Cabe ressaltar que resultados falso-negativos para a glicosúria são altamente indesejáveis, como é o caso dos pacientes diabéticos, os quais muitas vezes se encontram sob suplementação vitamínica. Considerando que estes pacientes, freqüentemente, precisam medir a glicosúria para a monitoração da glicemia, a diferença entre uma falsa reação negativa por um lado, e uma positiva (ou fracamente positiva) por outro, é muito importante, pois pode afetar o controle da doença.

A detecção de sangue na urina é, na maioria dos casos, indicativa de lesão renal e por isso a sua determinação precoce é importante para o diagnóstico e tratamento da patologia relacionada, principalmente em pacientes idosos (Britton e cols., 1989, Messing e cols., 1987). A interferência provocada pelo ácido ascórbico nas reações para a hemoglobina pode, portanto, provocar sérias conseqüências para esses pacientes. As implicações para a rotina de urinálise serão ainda maiores se considerarmos o fato de que alguns laboratórios não realizam o exame microscópico da urina quando os exames físico e químico pela tira reagente fornecem resultados normais (High e cols., 1988; Shaw e cols., 1985; Wenz e Lampasso, 1989).

Alguns analistas clínicos preocupados com a interferência do ácido ascórbico procuram utilizar tiras reagentes que sejam mais resistentes ou que detectam a presença do ácido, como é o caso da tira Rapignost Total-Screen e Medi-Test, entre outras. Os nossos resultados sugerem a introdução de uma terceira forma de contornar o problema, ou seja, pela

interrupção da ingestão de vitamina C 24 h antes da coleta da amostra, no caso de pequenas doses (menores do que 0,5 g/d), ou 72 h quando a dose ingerida for igual ou maior do que 1,0 g por dia.

Ao compararmos o grau de interferência urinária do ácido ascórbico *in vitro* utilizando diferentes marcas de tiras reativas com relação a alguns parâmetros urinários verificamos que não houve uma marca com destacada resistência ou sensibilidade. Houve comportamentos diferentes entre os analitos para a sensibilidade ao ácido ascórbico, variando ainda entre as diferentes marcas. Em geral, todos os analitos estudados sofreram interferência e a inibição das reações foi proporcional à concentração de ácido ascórbico na amostra. Todas as tiras analisadas utilizam o sistema de reação enzimático oxidase/peroxidase específico para a determinação de glicose e pseudo-peroxidase para hemoglobina. Os resultados de interferência do ácido ascórbico na determinação de glicose e hemoglobina urinárias, obtidos *in vitro*, foram semelhantes à interferência ocorrida *in vivo*. Apesar da existência de iodeto de potássio, a tira Multistix mostrou ser tão sensível quanto as demais ao efeito interferente do ácido ascórbico na determinação de glicose urinária.

O ácido ascórbico também interferiu na determinação de nitrito urinário (Tabela 17). Quando comparadas entre si, as tiras reativas mostraram-se semelhantes quanto à sensibilidade ao efeito interferente do ácido ascórbico. Na determinação de nitrito pela técnica de diazotização a enzima ascorbato oxidase é capaz de diminuir a interferência do ácido ascórbico para níveis tolerantes de interferência (Riise e Berg-Nielsen, 1990). A identificação de nitrito na urina, como produto de degradação do nitrato por bactérias, é importante para a triagem de infecções urinárias, principalmente naqueles laboratórios que não utilizam a microscopia do sedimento urinário em amostras que se apresentam normais para os resultados dos exames químicos. Desta forma, a presença de ácido ascórbico na amostra de urina pode mascarar a identificação de infecções, impedindo o tratamento precoce do paciente.

Um dos achados mais frequentes no exame parcial de urina é a leucocitúria, o que indica uma possível infecção do trato urinário. Esta prova tem a vantagem ainda de selecionar amostras para cultura (Strasinger, 1996). No entanto, os resultados mostraram que o ácido

ascórbico interferiu nesta reação, mas não de forma suficientemente elevada a ponto de modificar o diagnóstico clínico, pois praticamente não houve inibição completa da reação (Tabela 18). Normalmente, não existem quantidades detectáveis de bilirrubina na urina, inclusive pequenos níveis (traços) de bilirrubina são suficientes para sugerir uma posterior investigação, principalmente em relação às doenças hepatobiliares. Assim, resultados falsamente diminuídos pela presença de ácido ascórbico, demonstrados na Tabela 19, podem ser altamente prejudiciais aos pacientes.

Para prevenir resultados falso-negativos é importante a utilização de tiras reativas que contenham um indicador para o ácido ascórbico, ou então a utilização de tiras que apresentam maior resistência à interferência pelo ácido ascórbico, como exemplo pela incorporação da enzima ascorbato oxidase ao sistema de reação. Este processo tem sido utilizado também pelos fabricantes de "kits" para as determinações de alguns analitos plasmáticos. No entanto, não sabemos, ainda, qual a quantidade de enzima oxidase necessária à inibição de diferentes concentrações de ácido ascórbico. Sugerimos para trabalhos futuros a pesquisa de substâncias inibidoras do ácido ascórbico ou quantidade suficiente da enzima ascorbato oxidase.

