

Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara



Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicada à Farmácia

**“DESEMPENHO E ESTABILIDADE DE PARÂMETROS
BIOQUÍMICOS EM MATERIAIS DE CONTROLE LÍQUIDOS
CONGELADOS E SÓLIDOS LIOFILIZADOS”**

TÂNIA NAVARRO NUNES

Araraquara - SP
2011

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

N972d Nunes, Tânia Navarro
Desempenho e estabilidade de parâmetros bioquímicos em materiais de controle líquidos e congelados sólidos e liofilizados/ Tânia Navarro Nunes.- Araraquara, 2011.
173 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicada à Farmácia
Orientador: Iguatemy Lourenço Brunetti

. 1. Amostras-controle 2. Laboratório clínico 3. Controle de qualidade analítico. 4. Desempenho analítico. 5. Precisão I. Brunetti, Iguatemy Lourenço, orient. II. Título.

CAPES: 33004030081P7

TÂNIA NAVARRO NUNES

**“DESEMPENHO E ESTABILIDADE DE PARÂMETROS
BIOQUÍMICOS EM MATERIAIS DE CONTROLE LÍQUIDOS
CONGELADOS E SÓLIDOS LIOFILIZADOS”**

Dissertação de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicada à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual “Julio Mesquita Filho” campus de Araraquara como parte dos requisitos para o título de mestre em Biociências e Biotecnologia aplicada à Farmácia. Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti

Araraquara - SP
2011

Apresentação

Dissertação de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicada à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual “Julio Mesquita Filho” Campus de Araraquara como parte dos requisitos para o título de mestre em Biociências e Biotecnologia aplicada à Farmácia. Área de concentração: Bioquímica.

Trabalho desenvolvido no laboratório de Bioquímica Clínica da Coordenadoria de Análises Clínicas e Hemoterapia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP/Campus Araraquara.

Agradecimientos

Agradeço a Deus, por tudo que Ele me tem proporcionado na vida, sempre caminhando ao meu lado, colocando pessoas especiais em meu caminho.

Gostaria de agradecer de forma muito especial ao meu marido “Nino”, por seu amor que me fortalece e, pelo carinho, paciência e apoio incondicional. Aos meus filhos pela paciência que tiveram em minhas ausências, sem cobrar nada em troca.

A minha mãe que me deu o maior ensinamento e sabedoria a respeito da vida que nenhum livro possa oferecer, meu muito obrigado. A meu pai que mesmo não estando mais entre nós, dedico com todo carinho, pois sem ele não conseguiria chegar aonde cheguei.

As minhas irmãs, irmão, cunhados e cunhadas que de alguma forma sempre me incentivaram a buscar meus sonhos.

Ao Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti, pela paciência, conhecimento e dedicação ao aceitar este desafio comigo. Seus ensinamentos foram de grande valia para meu crescimento profissional.

A Profa. Dra. Regina Célia Vendramini por permitir que eu realizasse este grande sonho.

Ao Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa, coordenador da Coordenadoria de Análises Clínicas e Hemoterapia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, e as funcionárias da sorologia Jussara e Roberta pelas amostras de soro dos doadores.

A Profa. Dra. Edwil Aparecida de Lucca Gattás do Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP.

A Flávia por ser esta amiga maravilhosa que me entende e sempre me dá forças para eu não desistir.

A Vânia, pela ajuda sem medir esforços; meu maior agradecimento, pois você tornou meu caminho mais fácil.

Aos meus amigos do laboratório que direta ou indiretamente estiveram comigo nesta fase de minha vida.

RESUMO

O uso de amostras-controle para acompanhamento do desempenho analítico é necessário para reproduzir a veracidade dos resultados das análises, pois monitora as variações que podem ocorrer no sistema analítico. O ideal para amostras-controle é ter a mesma matriz que as amostras dos pacientes, assim elas comportar-se-ão da mesma forma. Entretanto, para alcançar a estabilidade necessária, as amostras-controle passam por manipulações durante sua produção que podem alterar as propriedades da matriz. Dentre estas manipulações estão a adição de aditivos e mudanças físicas do meio como o congelamento ou liofilização. Neste estudo, nós produzimos amostras-controle com pool de soro humano trabalhados na forma líquida, congelados, conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ e $\leq -80^{\circ}\text{C}$ e sólida a $2 - 8^{\circ}\text{C}$ liofilizados, sem preservante e com preservante e analisamos 23 analitos da rotina de laboratório clínico: ácido úrico, albumina, fosfatase alcalina, alanina aminotransferase, amilase, aspartato aminotransferase, bilirrubina direta, bilirrubina total, cálcio, capacidade latente de ligação do ferro, colesterol, creatinina, ferro, fósforo, gama-glutamyl transferase, glicose, colesterol-HDL, desidrogenase láctica, potássio, proteínas totais, sódio, triglicérides e uréia. As amostras foram analisadas por 300 dias, e comparado a estabilidade entre os soros sem preservante e com preservante nos diferentes processos de conservação. Os coeficientes de variação encontrados foram bastante satisfatórios, mas a estabilidade no decorrer do tempo foi melhor observada no soro com preservante, especialmente a $2 - 8^{\circ}\text{C}$ - liofilizado, onde todos os analitos estudados permaneceram estáveis por 300 dias, com exceção do ácido úrico que foi de 240 dias.

Palavras-chave: amostras-controle, laboratório clínico, controle de qualidade analítico, desempenho analítico, precisão.

ABSTRACT

Using control-samples for analytical performance monitoring is required to reproduce the veracity of the results of biochemical analyses, since they monitor changes that may occur in analytical system. The ideal for control-samples is to have the same matrix that samples of the patients, so they will behave the same way. However, to achieve the necessary stability control-samples undergo operations such as adding additives and/or physical changes of middle (freezing or lyophilization) during its production which can change the properties of the matrix. In this study, we produced control-samples with pool of human serum worked in frozen liquid form kept at $\leq -18^{\circ}\text{C}$ and $\leq -80^{\circ}\text{C}$ and freeze-dried solid kept between $2 - 8^{\circ}\text{C}$, without or with a preservative for 23 analytes of clinical laboratory routine: uric acid, serum albumin, alkaline phosphatase, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, amylase, direct bilirubin, total bilirubin, calcium, latent iron-binding capacity, cholesterol, creatinine, iron, phosphorus, gamma glutamyl transferase, HDL-cholesterol, glucose, lactic dehydrogenase, total proteins, potassium, sodium, triglycerides and urea. The samples were analyzed for 300 days, and the stability compared between the without a preservative and with a preservative sera in different processes of conservation. The coefficient of variation found were quite satisfactory, but stability over time was better observed in with a preservative serum, mainly in serum stored between $2 - 8^{\circ}\text{C}$ - freeze-dried, in which all analytes studied remained stable for 300 days, with the exception of uric acid that was for 240 days.

Keywords: control-samples; clinical laboratory; analytical quality control; analytic performance; precision.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE ESQUEMAS	16
LISTA DE TABELAS	17
LISTA DE QUADROS	18
LISTA DE ABREVIATURAS	19
1. INTRODUÇÃO	22
1.1 EVOLUÇÃO DA QUALIDADE DOS PROCESSOS ANALÍTICOS	24
1.2 QUALIDADE EM LABORATÓRIOS DE ANÁLISES CLÍNICAS	26
1.3 RASTREABILIDADE METROLÓGICA	28
1.3.1 Materiais de Referência (MR)	29
1.3.1.1 Materiais de Referência Certificados (MRC)	30
1.3.2 Padrões ou calibradores	30
1.3.3 Materiais de controle	32
1.3.3.1 Densidade de líquidos	33
1.3.3.2 Liofilização	36
1.3.3.2.1 Congelamento inicial	38
1.3.3.2.2 Secagem primária	39
1.3.3.2.3 Secagem secundária	39
1.4 COMUTATIVIDADE	40
1.4.1 Efeito matriz	41
1.5 CONTROLE DE QUALIDADE ANALÍTICO.....	43
1.5.1 Controle Interno da Qualidade (CIQ)	44
1.5.2 Avaliação Externa da Qualidade (AEQ)	45
1.6 CONTROLE ESTATÍSTICO DA QUALIDADE	46
1.6.1 Distribuição normal	47
1.6.2 Exatidão	47
1.6.3 Precisão	48
1.6.4 Incertezas em medições	48
1.6.5 Erros Aleatórios (E_A) e Erros Sistemáticos (E_S)	49

	10
1.6.6 Erros grosseiros	51
1.6.7 Gráficos de controle	51
1.6.7.1 Regras de controle	52
1.7 ESPECIFICAÇÕES DA QUALIDADE ANALÍTICA	53
2. OBJETIVOS	56
2.1 OBJETIVO GERAL	57
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	57
3. MATERIAIS E MÉTODOS	58
3.1 OBTENÇÃO DO POOL DE SORO.....	59
3.2 PREPARO DE AMOSTRAS-CONTROLE	59
3.2.1 Subdivisão das amostras	59
3.3. DETERMINAÇÃO DOS ANALITOS	60
3.3.1 Equipamentos	60
3.3.2 Tipo de amostras e reações utilizadas	61
3.4 MÉTODOS	61
3.4.1 Ácido úrico	61
3.4.2 Albumina	62
3.4.3 Fosfatase Alcalina (ALP)	62
3.4.4 Alanina Aminotransferase (ALT)	63
3.4.5 Amilase	64
3.4.6 Aspartato Aminotransferase (AST)	64
3.4.7 Bilirrubina Direta (Bil. Direta).....	65
3.4.8 Bilirrubina Total (Bil. Total).....	65
3.4.9 Cálcio	66
3.4.10 Capacidade Latente de Ligação de Ferro (CLLF)	66
3.4.11 Colesterol	66
3.4.12 Colesterol-HDL (Col.-HDL)	67
3.4.13 Creatinina	68
3.4.14 Desidrogenase Lática (LD)	69
3.4.15 Ferro	69
3.4.16 Fósforo	69
3.4.17 Gama-Glutamil Transferase (GGT)	70
3.4.18 Glicose	70
3.4.19 Proteínas Totais (Prot. Totais).....	71

3.4.20 Sódio (Na ⁺) e Potássio (K ⁺)	71
3.4.21 Triglicérides	72
3.4.22 Uréia	73
3.5 PROCEDIMENTOS	74
3.5.1 Determinação da densidade do soro	74
3.5.2 Liofilização	74
3.5.2.1 Liofilização do pool de soro sem preservante (SP)	75
3.5.2.1.1 Aliquotagem do soro liofilizado sem preservante (SP)	76
3.5.2.2 Liofilização do pool de soro com preservante (CP)	76
3.5.2.2.1 Aliquotagem do soro liofilizado com preservante (CP)	77
3.5.3 Reconstituição dos soros liofilizados	77
3.5.4 Determinação dos analitos	77
3.5.4.1 Determinação dos analitos nos pools de soro	77
3.5.4.2 Determinação dos analitos após conservação	77
3.5.5 Esquema da análise das amostras	77
3.5.6 Comitê de Ética	78
3.5.7 Análise estatística	78
4. RESULTADOS	79
4.1 Ácido Úrico	87
4.2 Albumina	89
4.3 Fosfatase Alcalina (ALP)	91
4.4 Alanina Aminotransferase (ALT)	93
4.5 Amilase	95
4.6 Aspartato Aminotransferase (AST)	97
4.7 Bilirrubina Direta (Bil. Direta)	99
4.8 Bilirrubina Total (Bil. Total)	102
4.9 Cálcio	104
4.10 Capacidade Latente de Ligação do Ferro (CLLF)	106
4.11 Colesterol	109
4.12 Creatinina	112
4.13 Ferro	115
4.14 Fósforo	117
4.15 Gama-Glutamil Transferase (GGT)	120
4.16 Glicose	123

4.17 Colesterol-HDL (Col.-HDL)	126
4.18 Desidrogenase Lática (LD)	129
4.19 Potássio (K^+)	132
4.20 Proteínas Totais (Prot. Totais)	134
4.21 Sódio (Na^+)	136
4.22 Triglicérides	139
4.23 Uréia	142
5. DISCUSSÃO	148
6. CONCLUSÃO	157
7. REFERÊNCIAS	159
8. ANEXOS	171

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cadeia de rastreabilidade metrológica	29
Figura 2. Diagrama de fases da água	37
Figura 3. Probabilidade de ocorrência de um resultado de controle em uma distribuição normal ou Gaussiana	47
Figura 4. Apresentação esquemática da diferença entre erro e incerteza	48
Figura 5. Demonstração de um processo estável, com E_A e E_S	50
Figura 6. Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de ácido úrico em amostras de soro conservados a $\leq -18^\circ\text{C}$; $\leq -80^\circ\text{C}$ e entre $2 - 8^\circ\text{C}$ – liofilizados	87
Figura 7. Gráficos de Levey-Jennings com a X_m e os 3s para o ácido úrico no soro SP .	88
Figura 8. Gráficos de Levey-Jennings com a X_m e os 3s para o ácido úrico no soro CP	88
Figura 9. Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de albumina em amostras de soro conservados a $\leq -18^\circ\text{C}$; $\leq -80^\circ\text{C}$ e entre $2 - 8^\circ\text{C}$ – liofilizados	89
Figura 10. Gráficos de Levey-Jennings com a X_m e os 3s para a albumina no soro SP ..	90
Figura 11. Gráficos de Levey-Jennings com a X_m e os 3s para a albumina no soro CP .	90
Figura 12. Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de ALP em amostras de soro conservados a $\leq -18^\circ\text{C}$; $\leq -80^\circ\text{C}$ e entre $2 - 8^\circ\text{C}$ – liofilizado	91
Figura 13. Gráficos de Levey-Jennings com a X_m e os 3s para a ALP no soro SP	92
Figura 14. Gráficos de Levey-Jennings com a X_m e os 3s para a ALP no soro CP	92
Figura 15. Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de ALT em amostras de soro conservados a $\leq -18^\circ\text{C}$; $\leq -80^\circ\text{C}$ e entre $2 - 8^\circ\text{C}$ – liofilizados	93
Figura 16. Gráficos de Levey-Jennings com a X_m e os 3s para a ALT no soro SP	94
Figura 17. Gráficos de Levey-Jennings com a X_m e os 3s para a ALT no soro CP	94
Figura 18. Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de amilase em amostras de soro conservados a $\leq -18^\circ\text{C}$; $\leq -80^\circ\text{C}$ e entre $2 - 8^\circ\text{C}$ – liofilizados	95
Figura 19. Gráficos de Levey-Jennings com a X_m e os 3s para a amilase no soro SP	96
Figura 20. Gráficos de Levey-Jennings com a X_m e os 3s para a amilase no soro CP	96
Figura 21. Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de AST em amostras de soro conservados a $\leq -18^\circ\text{C}$; $\leq -80^\circ\text{C}$ e entre $2 - 8^\circ\text{C}$ – liofilizados	97
Figura 22. Gráficos de Levey-Jennings com a X_m e os 3s para a AST no soro SP	98
Figura 23. Gráficos de Levey-Jennings com a X_m e os 3s para a AST no soro CP	98
Figura 24. Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de bil. direta em amostras de soro conservados a $\leq -18^\circ\text{C}$; $\leq -80^\circ\text{C}$ e entre $2 - 8^\circ\text{C}$ – liofilizados	99

Figura 25. Gráficos de Levey-Jennings com a X_m e os 3s para a bil. direta no soro SP .	101
Figura 26. Gráficos de Levey-Jennings com a X_m e os 3s para a bil. direta no soro CP .	101
Figura 27. Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de bil. total em amostras de soro conservados a $\leq -18^\circ\text{C}$; $\leq -80^\circ\text{C}$ e entre 2 - 8°C – liofilizados	102
Figura 28. Gráficos de Levey-Jennings com a X_m e os 3s para a bil. total no soro SP ...	103
Figura 29. Gráficos de Levey-Jennings com a X_m e os 3s para a bil. total no soro CP ...	103
Figura 30. Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de cálcio em amostras de soro conservados a $\leq -18^\circ\text{C}$; $\leq -80^\circ\text{C}$ e entre 2 - 8°C – liofilizados	104
Figura 31. Gráficos de Levey-Jennings com a X_m e os 3s para o cálcio no soro SP	105
Figura 32. Gráficos de Levey-Jennings com a X_m e os 3s para o cálcio no soro CP	105
Figura 33. Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de CLLF em amostras de soro conservados a $\leq -18^\circ\text{C}$; $\leq -80^\circ\text{C}$ e entre 2 - 8°C – liofilizados	106
Figura 34. Gráficos de Levey-Jennings com a X_m e os 3s para a CLLF no soro SP	108
Figura 35. Gráficos de Levey-Jennings com a X_m e os 3s para a CLLF no soro CP	108
Figura 36. Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de colesterol em amostras de soro conservados a $\leq -18^\circ\text{C}$; $\leq -80^\circ\text{C}$ e entre 2 - 8°C – liofilizados	109
Figura 37. Gráficos de Levey-Jennings com a X_m e os 3s para o colesterol no soro SP .	111
Figura 38. Gráficos de Levey-Jennings com a X_m e os 3s para o colesterol no soro CP	111
Figura 39. Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de creatinina em amostras de soro conservados a $\leq -18^\circ\text{C}$; $\leq -80^\circ\text{C}$ e entre 2 - 8°C – liofilizados	112
Figura 40. Gráficos de Levey-Jennings com a X_m e os 3s para a creatinina no soro SP .	114
Figura 41. Gráficos de Levey-Jennings com a X_m e os 3s para a creatinina no soro CP	114
Figura 42. Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de ferro em amostras de soro conservados a $\leq -18^\circ\text{C}$; $\leq -80^\circ\text{C}$ e entre 2 - 8°C – liofilizados	115
Figura 43. Gráficos de Levey-Jennings com a X_m e os 3s para o ferro no soro SP	116
Figura 44. Gráficos de Levey-Jennings com a X_m e os 3s para o ferro no soro CP	116
Figura 45. Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de fósforo em amostras de soro conservados a $\leq -80^\circ\text{C}$; $\leq -18^\circ\text{C}$ e entre 2 - 8°C – liofilizados	117
Figura 46. Gráficos de Levey-Jennings com a X_m e os 3s para o fósforo no soro SP	119
Figura 47. Gráficos de Levey-Jennings com a X_m e os 3s para o fósforo no soro CP	119
Figura 48. Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de GGT em amostras de soro conservados a $\leq -18^\circ\text{C}$; $\leq -80^\circ\text{C}$ e entre 2 - 8°C – liofilizados	120
Figura 49. Gráficos de Levey-Jennings com a X_m e os 3s para o GGT no soro SP	122
Figura 50. Gráficos de Levey-Jennings com a X_m e os 3s para o GGT no soro CP	122

