

SÔBRE UM MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE IÔDO NO SÔRO HUMANO

Maria Helena Sérgio PIOVESAN (1)

RESUMO

Uma técnica simplificada de determinação de iôdo protéico é apresentada. A técnica é baseada no método de ZAK et alii⁹, e apresenta as seguintes modificações: concentração das soluções, tempo e temperatura da reação e redução no volume do sôro com diminuição do tempo de digestão. A técnica simplificada foi comparada com a de digestão alcalina de BARKER et alii².

INTRODUÇÃO

A dosagem de iôdo protéico é considerada, atualmente, como um método de exploração indispensável da atividade tireoidiana. Sua determinação, por método simples, foi descrita primeiramente por CHANEY⁵, 1940, o qual utilizou a reação de SANDELL & KOLTHOFF⁸, que consta da redução de íons cêricos por arsenitos, quando catalizada por iodetos. Modificações e simplificações no método têm sido propostas por diversos autores e envolvem sempre duas etapas.

- a) Mineralização do iôdo orgânico das proteínas precipitadas.
- b) Determinação colorimétrica dêsse iôdo.

A mineralização pode se efetuar em meio ácido^{3,7,9} e em meio alcalino^{1,2,4,6}.

Em nosso laboratório utilizamos, inicialmente, a técnica de BARKER et alii². Embora êsse método nos leve a resultados corretos e reprodutíveis, a técnica exige manipulação trabalhosa e tempo longo, tanto no que se refere à precipitação das proteínas, quanto à fase de digestão. Nesta fase, há necessidade de

rigorosa padronização da temperatura e do tempo de incineração das amostras, pois a presença de carvão no resíduo propicia resultados não verdadeiros. A dissolução ácida das cinzas incineradas, como a subsequente formação de CO₂, pode também levar à perda de iôdo.

A técnica original de ZAK et alii⁹, que consta essencialmente, de precipitação ácida seguida da digestão clórica, tem sido modificada por diversos autores. Estas técnicas, quando repetidas de maneira controlada por nós, ainda nos deram resultados insatisfatórios. Por êste motivo, tentamos introduzir algumas modificações, as quais foram rigorosamente testadas e os resultados obtidos, nos animam a apresentá-las no presente trabalho. O método modificado levou-nos a resultados precisos e ainda às vantagens de tempo útil curto e menor a manipulação, uma vez que, o material a analisar permanece no tubo até o final da digestão. Êste fato ainda concorre para evitar contaminação. Diga-se, ainda, que nesta técnica há controle fácil de digestão e possibilidade de se fazer maior número de análises.

Recebido para publicação em 7-10-1966.

Trabalho da Cadeira de Nutrição e Higiene Alimentar da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da USP.

(1) Instrutor da Cadeira.

A dosagem de iodo protéico de um homogenado de soros foi feita pelos dois métodos e os resultados serão apresentados.

Daremos a seguir os detalhes da técnica original de ZAK et alii⁹, por nós modificada, no que se refere às concentrações dos reagentes, volume inicial do soro e ao processo técnico propriamente dito.

MATERIAL

Reagentes:

Todos os reagentes usados eram isentos de iodo e suas soluções preparadas com água bi-destilada, deiodizada em resinas.

Como a técnica de determinação de iodo protéico é extremamente sensível a impurezas, é conveniente trabalhar em local isolado, com vidraria e reagentes separados.

Acido clórico — 28%:

Em um béquer de 3 litros, adicionar 500 g de $KClO_3$ e 910 ml de H_2O . Aquecer até a dissolução. Agitando constantemente, adicionar 375 ml de $HClO_4$, 70-72%, com o auxílio de um funil de separação. Esta adição deve ser feita gota a gota até que, aproximadamente, metade do volume de $HClO_4$ tenha sido consumido. A seguir, aumenta-se o número de gotas até a adição final. Cobre-se o balão e deixa-se esfriar à temperatura ambiente. Guardar por uma noite a $-23^\circ C$. Filtrar em Büchner, usando papel de filtro Whatman n.º 1. Guardar na geladeira em frasco escuro. Essa preparação rende aproximadamente 1 litro.

Solução de arsenito de sódio 0.1 N:

Em um béquer, adicionar 4,95 g de As_2O_3 e 25 ml de H_2O , contendo aproximadamente 3 g de NaOH. Neutralizar com H_2SO_4 5 N, usando-se fenolftaleína como indicador. Adicionar 25 g de NaCl e 200 ml de H_2SO_4 5 N. Diluir a 1 litro.