Apesar dos inúmeros estudos demonstrando a interferência negativa provocada pelo ácido ascórbico nos ensaios laboratoriais, principalmente naqueles que são baseados no sistema de reação oxidase/peroxidase, confirmados e ampliados pelos nossos resultados, o mecanismo da interferência nas reações com 4-aminofenazona e compostos fenólicos encontra-se pouco esclarecido. Alguns autores sugerem que o ácido ascórbico interfere nestas reações por consumir o peróxido de hidrogênio necessário para oxidar o cromógeno, no entanto não apresentam resultados em relação às outras possibilidades de interferência, tais como, redução do cromógeno oxidado ou reação com a 4-aminofenazona, composto fenólico, e/ou peroxidase (Gochman e Schmitz, 1971; Fossati e cols., 1980; Sharp, 1972; Maguire e Price, 1983).

Nossos resultados demonstraram que a principal via de interferência do ácido ascórbico na reação de Trinder com 4-aminofenazona e compostos fenólicos foi pelo consumo do peróxido de hidrogênio. A enzima peroxidase reage primeiro, e extremamente rápido, com o peróxido de hidrogênio para formar o "composto I", identificado espectrofotometricamente

como um heme complexo intermediário. Em seguida, a peroxidase reage com uma grande variedade de substratos, inclusive com o ácido ascórbico, com diferentes ordens de magnitude (Chance, 1943). Assim, o ácido ascórbico pode competir com a 4-aminofenazona pelo peróxido/peroxidase. Realmente, o ácido ascórbico é, possivelmente, um substrato mais ativo para a peroxidase na presença de peróxido de hidrogênio do que a 4-aminofenazona e os compostos fenólicos, pois a adição de grandes quantidades desses componentes não removeu a interferência causada pelo ácido ascórbico (Tabela 20). Na tentativa de demonstrar a velocidade de reação entre o ácido ascórbico e o peróxido de hidrogênio catalisada pela peroxidase, verificamos a cinética dessa reação em tampão fosfato monitorando a absorvância do ácido ascórbico em 268 nm (Fig. 10). Os resultados demonstraram uma velocidade de oxidação do ácido ascórbico de aproximadamente 100 seg na presença de 1000 U/L de peroxidase, concentração normalmente utilizada nos "kits". A oxidação do ácido ascórbico e a concomitante redução do peróxido de hidrogênio envolve dois elétrons (White-Stevens, 1982). Considerando uma estequiometria de 1:1 entre ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio, este também foi o tempo necessário para a redução, ou consumo, do peróxido. Com 5 vezes mais peroxidase no sistema a oxidação foi 2 vezes mais rápida, 50 seg. No entanto, com um sistema completo para a formação do cromógeno oxidado, a presença de uma quantidade maior de peroxidase não reverteu a interferência causada pelo ácido ascórbico (Tabela 20). O monitoramento da oxidação do ácido ascórbico, e a concomitante redução do peróxido de hidrogênio, na reação de Trinder não foi possível de ser acompanhada devido à sobreposição dos espectros de absorvância em 268 nm (Fig. 12). Assim, verificamos a velocidade de reação entre o peróxido de hidrogênio, a 4-aminofenazona e o composto fenólico, catalisada pela peroxidase, através do monitoramento da formação do cromógeno oxidado, em 505 nm, na ausência e na presença de ácido ascórbico. Essa reação se processou num tempo relativamente pequeno, cerca de 25-50 seg, independente do composto fenólico envolvido. Curiosamente, o ácido ascórbico diminuiu a formação do cromógeno oxidado sem modificar a cinética da reação, sendo que a interferência ocorreu nos 25-50 seg iniciais (Fig. 11). As diferentes velocidades de oxidação do ácido ascórbico pelo peróxido de hidrogênio/peroxidase, em sistema isolado e juntamente com outros substratos para a peroxidase, sugerem que o ácido ascórbico pode apresentar um mecanismo adicional e concomitante de interferência na reação de Trinder, além do consumo de peróxido de hidrogênio. Como já comentado anteriormente, o

ácido ascórbico não reagiu com outros componentes da reação de Trinder (Tabela 20), o que impediria assim, a formação do cromógeno colorido. Isto foi confirmado também pela observação dos espectros de absorvância (Fig. 18), onde ficou evidenciado que o ácido ascórbico inibiu a formação do cromógeno oxidado com absorvância máxima em 490-510 nm, sem formar nenhum composto com absorvância em outro comprimento de onda. Utilizando outros compostos cromógenos, como a 3-metil-2-benzotiazolinona-hidrazona (MBTH), White-Stevens e Stover (1982) demonstraram que o ácido ascórbico interferiu por reagir com a MBTH.

Uma forma adicional de interferência do ácido ascórbico na reação de Trinder pode ser pela redução do cromógeno formado, conforme especulado por Fossati e cols. (1980). Nossos resultados demonstraram que o ácido ascórbico adicionado após a formação do cromógeno oxidado realmente diminuiu a quantidade do cromógeno colorido (Fig. 20). Porém, o baixo percentual de redução e o tempo necessário para tal (aprox. 10-15 min) não justificariam totalmente a interferência causada pelo ácido ascórbico. Este mecanismo ocorre, por exemplo, com cromógenos que apresentam um potencial de óxido-redução maior que o do ácido ascórbico, como a o-toluidina, criando um ciclo de formação do cromógeno oxidado e imediata redução do mesmo pelo ácido ascórbico (White-Stevens, 1982).