Figura 51. Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de glicose em amostras de soro conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$; $\leq -80^{\circ}\text{C}$ e entre $2 - 8^{\circ}\text{C}$ – liofilizados	123
Figura 52. Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para a glicose no soro SP	125
Figura 53. Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para a glicose no soro CP	125
Figura 54. Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de col.-HDL em amostras de soro conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$; $\leq -80^{\circ}\text{C}$ e entre $2 - 8^{\circ}\text{C}$ – liofilizados	126
Figura 55. Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para o col.-HDL no soro SP .	128
Figura 56. Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para o col.-HDL no soro CP .	128
Figura 57. Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de LD em amostras de soro conservados a $\leq -80^{\circ}\text{C}$; $\leq -18^{\circ}\text{C}$ e entre $2 - 8^{\circ}\text{C}$ – liofilizados	129
Figura 58. Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para a LD no soro SP	131
Figura 59. Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para a LD no soro CP	131
Figura 60. Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de potássio em amostras de soro conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$; $\leq -80^{\circ}\text{C}$ e entre $2 - 8^{\circ}\text{C}$ – liofilizados	132
Figura 61. Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para o potássio no soro SP ...	133
Figura 62. Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para o potássio no soro CP ...	133
Figura 63. Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de prot. totais em amostras de soro conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$; $\leq -80^{\circ}\text{C}$ e entre $2 - 8^{\circ}\text{C}$ – liofilizados	134
Figura 64. Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e 3s para as prot. totais no soro SP ..	135
Figura 65. Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e 3s para as prot. totais no soro CP ..	135
Figura 66. Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de sódio em amostras de soro conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$; $\leq -80^{\circ}\text{C}$ e entre $2 - 8^{\circ}\text{C}$ – liofilizados	136
Figura 67. Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para o sódio no soro SP	138
Figura 68. Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para o sódio no soro CP	138
Figura 69. Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de triglicérides em amostras de soro conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$; $\leq -80^{\circ}\text{C}$ e entre $2 - 8^{\circ}\text{C}$ – liofilizados	139
Figura 70. Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e 3s para o triglicérides no soro SP ..	141
Figura 71. Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e 3s para o triglicérides no soro CP .	141
Figura 72. Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de uréia em amostras de soro conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$; $\leq -80^{\circ}\text{C}$ e entre $2 - 8^{\circ}\text{C}$ – liofilizados	142
Figura 73. Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para a uréia no soro SP	144
Figura 74. Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para a uréia no soro CP	144

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Subdivisão das alíquotas nos diferentes estados de conservação do soro sem e com preservante	60
Esquema 2. Reações para determinação do ácido úrico	62
Esquema 3. Reação para determinação da ALP	63
Esquema 4. Reações para determinação da ALT	63
Esquema 5. Reação para determinação da amilase	64
Esquema 6. Reações para determinação da AST	65
Esquema 7. Reações para determinação do cálcio	66
Esquema 8. Reações para determinação do colesterol	67
Esquema 9. Reações para determinação do colesterol-HDL	68
Esquema 10. Reação para determinação da creatinina	68
Esquema 11. Reação catalisada pela LD com formação de L-lactato	69
Esquema 12. Reações para determinação do ferro sérico	69
Esquema 13. Reação para determinação do fósforo	70
Esquema 14. Reação para determinação da GGT	70
Esquema 15. Reações para determinação da glicose	71
Esquema 16. Reações para determinação dos triglicérides	73
Esquema 17. Reações para determinação da uréia	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores dos pesos à temperatura ambiente obtidos dos frascos de liofilização vazios, com soro SP antes e após a liofilização e o peso do soro liofilizado	75
Tabela 2. Valores dos pesos à temperatura ambiente obtidos dos frascos de liofilização vazios, com soro CP antes e após a liofilização e o peso do soro liofilizado	76
Tabela 3. Valores das médias e desvios padrão dos parâmetros bioquímicos para T_i , T_0 e T_{13} nos soros SP para os diferentes processos de conservação	172
Tabela 4. Valores das médias e desvios padrão dos parâmetros bioquímicos para T_i , T_0 e T_{13} nos soros CP para os diferentes processos de conservação	173
Tabela 5. Valores de p para os níveis dos analitos em T_i entre os soros SP e CP e entre o T_i e T_0 (amostras-controle conservadas durante 30 dias)	82
Tabela 6. Valores de p para os níveis dos analitos nos soros SP e CP entre T_0 (amostras-controle conservadas durante 30 dias) e T_{13} após 300 dias de monitoramento	83
Tabela 7. Valores de p para a comparação dos níveis dos analitos entre os processos de conservação após 300 dias de monitoramento (T_{13})	84
Tabela 8. Valores dos CV dos analitos nos soros SP e CP nos diferentes processos de conservação, após 300 dias de monitoramento	86
Tabela 9. Classificação dos CV analíticos dos soros SP e CP quanto às EQA baseados nos componentes da variação biológica após 300 dias de monitoramento.....	146
Tabela 10. Estabilidade dos analitos nos soros SP e CP nos processos de conservação a $\leq -18^\circ\text{C}$, $\leq -80^\circ\text{C}$ e a $2 - 8^\circ\text{C}$ – liofilizado, após 300 dias de monitoramento	147

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Esquema de trabalho durante os 300 dias de experimento	78
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AEQ	Avaliação Externa da Qualidade
ALP	Fosfatase Alcalina
ALT	Alanina Aminotransferase
AMC	Analytical Methods Committee
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASQ	American Society for Quality
AST	Aspartato Aminotransferase
ASTM	American Society for Testing and Materials
BPLC	Boas Práticas de Laboratório Clínico
CAP	College of American Pathology
CE	Colesterol Esterase
CEQ	Controle Externo da Qualidade
CIQ	Controle Interno da Qualidade
CITAC	Cooperation on International Traceability in Analytical Chemistry
CLIA'88	Clinical Laboratories Improvement Amendments – Focus on clinic and office laboratories
CLLF	Capacidade Latente de Ligação do Ferro
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute
CNP	2-cloro-4-nitrofenol
CO	Colesterol Oxidase
CP	Com preservante
CQ	Controle de Qualidade
CTLE	Comissão Técnica de Laboratório de Ensaio
CV	Coeficiente de Variação
Cv_i	Variação intra-indivíduo
Cv_g	Variação inter-indivíduo
DCA	Dicloroanilina Diazotada
DHBS	Ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibenzenosulfônico
DSBmT	Disulfobutilmetatoluidina Sódica
E_A	Erro Aleatório
EQA	Especificações da Qualidade Analítica

E _S	Erro Sistemático
E _T	Erro Total
EU	European Union
Gal-G2	1,4-galactopiranosilmaltose
Gal-G2- α -CNP	α -(2-cloro-4-nitrofenil)- β -1,4-galactopiranosilmaltose
GGT	Gama Glutamil Transferase
GLDH	Glutamato Desidrogenase
GOD	Glicose Oxidase
GQT	Gerenciamento de Qualidade Total
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
HTLV	Vírus Linfotrópicos-T Humano
IDMS	Diluição Isotópica e Espectrometria de Massa
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia
ISO	International Organization for Standardization
LDH	Desidrogenase Láctica
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LGC	Laboratory of the Government Chemistry
MDH	Malato Desidrogenase
MR	Material de Referência
MRC	Material de Referência Certificado
Na ⁺	Sódio
NAD ⁺	Nicotina Adenina Dinucleotídeo
NADH	Nicotina Adenina Dinucleotídeo, forma reduzida
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NCEP	National Cholesterol Education Program
NIST	National Institute of Standards and Technology
NKDEP	National Kidney Disease Education Program
NRSCL	National Reference System for the Clinical Laboratory
K ⁺	Potássio
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RSC	Royal Society of Chemistry

s	Desvio padrão
SP	Sem preservante
SRM	Standard Reference Material
TP	Teste de Proficiência
VIM	Vocabulary International of Metrology
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
WASP	Word Association of Society of Pathology
Xm	Média

1. Introdução

Os primeiros indícios de exames laboratoriais datam de vários séculos atrás. Papyrus, antes do ano de 1000 A.C. escreveu registros de descrições de parasitas intestinais. Médicos hindus realizaram urinálise rudimentar quando observaram que algumas urinas tinham sabor doce e atraía formigas. No século XVII, com a invenção do microscópio, o estudo de amostras biológicas evoluiu de simples exame visual para o exame microscópico. No final do século XIX surgiram os primeiros laboratórios clínicos nos Estados Unidos com apenas uma mesa e um microscópio. Eles eram na sua maioria, frequentados por médicos que tinham um interesse especial na "medicina de laboratório". Um censo realizado nos Estados Unidos em 1900 listou apenas cem técnicos de laboratório, todos do sexo masculino. Após a primeira Guerra Mundial, os laboratórios cresceram em número e tamanho, tornando-se necessário não só o treinamento e qualificação dos profissionais, como também a definição dos requisitos educacionais. Na década de 1930, os requisitos básicos de ensino foram estabelecidos e as escolas da tecnologia médica transformaram-se em laboratórios de formação de profissionais. Desde a segunda guerra mundial, a tecnologia dos ensaios laboratoriais tornou-se cada vez mais complexa e tais ensaios passaram a desempenhar uma função essencial na clínica médica. Atualmente, os ensaios laboratoriais fornecem um nível detalhado de cuidados à saúde. Estão em constante aprimoramento e ampliação em resposta às novas tecnologias, novas regulamentações federais, e mudanças nos cuidados necessários à saúde (ESTRIDGE et al., 2000).

A medicina laboratorial denominada Patologia Clínica ou Análises Clínicas é uma especialidade médica que fornece elementos essenciais para o diagnóstico, o prognóstico e o monitoramento terapêutico de pacientes. É uma estrutura prestadora de serviços especializada, cuja finalidade é fornecer recursos diagnósticos complementares (MENDES et al., 2007; YOUNG e BERMES, 1998). Para Young e Bermes (1998), a função do Laboratório Clínico é realizar análises qualitativas e quantitativas em líquidos biológicos como sangue, urina, fezes, líquido e outros materiais.

Os ensaios bioquímicos são utilizados extensamente pelos clínicos, tanto na confirmação do diagnóstico para uma doença de base metabólica evidente (Ex. Diabetes Mellitus, hipotireoidismo), como também para mudanças bioquímicas que são conseqüências das doenças (Ex. Insuficiência renal, má absorção). A clínica médica é baseada na anamnese do paciente, sendo que alguns sinais clínicos originam investigações que muitas vezes são auxiliadas pelos exames laboratoriais. Estas investigações podem ser determinantes para confirmar ou impugnar um diagnóstico. Estes testes utilizados primeiramente para diagnosticar podem também fornecer informações prognósticas e alguns são utilizados

especificamente para este propósito, como por exemplo, medições periódicas da concentração plasmática de creatinina em uma doença renal progressiva, utilizadas para indicar quando um processo de diálise pode ser necessário. Contudo, a maior utilização dos testes bioquímicos é o seguimento do curso de uma doença e o monitoramento dos efeitos do tratamento, tais como, a determinação de hemoglobina glicada em pacientes com Diabetes Mellitus ou a calemia durante tratamento com diuréticos. Outra utilização relevante dos testes bioquímicos é para determinar se uma condição está presente subclínicamente, como a triagem em massa de recém-nascidos para fenilcetonúria (MARSHALL e BANGERT, 2008).

1.1 EVOLUÇÃO DA QUALIDADE DOS PROCESSOS ANALÍTICOS

Os sistemas de qualidade em organizações de Assistência à Saúde estão evoluindo. As pressões públicas e privadas para a contenção de custos são paralelas às pressões pela melhoria da qualidade, requerendo que as organizações de Assistência à Saúde adotem novos sistemas ou aprimorem seus sistemas para o controle de qualidade. Diante destas pressões, as indústrias implementaram o chamado Gerenciamento de Qualidade Total (GQT) (WESTGARD e KLEE, 2006).

O laboratório clínico atual tem se desenvolvido para uma função de membro ativo aos cuidados com os pacientes. Com o rápido avanço da tecnologia, as exigências de qualidade do público em geral, a maior demanda de pacientes e o maior número de processos judiciais, aumentou a necessidade dos laboratórios primar com os cuidados aos pacientes e na geração de informações sobre a qualidade dos seus serviços. (TAMBWEKAR, 2009).

O controle de qualidade em química analítica é um conceito antigo. Desde a existência da química clínica há a necessidade de controle de qualidade para verificação do seu desempenho. Sua aplicação data do início do século passado (KATEMAN e BUYDENS, 1993):

1908 - Gosset publicou um artigo sobre o erro da média denominando-o de “Student” e criando um parâmetro estatístico conhecido até hoje como “t-Student”. Isto permitiu que dois grupos de resultados fossem comparados quantitativamente, tais como aqueles obtidos de métodos de amostras ou análise.

1928 – Baule e Benedetti-Pichler publicaram um estudo sobre o número mínimo de amostras de lotes não homogêneos, indicando assim, os parâmetros de qualidade por amostragem.

1931 – Shewhart introduziu o gráfico de controle conhecido como “gráficos de Shewhart”, sendo o primeiro grande impacto em controle de qualidade analítica. Tal gráfico

permite a supervisão contínua da exatidão e da precisão, possibilitando a tomada de medidas corretivas quando os limites de controle são ultrapassados (TABAK, 2004).

Após 1940, muitas publicações apareceram sobre a aplicação de técnicas estatísticas em química clínica, sendo que muitas foram direcionadas na validação dos resultados analíticos.

1947 – Belk e Sunderman introduziram o gráfico de Shewhart como um meio para o controle do produto, sendo mais tarde confirmadas por resultados de estudos semelhantes (TONKS, 1963).

1950 – Levey and Jennings descreveram um sistema formal de controle de qualidade intralaboratorial baseado na estimativa da exatidão e da precisão. Com este sistema muitos progressos de controle interlaboratorial foram criados, alguns sob a supervisão governamental, outros sob a supervisão de conselhos fundados por químicos clínicos.

1953 – Foi introduzido o primeiro soro controle para Bioquímica (TAMBWEKAR, 2009).

1959 – Foram introduzidos padrões para cianometahemoglobina (TAMBWEKAR, 2009).

Na década de 60, surgiram os controles comerciais para analisadores sanguíneos (TAMBWEKAR, 2009) e a introdução do Controle de Qualidade fornecendo ferramentas estatísticas para monitorar o desempenho dos testes, identificando problemas e corrigindo erros (WESTGARD et al., 1990a).

No início da década de 70, a prática de controle de qualidade evolui com o crescente uso dos analisadores multitestes (CEMBROWSKI, 1997).

1979 – Limonard sugeriu a aplicação da teoria de controle de qualidade para fins de controle de qualidade analítico.

Na década de 80, houve a introdução do conceito de Garantia da Qualidade (WESTGARD et al., 1990a). Em 1981, Westgard, baseado no gráfico de Levey-Jennings introduziu as “regras de controle” utilizando-as como critério de julgamento, para verificar se as medições dos controles representam desempenhos típicos ou atípicos (estáveis ou instáveis) do método analítico (WESTGARD et al., 1981; JESPERSEN et al., 1999).

Na década de 90, houve a introdução do conceito da incerteza, devido à falta de consenso sobre como expressar a qualidade dos resultados das medições (WESTGARD e STEIN, 1997; PANTEGHINI, 2010).

1.2 QUALIDADE EM LABORATÓRIO DE ANÁLISES CLÍNICAS

A “International Organization for Standardization” (ISO) 9001:2008 define qualidade como “o grau onde um conjunto de características inerentes efetua os requisitos”. A Garantia da Qualidade é a ferramenta que possibilita o laboratório fornecer resultados confiáveis, adequados e corretamente interpretados (TAMBWEKAR, 2009).

De acordo com Travnicková (2009), a “American Society for Quality” (ASQ) sugeriu a definição de qualidade em laboratório clínico como o sistema de coleta e análise de amostras humanas, cujos resultados:

- i) oferecem apoio ao diagnóstico, à prevenção e outras informações de importância clínica sobre o estado de saúde do paciente;
- ii) atendem aos requisitos de precisão, repetibilidade e rastreabilidade metrológica;
- iii) buscam minimizar os erros;
- iv) é rápido, seguro, eficiente e de baixo custo;
- v) devem estar focados na satisfação do cliente e na melhoria contínua.

O sistema de controle de qualidade é composto de: (i) compreensão do erro analítico; (ii) amostras para controle de qualidade; (iii) um conjunto de regras de inspeção, aplicadas sobre os resultados da amostra-controle, para avaliar se a corrida analítica está sob controle ou não; (iv) procedimentos bem definidos para a realização de ações quando a corrida analítica está “fora de controle”, de modo a garantir que o processo retorne ao controle aceitável (BADRICK, 2008).

No Brasil, as Boas Práticas de Laboratórios Clínicos (BPLC) constituem o conjunto mais importante de normas que definem a padronização dos processos no Laboratório Clínico. Estas normas foram desenvolvidas pela Comissão Técnica de Laboratórios de Ensaio - CTLE-04, um comitê multidisciplinar de especialistas coordenados pelo Instituto Nacional de Metrologia – INMETRO (INMETRO - BPLC, 1997). Além das BPLC, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou em 2005, a Resolução da Diretoria Colegiada – RDC 302:2005, que trata do “Regulamento técnico para funcionamento de laboratórios clínicos”, onde define os requisitos para funcionamento de laboratórios clínicos e postos de coleta, públicos ou privados, que realizam exames de patologia ou análises clínicas e citologia (BRASIL, 2005). Estas normas visam disciplinar as organizações quanto ao funcionamento e as condições sob os quais os exames nos laboratórios clínicos são planejados, realizados, monitorados, assinados, registrados e liberados e ainda como as amostras e os dados são arquivados e conservados. Para tanto é necessário o conhecimento de algumas definições utilizadas em um laboratório clínico.

Um sistema analítico inclui reagentes, calibradores, instrumentos, procedimentos analíticos, amostras de pacientes e amostras-controle, itens necessários para se produzir resultados. Os reagentes são soluções químicas que reagem de forma previsível para um determinado analito, e esta reação pode permitir a medição da quantidade do analito presente na amostra. Os calibradores são materiais que possuem uma quantidade conhecida do analito. Os equipamentos misturam as amostras (dos pacientes, dos Testes de Proficiência - TP e das amostras-controle) com os reagentes e comparam-na contra os valores conhecidos dos calibradores (BROOKS, 2001).

Uma definição para procedimento analítico conforme o “Vocabulary International of Metrology” (VIM) 2008 seria a “descrição detalhada baseada em um ou mais princípios de um dado método, conforme um modelo de medição incluindo todo cálculo destinado à obtenção de um resultado de medição” (OLIVEIRA, 2009).

O VIM (1993) define uma medição como um “processo de obtenção experimental de um ou mais valores que podem ser, razoavelmente, atribuídos a uma grandeza.”. Quantidade é definida como “um atributo de um fenômeno, corpo ou substância que pode ser qualitativamente distinguido e quantitativamente determinado” (HIBBERT, 2007; OLIVEIRA, 2009).

Hibbert (2007) postula que o programa de medição analítica validado pelo “Laboratory of the Government Chemistry” (LGC) exemplifica uma abordagem atual para a qualidade das medições clínicas. O programa tem seis princípios: (i) medições analíticas devem ser feitas para satisfazer um requisito; (ii) medições analíticas devem ser feitas usando métodos e equipamentos que tenham sido testados para garantir que sejam adequados à finalidade; (iii) funcionários que realizam as medições analíticas devem ser qualificados e competentes para realizar tal tarefa; (iv) deve haver uma avaliação regular, independente do desempenho técnico do laboratório; (v) medição analítica feita em um local deve ser coerente com outras localidades; e (vi) organizações que fazem medições analíticas devem ter bem definido seus controle e procedimentos para a garantia da qualidade.

A garantia da qualidade provê a confiança aos laboratórios de que os requisitos da qualidade estão sendo realizados. De uma maneira geral, ajuda as organizações a fornecer confiabilidade, qualidade e desempenho de seus processos. A garantia da qualidade faz parte do gerenciamento da qualidade, um processo avançado que é implementado para monitorar e avaliar todos os passos das operações dos ensaios laboratoriais e inclui os processos pré-analíticos, analíticos e pós-analíticos. Os sistemas mais comuns de garantia da qualidade em laboratório clínico são a ISO 9001:2008, “Clinical Laboratories Improvement Amendments –

Focus on clinic and office laboratories” (CLIA’88) e ISO 15.189 (2003) (TAMBWEKAR, 2009).