Solução de cromato de sódio 1%:

Pesar 1 g de cromato de sódio e dissolver a 100 ml de solução.

Solução de ácido tricloroacético (TCA) — 5%:

Dissolver 5 g de TCA em 100 ml da solução. Esta solução deve ser feita semanalmente e guardada na geladeira.

Solução de H_2SO_4 1 N:

Adicionar vagarosamente 26,5 ml de H_2SO_4 concentrado (densidade 1,84) em 500 ml de H_2O .

Solução de sulfato de cério e amônia 0,0474 N:

Dissolver 30 g de sulfato de cério e amônia em 1 litro de H_2SO_4 7,5 N. Guardar em frasco escuro.

Solução padrão de KIO_3 :

Pesar 168,5 mg de reagente analítico sêco e dissolver em 1 litro de H_2O . Diluir 10 ml deste padrão a 1 litro de H_2O . Constitui uma solução de 1 μg de I^- /ml.

Aparelhos e utensílios:

Fotocolorímetro Evelyn, filtro 420.
Banho-maria com temperatura constante $28 \pm 0,1^\circ C$.
Aquecedor elétrico com agitador magnético.
Centrifugador — 2500 rpm.
Cronômetro.

MÉTODO

Precipitação do iodo protéico:

Em tubos pirex de 15/120 mm, de fundo redondo, em duplicata, adicionar 0,5 ml de soro e precipitar as proteínas com 10 ml de solução de TCA 5%. Essa precipitação deve ser feita de vez, a fim de separar o iodo inorgânico das proteínas. Esperar 20 minutos e a seguir centrifugar por 10 minutos. Desprezar o sobrenadante. Remover o precipitado com leves batidas no tubo. La-

var com 10 ml de TCA 5%. Esperar 20 minutos. Centrifugar novamente. Desprezar o sobrenadante.

Digestão:

Adicionar ao precipitado 0,1 ml de solução de Na_2CrO_4 e 3 ml da solução de HClO_3 28%. Numa das amostras do sôro adicionar 0,5 ml de solução de KIO_3 0,04 $\mu\text{gI}^-/\text{ml}$.

Uma curva padrão é feita em idênticas condições às do sôro, usando-se a solução padrão de KIO_3 com 1 μg de iodeto/ml.

Pipetar 4, 8, 12 e 16 ml desta solução e diluir a 100 ml, correspondendo assim a concentração de 0,04, 0,08, 0,12 e 0,16 μg de iodeto/ml respectivamente, e a seguir juntar solução de ácido clórico e a de cromato de sódio como a seguir:

	KIO_3	HClO_3	Na_2CrO_4	H_2O
a)	0,04 μg de I^-/ml — 0,5 ml	3 ml	0,1 ml	—
b)	0,08 μg de I^-/ml — 0,5 ml	3 ml	0,1 ml	—
c)	0,12 μg de I^-/ml — 0,5 ml	3 ml	0,1 ml	—
d)	0,16 μg de I^-/ml — 0,5 ml	3 ml	0,1 ml	—
e)	0 μg de I^-/ml — 0 ml	3 ml	0,1 ml	0,5 ml

Os tubos são colocados em banho de óleo mineral*, tomando-se o cuidado de deixá-los suspensos na solução, com auxílio de telas de arame. Aquece-se o óleo vagarosamente (cêrca de 30 minutos) até atingir a temperatura de 120°C. Conserva-se essa temperatura, com variações máximas de $\pm 10^\circ\text{C}$, até o final da digestão.

A digestão termina quando o volume final é de aproximadamente 0,5 ml. Periódicamente e, principalmente, na fase final da digestão, observar, se há variação da côr amarelo laranja para o amarelo esverdeado, verde e incolor, quando ocorre a redução do ion crômico

e cromoso, com conseqüente perda de iôdo. Se eventualmente tal redução acontecer, adicionar gotas de ácido clórico, até se conseguir novamente a côr amarelo laranja.

A digestão se completa quando nos tubos resfriados formarem-se pequenos cristais vermelhos de CrO_3 . Se tal não ocorrer, adicionar 1 a 2 gotas de ácido clórico e voltar o resíduo ao digestor. O tempo gasto nesta fase é de, aproximadamente, 6 horas.