É interessante notar que a interferência do ácido ascórbico na cinética de reação envolvendo a primeira parte da reação de Trinder, com a adição de soro humano e a geração do peróxido de hidrogênio, foi diferente para os vários analitos bioquímicos estudados. Enquanto na reação de ácido úrico, o ácido ascórbico interferiu pelo impedimento da formação do cromógeno oxidado sem modificar a velocidade de formação deste (Fig. 13), para a reação de glicose, colesterol total e triglicérides ocorreu a existência de uma fase “lag” para a formação do cromógeno colorido (Figs. 14, 15 e 16). A extensão da fase “lag” foi diretamente proporcional à quantidade de ácido ascórbico e inversamente proporcional à quantidade de amostra, e conseqüentemente de peróxido de hidrogênio no sistema (Fig. 17). A formação do cromógeno colorido, provavelmente, ocorreu somente quando não havia mais ácido ascórbico no sistema. Apesar da pouca probabilidade e da falta de evidências de uma reação entre o ácido ascórbico e as oxidases, nossos resultados (Fig. 14), e de outros pesquisadores (Maguire

e Price, 1983), demonstrando existir uma associação entre a extensão da fase “lag” e a quantidade de glicose oxidase no sistema, sugerem que essa possibilidade dever ser melhor investigada. No momento, a explicação mais plausível para a existência da fase “lag” provocada pelo ácido ascórbico parece ser a velocidade com que as oxidases específicas atuam sobre os substratos (analitos) gerando o peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio gerado numa pequena velocidade parece favorecer a sua reação com o ácido ascórbico, formando a fase “lag”, ao invés de reagir com o cromógeno. Nos sistemas de reações em que o peróxido de hidrogênio foi formado rapidamente, pela característica da oxidase específica (Figs. 13 e 15), ou pela adição de peróxido ao sistema (Fig. 11) não se observou a presença da fase “lag”. Nas cinéticas de reação de colesterol e triglicérides, a extensão da fase “lag” não esteve associada com a quantidade de oxidases, provavelmente, porque estas reações dependem, também, da velocidade de outras enzimas. Considerando uma mesma relação molar ácido ascórbico:analitos, coincidentemente, a presença da fase “lag” não modificou o nível final de interferência causada pelo ácido ascórbico para os diferentes analitos (Figs. 13 a 16 e Fig. 19). Assim, métodos cinéticos são potencialmente mais susceptíveis à interferência deste tipo e o grau de interferência na determinação dos analitos dependerá da concentração da enzima e do tempo pelo qual a reação é monitorada. Uma solução para este problema pode ser o uso de métodos de ponto final, no qual a interferência observada é mínima com pequenas concentrações de ácido ascórbico, ou usar métodos que não sofrem interferência (Maguire e Price, 1983). Podemos concluir, então, que o principal mecanismo de interferência do ácido ascórbico na reação de Trinder utilizando a 4-aminofenazona e compostos fenólicos, como DHBS, fenol e diclorofenol, foi pelo consumo do peróxido de hidrogênio, sendo que esta reação entre o ácido ascórbico e o peróxido/peroxidase é favorecida, ou aumentada, pela presença dos demais constituintes da reação, provocando assim, a interferência negativa.

Finalmente, a normalização dos resultados do percentual de interferência negativa em termos molares ácido ascórbico:analitos para os diferentes parâmetros bioquímicos que utilizam a reação de Trinder demonstrou que os ensaios sofreram o mesmo grau de interferência, independente do tipo de composto fenólico utilizado (Fig. 19). Estes resultados confirmaram, de forma definitiva, que a diferença no nível de interferência provocada pelo ácido ascórbico nos diferentes analitos bioquímicos, particularmente uma maior interferência

nos ensaios para ácido úrico (Fig. 5), deve-se à quantidade de analito presente no sistema de reação, e à conseqüente menor quantidade de peróxido de hidrogênio gerado, e não ao tipo de composto fenólico utilizado, no caso o DHBS, como havia sido sugerido por outros autores. Além disso, a significativa interferência na reação para o ácido úrico poderia ser devida ao maior volume de soro utilizado nos sistemas de reação (20 μ L), e assim também, uma maior concentração de ácido ascórbico, em comparação com os demais analitos bioquímicos que utilizam 10 μ L. No entanto, os níveis de interferência mostraram ser semelhantes para ensaios que utilizam 20 ou 10 μ L (Fig. 19B), confirmando que a interferência está relacionada à concentração de analito e ácido ascórbico no sistema.

Os resultados do estudo do mecanismo de interferência do ácido ascórbico nas reações de Trinder, que utilizam a 4-aminofenazona e compostos fenólicos, demonstraram que estes constituintes são resistentes ao efeito inibitório, ou seja, não reagem com o ácido ascórbico e o cromógeno formado não é susceptível à redução. Portanto, a interferência pode ser evitada pela adição de substâncias inibidoras do ácido ascórbico.

Em suma, os resultados deste trabalho demonstraram que o ácido ascórbico continua a interferir de forma significativa nos ensaios laboratoriais para a determinação de parâmetros bioquímicos séricos e urinários, podendo dessa forma, modificar o diagnóstico clínico laboratorial. Portanto, cabe a todos os profissionais de saúde envolvidos, fabricantes de reagentes, médicos e analistas clínicos, a introdução de métodos para minimizar os efeitos interferentes do ácido ascórbico, como por exemplo, a adição de componentes que inibam a ação do ácido ascórbico, a orientação aos pacientes para suspender o consumo de vitamina C alguns dias antes da realização dos exames e, a utilização de "kits" e tiras reagentes que sejam resistentes ou detectam o ácido ascórbico.