A garantia da qualidade depende de vários fatores inter-relacionados, como: (i) procedimentos documentados e padronizados das fases pré-analítica, analítica e pós-analítica; (ii) desempenho de instrumentos e equipamentos (manutenções); (iii) desempenho dos ensaios (método, validação, padrões, calibradores, controles e ensaio de proficiência); (iv) manutenção de registros; (v) sistemas de acreditação e; (vi) melhoria contínua da qualidade (TAMBWEKAR, 2009).

1.3 RASTREABILIDADE METROLÓGICA

O VIM (2008) define Rastreabilidade Metrológica como a “Propriedade de um resultado de medição estar relacionado a uma referência através de uma cadeia ininterrupta e documentada de calibrações, cada uma contribuindo para a incerteza de medição” (OLIVEIRA, 2009; KONIECKA e NAMIESNIK, 2009).

Em 1993, a “Cooperation on International Traceability in Analytical Chemistry” (CITAC) foi criada para incentivar a realização da rastreabilidade metrológica em química analítica. A “European Union” (EU) implementou a obrigatoriedade da rastreabilidade metrológica dos dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro* com efeito em nível mundial. O objetivo da rastreabilidade metrológica em laboratório clínico é ligar os resultados das medições de uma amostra do paciente com um material de referência, tornando-os comparáveis através do sistema de medição, da localização e do tempo. Assim, o estabelecimento da rastreabilidade metrológica necessita de um sistema de medição de referência composto por (VESPER e THIENPONT, 2009):

- Definição do analito;
- Processo de referência e/ou material de referência estabelecido;
- Conhecimento das incertezas de medição; e
- Cadeia ininterrupta de calibrações e valores de atribuições.

Bièvre e Gunzler (2003) colocam que a veracidade (“grau de concordância entre a média de um número infinito de valores medidos repetidamente e um valor verdadeiro” – VIM, 2008) de um procedimento de medição é obtida por uma rigorosa rastreabilidade metrológica de resultados, baseados na hierarquia de calibração.

A figura 1 apresenta a cadeia de rastreabilidade metrológica, adaptada por Tambwekar (2009) da ISO 17511:2003.

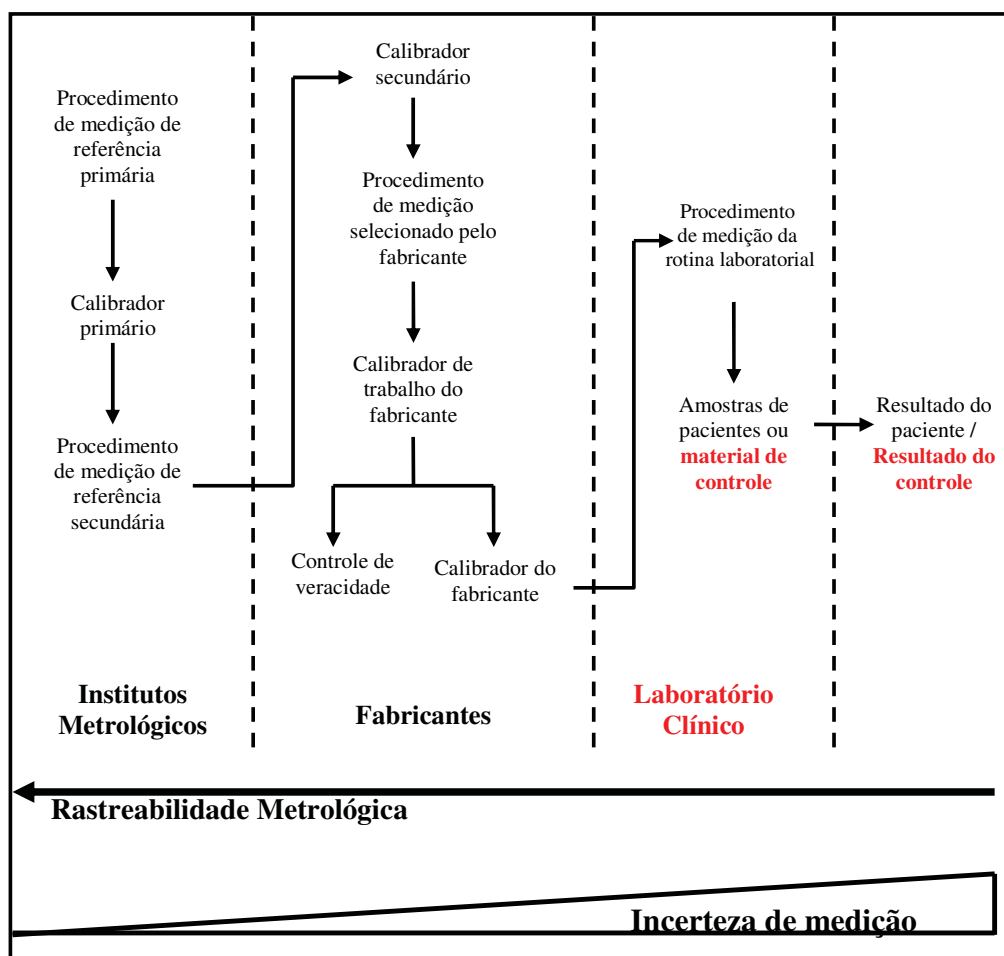


Figura 1- Cadeia de Rastreabilidade Metrológica. Fonte: Tambwekar (2009).

1.3.1 Materiais de Referência (MR)

Um critério para a harmonização dos ensaios é a preparação e disponibilidade de MR internacionais da mais alta qualidade; sendo preparados de uma forma que preserve, na medida do possível, as características naturais dos analitos a que se destinam, e ao mesmo tempo resulte em estabilidade em longo prazo e comutatividade com as amostras dos pacientes nos diferentes sistemas de ensaios utilizados para esses analitos (JOHNSON, 2010).

Os MR são as estruturas principais na cadeia de rastreabilidade em química analítica. Suas características metrológicas, principalmente a incerteza das propriedades fornecidas e sua posição na hierarquia de rastreabilidade devem ser focadas para a garantia da qualidade (ZSCHUNKE, 2000). Para a manutenção da precisão dos resultados das medições de laboratório no decorrer do tempo é necessária a criação e manutenção de veracidade desses resultados, ou seja, rastreabilidade metrológica com um sistema de referência e uma precisão definida ao longo do tempo.

O VIM (1993) define MR como “um material ou substância, que tem uma ou mais propriedades bem estabelecidas para ser usado na calibração de um equipamento, na avaliação de um método de medição ou para especificação de valores de padrões e calibradores” (CROSBY et al., 1995; THOMPSON e WOOD, 1995; FÉRARD e LESSINGER, 1998; BARWICH et al., 2001; LINKO, 2003; BIÈRE e GUNZLER, 2005; WESTGARD e KLEE, 2006; VÉSPER et al., 2007; OLIVEIRA, 2009; KONIECKA e NAMIESNIK, 2009).

1.3.1.1 Materiais de Referência Certificados (MRC)

O VIM (1993) define MRC como “um MR acompanhado por um certificado onde os valores de uma ou mais propriedades são certificados por procedimentos que garantam sua rastreabilidade metrológica para a realização exata da unidade onde as propriedades dos valores são expressas”. Cada valor certificado é acompanhado de uma incerteza em um nível declarado de confiança. (CROSBY et al., 1995; THOMPSON e WOOD, 1995; FÉRARD e LESSINGER, 1998; BARWICH et al., 2001; WESTGARD e KLEE, 2006; OLIVEIRA, 2009; TAMBWEKAR, 2009; KONIECKA e NAMIESNIK, 2009) .

1.3.2 Padrões ou Calibradores

Um padrão é uma substância cuja concentração é conhecida. A “International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine” (IFCC) define uma solução padrão como “material ou solução onde a amostra é comparada em sequência para determinar a concentração ou outra quantidade”. O padrão possui matriz diferente da amostra do paciente. No final do procedimento de medição, a amostra é comparada, via a mesma propriedade medida (Ex. intensidade de cor), à solução padrão como base para a estimativa da concentração do analito na amostra (TAMBWEKAR, 2009).

Existem três tipos de padrões:

1. Padrão Primário: É o padrão com a mais elevada qualidade metrológica, cujo valor é aceito sem referência de outros padrões de igual qualidade (BARWICH et al., 2001). São estabelecidos por meio de um procedimento de medição de referência primário (KONIECKA e NAMIESNIK, 2009). São formas purificadas de substâncias químicas dissolvidas em solventes adequados. São estáveis e quando higroscópicos podem ser secados a temperaturas de 104 a 110°C sem alteração em sua composição. Um padrão primário é fornecido com um registro de análise dos elementos contaminantes que não deve exceder a 0,05% de seu peso (TAMBWEKAR, 2009).

2. Padrão Secundário: São substâncias fisicamente semelhantes aos analitos sob análise. A concentração do analito de um padrão secundário é determinada utilizando a análise por um método de referência aceitável calibrado com um padrão primário (KONIECKA e NAMIESNIK, 2009). Sua concentração não pode ser determinada diretamente pela massa do soluto ou volume da solução.

3. Padrão Interno ou Intrínseco: É um padrão que possui uma propriedade semelhante aquela do analito a ser avaliado. Idealmente o padrão interno deveria ser quimicamente semelhante à substância a ser analisada. A concentração do analito é determinada pela semelhança do resultado do analito e do padrão interno.

Na rotina laboratorial, os padrões primários não funcionam bem como calibradores, pelo fato de serem soluções aquosas ou alcoólicas contendo um composto puro preparado pela massa e assim se assemelharem muito pouco com as amostras humanas. São mais utilizados os padrões secundários, pois são soluções com uma matriz semelhante às amostras humanas (RICÓS et al., 1999).

Um calibrador é definido como “Um material (por exemplo, solução) ou um padrão conhecido com características quantitativas e/ou qualitativas atribuídas (por exemplo, concentração, atividade, intensidade, reatividade) usado para calibrar, graduar, ou ajustar um procedimento de medição ou para comparar a resposta obtida com a resposta do modelo da amostra e/ou ensaio” (WESTGARD e KLEE, 2006).

De uma maneira mais simples, a calibração é o processo do ensaio que confere o ajustamento de um instrumento, kit ou sistema analítico apresentando uma relação conhecida entre a resposta da medição e uma propriedade do analito que está sendo medido no procedimento analítico. A frequência de calibração recomendada pelos fabricantes dependerá da estabilidade do sistema analítico (TAMBWEKAR, 2009). A calibração e validação de materiais de precisão fornecidos pelo fabricante serão apropriadas para o sistema analítico de medição em uso. Os MR de uso geral para utilização com múltiplos métodos devem ser validados para cada sistema. Os fabricantes dos MR secundários devem fornecer esta informação, bem como a documentação de rastreabilidade metrológica com a base de precisão utilizada para a atribuição do valor alvo (MILLER, 1996).

A CLIA'88 solicita que os laboratórios recalibrem seus métodos analíticos pelo menos a cada seis meses. No entanto, os instrumentos devem ser recalibrados em situações como: (i) manutenção do equipamento (substituição de algum componente relevante ou conserto); (ii) instalação de novo software e; (iii) ocorrências no controle de qualidade mostrando alterações ou tendências. Os calibradores podem ser classificados como específicos (utilizado para

calibração de um único parâmetro) ou multicalibradores (usado para calibração de vários parâmetros ao mesmo tempo), e devem ser utilizados conforme as recomendações dos fabricantes (TAMBWEKAR, 2009).

Conforme Sadler (2008), o “Clinical and Laboratory Standard Institute” (CLSI) não recomenda múltiplas recalibrações, pois os efeitos da calibração podem afetar a precisão estruturada e, conseqüentemente afetar os resultados dos testes de pacientes. Entretanto, variação de lote para lote de materiais de calibração (incluindo a composição da matriz) é uma conhecida fonte de erro em imunoensaios.

1.3.3 Materiais de Controle

A IFCC define um material de controle como **“amostra/solução utilizada exclusivamente para procedimentos de controle de qualidade, não para calibração”** (WESTGARD e KLEE, 2006; TAMBWEKAR, 2009; QUAM, 2010).

O “National Reference System for the Clinical Laboratory” (NRSCL) define material de controle como “um dispositivo, solução, preparação liofilizada, ou pool coletado de amostras humanas ou animais, ou ainda material derivado artificialmente, destinados a serem utilizados no processo de controle de qualidade” (WESTGARD e KLEE, 2006).

Os tipos de materiais de controle que podem ser utilizados para Controle Interno da Qualidade (CIQ) no laboratório de análises clínicas são: pool de amostras congeladas ou liofilizadas de pacientes e; pool de soro líquido comercial estabilizado em baixas temperaturas (CHAWLA, 2003).

Sempre que possível, é recomendado adquirir ou produzir controles para um longo período de tempo (pelo menos, um ano), com o mesmo número de lote. Esse aspecto do planejamento proporcionará um monitoramento contínuo do processo analítico, uma vez que ocorre a substituição dos reagentes e a manutenção de instrumentos (QUAM, 2010). A variação frasco a frasco deve ser pequena de modo que as diferenças entre as medições repetidas são atribuídas apenas ao método analítico. Eles devem ter a mesma matriz da amostra a ser analisada (sangue total, plasma, soro, urina, líquido, etc.) (WESTGARD e KLEE, 2006).

Os frascos com materiais de controle liofilizados são produzidos em um processo de fabricação onde a variação de peso do produto liofilizado de frasco para frasco pode variar até 0,6%. (BADRICK, 2003). Amostras-controle comerciais liofilizadas devem ser reconstituídas com água ou diluente específico. A padronização dos passos de reconstituição como o uso de pipeta calibrada, água tipo I (resistividade maior ou igual a 10 megaohm/cm e condutividade

menor ou igual a 0,1 mS/cm a 25°C - CLSI) e outras instruções especificadas são de grande importância para minimizar a variabilidade frasco a frasco durante o processo de reconstituição. Amostras-controle líquidas eliminam o processo de reconstituição. Estes produtos são geralmente mais caros e às vezes contêm aditivos e preservantes que podem introduzir fontes de erros em certos métodos. Em geral, as amostras-controle líquidas são estáveis por 14 a 30 dias após o frasco ser aberto quando em temperatura de refrigeração, enquanto que produtos liofilizados são estáveis por aproximadamente 48 horas após reconstituição. Em alguns casos os controles líquidos podem ser a opção mais apropriada, pois reduzem o desperdício devido à estabilidade, eliminam a variabilidade frasco a frasco, e reduzem os erros do operador devido aos processos de reconstituição (QUAM, 2010).

Os níveis dos analitos nas amostras para o Controle de Qualidade (CQ) devem ser escolhidos em concentrações importantes para decisões clínicas e/ou limites críticos de desempenho dos métodos analíticos, tais como os limites superior e/ou inferior de linearidade. Duas ou três diferentes concentrações podem ser necessárias para cada analito. A escolha das amostras-controle com concentrações críticas (clínica e/ou de desempenho) permite ao analista a estimativa do erro casual e dos níveis críticos dos métodos durante a sua aplicação e monitoramento (QUAM, 2010). A CLIA'88 recomenda o uso de no mínimo dois níveis de controle por dia como requisito mínimo para o CQ (DOOLEY, 2007).

Muitos ensaios laboratoriais, tais como para digoxina, hemoglobina A1c e capacidade total de ligação do ferro, necessitam de pré-tratamento das amostras para sua realização. Estes procedimentos freqüentemente necessitam de pipetagem manual e passos de homogeneização, e para manter constante o fluxo operacional o melhor é ter amostras-controle que também serão submetidos ao pré-tratamento (QUAM, 2010).

1.3.3.1 Densidade de líquidos

As propriedades físicas são propriedades de uma substância que não se alteram, independentemente do tamanho da amostra que é analisada. A densidade é a mais fundamental de todas as propriedades físicas. Aplica-se em substâncias em qualquer dos três estados: sólido, líquido ou gás. A medição da densidade também é necessária para converter as medições volumétricas em massa. A densidade é definida como a massa por unidade de volume de uma substância em condições estabelecidas, assim expressa a quantidade de matéria presente nesta unidade de volume. É geralmente indicada pela letra grega rho (ρ) e é dada por (RUSSELL, 1994; SINGH, 2009):

$$\rho = \frac{m}{V}$$

Onde: ρ = densidade de uma substância

m = massa de uma substância em kg

v = volume de uma substância em m^3

As unidades mais comuns de densidade são quilograma/ m^3 (kg/m^3) ou grama/litro (g/L) ou grama/mililitro (g/mL) (RUSSELL, 1994; GILLUM, 2008; SINGH, 2009).

A gravidade específica, também conhecida como densidade relativa, é um número abstrato que expressa a relação entre a densidade de uma substância com a densidade de outra substância de referência, ambos obtidos na mesma temperatura e pressão (GILLUM, 2008; SINGH, 2009). Para sólidos e líquidos a água é tomada como referência, enquanto que o ar é a referência para gases. Cuidados devem ser tomados para definir condições normais em que as densidades e pesos específicos são avaliados, de modo a não introduzir erros devido à variação das condições de medição (SINGH, 2009).

Alguns pontos devem ser considerados para a padronização das medições de densidade (KOLESKE, 1995):

- Um centímetro cúbico (cm^3) de água pura a $4^\circ C$ é definido em peso como 1.0000g (densidade da água = $1.000g/1.000\ cm^3$).
- A densidade relativa é a relação entre a densidade determinada para um material à temperatura T_1 dividido pela densidade de um material de referência na temperatura T_2 (Densidade relativa_A = densidade A à temperatura T_1 / densidade da água à $0^\circ C$.)

Se um líquido A tem a mesma densidade da água em T_1 , quando determinada por um dispositivo de flutuação, a densidade pode ser determinada a partir de uma tabela de valores conhecidos da densidade estabelecidos para a água pura em um intervalo de temperatura. Quando T_2 é igual a $4^\circ C$, a densidade relativa da água pura é igual à densidade medida. Com o aumento da temperatura, a água se expande. Para um volume constante, a massa de água deve ser reduzida para caber em um determinado volume. Assim, o valor da densidade da água deve diminuir com o aumento da temperatura. A densidade relativa é uma relação de dois valores carregando as mesmas unidades, portanto, é um número sem unidade (KOLESKE, 1995).

A densidade é uma grandeza derivada, pois é definida através de outras grandezas e depende do tipo de substância, da temperatura e da pressão. Ela pode ser utilizada para a

determinação da pureza de amostras, pois é significativamente alterada pela presença de contaminantes (BRAGA, 2009).

Picnômetro são dispositivos estáticos usados para medir as densidades de líquidos e gases. São fabricados como recipientes de volume fixo, que podem ser preenchidos com amostras de fluidos. A densidade do fluido é medida por pesagem da amostra no recipiente. A versão mais simples consiste de um recipiente de vidro na forma de uma garrafa com tampa longa contendo um orifício capilar. O volume e sua variação com a temperatura são determinados com exatidão. O capilar é usado para determinar o volume exato de líquido, proporcionando assim exatidão no preenchimento do picnômetro. Se o peso do picnômetro vazio é w_1 e o peso do picnômetro contendo um volume de líquido v à temperatura t , é w_2 , a densidade do líquido ρ_1 pode ser calculada diretamente de (DYER, 2001; SINGH, 2009):

$$\rho_1 v = w_2 - w_1$$

Onde: ρ_1 = densidade do líquido

v = volume do líquido a uma determinada temperatura

w_1 = peso do picnômetro vazio

w_2 = peso do picnômetro contendo um volume de líquido

Existem alguns problemas técnicos potenciais relacionados à picnometria: (i) o volume interior deve ser reproduzível com a exatidão necessária; (ii) o frasco deve ser cuidadosamente limpo entre as medições; (iii) o picnômetro por si só deve ser um objeto apropriado para a pesagem; (iv) se todas as medidas não podem ser realizadas na mesma temperatura, então a expansão térmica do picnômetro deve ser conhecida e; (v) os líquidos devem ser introduzidos sem entrada de bolhas de ar (KOCHSIEK e GLASER, 2010).