Verificamos que êste intervalo poderá ser reduzido para 1,5 a 2 hs, se forem usados tubos de diâmetro maior (por exemplo 30-130 mm). Nessas condições, há, porém, necessidade de vigilância constante durante tôda a fase de digestão e ocasional adição de HClO_3 nos tubos da prova.

Colorimetria e determinação do iôdo:

Quando a digestão se completa, o material é transferido para os tubos do fotocolorímetro Evelyn (tubos de 20-180 mm). A remoção é feita cuidadosamente e os tubos de digestão são lavados com os reagentes, na seguinte ordem: 2,0 ml de solução de arsenito de sódio; 3 ml de solução de H_2SO_4 1 N; 4 ml de água deiodizada. A seguir, os tubos do colorímetro são colocados em banho-maria a 28°C durante 15 minutos.

Faz-se então a adição em cada tubo, de 0,5 ml da solução cêrica em intervalos de 30 segundos. 30 minutos após, são lidas as percentagens de transmissão, respeitando-se a ordem dos tubos e intervalos de 30 segundos. Um branco a

* Esso extra motor oil 30.

100% de transmissão é usado com água destilada.

A curva padrão é traçada e por elas são calculados os resultados de PBI¹²⁷ em μg de iodeto/100 ml de sôro.

Os valôres lidos em percentagem de transmissão da curva padrão já referidos estão situados entre 20-60%.

Achamos indispensável trabalhar sempre com provas de recuperação e com um sôro contrôle, cuja concentração em iôdo seja exatamente conhecida.

Quando a recuperação for $\pm 10\%$ do valor esperado, a análise deverá ser repetida para a confirmação do resultado.

Presentemente, estamos utilizando os tubos de 20-160 mm para precipitação e digestão das proteínas. Dessa maneira, não há necessidade de transferência de tubos, e o tempo de digestão fica reduzido de 2,30 a 3 horas. Oportunamente, divulgaremos os resultados.

RESULTADOS

Testamos o método acima descrito com um "pool" homogeneizado de soros e tendo sido obtido com a observa-

ção de 100 amostras de mesmo universo, os valôres amostrais:

$$\bar{x} = 4,27 \mu\text{g de iodeto/100 ml}$$

$$s = 0,27 \mu\text{g de iodeto/100 ml}$$

chegamos à seguinte estimativa por intervalo: com 95% de confiança dizemos que a média naquele universo está contida no intervalo:

$$3,74 \mu\text{g I}^-/100 \text{ ml} \text{ --- } 4,80 \mu\text{g I}^-/100 \text{ ml}$$

No teste de recuperação adicionamos à amostra, iôdo correspondendo 4 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ e tendo sido obtidos os seguintes valôres amostrais:

$$\bar{x} = 8,34 \mu\text{g de iodeto/100 ml}$$

chegamos à seguinte estimativa por intervalo de confiança de 95% de valor médio pesquisado:

$$7.61 \mu\text{g de iodeto/100 ml} \text{ --- } 9.07 \mu\text{g de iodeto/100 ml}$$

No estudo comparativo entre as técnicas de determinação clórica e a de Barker (Tabelas I e II), obtivemos os seguintes resultados para 20 amostras de um outro "pool" homogeneizado de soros:

TABELA I

Resultados das análises dos soros, segundo o método de Barker e segundo o método de digestão clórica modificado

Métodos	Valores amostrais		
	Média (em $\mu\text{g I}^-/100 \text{ ml}$)	Desvio padrão (em $\mu\text{g I}^-/100 \text{ ml}$)	Coefficiente de variação
Método de Barker	4,20	0,12	2,8%
Método de digestão clórica, modificado	3,94	0,19	4,8%

TABELA II

Resultados das análises dos soros aos quais foram adicionados 4 $\mu\text{g I}^-/100 \text{ ml}$

Métodos	Valores amostrais		
	Média (em $\mu\text{g I}^-/100 \text{ ml}$)	Desvio padrão (em $\mu\text{g I}^-/100 \text{ ml}$)	Coefficiente de variação
Método de Barker	8,30	0,25	3,1%
Método de digestão clórica, modificado	8,04	0,24	3,1%

COMENTARIOS

Conforme foi descrito foram alteradas as concentrações das soluções de Ce^{4+} , As^{3+} , Cl^- SO_4^{--} , temperatura e tempo da reação.

Alteramos a concentração da solução de Ce_1^+ , no sentido de obtermos leituras de extinção entre 0,7-0,1, pois é nesta faixa de leitura que há maior precisão dos resultados, uma vez que a concentração de iodeto das amostras, em geral varia entre 0,01-0,06 μg .