7. CONCLUSÕES

- Os níveis séricos e urinários de ácido ascórbico aumentaram significativamente após a ingestão de 0,15 a 4,0 g/d de vitamina C, sendo que essas concentrações de ácido ascórbico foram suficientemente elevadas para causar interferências importantes na determinação sérica de ácido úrico e bilirrubina total e na detecção de glicose e hemoglobina urinárias até 24 e 48 h após a ingestão;
- Os "kits" das marcas Bioclin, Biodiagnóstica, BioSystems, Celm e Labtest e as tiras reativas para urinálise das marcas Combur, MediTest, Multistix e Rapignost Total Screen apresentaram sensibilidades semelhantes entre si ao efeito interferente do ácido ascórbico *in vitro* em relação à determinação de ácido úrico, bilirrubina, colesterol total, glicose e triglicerídeos séricos e glicose, hemoglobina, bilirrubina, nitrito e leucócitos urinários, respectivamente;
- A ordem de interferência negativa do ácido ascórbico nos parâmetros bioquímicos séricos baseados na reação de Trinder foi: ácido úrico > triglicerídeos > colesterol total > glicose. Os diferentes graus de interferência foram devidos às quantidades dos analitos na amostra e à conseqüente quantidade de peróxido de hidrogênio formado no sistema;
- Dependendo da concentração de ácido ascórbico e do analito bioquímico na amostra, o ácido ascórbico pode ainda interferir de forma significativa por até 72 h;
- O resultados dos estudos sobre o mecanismo da interferência do ácido ascórbico nas reações baseadas no sistema oxidase/peroxidase utilizando a 4-aminofenazona e compostos fenólicos demonstraram que o ácido ascórbico interferiu por consumir o peróxido de hidrogênio e não por interagir com os constituintes da reação ou por reduzir o cromógeno oxidado formado.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARO, A., KYLLÄSTINEN, M., KOSTIAINEN, E., GREF, C., ELFVING, S., UUSSITALO, U. No effect on serum lipids by moderate and high doses of vitamin C in elderly subjects with low plasma ascorbic acid levels. **Ann. Nutr. Metabol.** v. 32, p. 133-137, 1988.
- BADRICK, T. C., CAMPBELL, B. Effects of intravenous infusion of ascorbate on clinical chemistry tests. **Clin. Chem.** v. 38, n. 10, p. 2160, 1992.
- BANKSON, D. D.; RESTIN, M.; RIFAI, N. Role of free radical in cancer and atherosclerosis. **Clin. Lab. Med.** v. 13, p. 463, 1993.
- BERG, B. Ascorbate interference in the estimation of urinary glucose by test strips. **J. Clin. Chem. Clin. Biochem.** v. 24, p. 89-96, 1986.
- BESER, E. The effects of short-term vitamin C on plasma BUN, uric acid, cholesterol and triglycerides levels. **Acta Med. Hung.** v. 48, p. 73-78, 1991.
- BASU, T. K., SCHORAH, C. J.; **Vitamin C in health and disease.** Westport CT, AVI, 1982.
- BISHOP, M. L., DUBEN-ENGELKIRK, J. L., FODY, E. P. **Clinical Chemistry. Principles, Procedures, Correlations.** 3rd. ed. Philadelphia, PA, Lippincott Com., 1996.
- BRANDY, R., GUYER, K. E., BANKS, W. L. Urinary glucose and vitamin C. **Am. J. Clin. Path.** v. 6, p. 592, 1977.
- BRIDGEN, M. L. Unorthodox therapy and your cancer patient. **Postgrad. Med.** v. 81, p. 271-280, 1987.
- BRIGDEN, M. L., EDGELL, D., MCPHERSON, M., LEADBEATER, A.; HOAG, G. High incidence of significant urinary ascorbic acid concentrations in a West Coast population – Implications for routine urinalysis. **Clin. Chem.** v. 38, n. 3, p. 426-431, 1992.
- BRIN, M. Nutritional and health aspects of ascorbic acid. In: **Ascorbic acid: chemistry, metabolism and uses.** Washington, American Chemical Society, 1982.
- BRITTON, J. P., DOWELL, A. C.; WHELAN, P. Dipstick haematuria and bladder cancer in men over 60: results of a community study. **Br. Med. J.** v. 299, p. 1010-1012, 1989.
- CAMERON, E. Protocol for use of vitamin C in treatment of cancer. **Med. Hypotheses** v. 36, p. 190-194, 1991.
- CAMERON, E., PAULING, L., LEIBOVITZ, B. Ascorbic acid and cancer: A review. **Cancer Res.** v. 39, p. 663, 1979.
- CARR, A. C., FREI, B. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 69, p. 1086-1107, 1999.