O picnômetro tem vantagens e desvantagens. As vantagens são que, se usados corretamente, eles são precisos e podem ser utilizados tanto para medições de densidade como de massa específica. As desvantagens são: (i) os cuidados técnicos devem ser praticados para obtenção de resultados exatos; (ii) picnômetro de alta precisão são caros e; (iii) necessidade de balanças de precisão e condições controladas de laboratório (DYER, 2001; SINGH, 2009).

1.3.3.2 Liofilização

A aplicação da liofilização é em geral para preservação dos componentes de materiais biológicos ou sintéticos, sendo utilizada inicialmente nos meados de 1930 para a preservação de preparações biológicas como a preservação de plasma humano. Aplicações correntes

incluem peptídeos, proteínas, vírus e outros microrganismos como ingredientes ativos de formulações farmacêuticas ou mesmo produto concluído na forma de dose final (CONSTANTINO e PIKAL, 2004).

O processo de liofilização tem sido amplamente utilizado na química clínica para preparação de amostras-controle e até mesmo na preparação de amostras individuais para análise. Em um típico processo de liofilização mais de 99% de água pode ser removida do produto liofilizado. Normalmente, a composição de um material liofilizado não é alterada no processo. A liofilização consiste na primeira etapa no congelamento do material em aproximadamente - 40°C ou menos e, em seguida, sua submissão ao alto vácuo; nestas condições a água sublima restando o material sólido não-sublimável. A liofilização é mais eficiente quando o material a ser processado é estendido como uma película fina sobre a superfície interior do frasco do liofilizador. Isto pode ser obtido quando o recipiente é girado durante o congelamento (BERMES e YOUNG, 1998).

O processo de liofilização pode ser representado pelo diagrama de fases da água, uma abordagem gráfica de suas propriedades em termos de duas variáveis intensivas, pressão e temperatura. Este diagrama mostra as regiões onde as fases sólida, líquida e vapor estão presentes. A interseção das três linhas ocorre a uma temperatura de 0,0098°C e uma pressão de 4,58 mmHg, o chamado ponto triplo. Neste ponto, todas as três fases da água coexistem. Fornecendo calor a um material em condições abaixo do ponto triplo, a água contida neste produto passará diretamente do estado sólido ao de vapor, sublimando, sendo, portanto nestas condições onde ocorre a liofilização (AYROSA, 2004).

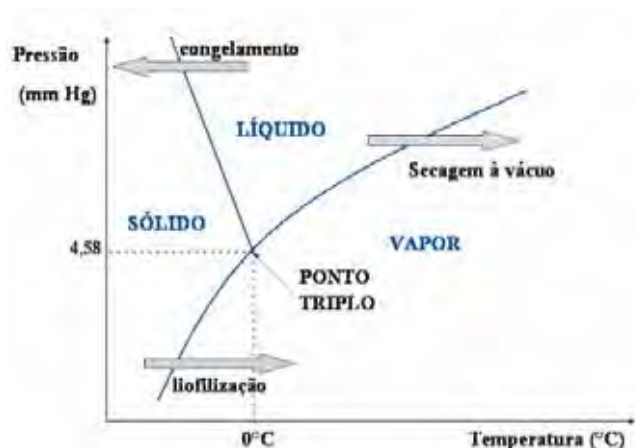


Figura 2 - Diagrama de fases da água. Fonte: Ayrosa, 2004.

A liofilização pode ser definida como um método controlável de desidratar materiais lábeis, normalmente de origem biológica, por meio da dessecação sob pressão reduzida. Tecnicamente pode ser descrita como: (i) resfriamento da amostra; (ii) conversão da água congelável em gelo e congelamento em temperatura de solidificação total dos componentes cristalizáveis; (iii) persistência de uma matriz amorfa composta de solutos não cristalizáveis e umidade não congelável; (iv) sublimação do gelo sob pressão reduzida; (v) evaporação da água da matriz amorfa e; (vi) eliminação da umidade remanescente na matriz aparentemente seca (AYROSA, 2004).

A liofilização apresenta algumas vantagens em relação a outros processos de desidratação. Mantendo-se a temperatura baixa durante todo o processo, evita-se muitas alterações das substâncias sensíveis ao calor e a umidade, resultando em um produto seco com características inalteradas da composição original. A reconstituição dos produtos liofilizados é mais fácil devido à estrutura porosa deixada pela saída da água (AYROSA, 2004). Camargo (2007) complementa que o processo de liofilização reduz a perda de constituintes voláteis e a tendência de aglomeração que alguns produtos apresentam quando dessecados por outras técnicas apresentando assim, maior estabilidade em sólidos liofilizados que as soluções aquosas equivalentes.

O sucesso do processo de liofilização é a estabilidade em longo prazo, preservação dos constituintes e reconstituição rápida do produto final liofilizado (MATEJTSCHUK et al., 2007). A meta de liofilização é obter um produto com boa estabilidade e que se mantenha inalterado após reconstituição. As vantagens e desvantagens da liofilização podem ser resumidas como segue (OETJEN e HASELEY, 2004):

Vantagens:

- A secagem em baixas temperaturas reduz a degradação de produtos sensíveis ao calor;
- O teor de umidade do produto final pode ser controlado durante o processo;
- O produto seco pode ter uma forma física atraente;
- Tendo o produto seco uma elevada superfície específica é rapidamente reconstituído;
- Após reconstituição, o analito pode ser determinado com precisão.

Desvantagens:

- O elevado investimento, manutenção e custos operacionais;
- A complexidade do processo e do equipamento requer uma equipe qualificada e permanentemente treinada.

O processo de liofilização ocorre em três etapas: congelamento, secagem primária e secagem secundária. A qualidade do produto final depende da aplicação correta dos parâmetros que envolvem estas fases e sua correta manipulação. (AYROSA, 2004; TATTINI JUNIOR, 2004; CAMARGO, 2007).

1.3.3.2.1 Congelamento inicial

O congelamento da solução é necessário para preparar o produto para a liofilização. Esta parte do processo muitas vezes é mais crítica porque a estrutura porosa do produto final dependerá do congelamento do produto inicial (BINDSCHAEDLER, 2007). O congelamento tem uma importante influência na forma, tamanho e distribuição dos cristais de gelo e, desta forma nos processos de secagem e estrutura final dos produtos liofilizados (HUI et al., 2008). Durante o congelamento de uma solução aquosa, a água transforma-se em gelo com alto grau de pureza, porém os constituintes não aquosos são concentrados em uma pequena quantidade de água. Quando uma solução, cuja concentração está situada à esquerda do ponto eutético (temperatura de solidificação total) é submetida à redução da temperatura, ocorre a separação do gelo e a solução remanescente torna-se cada vez mais concentrada. Para a liofilização ocorrer, o material deve estar congelado havendo uma mudança de fase envolvendo o solvente. Se o solvente é água, então devem ser formados cristais de gelo que resultam na separação entre soluto e solvente. Os solutos são então confinados a uma localização conhecida como a região intersticial da matriz. Essa região intersticial não só tem que conter os solutos da formulação original, como também uma quantidade pequena de água que não cristalizou. A temperatura significativa da mobilidade da água intersticial é definida como a temperatura de colapso e dependerá da natureza dos solutos. A determinação precisa da temperatura de solidificação total de um determinado material constitui o limite térmico

superior que não deve ser ultrapassado durante a liofilização. Assim é descartado o risco de provocar o fenômeno do colapso, que é uma alteração estrutural perceptível como um encolhimento radial da matriz sólida do liofilizado, atribuída a uma redução da viscosidade (AYROSA, 2004).

O congelamento do material a ser liofilizado poderá ser realizado na forma de gotículas, pois apresenta uma maior área de superfície no ambiente resfriado e conseqüentemente, promove um congelamento rápido, resultando assim em um produto liofilizado mais homogêneo (BRIGGS e MAXWELL, 1976).

O congelamento rápido do soro ou plasma resulta em uma maior conservação da atividade e estabilidade das enzimas e outros compostos biológicos presentes, pois evita a formação de cristais de gelo e produz uma distribuição equilibrada dos componentes biologicamente ativos nas partículas congeladas (BRIGGS e MAXWELL, 1976).

1.3.3.2.2 Secagem primária

Quando no condensador e câmara do liofilizador, a temperatura e pressão requeridas são atingidas respectivamente, inicia-se a secagem primária. A temperatura de placa é aumentada de tal forma que a sublimação do gelo possa ocorrer na matriz do produto. A temperatura do produto é então diminuída para assegurar uma matriz completamente congelada ao longo de todo o processo de secagem primária. A temperatura do produto, durante o processo de secagem primária, será diretamente dependente da temperatura de placa e da pressão na câmara. Conseqüentemente para manter uma determinada temperatura do produto não é possível mudar a pressão na câmara sem a compensação de uma mudança na temperatura de placa. O final da secagem primária pode ser constatado pelo aumento da temperatura do produto, num valor próximo à do ambiente o que equivaleria, pela observação visual, ao desaparecimento da interface entre a camada seca e a camada congelada (AYROSA, 2004).

1.3.3.2.3 Secagem secundária

Após a secagem primária, prossegue-se com a evaporação da água remanescente por um período em geral de 30% a 50% do tempo gasto na primeira fase. O processo de secagem secundária diminui o conteúdo de umidade residual na massa formada pelo produto, de tal forma que já não haverá crescimento biológico ou reações químicas. O conteúdo de umidade de equilíbrio do produto será dependente da temperatura da massa, da pressão parcial do vapor de água sobre a superfície da mesma e da interação química entre a composição do

material e o vapor de água. Para um determinado material, o conteúdo de umidade final pode ser reduzido por um aumento na temperatura de placa (a uma pressão parcial constante do vapor de água) ou uma redução na pressão parcial do vapor de água sobre a superfície da massa (a uma temperatura constante do produto) (AYROSA, 2004).

1.4 COMUTATIVIDADE

Um dos objetivos fundamentais do laboratório clínico é que os resultados para as amostras dos pacientes sejam comparáveis independentes dos laboratórios que produziram os resultados (MILLER et al., 2006).

O termo “comutatividade” foi usado por Fasce et al., em 1973, referindo-se “a habilidade de um material processado mostrar propriedades analíticas interensaios semelhantes as amostras clínicas dos pacientes” (RICÓS et al., 1997; FRANZINI e CERIOTTI, 1998; RIFAI et al., 2000; VESPER et al., 2007). O ideal seria que materiais processados utilizados para calibração, padronização e verificação da exatidão entre os laboratórios fossem comutáveis com amostras de plasma ou soro fresco, mas na prática isto não ocorre (RIFAI et al., 2000).

Este conceito foi ampliado por documentos metrológicos mais recentes, onde descreve comutatividade como “a equivalência do relacionamento matemático entre os resultados dos diferentes procedimentos de medições para um material de referência com as amostras representativas de indivíduos saudáveis e doentes” (MILLER et al., 2006, VESPER et al., 2007). Comutatividade é uma característica específica do procedimento de medição e qualquer declaração da comutatividade de um material de referência exige mais informações sobre os procedimentos específicos de medição onde foi estabelecido ser comutável (VESPER et al., 2007).

Bièvre e Gunzler (2003) referem-se à comutatividade como a habilidade de um material mostrar a mesma relação entre os resultados de um conjunto de procedimentos e as amostras de rotina; e Gubern et al. (1995) completa que é dependente do método utilizado e quando enzimático, da natureza e fonte da enzima, e da matriz onde a enzima está dissolvida. Para tanto, a especificidade analítica de um procedimento de medição deve medir somente aquela quantidade pretendida. Discrepâncias entre os resultados de um procedimento de referência e o de rotina são freqüentemente causados pela não especificidade do procedimento de rotina, bem como a não utilização de um calibrador de amostras humanas para eliminar o efeito matriz. Portanto, as duas razões principais que podem afetar a cadeia de rastreabilidade metrológica e conseqüentemente perder a veracidade pela introdução do erro sistemático

(bias) são: insuficiência de comutatividade do material de calibração e a não especificidade do procedimento de medição. O efeito dessas propriedades separadas é frequentemente considerado em conjunto como “efeito matriz” (BIÈVRE e GUNZLER, 2003).

Os efeitos de matriz são geralmente considerados como a principal causa da falta de comutatividade das amostras-controle. Na verdade, o termo efeito matriz é usado como sinônimo de falta de comutatividade. Em alguns casos, alterações específicas da matriz mostram-se diretamente responsáveis pelo comportamento irregular dos materiais em alguns métodos analíticos. No entanto, as características do analito, em materiais de origem não humana, pode ser uma alternativa para não comutatividade (FRANZINI e CERIOTTI, 1998).

Os fornecedores de materiais de referência, destinados para calibração de procedimento de medição de rotina ou para avaliação do status de calibração devem incluir a validação da comutatividade como um requisito essencial. As BPLC recomendam que os materiais de referência destinados aos procedimentos de medição de rotina sejam providos de informações da comutatividade incluído no certificado de análise ou no rótulo dos produtos. (MILLER et al., 2006).

1.4.1 Efeito Matriz

A incompatibilidade das características de amostras, reagentes, instrumentos e ensaios têm sido designados como efeito matriz, a qual em geral é atribuída às características do pool de material processado. A natureza e causa do efeito matriz são pouco conhecidas, mas é reconhecido que podem afetar a exatidão se eles não forem considerados (WAYMACK et al., 1993).

Um dos problemas de alta complexidade em amostras-controle é o monitoramento do efeito matriz. Matriz é o meio físico-químico no qual o analito está contido. Quando um sistema analítico apresenta resultados estatisticamente diferentes para a mesma quantidade do analito presente em amostras-controle no decorrer de um período, processadas concomitantemente com amostras humanas frescas, esta diferença nos resultados é denominada efeito matriz. O impacto produzido pelo efeito matriz nas respostas analíticas ocorre de maneira complexa, devido a uma grande variedade de fatores (RIFAI et al., 2000; BASQUES, 2009b). Portanto, o efeito matriz afeta amostras de CIQ e TP, mas não afeta amostras de pacientes (BROOKS, 2001).

A composição e textura da matriz podem afetar a medição do analito a ser mensurado. O efeito matriz está sujeito a ser desconsiderado, já que frequentemente é obscurecido por outras fontes de erros, e desta forma é menosprezado na medição da incerteza total. Ignorar a

influência da matriz nas medições conduz às estimativas da incerteza ser apenas atribuídas ao método utilizado, equipamento ou material de referência inapropriado (BIÈVRE e GUNZLER, 2005).

O ideal para amostras-controle é ter a mesma matriz das amostras dos pacientes, assim elas comportar-se-ão da mesma forma. Contudo, os materiais de controle passam por manipulações durante sua produção que podem alterar as propriedades da matriz. Dentre estas manipulações estão a adição de aditivos para obter concentrações específicas e/ou estabilidade e mudanças físicas do meio como congelamento ou liofilização. Estas alterações podem causar interferências no processo analítico em relação às amostras humanas frescas (QUAM, 2010).

As amostras-controle líquidas ou liofilizadas reproduzem em geral os efeitos matriz, contudo é necessária a devida atenção para os seguintes fatores (RIFAI et al., 2000; ECKFELDT e COPELAND, 1993):

- Não utilizar plasmas vencidos e recalificados para se obter o soro;
- Modificações físicas introduzidas na estrutura das biomoléculas e na viscosidade do meio;
- Materiais submetidos a procedimentos necessários para alcançar estabilidade em longo prazo como a liofilização ou adição de preservante ou ambos;
- Diferenças entre isoformas de proteínas presentes nas amostras de pacientes e nas amostras-controle processadas;
- A combinação de certos analitos acrescentados nas amostras-controle para se alcançar a concentração desejada que possam ser encontradas nas amostras de pacientes, com menor prevalência.

O efeito matriz difere de interferências analíticas, onde estas são efeitos de substâncias exógenas (ex. fármacos) ou endógenas (metabólitos como a bilirrubina) que apresentam efeitos semelhantes tanto nas amostras-controle como em amostras de pacientes (ECKFELDT e COPELAND, 1993). A American Society for Testing and Materials (ASTM) descreve interferente como “um efeito devido à presença de um constituinte ou característica que influencia na medição de outro constituinte ou característica” (RIFAI et al., 2000). Para Fifield e Kealey (2000) a interferência é um efeito onde o comportamento de um analito no procedimento analítico é alterado ou ocultado, podendo originar-se da própria amostra, contaminantes, reagentes ou equipamentos utilizados para a medição.

Várias definições têm sido empregadas para efeito matriz. O “National Committe for Clinical Laboratory Standard” (NCCLS), atualmente conhecido como CLSI define matriz como “todos os componentes de um sistema de material, exceto o analito”. (RIFAI et al., 2000; VESPER et al., 2007) e para a ASTM, matriz é “o principal elemento ou elementos em uma amostra”. Vesper et al. (2007) considera efeito matriz como a influência de uma propriedade da amostra na medição sobre o valor da quantidade mensurada, independente da presença do analito.

O pool de soros congelados é geralmente considerado ser menos propenso a modificações da matriz que as amostras-controle comerciais liofilizadas. Entretanto, estes pools congelados podem ser preparados por um grande número de protocolos e podem exibir tendência de matriz método e material específico, requerendo assim, a validação de características de desempenho para assegurar a comutatividade com amostras individuais dos pacientes para um grupo de métodos analíticos, ou seja, os ensaios da rotina laboratorial. (RIFAI et al., 2000).

1.5 CONTROLE DE QUALIDADE ANALÍTICO

Controle de qualidade analítico é a parte do sistema de gerenciamento da qualidade com foco no cumprimento das exigências da qualidade analítica. São atividades planejadas para verificação da qualidade das medições (CROSBY et al., 1995).

O controle de qualidade baseado em desempenho permite selecionar regras e estratégias de controle que alertem para mudanças no desempenho do método. O desempenho que não contemplar as especificações da qualidade afeta tanto amostras de pacientes, como do controle interno e/ou externo da qualidade. Uma vez definida a especificação da qualidade, pode-se implementar a padronização nos processos de controle de qualidade e tomadas de decisão por meio das etapas (BROOKS, 2001):

1. Definir o valor alvo para cada controle de cada analito;
2. Definir o erro total aceitável para cada controle de cada analito;
3. Determinar a média ($\bar{X}_m$) válida para cada controle;
4. Determinar o desvio padrão (s) válido para cada controle;
5. Selecionar uma estratégia de controle apropriado que aumenta a probabilidade de detecção de erros e diminua a falsa rejeição.
6. Desenvolver métodos padronizados para investigar e escolher a ação apropriada para os sinais de alerta do CIQ diário.

1.5.1 Controle Interno da Qualidade (CIQ)

O propósito do CIQ é assegurar que um determinado nível de qualidade está sendo mantido nas análises de rotina. Isto significa que os erros que possam ocorrer devem estar dentro dos limites especificados. A probabilidade de falsa rejeição e a probabilidade de detecção de erros são características de desempenho do sistema de controle e devem ser conhecidos. A probabilidade de falsa rejeição é definida como a probabilidade de obter-se um sinal de rejeição quando os erros analíticos não estão presentes, exceto para a imprecisão inerente ou erro aleatório do método analítico; ou seja, a probabilidade de detecção de erros é a probabilidade de obter-se um sinal de rejeição quando um erro na análise está ocorrendo (WESTGARD et al., 1979). Para alcançar um ótimo desempenho, um procedimento de CIQ deve ter uma baixa probabilidade de falsa rejeição e uma alta probabilidade de detecção de erro, e isto dependerá das regras de controle adotadas e do número das medições de amostras-controle no processo analítico (KOCH et al., 1990; WESTGARD et al., 1990b; PARVIN, 1997; BAIS, 2008).

