# DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO DELTA-AMINOLEVULÍNICO

AMOSTRA : Urina
Adicionar HCl ou ácido acético glacial para obter pH 1,0 -5,0 e conservar a 4ºC, em frasco escuro. Para urina de 24h a concentração do ácido deve ser 0,001mol/L - 0,1mol/L .Nessas condições o ALA permanece estável durante alguns meses.

MATERIAL:
1. Espectrofotômetro para região do visível.
2. Solução estoque de ácido delta-aminolevulínico (50mg/L).
Dissolver 0,0064g de cloridrato de ácido delta-aminolevulínico em água destilada e completar o volume até 100 mL . Essa solução é estável por mais de 2 meses quando guardada sob refrigeração.
3. Tampão-acetato pH 4,6
Dissolver 13,6g de acetato de sódio trihidratado em 70 mL de água destilada e juntar
4,0 mL de ácido acético glacial; completar o volume até 100 mL com água destilada.
4. Reativo de EHRLICH modificado
Dissolver 1,0 g de p-dimetilaminobenzaldeído em cerca de 30 mL de ácido acético glacial; adicionar 5 mL de $HClO_4$ 60%; 5 mL de água destilada e completar o volume até 50 mL com ácido acético.
5. Acetoacetato de etila
6. Acetato de etila.

MÉTODO:
**Preparo de Curva de Calibração**
1) Colocar em 6 tubos de ensaio 1 mL de urina branco fortificada com delta-ALA nas concentrações de zero (sem adição), 2, 5, 10, 20, 30 mg/L. Para isso utilize urina de indivíduo não exposto não fortificada e/ou fortificada com 50 mg/L de delta-ALA, conforme o quadro a seguir.

| **Concentração / mg/L** | **Volume de urina de indivíduo não exposto fortificada com 50 mg/L de delta-ALA/ mL** | **Volume de urina de indivíduo não exposto (branco)/ mL** |
|---|---|---|
| Zero | Zero | 1,00 |
| 2 | 0,04 | 0,96 |
| 5 | 0,10 | 0,90 |
| 10 | 0,20 | 0,80 |
| 20 | 0,40 | 0,60 |
| 30 | 0,60 | 0,40 |

2) Adicionar 1 mL de tampão acetato a cada tubo.
3) Adicionar 0,2 mL de acetoacetato de etila em cada tubo e agitar durante 5 s.
4) Manter os tubos em banho de água fervente durante 10 min.
5) Esfriar e adicionar 3 mL de acetato de etila em cada tubo, agitando manualmente 50 vezes (agitação vigorosa pode resultar na formação de emulsão).
6) Centrifugar os tubos a 2000 rpm por 3 min, se necessário, e transferir 2 mL da camada orgânica (superior) para outros tubos de ensaio.
7) Adicionar 2 mL de reativo de EHRLICH modificado a cada tubo e misturar.
8) Após 10 min determinar a absorbância do branco e dos padrões por meio do monitoramento do produto colorido formado em 553 nm.
9) Construir a curva de calibração descontando o valor do branco e obter as concentrações das amostras reais por meio da equação da reta.

**Análise das amostras reais**

1) Colocar 1 mL da urina a ser analisada em um tubo de ensaio.
2) Adicionar 1 mL de tampão acetato a cada tubo.
3) Adicionar 0,2 mL de acetoacetato de etila em cada tubo e agitar durante 5 s.
4) Manter os tubos em banho de água fervente durante 10 min.
5) Esfriar e adicionar 3 mL de acetato de etila em cada tubo, agitando manualmente 50 vezes (agitação vigorosa pode resultar na formação de emulsão).
6) Centrifugar os tubos a 2000 rpm por 3 min, se necessário, e transferir 2 mL da camada orgânica (superior) para outros tubos de ensaio.
7) Adicionar 2 mL de reativo de EHRLICH modificado a cada tubo e misturar.
8) Após 10 min determinar a absorbância do branco e dos padrões por meio do monitoramento do produto colorido formado em 553 nm.
9) Determinar a concentração na amostra usando a curva analítica.

BIBLIOGRAFIA :

1. TOMOKUMI, K. & OGATA, M. - Simple method of urinary aminolevulinic acid as index of lead exposure. Clin. Chem., New York 18, 1354-1536, 1972.
2. TOLEDO SALGADO, P.E.- Controle diagnóstico laboratorial de intoxicação pelo chumbo. São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, 1976. (Tese de Mestrado) .