- CHANCE, B. The kinetics of the enzyme-substrate compound of peroxidase. **J. Biol. Chem.**, v. 151, p. 553-577, 1943.
- COMBS, G. F. Jr. **The Vitamins Fundamental Aspects in Nutrition and Health**. 2nd ed., Academic Press, New York, p. 246-275, 1998.
- DAAE, L. N. W., JUELL, A. Ascorbic acid and test strip reactions for haematuria. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.** v. 43, p. 267-269, 1983.
- DRISKELL, J. A. Water soluble vitamins. In: **Nutritional Aspects of Aging**. Boca Raton, FL. CRC Press, 1986.
- ENSTROM, J. E., KANIM, L. E., KLEIN, M. A. Vitamin C intake and mortality among a sample of the United States population. **Epidemiology** v. 3, p. 194, 1992.
- FITURI, N., ALLAWI, N., BENTLEY, M., COSTELLO, J. Urinary and plasma oxalate during ingestion of pure ascorbic acid: a re-evaluation. **Eur. Urol.** v. 9, n. 5, p. 312-315, 1983.
- FOSSATI, P., PRENCIPE, L., BERTI, G. Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. **Clin. Chem.** v. 26, n. 2, p. 227-231, 1980.
- FREEMANTLE, J., FREEMANTLE, M. J., BADRICK, T. Ascorbate interferences in common clinical assays performed on three analyzers. **Clin. Chem.** v. 40, p. 950-951, 1994.
- FREI, B., ENGLAND, L., AMES, B.N. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* v. 86, p. 6377-6381, 1989.
- GILMAN, A. G. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 8th ed., New York, Pergamon Press, p. 1548, 1990.
- GOCHMAN, N., SCHMITZ, J.M. Automated determination of uric acid, with use of a uricase-peroxidase system. **Clin. Chem.** v. 17, n. 12, p. 1154-1159, 1971.
- GOCHMAN, N., SCHMITZ, J.M. Application of a new peroxide indicator reaction to the specific, automated determination of glucose with glucose oxidase. **Clin. Chem.** v. 18, n.9, p. 943-950, 1972.
- HABER, F., WEISS, J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. **Proc. R. Soc. London A.** v. 147, p. 332-351, 1934.
- HARPER, H. A.: The water-soluble vitamins. In: **Review of Physiological Chemistry**. Los Altos, CA, Lange Medical Publications, p. 159, 1979.

- HERBERT, V. The antioxidant supplement myth. **Am. J. Clin. Chem.** v. 60, p. 157, 1994.
- HIGH, S. R., ROWE, J. A., MAKSEM, J. A. Macroscopic physicochemical testing for screening urinalysis. **Lab. Med.** v. 19, p. 174-176, 1988.
- HIRATA, F., HAYAISHI, O. Studies of indoleamine 2,3-dioxygenase I. Superoxide anion as substrate. **J. Biol. Chem.** v. 250, p. 5960-5966, 1975.
- HORNIG, D. H., MOSES, U., GLATTHAAR, B. E. Ascorbic acid. In: **Modern nutrition in health and disease**. 7th ed. Philadelphia, Lea & Febriger. p. 417-435, 1988.
- INAMDAR, K. V., RAGHAVAN, K. G., PRADHAN, D. S. Five treatment procedures evaluated for the elimination of ascorbate interference in the enzymatic determination of urinary oxalate. **Clin. Chem.** v. 37, n. 6, p. 864-868, 1991.
- JACOB, R. A., OTRADOVEC, C. L., RUSSEL, R. M. Vitamin C status and nutrient interactions in a healthy elderly population. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 48, p. 1436-1442, 1988.
- JACOB, R. A., MILNE, D. B. Biochemical assessment of vitamins and trace metals. **Clin. Lab. Med.** v. 13, p. 371, 1993.
- JACQUES, P. F., HARTZ, S. C., MCGANDY, R. B., JACOB, R. A., RUSSEL, R. M. Ascorbic acid, HDL, and total plasma cholesterol in the elderly. **J. Am. Col. Nutr.** v. 6, p. 169-174, 1987.
- JACQUES, P. F., SULSKY, S. I., PERRONE, G. A., SCHAEFER, E. J. Ascorbic acid and plasma lipids. **Epidemiology** v. 5, p. 19, 1994.
- JOHNSON, J.D., OVERBY, R. Stabilized neutral *ortho*-tolidine, SNORT, colorimetric method for chlorine. **Anal. Chem.** v. 41, p. 1744-1750, 1969.
- KABASAKALIAN, P., KALLINEY, S., WESTCOTT, A. Determination of uric acid in serum, with use of uricase and a tribromophenol-aminoantipyrine chromogen. **Clin. Chem.** v. 19, n. 5, p. 522-524, 1973.
- KALLNER, A. B., HARTMANN, D., HORNIG, D. H. On the requirements of ascorbic acid in man: steady-state turnover and body pool in smokers. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 34, p. 1347-1355, 1981.
- KAPEGHIAN, J. C., VERLANGIERI, A. J. The effects of glucose on ascorbic acid uptake in heart endothelial cells: possible pathogenesis of diabetic angiopathies. **Life Sci.** v. 34, p. 577-584, 1984.
- KAPLAN, L. A., PESCE, A. J. **Clinical Chemistry** 3rd. ed. St. Louis, Mosby, 1996.