Considerando que o programa da qualidade analítica tem por objetivo verificar o procedimento analítico de rotina, o planejamento desse programa deve considerar previamente os seguintes aspectos: i) a concentração e a quantidade de amostras-controle necessária para um período com o mesmo lote e sua utilização simultânea com as amostras de pacientes; (ii) o desempenho e a estabilidade das amostras-controle (monitorar o efeito matriz); (iii) as regras de inspeção ou controle (critérios para aceitar ou recusar o lote dos reagentes analíticos); (iv) analisar os resultados das amostras-controle antes dos resultados das amostras dos pacientes serem liberados; (v) a documentação para registro e consulta, e vi) controle de fontes de erros (TIBÚRCIO, 1995).

A variação observada quando monitoramos um método analítico é freqüentemente devido à imprecisão da variabilidade frasco a frasco das amostras-controle, que devem representar apenas uma pequena parte da variação total aceitável (QUAM, 2010).

O desempenho dos métodos analíticos deve ser monitorado pela análise de amostras-controle com valores conhecidos. As quantidades conhecidas são geralmente representadas por faixas de valores aceitáveis, ou limites inferiores e superiores para controle (limites de controle). Na análise dos resultados, quando os valores estão dentro dos limites de controle, pode-se esperar que o método analítico esteja funcionando corretamente, mas quando os valores estão fora desses limites, ações corretivas devem ser tomadas (WESTGARD e KLEE, 2006).

A CLIA'88 recomenda que o laboratório determine suas próprias médias e desvios padrão. **Os valores médios e os limites de amostras-controle comerciais descrevem o desempenho a ser observado para análise de um determinado analito em vários laboratórios diferentes com o valor médio e limites amplos, a fim de incluir variações que possam ocorrer nesses diferentes laboratórios.** Sendo assim, limites amplos tornam difícil detectar problemas analíticos que por ventura possam ocorrer. O propósito dos procedimentos estatísticos para o CQ é monitorar a qualidade analítica das medições durante operações estáveis, possibilitando detectar mudanças nessas operações. É necessário calcular a média e o desvio padrão dos níveis do analito selecionado para cada amostra-controle. Calcula-se também o desvio padrão em porcentagem que é o coeficiente de variação (CV) (WESTGARD, 2010).

A regra prática é realizar pelo menos 20 medições do material controle em 20 dias de trabalho, incluindo-os na rotina diária. Períodos menores não são uma boa estimativa para o desvio padrão. Períodos maiores são melhores porque a estimativa incluiria variações operacionais, tais como: desempenho antes e depois da manutenção de equipamentos, mudança no lote de reagentes analíticos, etc. Assim, até mesmo um mês poderia ser considerado um período curto. O ideal seria que os cálculos da média e desvio padrão obtidos mensalmente fossem adicionados aos dados dos meses anteriores para calcular os valores cumulativos e fixar os limites de controle. O cálculo da média e desvio padrão cumulativo é a melhor representação do desempenho de um teste ao longo do tempo (WESTGARD, 2010).

Após os cálculos da média, desvio padrão e CV dos níveis dos analitos presentes nas amostras-controle, é necessário especificar o nível de desempenho desejável para dar suporte às decisões clínicas. Esta meta de desempenho analítico é denominada de Especificações da Qualidade Analítica (EQA) (BASQUES, 2009b).

1.5.2 Avaliação Externa da Qualidade (AEQ)

A AEQ evidencia o desempenho do laboratório comparando suas medições com outros laboratórios que fazem medições semelhantes. Para isto, o laboratório se inscreve em programas de AEQ como os TP (CROSBY et al., 1995).

Os programas têm frequência mensal, onde as amostras a serem analisadas são enviadas para os laboratórios participantes pela agencia provedora. O laboratório participante analisa a amostra e envia os resultados (TAMBWEKAR, 2009). O laboratório é comparado com seu grupo, que utiliza mesmo método, reagente, instrumento e calibrador. Assim, a amostra de AEQ reflete fielmente o desempenho de um único laboratório no grupo, uma vez

que um único procedimento analítico está envolvido e o problema de comutatividade entre as amostras estabilizadas e humanas não afetam a comparação (RICÓS et al., 1999).

1.6 CONTROLE ESTATÍSTICO DA QUALIDADE

O CQ em Análises Clínicas significa o monitoramento da precisão e exatidão. Este processo se baseia na análise das amostras-controle e no tratamento dos dados obtidos utilizando métodos estatísticos, por esta razão muitas vezes o CQ é denominado de Controle Estatístico da Qualidade (BASQUES, 2009a).

Os resultados analíticos são importantes no processo de tomada de decisões. O propósito do Controle Estatístico da Qualidade é identificar e controlar as variações que possam ocorrer durante as medições (GARFIELD et al., 2000).

Na realização do Controle Estatístico da Qualidade em laboratórios clínicos monitoramos os reagentes, calibradores e amostras. Cada grupo de calibradores (padrões), amostras-controle e amostras de pacientes é denominado de corrida analítica. Atualmente os analisadores são de acesso randômico. Este tipo de equipamento tanto analisa muitas amostras para um único analito como executa variados ensaios de cada amostra, de forma aleatória, em uma única corrida (BROOKS, 2001).

Parvin (2008) define corrida analítica como “o conjunto de amostras de pacientes onde uma decisão sobre o status do controle também está sendo feito”. Já o documento NCCLS (atualmente CLSI) C24-A2 define como “um intervalo, período de tempo, ou séries de medições, onde a exatidão e precisão dos sistemas analíticos são esperadas estar estáveis” (BADRICK, 2008; TAMBWEKAR, 2009). Esta estabilidade é determinada por dois fatores: (i) a estabilidade fornecida pelo fabricante durante seus estudos em condições reais e; (ii) a susceptibilidade dos processos de medições para as alterações que podem ocorrer durante a medição no laboratório. Portanto, o laboratório deve definir a duração de sua corrida analítica, adequada para suas condições de trabalho (TAMBWEKAR, 2009).

O Controle Estatístico da Qualidade é o aspecto do CQ onde se verifica a exatidão e consistência dos resultados obtidos. Medições repetidas do mesmo analito podem produzir valores diferentes devido a variações em equipamentos, reagentes, operadores e condições ambientais, incluindo temperatura. Estas variações são chamadas de variações analíticas e são responsáveis pelo aumento dos erros durante as medições. Desta forma, os parâmetros estatísticos são necessários para descobrir se os valores obtidos pelos procedimentos de medição são aceitáveis ou não, e qual a extensão do erro (TAMBWEKAR, 2009).

Os gráficos de CQ são ferramentas poderosas para o monitoramento da estabilidade dos sistemas analíticos. As amostras-controle são medidas regularmente e os níveis dos analitos são plotados no gráfico em função de tempo (MULLINS, 2003).

1.6.1 Distribuição Normal

A curva de distribuição normal ou curva de Gauss é a distribuição da frequência mais utilizada. É definida pela média ($\bar{X}_m$) e desvio padrão (s). Quando o desvio padrão aumenta, a curva torna-se mais dispersa e a densidade de frequência em torno da média diminui. Inversamente, quando ocorre diminuição do desvio padrão, a curva se torna mais estreita aumentando a densidade de frequência em torno da média. Quando há alteração da média, a curva desvia para direita ou esquerda no eixo horizontal. A área sob a curva normal entre os dois eixos, expressa a probabilidade de uma medida aleatória de uma população normal cair no intervalo delimitado por dois pontos. Se a distribuição é normal, a probabilidade de um resultado cair dentro $\bar{X}_m \pm 1s$ é de 68,27%, da $\bar{X}_m \pm 2s$ é de 95,44%, e da $\bar{X}_m \pm 3s$ é de 99,74% (FRASER, 2001; KENKEL, 2003; MULLINS, 2003; BECKETT et al., 2005; WESTGARD, 2010). A probabilidade de um resultado superior ao valor da $\bar{X}_m \pm 3s$ em um processo de controle é pequena, ou seja, 0,26%. Estes cálculos têm valor prático para descrever o que deveria ser esperado, e indicaria situações fora de controle (GARFIELD et al., 2000).

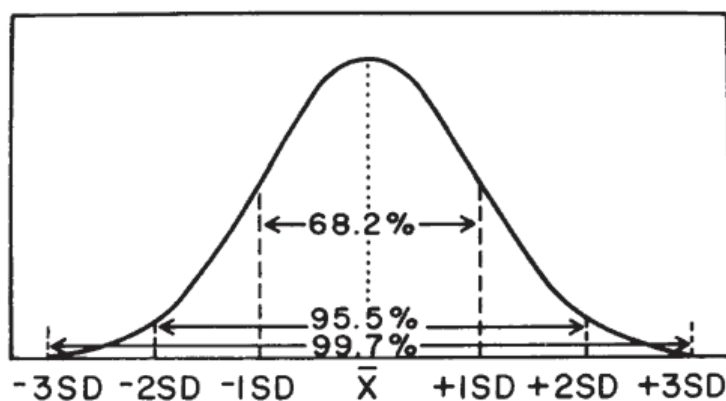


Figura 3 - Probabilidade de ocorrência de um resultado de controle em uma distribuição normal ou Gaussiana. Fonte: Westgard, 2010.

1.6.2 Exatidão

O termo exatidão refere-se à veracidade (certeza) de uma medição, ou quão perto o resultado pode aproximar-se do valor correto de um parâmetro (KENKEL, 2003). Conforme

Tambwekar (2009), exatidão é a relação do valor medido com o “verdadeiro” ou valor real do analito sob teste. A inexatidão advém de erros de bias (ou sistemáticos).

1.6.3 Precisão

O termo precisão refere-se à reprodutibilidade (repetitividade) de uma medição. Quando em medições repetidas de uma amostra, os resultados desviam ligeiramente um do outro, mas dentro dos limites do número de algarismos significativos obtidos, pode-se dizer que os dados são precisos ou que os resultados apresentam um elevado grau de precisão. A média desses dados pode ou não representar o valor real do parâmetro. O desvio padrão é utilizado para determinar a precisão. A imprecisão advém de erros de dispersão ou aleatórios (KENKEL, 2003; TAMBWEKAR, 2009).

Todas as medições são acompanhadas por certa quantidade de erros, e para a validação dos resultados é necessário conhecer a magnitude dos mesmos. O erro não pode ser eliminado completamente, mas sua natureza e magnitude podem ser caracterizadas (MULLINS, 2003; MITRA, 2003).

1.6.4 Incertezas em Medições

O termo incerteza refere-se a um significado técnico específico: “um parâmetro associado com o resultado da medição, que caracteriza a dispersão dos valores que poderia ser atribuído aos resultados medidos” (MULLINS, 2003; KONIECKA e NAMIESNIK, 2009). Para Koniecka e Namiesnik (2009) existe uma diferença entre erro de medição e incerteza. O erro é a diferença entre o valor encontrado e o esperado, e a incerteza é o limite onde o valor esperado pode ocorrer com certa probabilidade. A figura 4 mostra um esquema simplificado desta diferença.

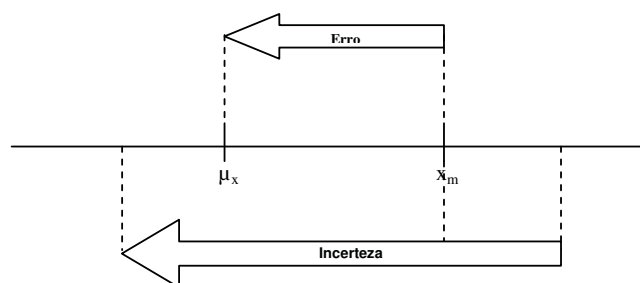


Figura 4 - Apresentação esquemática da diferença entre erro e incerteza. X_m : valor esperado; μ_x : valor encontrado. Fonte: Koniecka e Namiesnik (2009).

O VIM (1993) considera medições como “uma série de ações que melhoram o conhecimento sobre o valor desconhecido de um mensurando (a quantidade que está sendo medida)”. O conhecimento do valor inclui uma estimativa de incerteza do resultado da medição. A avaliação da incerteza de medição é facilitada, tendo em vista a natureza de cada componente de incerteza (HIBBERT, 2007; OLIVEIRA, 2009).

O termo sistema analítico refere-se a tudo que se infringe em uma medição: método, equipamento, reagentes, analista, o ambiente laboratorial, etc. O “Analytical Methods Committee” (AMC) da “Royal Society of Chemistry” (RSC) tem tomado uma posição clara em relação a incerteza em laboratórios dizendo que “resultados analíticos devem ser acompanhados por uma declaração explícita e quantitativa da incerteza e qualquer significado definitivo ou interpretação plausível devem ser informados” (MULLINS, 2003).

Existem três tipos de erros que contribuem para a variabilidade do resultado analítico (HIBBERT, 2007):

1. Erros aleatórios;
2. Erros sistemáticos (bias);
3. Erros grosseiros.

1.6.5 Erros Aleatórios (E_A) e Erros Sistemáticos (E_S)

Erros aleatórios são erros que não são especificamente identificados, portanto, difíceis de evitar (KENKEL, 2003). Ele pode ser positivo ou negativo dependendo de que lado da média que o resultado estiver. É um erro decorrente da imprecisão metodológica e é estimado pelo desvio padrão (s), expresso na unidade do analito, ou como CV%, também denominado como desvio padrão relativo. Este tipo de erro é denominado aleatório, pois, ao realizar uma única medição, não é possível prever a posição exata onde o resultado estará no intervalo de distribuição, e o seu valor exato (BASQUE, 2009a). Algumas variáveis que podem levar a imprecisão do método e, portanto, a um erro aleatório podem ser atribuídas a: (i) instabilidade do equipamento; (ii) variações nos reagentes (deterioração, uso de reagentes vencidos, etc.), calibradores e amostras-controle (devido ao efeito matriz, uso de aditivos como substâncias de origem não humana para alcançar concentrações de certos analitos e processos de liofilização e/ou conservação) e; (iii) condições ambientais e mudança de operador (TAMBWEKAR, 2009).

Ao contrário do E_A , os E_S associados a um dado processo de medição têm sempre o mesmo sinal e magnitude. Quando a sua existência é estabelecida, esse erro é chamado de bias. O tratamento estatístico dos dados serve para decidir se um resultado aparentemente

errado é real e indica um bias, ou se é resultado da ocorrência de variabilidade, mesmo em um sistema de medição estável (TAYLOR e CIHON, 2004). O bias ou E_S é a diferença entre a média dos resultados encontrados nas medições em replicata e a melhor estimativa disponível do valor verdadeiro da concentração do analito (FRASER, 2001; BASQUE, 2009a). Fraser (2001) complementa que a estimativa do bias pode ser realizada pela diferença entre os valores obtidos pelo laboratório e as amostras provenientes dos TP ou AEQ. Algumas causas prováveis da ocorrência do erro sistemático são: (i) contaminações e/ou impurezas de reagentes; (ii) calibração recente do equipamento; (iii) mudança no número do lote de reagentes, calibradores e amostras-controle; etc (KENKEL, 2003).

A figura 5 mostra a diferença entre a imprecisão e inexatidão (BASQUES, 2009b).

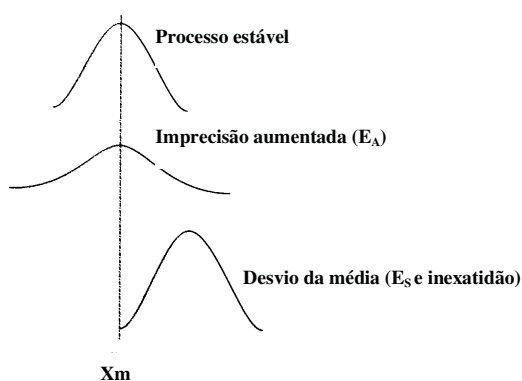


Figura 5 - Demonstração de um processo estável, com E_A e E_S . Fonte: Basques, 2009b.

O erro total (E_T) é estimado pela soma dos efeitos do E_A e do E_S (ou bias) analítico (BASQUE, 2009a). Portanto, para a qualidade analítica, o E_T deve incluir componentes de inexatidão e imprecisão do método, a incerteza de calibração e a falta de sensibilidade do procedimento de controle de qualidade estatístico. A interpretação pode ser mais difícil porque existe a necessidade de especificações necessárias para avaliar e controlar cada tipo de erro, tais como: i) a exatidão requer uma especificação na forma de um bias admissível; ii) a precisão exige uma especificação na forma de desvio padrão permitido, e iii) a calibração geralmente apresenta um E_S , que pode ser reconhecido por uma tendência quando a calibração ocorre muito raramente, ou especificado por um desvio padrão admissível quando a calibração ocorre diariamente ou mais frequentemente (WESTGARD et al., 1990b).

Para Panteghini (2010), “os laboratórios clínicos devem utilizar o conceito de E_T como uma estimativa concreta da esquerda para direita (figura 1) na medição de incerteza apenas se

os conceitos de rastreabilidade metrológica estiverem corretamente implementados em seu controle de qualidade analítica”.

1.6.6 Erros Grosseiros

Além das causas que introduzem os E_A e E_S nos procedimentos analíticos, os resultados do laboratório também podem conter erros grosseiros que produzem um grande desvio nos resultados e não são considerados erros estatísticos. Muitas vezes é difícil distinguir se um resultado está incorreto devido a um E_A ou E_S ou se é devido a um erro grosseiro, mas é necessário identificar e eliminar a causa, criando condições de prevenir sua recorrência. As causas primárias deste tipo de erro são (BASQUE, 2009b): (i) incoerência na escolha dos métodos analíticos; (ii) modificações de procedimentos nas etapas dos ensaios; (iii) preparações incorretas de amostras-controle e padrões; (iv) equipamento com defeito ou ajustado incorretamente; (v) erros nos cálculos; (vi) erros na transcrição do resultado.

Estas causas nos procedimentos analíticos são as principais que podem introduzir um erro grosseiro no resultado de exame laboratorial e, muitas vezes não podem ser identificados pelas corridas de amostras-controle.

1.6.7 Gráficos de Controle de Qualidade

O uso do gráfico de controle de Shewhart permite fácil identificação de situações de erros, como um valor de controle fora do especificado resultando no aumento da imprecisão e/ou da inexatidão. (ALBERTINI e SIGNORINI, 1995). Eles foram aplicados no laboratório clínico por Levey-Jennings em 1950, sendo hoje conhecidos como “gráficos de Levey-Jennings”. Para a confecção de um gráfico de controle, Westgard e Klee (2006) recomendam os seguintes passos:

1. Analisar a amostra de controle pelo método analítico por pelo menos 20 dias diferentes. Calcular a média e o desvio padrão dos resultados.
2. Construir um gráfico rotulando o eixo y (eixo das ordenadas) com “valores dos níveis das amostras-controle” com os limites da $\bar{X}_m \pm 4s$. Traçar linhas horizontais para a $\bar{X}_m$ e para os limites superiores e inferiores a $\bar{X}_m$. Rotular o eixo x (eixo das abscissas) como temporal, usando dia, número da corrida, número de observações do controle, ou qualquer tipo que seja mais apropriado para demonstrar o tempo das observações do controle.
3. Introduzir o resultado da amostra de controle no gráfico.