Para se determinar essa concentração ideal, preparamos curva padrão do modo já descrito, mantendo todos os outros reagentes nas proporções já mencionadas variando somente as concentrações de soluções Ce^{4+} . A melhor curva que obtivemos corresponde a solução cuja concentração de Ce^{4+} foi 0,0047 N (no método de Zak a concentração é de 0,016 N).

O mesmo procedimento fizemos para escolher a melhor concentração da solução de As^{3+} . Verificamos que, os melhores resultados foram obtidos, quando a concentração de As^{3+} foi 0,02 N (no método de Zak a concentração é de 0,0066 N).

Por outro lado notamos também, que a melhor curva foi obtida na temperatura de 28°C e as leituras de transmissão feitas 30 minutos após adição da solução de Ce^{4+} .

A variação da concentração H_2SO_4 dentro dos limites 0,5-1,5 N não interfere nos resultados.

Sabe-se que a presença de cloreto é necessária para que o iodeto exerça um total efeito catalítico na redução do ion Ce^{4+} , quando na presença de arsenito. Para testar o efeito catalítico máximo, preparamos curvas padrão com variações do teor de cloreto. Melhor resultado obtivemos quando a concentração da solução foi 0,894 N.

Fazendo a análise estatística dos resultados, verificamos que o método modificado é preciso, que as provas de recuperação variaram entre 99-105%.

Os trabalhos publicados sôbre o assunto, quando testam repetidas vês o mesmo "pool" de soros, apresentam resultados, cujas diferenças estão por volta de 1 $\mu\text{g}\%$. Aplicamos então o teste de significância às médias obtidas pelos dois métodos para verificar se diferiam de mais de 1 $\mu\text{g}\%$. Rejeita-se a hipótese de que estas médias sejam diferentes ao nível de 5%.

A fim de verificar se poderíamos aceitar, que as duas distribuições das dosagens de PBI^{27} , por ambos os métodos, teriam a mesma variabilidade, fizemos o teste de hipótese de duas variâncias e aceitou-se, ao nível de 5%, que as variâncias dessas duas distribuições eram estatisticamente iguais.

CONCLUSÕES

1. Tendo em vista os resultados apresentados nas dosagens, concluímos que o método modificado é preciso, sua técnica menos trabalhosa e o tempo útil mais curto.
2. Comparando os dois métodos, as médias de dosagens não diferiram de mais de 1 $\mu\text{g}\%$.
3. Ambos os métodos apresentaram a mesma variabilidade.

SUMMARY

A simplified technique for determination of serum protein bound iodine (PBI) is presented. The technique is based on the ZAK et alii⁹ method, and it includes the following modifications: concentrations of solutions, time and temperature reaction, less serum volume is used with digest time decreased. The simplified method was compared with the BARKER et alii² alkaline ashing technique.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARKER, S. B. — Determination of protein bound iodine. *J. biol. Chem.* **173**: 715, 1948.
2. BARKER, S. B.; HUMPHREY, M. J. & SOLEY, H. H. — The clinical determination of protein bound iodine. *J. clin. Invest.* **30**:55, 1951.
3. BENOTTI, J. & BENOTTI, N. — PBI, total iodine and butanol extractable iodine by partial automation. *Clin. Chem.*, **9**:409, 1963.
4. BRUCE, A. W. et alii — Laboratory and clinical incidence of the reability of the alkaline incenerator method of serum of PBI measurement. *J. Lab. clin. Med.*, **55**:643, 1960.
5. CHANEY, A. L. — Improved in determination of iodine in blood. *Industr. Eng. Chem. Anal. Ed.*, **12**:179, 1940.
6. FOSS, O.; LAWRENCE, V. H.; VANSLIKE, D. D. — A study of alkaline ashing method for determination of PBI. *Clin. Chem. Acta*, **5**:301, 1960.
7. O'NEAL, L. W. & SIMMS, E. S. — Determination of protein bound iodine in plasma or serum: a simple and rapid method. *Amer. J. clin. Path.*, **23**:493, 1953.
8. SANDELL, E. B. & KOLTHOFF, I. M. — Microdetermination of iodine by a catalytic method. *Mikrochim. Acta*, **1**:9, 1937.
9. ZAK, B. et alii. — Chloric acid method for determination of protein bound iodine. *Anal. Chem.* **24**:1345, 1952.