- KAYAMORI, Y., KATAYAMA, Y., URATA, T. Nonenzymatic elimination of ascorbic acid in clinical samples. **Clin. Biochem.** v. 33, n. 1, p. 25-29, 2000.
- KIMOTO, E., TANAKA, H., OHMOTO, T., CHOAMI, M. Analysis of the transformation products of dehydro-L-ascorbic acid by ion-pairing high-performance liquid chromatography. **Anal. Biochem.** v. 214, p. 38-44, 1993.
- LEVER, M., POWELL, J.C., KILLIP, M., SMALL, C.W. A comparison of 4-hydroxybenzoic acid hydrazide (PAHBAH) with other reagents for the determination of glucose. **J. Lab. Clin. Med.** v. 82, n. 4, p. 649-655, 1973.
- LUNEC, J. Oxygen radicals: Their measurement and role in major diseases. **J. Int. Clin. Chem.** v. 4, p. 58, 1992.
- MAGUIRE, G. A., PRICE, C. P. Evidence for interference by ascorbate in the measurement of cerebrospinal fluid glucose by a kinetic glucose oxidase/peroxidase procedure. **Clin. Chem.** v. 29, n. 10, p. 1810-1812, 1983.
- MARCOVINA, S.M., GAUR, V.P., ALBERS, J.J. Biological variability of cholesterol, triglyceride, low- and high-density lipoprotein cholesterol, lipoprotein (a), and apolipoproteins A-I and B. **Clin. Chem.** v. 40, n. 4, p. 574-578, 1994.
- MARTINELLO, F., BARBOSA, M.M., STANKE, M.K. Presença de ácido ascórbico em amostras de urina de pacientes do HU-UFSC: Implicação para a rotina de urinálise. Florianópolis, SC. **Trabalho de Conclusão de Curso - Departamento de Análises Clínicas.** Trabalho não publicado. p. 27, 2000.
- McCORMICK, D. B., GREENE, H. L. Vitamins. In: **Tietz Textbook of Clinical Chemistry.** 2nd ed. Philadelphia, Pennsylvania, W.B. Saunders Co. p. 1313, 1994.
- MENNE, I. V., GREY, P. C., KOTZE, J. P., SOMMERS, D. K., BROWN, J. M., SPIES, J. H. Ascorbic acid and blood lipid and uric acid levels of students. **S. Afr. Med. J.** v. 49, n. 54, p. 2225-2228, 1975.
- MESSING, E. M., YOUNG, T. B., HUNT, V. B., EMOTO, S. E., WEHBIE, J. M. The significance of asymptomatic microhematuria in men 50 or more years old: finding of a home screening study using urinary dipsticks. **J. Urol.** v. 137, p. 919-922, 1987.
- MITCH, W. E., JONHSON, M. W., KIRSHENBAUM, J. M., LOPEZ, R.E. Effect of large oral doses of ascorbic acid on uric acid excretion by normal subjects. **Clin. Pharmacol.** v. 29, n. 3, p. 318-321, 1981.

- MOSTER, U., BENDISH, A. Vitamin C. In: **Handbook of Vitamins** 2nd ed. New York, Marcel Dekker, 1991.
- ORTEN, J. M., NEUHAUS, O. W. **Human Biochemistry**. St. Louis, Mosby, 1982.
- PADH, H. Vitamin C: Newer insights into its biochemical functions. **Nutr. Rev.** v. 49, n. 2, p. 65, 1991.
- PEDRAZZI, A. H. P., RODRIGUES, E. R., ZANARDO F., A. Ação redutora da vitamina C em bioquímica clínica. **Rev. Bras. Anal. Clin.** v. 30, p. 5-6, 1998.
- PESCE, M. A., BODOURIAN, S. H. Interference with the enzymic measurement of cholesterol in serum by use five reagent kits. **Clin. Chem.** v. 23, n. 4, p. 757-760, 1977.
- PETRARULHO, M., MARANGELLA, M., BIANCO, O., MARCHESINI, A., LINARI, F. Preventing ascorbate interference in ion-chromatographic determinations of urinary oxalate: four methods compared. **Clin. Chem.** v. 36, n. 9, p. 1642-1645, 1990.
- PODMORE, I.D., GRIFFITHS, H.R., HERBERT, K.E., MISTRY, N., MISTRY, P., LUNEC, J. Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. **Nature** v. 392, p. 559, 1998.
- RICE, G. K., GALT, K. A. In vitro drug interference with home blood-glucose-measurement systems. **Am. J. Hosp. Pharm.** v. 42, n. 10, p. 2202-2207, 1985.
- RIISE, E., BERG-NIELSEN, K. Improved extraction method for avoiding the interference of ascorbic acid in the spectrophotometric determination of nitrito in meat products. **Analyst** v. 115, n.9, p. 1265-1267, 1990.
- RODRIGUES, E. R., PEDRAZZI, A. H. P., FRANCO, J. J., ZANARDO F. A. Ação interferente do ácido ascórbico no doseamento da glicose sérica e urinária e do ácido úrico sérico, "in vitro". **Rev. Bras. Anal. Clin.** v. 29, n. 4, p. 220-222, 1997.
- ROE, D. A. Drug interference with the assessment of nutritional status. **Clin. Lab. Med.** v. 1, n. 4, p. 647, 1981.
- ROLTON, H. A., McCONNELL, K, N,, MODI, K, S,, McDOUGALL, A. I. A simple, rapid assay for plasma oxalate in uraemic patients using oxalate oxidase, which is free from vitamin C interference. **Clin. Chim. Acta** v. 182, n. 3, p. 247-254, 1989.
- RUSSELL, R. M., SUTER, P. M. Vitamin requirements of elderly people: An update. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 58, p. 4, 1993.
- SAUBERLICH, H. E. Methods for the assessment of nutritional status. In: **Nutritional Aspects of Aging**, Boca Raton, FL., CRC Press, 1986.