Para facilitar a visualização da $\bar{X}_m$ e os limites de controle (s), Basques (2009b) recomenda a sinalização da $\bar{X}_m$ com uma linha de cor verde; a $\bar{X}_m \pm 1s$ com linha azul; a $\bar{X}_m \pm 2s$ com linha laranja; e a $\bar{X}_m \pm 3s$ com linha de cor vermelha.

Os resultados dos controles devem ser plotados nos gráficos no mesmo dia de sua análise, antes da liberação dos resultados dos pacientes, para a verificação do comportamento analítico. (BASQUES, 2009b)

Após a elaboração do gráfico é necessário criar critérios de aceitabilidade para a corrida analítica. Para tanto utilizamos as regras múltiplas preconizadas por Westgard (WESTGARD e KLEE, 2006).

1.6.7.1 Regras de Controle

Regras de controle são utilizadas para indicar os critérios de julgamento do comportamento dos resultados das amostras-controle na corrida analítica. Para melhorar o desempenho do procedimento de controle é recomendável a aplicação de pelo menos duas regras de controle, uma que detecta o erro aleatório e outra, o erro sistemático. Elas devem ser escolhidas para proporcionar baixa probabilidade de falsa rejeição e elevada probabilidade para detecção de erros (WESTGARD et al., 1981; BASQUES, 2009b). Diferentes regras de controle podem ser combinadas por meio da aplicação de uma sequência, de modo a aumentar a sensibilidade ao erro para um dado nível de falsa rejeição (BADRICK, 2008).

As regras de controle têm uma notação própria, “A_L”, onde “A” é uma abreviatura de um dado estatístico ou representa o número de medidas de controle e “L” identifica os limites de controle, freqüentemente referidos como a média mais ou menos um múltiplo do desvio padrão (WESTGARD et al., 1981).

Uma regra única de CQ usa um único critério ou limites de controle, tais como um gráfico de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m \pm 2s$ ou a $\bar{X}_m \pm 3s$. "Regras de Westgard" são geralmente usados com duas ou quatro medidas de controle por corrida, o que significa que são apropriados quando duas amostras-controle são medidas uma ou duas vezes por amostra, que é o caso em muitas aplicações da química. Algumas regras alternativas de controle são mais adequadas quando três amostras-controle são analisados, o que é comum para aplicações em hematologia, coagulação e imunoensaios. As regras estão definidas a seguir (WESTGARD, 2010):

- **1_{2s}** - Quando o valor do controle excede um dos limites da $\bar{X}_m \pm 2s$. Regra de alerta. Aplicar as demais regras.

- **1_{3s}** - Quando o valor do controle excede um dos limites da $X_m \pm 3s$. Uma corrida é rejeitada quando uma única amostra-controle excede a $X_m \pm 3s$.
- **2_{2s}** - Dois valores consecutivos excedendo a $X_m \pm 2s$ no mesmo sentido. Na mesma corrida ou em duas corridas consecutivas.
- **4_{1s}** - Quatro resultados de controle consecutivos excedem o mesmo limite de controle da $X_m \pm 1s$. Um nível de controle quatro vezes ou dois níveis duas vezes cada.
- **8x** - Oito resultados de controle consecutivos do mesmo lado da X_m . Usada em substituição à regra 10x em alguns sistemas analíticos.
- **7t** - Quando se observa tendência de sete medições de controle no mesmo sentido (ficando progressivamente maior ou menor).
- **10x** - Dez resultados de controle consecutivos do mesmo lado da média. Um nível dez vezes ou dois níveis cinco vezes cada.
- **R_{4s}** - Um resultado de controle excede a $X_m + 2s$ e o outro resultado excede a $X_m - 2s$. Só pode ser usada na mesma corrida.
- **12x** - Doze resultados de controle consecutivos do mesmo lado da X_m . Utilizado como alternativa à regra 10x.

1.7 ESPECIFICAÇÕES DA QUALIDADE ANALÍTICA

Para julgamento dos resultados obtidos é necessário um critério para medir se a qualidade está boa ou ruim. Este critério deve ser bem definido para avaliar o desempenho analítico, ou seja, o bias e a imprecisão analítica (PETERSEN et al., 1994). O grande desafio entretanto, é a definição dos objetivos da qualidade que são descritos na literatura com várias denominações diferentes, como: padrões desejáveis, metas analíticas, metas da qualidade, metas de desempenho ou especificações da qualidade (PETERSEN e FRASER, 1994).

Resultados obtidos dentro das características de desempenho podem ser comparados com especificações da qualidade documentadas como: (i) em dados publicados baseado no estado de arte; (ii) no desempenho exigido por órgãos reguladores como a CLIA'88; (iii) nas recomendações documentadas por grupos de profissionais especialistas nacionais e

internacionais, e; (iv) nas especificações da qualidade derivada da análise de desempenho baseada em decisões clínicas (CEMBROWSKI, 1990; FRASER e PETERSEN, 1999).

Considerando que os resultados dos testes são específicos dos pacientes e sua aplicação no auxílio diagnóstico e monitoramento terapêutico são baseados em intervalos de referência, a aplicação das especificações da qualidade baseada na variação biológica, ou seja, variação intra-indivíduo (C_{vi}) e interindivíduo (C_{vg}) seria a melhor escolha (FRASER e PETERSEN, 1993).

Variação biológica intrínseca é a flutuação aleatória em torno de um ponto de ajuste homeostático. Realizando um teste, várias vezes em um único indivíduo com intervalos de tempo entre as medições e aplicando procedimentos que diminua os efeitos dos fatores pré-analíticos de variação é observado que a concentração do analito será diferente entre si. Estas diferenças são decorrentes das variações analíticas e biológicas. Aplicando um procedimento que remova as variações analíticas (C_{IQ}) permanece ainda uma diferença entre os resultados. Esta variação aleatória é chamada variação biológica intra-individual. Da mesma forma, realizando o mesmo teste em vários indivíduos, observa-se que os resultados serão diferentes entre si. Esta diferença entre indivíduos é chamada de variação biológica interindividual ou intragrupo (FRASER, 2001).

O desenvolvimento de padrões de desempenho desejável baseado na variação biológica é uma estratégia amplamente defendida, sendo sugerida por Cotlove et al. (1970). Este conceito foi aprovado pelo College of American Pathology (CAP) em 1976 e pelo comitê World Association of Society of Pathology (WASP) em 1978. A grandeza originalmente proposta para a imprecisão analítica, foi que esta não deve exceder a metade da C_{vi} . Dados da variação biológica, primeiro usado para definir padrões de desempenho desejáveis, são agora amplamente utilizados para padrões de desempenho da exatidão, no estudo de interferências e na comparação entre dois métodos analíticos. Além disso, a imprecisão e inexatidão aceitáveis têm sido adotadas pelo grupo de trabalho Europeu na evolução de sistemas analíticos (avaliação da precisão) e na AEQ (avaliação da exatidão) (CEMBROWSKI, 1990; PETERSEN e FRASER, 1994).

Na hierarquia de modelos para estabelecimento da especificação da qualidade, a utilização dos componentes da variação biológica ocupa a posição imediatamente abaixo do modelo de avaliação de desempenho analítico baseado em decisões clínicas específicas, que é considerado como o melhor modelo para definição das especificações da qualidade. Como esse modelo tem aplicação difícil, portanto, abrangência muito limitada, a utilização dos

componentes da variação biológica passa a ser o modelo de escolha, considerando que (BASQUES, 2009a):

- São concretamente definidas para imprecisão e inexatidão;
- São aplicáveis a todos os laboratórios, independentemente do porte, do tipo e da localização;
- Foram construídas baseadas em modelos simples, compreensíveis e amplamente aceito por profissionais da saúde, em razão da coerência.

O modelo de utilização dos componentes da variação biológica para definir as especificações da qualidade analítica tem flexibilidade para se adaptar às tecnologias atualmente disponíveis e tem sido recomendado por especialistas dedicados ao estudo da qualidade no laboratório clínico (BASQUES, 2009a).

O conhecimento incompleto dos fundamentos teóricos e dos procedimentos práticos para estabelecer as especificações da qualidade analítica tem levado muitos laboratórios clínicos a aplicar somente os procedimentos isolados de controle estatístico do processo, utilizando especificações inadequadas aos objetivos de utilidade médica. Os limites e as regras de controle estatístico, como as regras múltiplas de Westgard, são muitas vezes aplicados inadvertidamente como especificações da qualidade. Entretanto, as regras de controle ou outros critérios de julgamento do CIQ são apenas ferramentas para monitorar a qualidade do processo e possibilitar a comprovação de que o sistema analítico atende às especificações da qualidade desejada (BASQUES, 2009a).

É importante observar que o controle estatístico do processo é adequado quando a implementação do CIQ é precedida pelos procedimentos de seleção e validação de métodos caracterizando previamente o desempenho do sistema analítico e definindo se os erros encontrados atendem às especificações da qualidade, de forma a minimizar a liberação de resultados com erros clinicamente significativos (BASQUES, 2009a).

2. Objetivos

2.1 OBJETIVO GERAL

Produção de amostras-controle (soro) para parâmetros bioquímicos do Laboratório Clínico, com materiais líquidos congelados e sólidos liofilizados.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

2.2.1 Comparação, pela análise estatística dos resultados, de desempenho e estabilidade em 300 dias entre as amostras-controle líquidas congeladas ou liofilizadas de soros sem preservante (SP) e com preservante (CP) para os seguintes analitos: Ácido úrico, Albumina, Fosfatase Alcalina (ALP), Alanina aminotransferase (ALT), Amilase, Aspartato Aminotransferase (AST), Bilirrubina Direta (Bil. Direta), Bilirrubina Total (Bil. Total), Cálcio, Capacidade Latente de Ligação do Ferro (CLLF), Colesterol Total, Colesterol-HDL (Col.-HDL), Creatinina, Ferro, Fósforo, Gama Glutamil Transferase (GGT), Glicose, Desidrogenase Lática (LD), Potássio (K^+), Proteínas Totais (Prot. Totais), Sódio (Na^+), Triglicérides e Uréia.

3. Materiais e Métodos

3.1 OBTENÇÃO DO POOL DE SORO

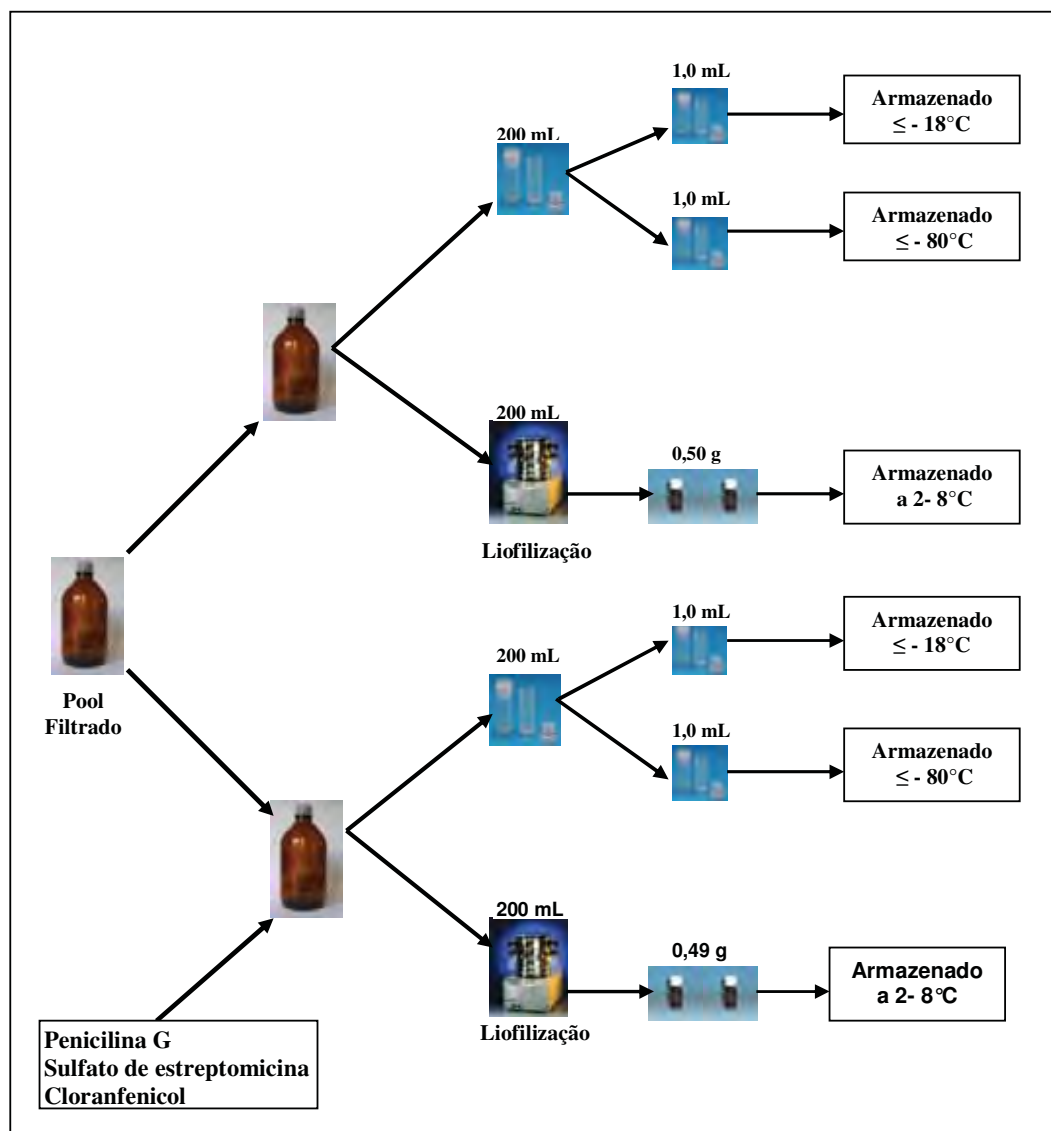
Para a obtenção do pool de soro foram utilizados soros obtidos dos doadores de sangue, atendidos no Hemonúcleo Regional de Araraquara da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, após a realização da sorologia. As amostras utilizadas foram os soros que não apresentavam hemólise, icterícia e lipemia e, com sorologia negativa para hepatite B e C, HIV (Vírus da Imunodeficiência Adquirida), HTLV I e II (Vírus Linfotrópicos-T Humano), sífilis e doença de chagas.

O pool de soro foi acondicionado em frasco âmbar e mantido em freezer a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ até alcançar um volume de aproximadamente 1000 mL.

3.2 PREPARO DE AMOSTRAS-CONTROLE

O pool de soro foi descongelado a temperatura ambiente e filtrado para eliminação de fibrina em papel de filtro qualitativo 80g/m^2 , porosidade de três micras e cinzas de 0,5% (Nalgon – Itupeva, SP). O pool de soro foi dividido em duas alíquotas de 400 mL. A uma alíquota foi adicionado como preservante 500 unidades USP de penicilina G, 50 μg de sulfato de estreptomicina e 20 μg de cloranfenicol por mL de soro (MARCOVINA et al., 1990). Após homogeneização foram determinados os analitos selecionados em equipamento Labmax 240 e Eletrodo Seletivo nos pool de soro sem e com preservante. Cada alíquota foi subdividida como a seguir.

3.2.1 Subdivisão das amostras



Esquema 1 - Subdivisão das alíquotas nos diferentes processos de conservação do soro SP e CP.

3.3 DETERMINAÇÃO DOS ANALITOS

3.3.1 Equipamentos

Foi utilizado para o processo de liofilização o Liofilizador da Marca Thermo – Electron Corporation (Modelo Modulyod 115 – Freezer Drying Digital Unit), do Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP.

Os analitos foram determinados nas amostras líquidas descongeladas e liofilizados reconstituídos, no equipamento automatizado Labmax 240 (Tokyo Boeki Machinery Ltd, Medical Project Department – Tokyo, Japão) e Eletrodo Seletivo – AVL 9180 (AVL Medical

instruments AG – Schaffhasue, Suíça) do setor de Bioquímica Clínica da Coordenadoria de Análises Clínicas e Hemoterapia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, que realiza o CIQ com amostras-controle comerciais em dois níveis. As amostras liofilizadas foram mantidas entre 2 – 8°C e reconstituídas com 5,0 mL de água tipo I (resistividade maior ou igual a 10 megaohm/cm e condutividade menor ou igual a 0,1 mS/cm a 25°C - CLSI) utilizando um purificador Milli-Q plus, fracionadas em alíquotas de 1,0 mL em tubos criogênicos e congeladas a $\leq -18^{\circ}\text{C}$, sendo utilizadas no prazo de cinco dias.

Para a determinação da densidade do soro foi utilizado um picnômetro da marca Vidrolabor® - LaborQuimi (Poá – São Paulo, Brasil) com capacidade volumétrica de 25 mL.

Foram utilizadas as balanças OHAUS – Precision Plus (Biotecnologia) e Mettler Toledo AB 204, para as pesagens dos frascos do liofilizador e soro liofilizado, respectivamente.

3.3.2 Tipo de amostras e reações utilizadas

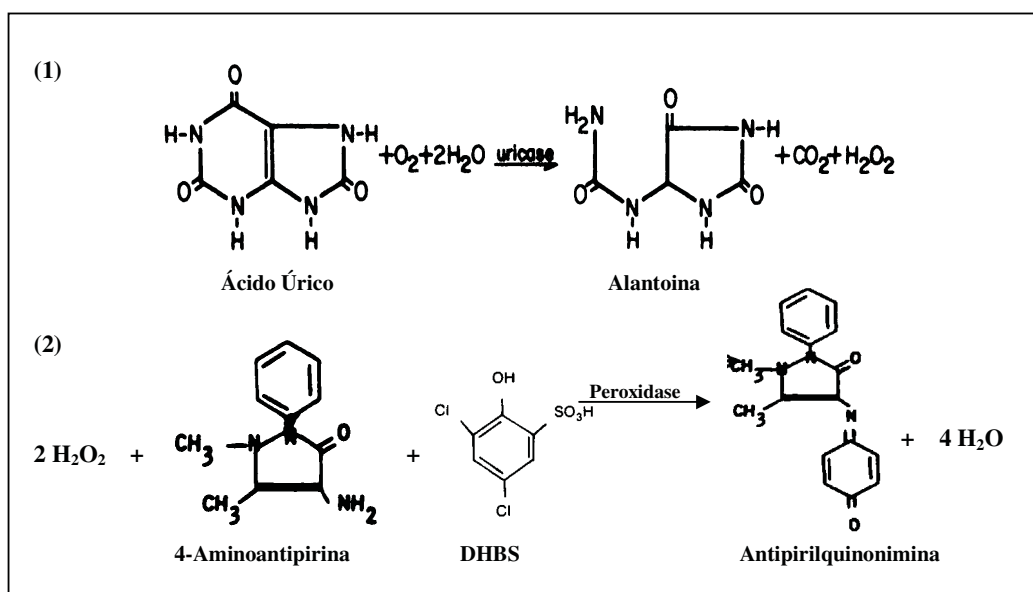
Para todos os analitos foram utilizadas amostras de soro, previamente congeladas ou liofilizadas, e quantificados com reações de ponto final por espectrofotometria, exceto quando indicado.

3.4 MÉTODOS

Para a determinação dos analitos foram utilizados kits reagentes comerciais da marca Labtest, exceto para as determinações de Na^+ e K^+ que foram realizadas por potenciometria com eletrodo íon seletivo, com reagentes da marca Roche.