- SEVANIAN, A., DAVIES, K. J., HOCHSTEIN, P. Conservation of vitamin C by uric acid in blood. **Free Radical Biol. Med.** v. 1, n. 2, p. 117-124, 1985.
- SHARP, P. Interference in glucose oxidase-peroxidase blood glucose methods. **Clin. Chim. Acta** v. 40, p. 115-120, 1972.
- SHAW, S. T., POON, S. Y., WONG, E. T. Routine urinalysis: is the dipstick enough? **J. Am. Med. Assoc.** v. 253, p. 1596-1600, 1985.
- SIEST, G., APPEL, W., BLIJENBERG, G. B., CAPOLAGHI, B., GALTEAU, M. M., HEUSGHEM, C., HJELM, M., LAUER, K. L., LE PERRON, B., LOPPINET, V., LOVE, C., ROYER, R. J., TOGNONI, C., WILDING, P. Drug interference in clinical chemistry: studies on ascorbic acid. **J. Clin. Chem. Biochem.** v. 16, n. 2, p. 103-110, 1978.
- SIMON, J. A., SCHREIBER, G. B., CRAWFORD, P. B., FREDERICK, M. M. Dietary vitamin C and serum lipids in black and white girls. **Epidemiology** v. 4, p. 537-541, 1993.
- SINGH, P. P., KIRAN, R., PENDSE, A. K., GOSH, R., SURANA, S. S. Ascorbic acid is an abettor in calcium urolithiasis: an experimental study. **Scanning Microsc.** v. 7, n. 3, p. 1041-1048, 1993.
- SMALLEY, D. L., BRADLEY, M. E. New test for urinary glucose (BM 33071) evaluated. **Clin. Chem.** v. 31, p. 90-92, 1985.
- STANKOVA, L., RIDDLE, M., LARNED, J. Plasma ascorbate concentrations and blood cell dehydroascorbate transport in patients with diabetes mellitus. **Metabolism** v. 33, p. 347-353, 1984.
- STATLAND, B. E. Nutrition and cancer. **Clin. Chem.** v. 38, n. 8, p. 1587, 1992.
- STEIN, H. B., HASAN, A., FOX, I. H. Ascorbic acid-induced uricosuria: a consequence of megavitamin therapy. **Ann. Int. Med.** v. 84, p. 385-388, 1976.
- STEINBERG, D. Antioxidant vitamins and coronary heart disease. **N. Engl. J. Med.** v. 328, p. 1487, 1993.
- STRASINGER, S. K. **Uroanálise e Fluidos Biológicos**. 3.ed., São Paulo, Editorial Premier, 1996.
- SUBAR, A. F., BLOCK, G. Use of vitamin and mineral supplements: Demographics and amounts of nutrients consumed. The 1987 Healthy Interview Survey. **Am. J. Epidemiol.** v. 132, p. 1091-1099, 1990.
- SUMBAEV, V. V., IASINSKAIA, I. M. Effect of ascorbic acid on uric acid formation in men and animals. **WMJ** v. 69, n. 2, p. 116-120, 1997.

- TANG, Z., DU, X., LOUIE, R.F., KOST, G.J. Effects of drugs on glucose measurements with handheld glucose meters and a portable glucose analyzer. **Am. J. Clin. Pathol.** v. 113, n.1, p. 75-86, 2000.
- TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Ann. Clin. Biochem.** v. 6, p. 24-27, 1969.
- VINET, B., LETELLIER, G. The in vitro effect of drugs on biochemical parameters determined by a SMAC system. **Clin. Biochem.** v. 10, n. 1, p. 47-51, 1977.
- WENZ, B., LAMPASSO, J. A. Eliminating unnecessary urine microscopy. **Am. J. Clin. Pathol.** v. 92, p. 78-91, 1989.
- WILSON, D. M., LIEDTKE, R. R. Modified enzyme-based colorimetric assay of urinary and plasma oxalate with improved sensitivity and no ascorbate interference: reference values and sample handling procedures. **Clin. Chem.** v. 37, n. 7, p. 1229-1235, 1991.
- WHITE, A., HANDLER, P., SMITH, E.L. **Princípios de Bioquímica**, 5th ed., Rio de Janeiro, RJ, Guanabara Koogan, p. 264, 1976.
- WHITE-STEVENSON, R.H. Interference by ascorbic acid in test systems involving peroxidase. I. Reversible indicators and the effects of copper, iron, and mercury. **Clin. Chem.** v. 28, n. 4, p. 578-588, 1982.
- WHITE-STEVENSON, R.H., STOVER, L.R. Interference by ascorbic acid in test systems involving peroxidase. II. Redox-coupled indicator systems. **Clin. Chem.** v. 28, n. 4, p. 589-595, 1982.
- YAMAGUCHI, T., HASHIZUME, T., TANAKA, M., NAKAYAMA, M., SUGIMOTO, A., IKEDA, S., NAKAJIMA, H., HORIO, F. Bilirubin oxidation provoked by endotoxin treatment is suppressed by feeding ascorbic acid in a rat mutant unable to synthesize ascorbic acid. **Eur. J. Biochem.** v. 245, p. 233-240, 1997.
- YAMAZAKI, I., PIETTE, L.H. The mechanism of aerobic oxidase reaction catalyzed by peroxidase. **Biochim. Biophys. Acta** v. 77, p. 47-64, 1963.
- YAMAZAKI, I., MASON, H.S., PIETTE, L.H. Identification, by electron paramagnetic resonance spectroscopy, of free radicals generated from substrate by peroxidase. **J. Biol. Chem.** v. 235, p. 2444-2449, 1960.
- YOUNG, D. S. Effect of vitamin C on laboratory tests. **Lab. Med.** v. 14, n. 5, p. 278, 1983.
- ZOPPI, F., FENILI, D. Drug interferences in reactions for detecting hydrogen peroxide by means of peroxidase. **Clin. Chem.** v. 26, p. 1229-1230, 1980.

ZWEIG, M. H., JACKSON, A. Ascorbic acid interference in reagent-strip reactions for assay of urinary glucose and hemoglobin. **Clin. Chem.** v. 32, n. 4, p. 674-677, 1986.

9. ANEXO I



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARNA
CAMPUS UNIVERSITÁRIO - TRINDADE CEP: 88040-900 - FLORIANÓPOLIS - SC

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS

Parecer

Processo nº: 068/2000

Projeto de Pesquisa: AVALIAÇÃO DA AÇÃO INTERFERENTE DO ÁCIDO ASCÓRBICO E SEUS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO EM ENSAIOS LABORATORIAIS.

Pesquisador Responsável: Edson Luiz da Silva

Instituição: UFSC

Parecer dos Relatores:

- aprovado
- reprovado
- com pendência (detalhes pendência)*
- retirado
- aprovado e encaminhado ao CONEP

Justificativa: O projeto é bem descrito e fundamentado, contendo todas as etapas necessárias; o tema é relevante; o pesquisador revela conhecimentos sobre o assunto. Inclui toda a documentação necessária e está de acordo com os termos das Resoluções 196/96 e 251/97 e que todas as pendências foram adequadamente esclarecidas pelo pesquisador responsável. O parecer é pela aprovação do presente projeto e consentimento informado.

Informamos que o parecer dos relatores foi aprovado, por unanimidade, em reunião deste Comitê na data de 27/11/2000.

Florianópolis, 29/11/2000.


Profª Márcia Margaret Menezes Pizzichini
Coordenadora

10. ANEXO II

Composição dos “kits” de diferentes marcas comerciais utilizadas:

Ácido Úrico

Marca Comercial	Uricase U/L	POD U/L	Composto Fenólico	Cromógeno 4-AF	Tampão Fosfato/pH
Bioclin	≥ 80	≥ 660	DHBS 4 mM	1 mM	100 mM/7,5
Biodiagnóstica	20	4000	DHBS 2 mM	0,25 mM	X
Bio Systems	> 120	> 1000	DHBS 4 mM	0,5 mM	100 mM/7,8
Celm	≥ 60	≥ 150	DHBS 2 mM	0,25 mM	150 mM/7,0
Labtest	≥ 60	≥ 660	DHBS 4 mM	1 mM	50 mM/7,5

POD: peroxidase

DHBS: ácido 3,5-diclorohidroxibenzenosulfônico

4-AF: 4-aminofenazona = 4-aminoantipirina

X: não informa a concentração

Bilirrubina

Marca Comercial	Acelerador	Ácido sulfanílico	Nitrito de sódio
Bioclin	Benzoato de sódio e cafeína X	X	X
Bio Systems	Cetrimida, X	29 mM em HCl 0,2 M	58 mM
Celm	Benzoato de sódio e cafeína 0,13 M	29 mM em HCl 0,17 M	70 mM
Labtest	Benzoato de sódio e cafeína X	X	X

X: não informa a concentração

Cetrimida = brometo de alquiltrimetilamônio

Colesterol total

Marca Comercial	CE U/L	COx U/L	POD U/L	Fenol mM	Cromógeno 4-AF mM	Tampão/pH
Bioclin	≥ 500	≥ 500	1000	24	0,5	Tris/6,9
Biodiagnóstica	40	30	500	20	0,25	Fosfato 300 mM
Bio Systems	> 200	> 100	> 800	28	0,5	Pipes 35 mM/7,5
Celm	X	X	X	X	X	Tris/7,0
Labtest	≥ 250	≥ 250	≥ 1000	2,4	0,5	50 mM/7,0

CE: colesterol esterase

COx: colesterol oxidase

POD: peroxidase

X: não informa a concentração

Glicose

Marca Comercial	Gox U/L	POD U/L	Composto Fenólico	Cromógeno 4-AF mM	Tampão/pH
Bioclin	≥12000	≥1000	Fenol 100 mM	0,4	Fosfato 100 mM/7,4
Biodiagnóstica	5000	500	Hidroxibenzoato 5 mM	0,1	X
Bio Systems	> 10000	>1000	Fenol 5 mM	0,4	Fosfato 70 mM/7,5
Celm	1000000	≥1200	Fenol 55 mM	25	Tris 920 mM
Labtest	≥ 8000	≥800	Fenol 2,7 mM	0,78	100 mM/7,4

Gox: glicose oxidase

POD: peroxidase

X: não informa o tipo e a concentração

Triglicérides

Marca Comercial	Lipase U/L	GPO U/L	POD U/L	GQ U/L	Composto Fenólico	Cromógeno 4-AF	Tampão/pH
Bioclin	≥ 1000	≥ 4000	≥ 440	≥ 1000	ESPAS 1 mM	0,7 mM	50 mM/7,0
Biodiagnóstica	120000	5000	6000	500	DHBS 0,5 mM	0,5 mM	Fosfato 50 mM
Bio Systems	>100000	> 4000	> 800	> 1500	Clorofenol 6 mM	0,75 mM	Pipes 45 mM/7,5
Labtest	≥100000	≥ 2500	≥ 350	≥ 800	ESPAS 1 mM	0,7 mM	50 mM/7,5

GPO: glicerol fosfato oxidase

POD: peroxidase

GQ: glicerolquinase

ESPAS: N-etil-N-sulfopropil-m-Anisidina

Pipes: ácido 1,4-piperazina-dietanosulfônico