3.4.1 Ácido Úrico

O ácido úrico foi quantificado por método enzimático. A uricase catalisa a reação de oxidação do ácido úrico com produção de alantoína e H_2O_2 . O H_2O_2 , na presença da peroxidase, reage com o ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibenzenosulfônico (DHBS) e a 4-aminoantipirina, formando a antipirilquinonimina, cuja absorbância é monitorada a 520 nm (KABASAKALIAN et al., 1973; SCHULTZ, 1987).



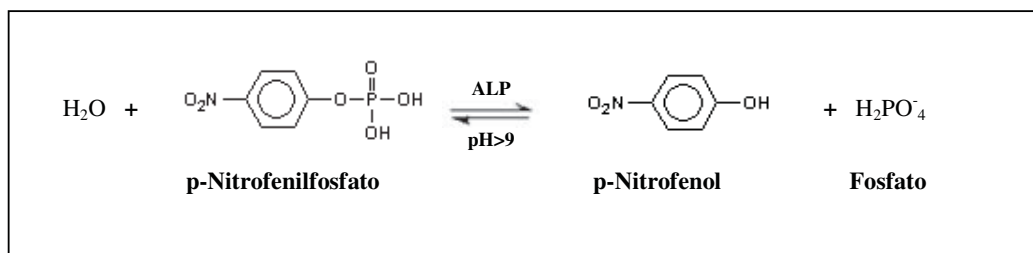
Esquema 2 - Reações para determinação do ácido úrico. (1) Oxidação do ácido úrico pela ação da uricase; (2) Formação de antipirilquinonimina.

3.4.2 Albumina

A albumina tem a propriedade de se ligar aos corantes com alta afinidade e com alteração na banda de absorção de luz destes corantes. A mudança do comprimento de onda de absorção máxima de luz (deslocamento espectral) permite quantificar a albumina na presença de excesso de corante. A interação com o Verde de Bromocresol (3,3',5'-tetrabromo-*m*-cresolsulfonftaleína) foi introduzida por Rodkey (1965) e é monitorada a 630 nm (GENDLER, 1987).

3.4.3 Fosfatase Alcalina (ALP)

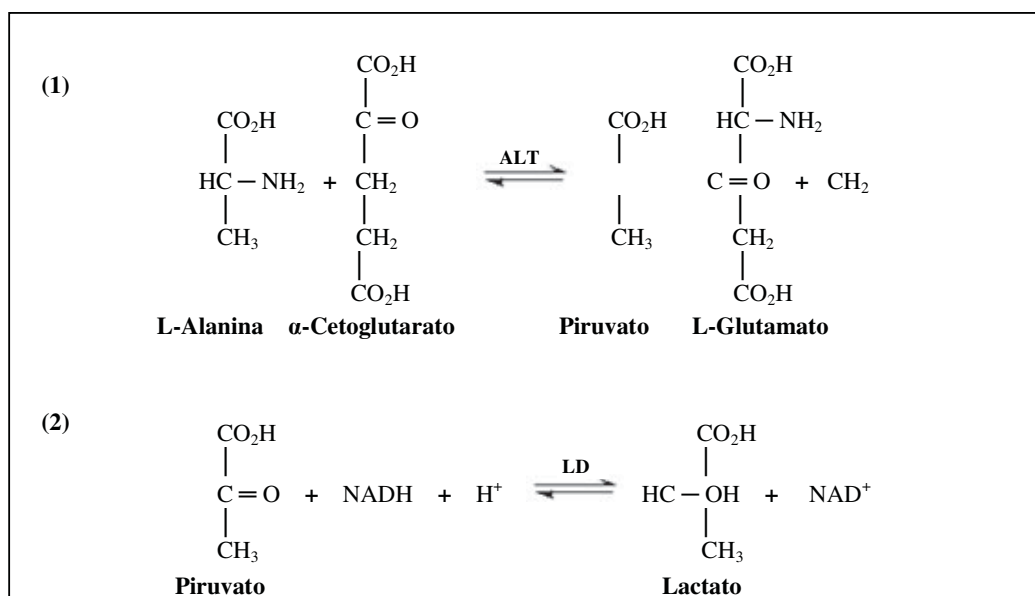
A ALP foi quantificada pelo método desenvolvido por Bowers e McComb modificado (BOWERS et al., 1981). A ALP do soro em meio alcalino, hidrolisa o p-nitrofenilfosfato liberando p-nitrofenol e fosfato inorgânico. A quantidade produzida de p-nitrofenol tem elevada absorbância em 405 nm e é diretamente proporcional à atividade enzimática da ALP na amostra (KAZMIERCZAK e LOTT, 1987).



Esquema 3 - Reação para determinação da ALP.

3.4.4 Alanina Aminotransferase (ALT)

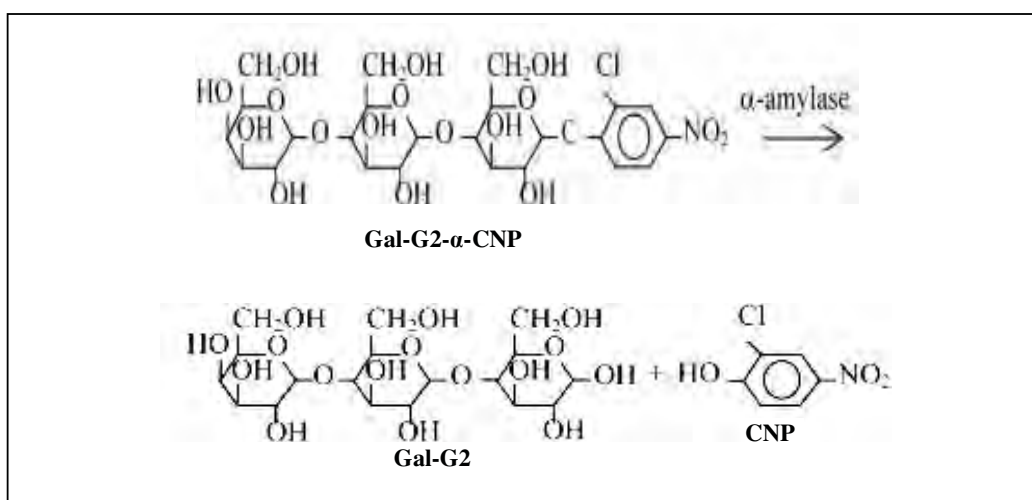
A ALT foi quantificada pelo método cinético no UV recomendado pela IFCC. A ALT catalisa a transferência de um grupo amina entre L-alanina e L-glutamato com formação de glutamato e piruvato. Por ação da lactato desidrogenase (LD), o piruvato é reduzido a lactato, enquanto a coenzima NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo, na forma reduzida) é oxidada a NAD^+ (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo). Com a oxidação da coenzima NADH, a diminuição da absorbância a 340 nm é monitorada, sendo diretamente proporcional à atividade da ALT na amostra. Foi utilizado o tampão Tris no lugar do tampão fosfato por duas razões: o NADH é mais estável em Tris do que em tampão fosfato, e o piridoxal-5'-fosfato (grupo protéico da enzima) como ativador para ALT (MURRAY, 1987a; IFCC, 2002b).



Esquema 4 - Reações para determinação da ALT. (1) Amino transferência catalisada pela ALT. (2) Conversão de piruvato em lactato, catalisada pela LD.

3.4.5 Amilase

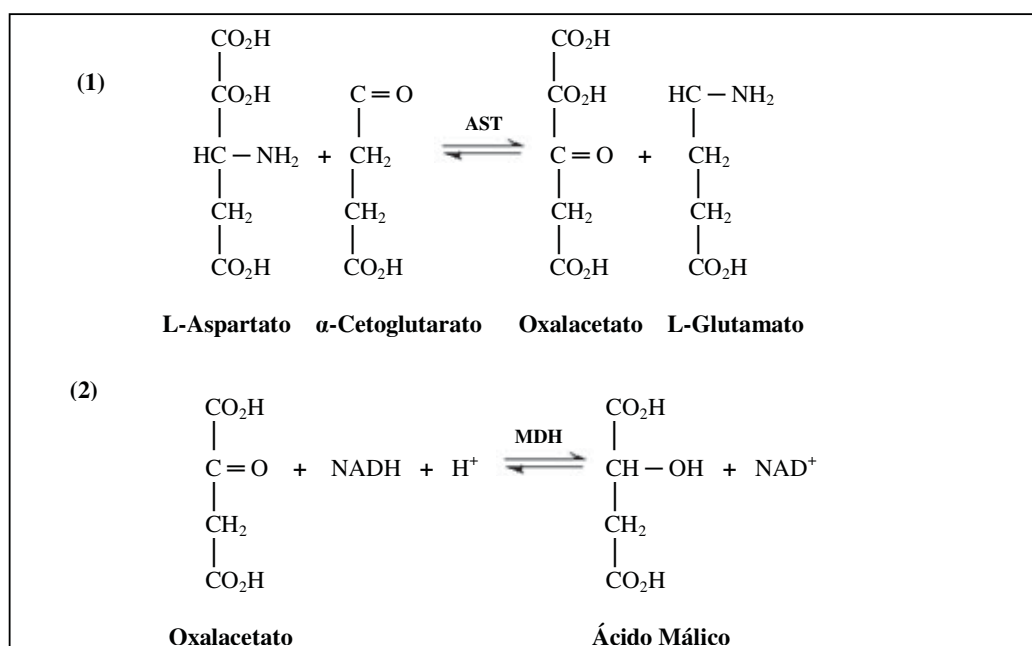
A amilase foi quantificada utilizando o substrato α -(2-cloro-4-nitrofenil)- β -1,4-galactopiranosilmaltose (Gal-G2- α -CNP). A α -Amilase hidrolisa o substrato, liberando 2-cloro-4-nitrofenol (CNP) e 1,4-galactopiranosilmaltose (Gal-G2). A velocidade de formação de CNP é monitorada a 405 nm e proporciona uma medida direta da atividade da α -amilase na amostra (MORISHITA et al., 2000; YAMAGUCHI et al., 2008).



Esquema 5 - Reação para determinação da Amilase.

3.4.6 Aspartato Aminotransferase (AST)

A AST foi quantificada pelo método cinético no UV recomendado pela IFCC. A metodologia foi introduzida por Karmen sendo posteriormente otimizada por Henry e colaboradores. O método de referência proposto pela IFCC recomenda a utilização do piridoxal-5'-fosfato para assegurar que toda transferase presente no soro esteja ativa, com a presença do grupo prostético. Na reação a AST catalisa a transferência de um grupo amino de aminoácidos específicos (L-glutamato ou L-aspartato) para cetoácidos específicos (α -cetoglutarato ou oxalacetato). A malato desidrogenase (MDH) é usada para converter o oxalacetato em malato. O decréscimo na absorvância em 340 nm, causado pela oxidação do NADH consumido na segunda reação, é usada para monitorar a reação do AST e é quantitativamente proporcional a quantidade de AST no soro. (MURRAY, 1987b; IFCC, 2002c).



Esquema 6 - Reações para determinação da AST. (1) Amino transferência catalisada por AST. (2) Conversão de oxalacetato para ácido málico catalisada pela MDH.

3.4.7 Bilirrubina Direta (Bil. Direta)

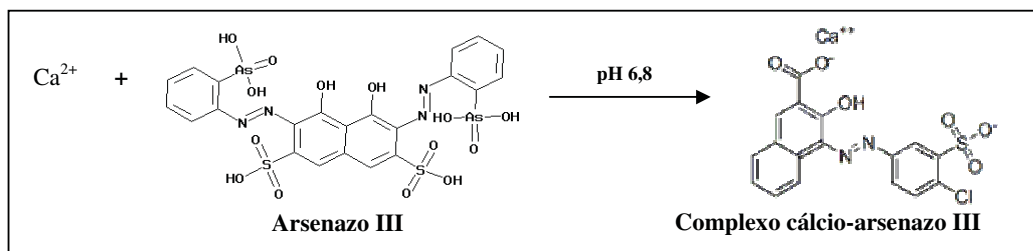
A Bilirrubina Direta foi quantificada utilizando a metodologia com Dicloroanilina Diazotada-DCA (RAND e PASQUA, 1962). A amostra é acidificada com ácido sulfâmico, adequado para minimizar a interferência da bilirrubina indireta, garantindo a especificidade da medição. Após a acidificação, a bilirrubina direta reage com a DCA formando azobilirrubinas, cuja intensidade de absorção em 546 nm é diretamente proporcional à concentração de bilirrubina direta na amostra.

3.4.8 Bilirrubina Total (Bil. Total)

A metodologia utilizada para quantificação da Bilirrubina Total foi a mesma utilizada para quantificar a Bilirrubina Direta (Dicloroanilina Diazotada - DCA). A bilirrubina indireta da amostra é desligada da albumina e solubilizada em meio aquoso por ação do 2-fenoxietanol, o qual também facilita a reação com a DCA. As bilirrubinas diretas e indiretas reagindo com DCA formam azobilirrubinas. A leitura é realizada em 546 nm, cuja intensidade de absorção é proporcional à concentração de bilirrubina total na amostra (RAND e PASQUA, 1962; PERRY et al., 1983; SHERWIN e OVERNOLTE, 1986).

3.4.9 Cálcio

O cálcio foi quantificado utilizando a metodologia de Arsenazo III, introduzida por Michaylova e Illkova, em 1971 (LEARY et al., 1992). O cálcio reage com o arsenazo III em meio levemente ácido (pH 6,8) formando o complexo cálcio-arsenazo III de cor azul, cuja absorbância é medida em 600nm.



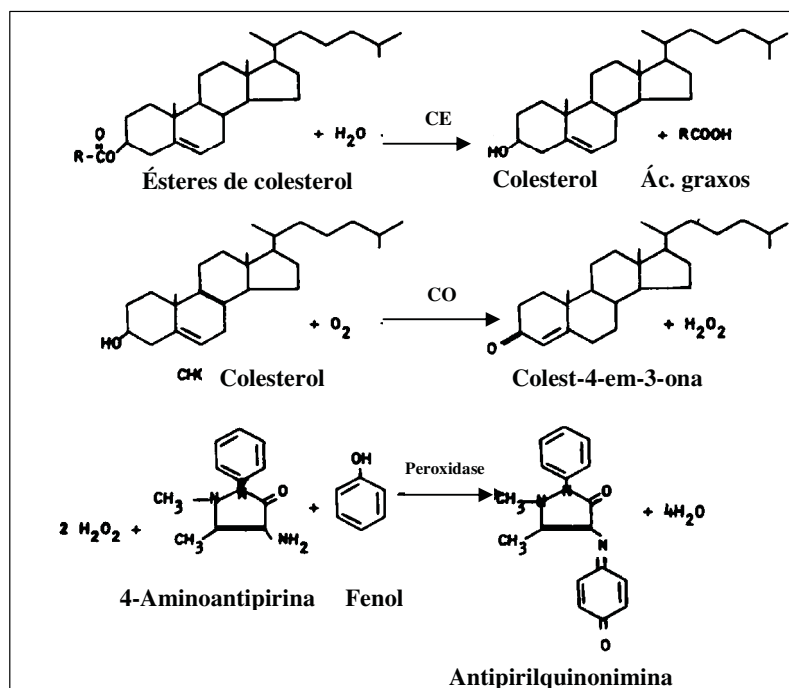
Esquema 7 - Reação para determinação do cálcio utilizando arsenazo III.

3.4.10 Capacidade Latente de Ligação do Ferro (CLLF)

A CLLF foi determinada pelo método da 3-(2-piridil)-5,6-bis(4-ácido fenilsulfônico)-1,2,4-triazina (*Ferrozine*) (GOODWIN et al., 1966). Os íons férricos contidos no reagente saturam os sítios disponíveis para a ligação de ferro da transferrina na amostra. O excesso de ferro não ligado forma com a *Ferrozine*, um complexo magenta brilhante, cuja absorbância é medida em 560 nm. A diferença entre esta quantidade de ferro ligado e aquela contida no reagente é a CLLF (PERROTTA, 1987).

3.4.11 Colesterol

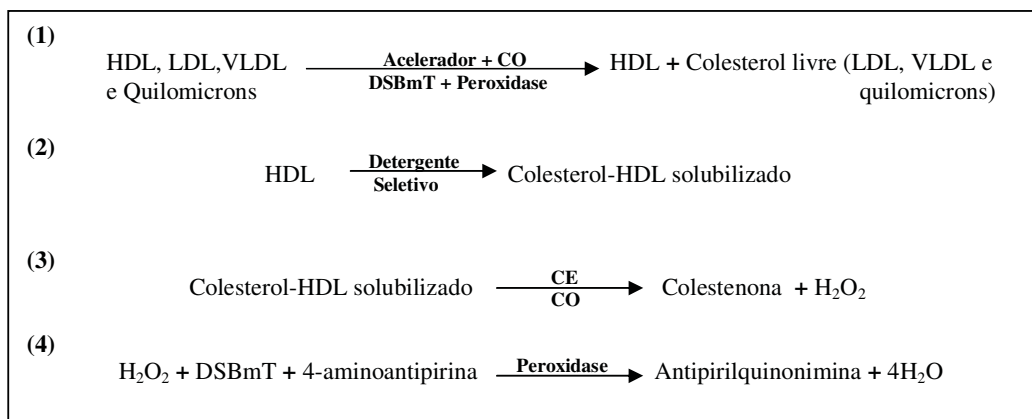
O colesterol foi quantificado por ensaios enzimáticos acoplados. O método utiliza a colesterol esterase que tem alta especificidade para os ésteres de colesterol (ALLAIN et al., 1974). Na primeira reação, a colesterol esterase (CE) hidrolisa os ésteres de colesterol presentes no soro a colesterol livre e ácido graxos. Na segunda reação, a colesterol oxidase (CO), na presença de oxigênio, oxida o colesterol em colest -4-en-3-ona e H_2O_2 . Na última reação, o H_2O_2 oxida a 4-aminoantipirina na presença do fenol a antipirilquinonimina em meio catalisado pela peroxidase. A antipirilquinonimina tem absorção máxima em aproximadamente 500 nm, com intensidade diretamente proporcional à concentração do colesterol na amostra (RIFAI et al., 2000).



Esquema 8 - Reações para determinação do colesterol. (1) Hidrólise dos ésteres de colesterol presente no soro; (2) Oxidação do colesterol livre; (3) Formação da Antipirilquinonimina.

3.4.12 Colesterol-HDL (Col.-HDL)

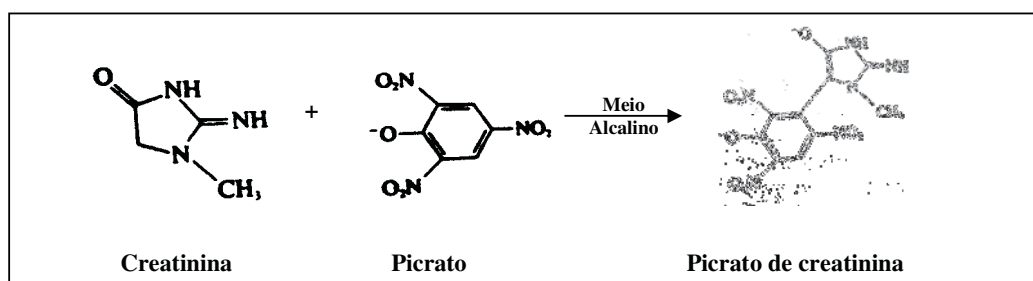
Para a quantificação do colesterol-HDL foi utilizado o método direto por inibição seletiva. O poliânion composto por fosfotungstato de sódio, 4-aminoantipirina e íons de magnésio forma complexos estáveis com a superfície das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e dos quilomicrons. Os complexos formados com as partículas do colesterol-HDL presentes no soro não se estabilizam, ficando sujeitos à ação detergente de um segundo reagente composto por polioxietileno lauril éter, solubilizando-se e sob ação da CE, CO, peroxidase e N-bis (DSBmt)-m toluidina, se, resultando em um pigmento que é diretamente proporcional à concentração presente no colesterol-HDL da amostra (BACHORIK e ROSS, 1995; HALLORAN et al., 1999).



Esquema 9 - Reações para determinação do Colesterol-HDL. (1) Oxidação das partículas de quilomicros, LDL e VLDL; (2) Solubilização do Colesterol-HDL; (3) Formação de H_2O_2 ; (4) Formação da Antipirilquinonimina.

3.4.13 Creatinina

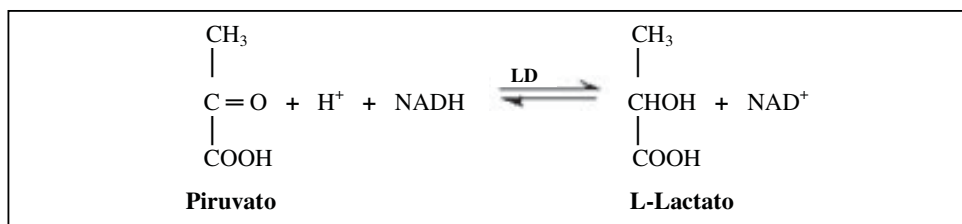
A determinação de creatinina foi realizada pelo método desenvolvido por Lustosa-Basques utilizando a reação de Jaffé (1886) e um procedimento otimizado de dois tempos, com melhora na especificidade e minimização de interferentes. O procedimento de medição utilizado é calibrado com o SRM (Standard Reference Material) 914 do NIST (National Institute of Standards and Technology), tornando-o rastreável ao método definitivo IDMS (Diluição Isotópica e Espectrometria de Massa), atendendo as recomendações do NKDEP (National Kidney Disease Education Program) para padronização da determinação de creatinina no soro. A creatinina reage com o picrato em meio alcalino formando (hidróxido de cálcio 200 mmol/L) um complexo de cor vermelha que tem absorção máxima em 510 nm, proporcional à concentração de creatinina na amostra (MURRAY, 1987c; MYERS et al., 2006).



Esquema 10 - Reação para determinação da creatinina.

3.4.14 Desidrogenase láctica (LD)

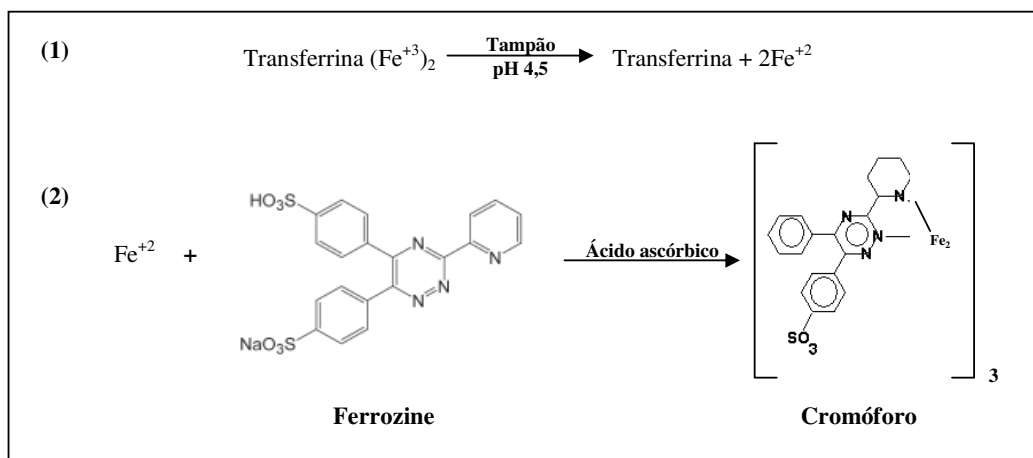
A LD catalisa a inter conversão do piruvato em lactato na presença de NAD^+/NADH como coenzima. O decréscimo da absorbância em 340 nm devido à oxidação do NADH é proporcional à atividade da LD na amostra (PESCE, 1987; IFCC, 2002d).



Esquema 11 - Reação catalisada pela LD com formação de L-lactato.

3.4.15 Ferro

O método utilizado para quantificação do ferro foi o da 3-(2-piridil)-5,6-bis(4-ácido fenilsulfônico)-1,2,4-triazina (*Ferrozine*) (GOODWIN et al., 1966), rastreável ao método de referência proposto pelo CLSI. Por ação de um tampão pH 4,5, o ferro é dissociado da transferrina. O ácido ascórbico reduz os íons férricos a íons ferrosos e estes formam um complexo com a *Ferrozine*, cuja absorção a 560 nm é proporcional à quantidade de ferro na amostra (PERROTTA, 1987).

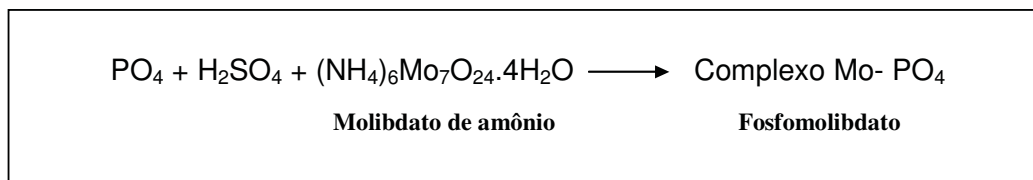


Esquema 12 - Reações para determinação do Ferro sérico. (1) Dissociação do ferro da transferrina em meio ácido; (2) Formação do cromóforo.

3.4.16 Fósforo

A metodologia utilizada para quantificar o fósforo foi de Daly e Ertingshausen (1972) modificado por Farrell Junior, 1987. O fósforo inorgânico da amostra reage com o molibdato de amônio na presença do ácido sulfúrico formando um complexo de fosfomolibdato não

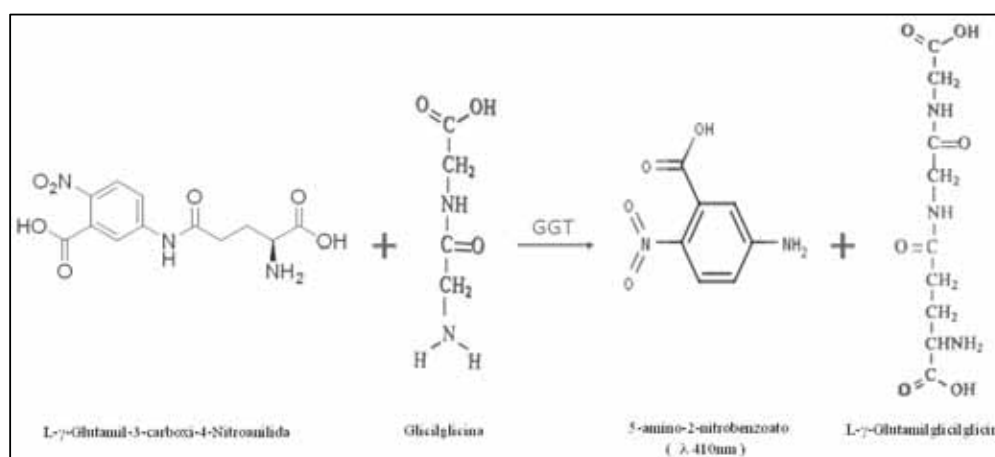
reduzido. Este complexo absorve luz em 340 nm, proporcional à concentração de fósforo inorgânico na amostra (MUNOZ et al., 1983).



Esquema 13 - Reação para determinação do fósforo.

3.4.17 Gama-Glutamil Transferase (GGT)

Para a quantificação de GGT foi utilizada a metodologia de Szasz modificado por Pesce e Gendler, 1987 com monitoramento contínuo, cujo desempenho é equivalente ao método de referência proposto pela IFCC. A GGT catalisa a transferência do grupamento glutamil da L-γ-glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida para a glicilglicina, formando 5-amino-2-nitrobenzoato e L-γ-glutamilglicilglicina (SZASZ, 1969). A quantidade formada de p-nitroanilina, que absorve em 405 nm é diretamente proporcional à atividade da GGT na amostra (IFCC, 2002a).



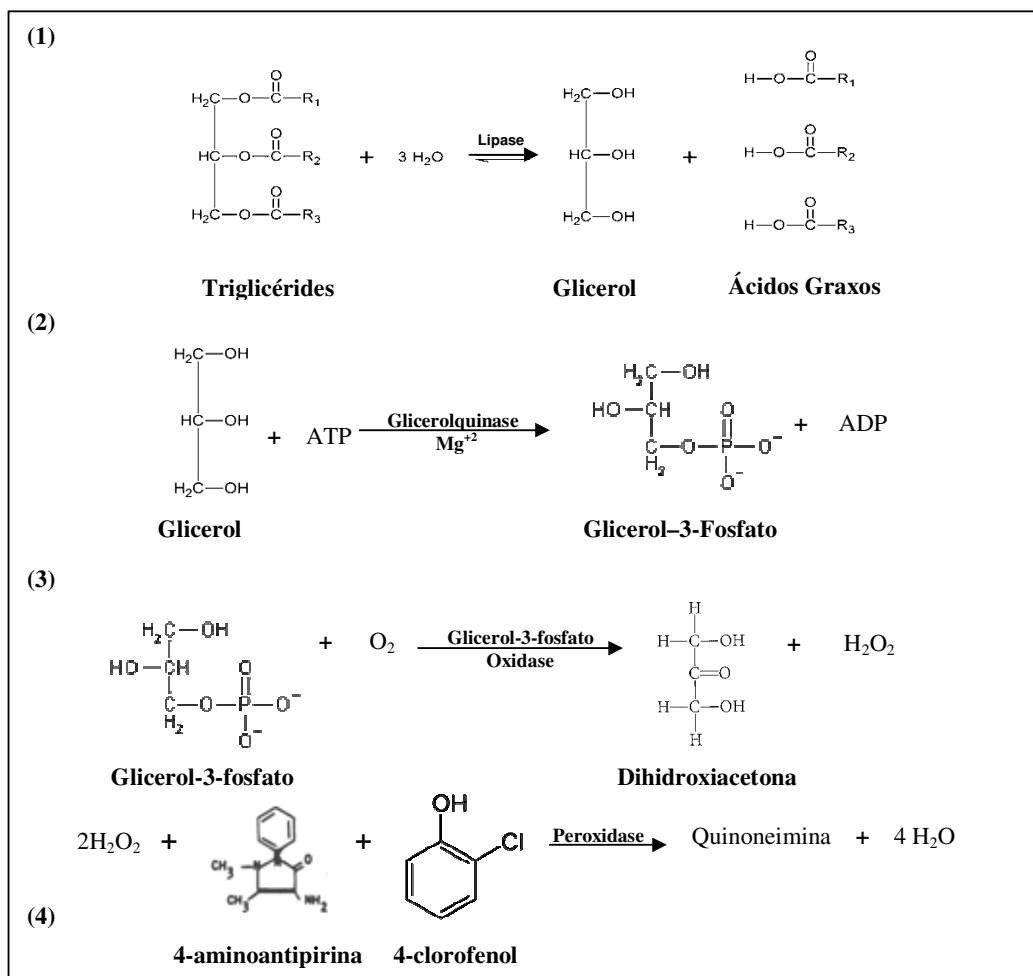
Esquema 14 - Reação para determinação do GGT, com formação de p-nitroanilina.

3.4.18 Glicose

O método utilizado para quantificação de glicose foi o da glicose-oxidase (TRINDER, 1969). A glicose-oxidase (GOD) catalisa a oxidação da glicose originando ácido glucônico e H_2O_2 . Numa segunda etapa da reação o H_2O_2 reage com 4-aminoantipirina na presença de fenol, em reação catalizada por peroxidase. Esta reação oxidativa de acoplamento forma a

3.4.21 Triglicérides

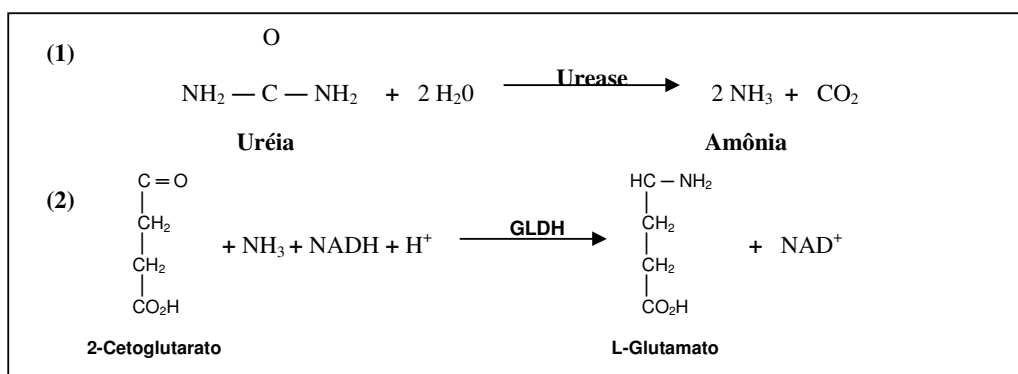
Os triglicérides foram determinados com ensaios enzimáticos acoplados (FOSSATI e PRENCIPE, 1982; MCGOWAN et al., 1983, SHEPHARD e WHITING, 1990). Os triglicérides são hidrolisados pela enzima lipase lipoprotéica liberando glicerol que é convertido a glicerol-3-fosfato pela ação glicerolquinase. O glicerol-3-fosfato é oxidado pela glicerolfosfato oxidase à dihidroxiacetona e H_2O_2 . A reação reveladora ocorre com a reação de acoplamento entre o H_2O_2 , 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, catalisada pela peroxidase, produzindo uma quinoneimina. A quinoneimina formada tem absorção máxima em 505 nm, diretamente proporcional à concentração do triglicérides na amostra.



Esquema 16 – Reações para determinação do Triglicérides. (1) Hidrólise dos triglicérides pela enzima lipase lipoprotéica; (2) Conversão do glicerol a glicerol-3-fosfato; (3) Oxidação do glicerol-3-fosfato a dihidroxiacetona e H_2O_2 ; (4) Formação de quinoneimina.

3.4.22 Uréia

A Uréia foi quantificada pelo método enzimático acoplado (KAPLAN, 1987). Numa primeira reação, a enzima urease hidrolisa a uréia produzindo amônia (NH_3) e dióxido de carbono (CO_2). Numa segunda reação a amônia reage com o 2-cetoglutarato e NADH em reação catalisada pela glutamato desidrogenase (GLDH) com oxidação do NADH a NAD^+ . A conseqüente redução na absorbância do NADH em 340 nm é proporcional à concentração de uréia na amostra.



Esquema 17 - Reações para determinação da Uréia. (1) Hidrólise da uréia pela enzima urease; (2) Oxidação do NADH a NAD^+ .

3.5 PROCEDIMENTOS

3.5.1 Determinação da densidade do Soro

A densidade do soro foi calculada por meio de um picnômetro com capacidade volumétrica de 25 mL. Foram realizadas três pesagens: picnômetro vazio, com água e com o soro.

Peso do picnômetro vazio = 28,617 g (m_0)

Peso do picnômetro com soro = 54,605 g (m_1)

Peso do picnômetro com água = 53,900 g (m_2). A temperatura da água foi monitorada e estava em 25°C. A densidade da água a esta temperatura é de 0,99707 (D). Cálculos:

Massa do soro $\longrightarrow m_1 - m_0 = 54,605 - 28,617 = 25,988$

Massa da água $\longrightarrow m_2 - m_0 = 53,900 - 28,617 = 25,283$

Densidade $\longrightarrow d' = (m_1 - m_0) / (m_2 - m_0) = 1,028$

Densidade corrigida $\longrightarrow d = D \times d' = 0,99707 \times 1,028 = 1,025 \text{ g/mL}$

Com a densidade do soro de 1,025 g/mL, calcula-se a massa contida em 5,0 mL de soro:

$$D = m/v \text{ (g/mL)} \rightarrow 1,025 = m / 5,0 \text{ mL} \rightarrow m = 5,13 \text{ g}$$

3.5.2 Liofilização

Os frascos do liofilizador foram numerados e pesados separadamente e colocados no freezer a $\leq -18^\circ\text{C}$ de um dia para o outro. Para o congelamento das amostras antes da liofilização, foi utilizado um banho de acetona com gelo seco, cuja temperatura durante todo o processo de congelamento permaneceu a $\leq -30^\circ\text{C}$. Foram colocados 50 mL de soro pelas paredes dos frascos girando os mesmos no banho de acetona. Os frascos com os soros antes

de serem colocados no liofilizador foram pesados novamente. Os frascos foram mantidos no liofilizador por 24 horas. Após a liofilização foi realizado outra pesagem dos frascos com o soro liofilizado. A pesagem dos frascos foram realizadas à temperatura ambiente.

3.5.2.1 Liofilização do pool de soro sem preservante (SP)

Os resultados obtidos da pesagem dos frascos vazio e com soro SP estão apresentados na tabela 1.

Frascos	Vazio	Com soro antes da liofilização (g)	Com soro após liofilização (g)	Soro antes liofilização (g)	Soro após liofilização (g)
1	229,56	280,70	234,17	51,14	4,61
2	226,71	279,18	231,39	47,79	4,68
3	239,03	291,18	243,84	47,34	4,81
4	235,14	287,77	240,07	47,70	4,93
Média	232,61±5,53	284,71±5,71	237,37±5,63	48,49±1,78	4,76±0,49

Tabela 1 – Valores dos pesos à temperatura ambiente obtidos dos frascos de liofilização vazios, com soro SP antes e após a liofilização e o peso do soro liofilizado.

Para a alíquotagem do soro liofilizado é necessário estimar a quantidade de soluto remanescente e a quantidade de água retirada no processo de liofilização. Assim, utilizando-se os pesos do soro antes e após a liofilização, calculou-se a quantidade de soluto a ser pesado para reconstituição de um determinado volume de soro:

$$\begin{array}{rcl}
 48,49 \text{ g} & \text{-----} & 100\% \\
 4,76 \text{ g} & \text{-----} & x \\
 x = 9,82\%
 \end{array}$$

Para 50 mL de soro liofilizado a quantidade de soluto recuperado foi de 9,82%, significando que 90,18% de água foi retirada. Utilizando a massa (calculada pela fórmula da densidade) para 5,0 mL de soro reconstituído obtemos:

$$\begin{array}{rcl}
 5,13 \text{ g} & \text{-----} & 100\% \\
 x' & \text{-----} & 9,82\% \\
 x' = 0,50 \text{ g}
 \end{array}$$

3.5.2.1.1 Aliquotagem do soro liofilizado sem preservante (SP)

Foram pesados 0,50 g do soro liofilizado sem preservante e aliquotados em frascos âmbar. Foram bem vedados e mantidos refrigerados a 2 - 8°C.

3.5.2.2 Liofilização do pool de soro com preservante (CP)

Os resultados obtidos da pesagem dos frascos vazio e com soro com preservantes estão apresentados nas tabelas 2.

Frascos	Vazio	Com soro antes da liofilização (g)	Com soro após liofilização (g)	Soro antes liofilização (g)	Soro após liofilização (g)
5	226,72	278,28	231,55	51,56	4,83
6	235,11	285,47	239,86	50,36	4,75
7	239,10	287,47	243,98	48,37	4,88
8	229,86	278,69	234,56	48,83	4,70
Média	232,70±5,50	282,48±4,68	237,49±5,53	49,78±1,46	4,79±0,08

Tabela 2 – Valores dos pesos à temperatura ambiente obtidos dos frascos de liofilização vazios, com soro CP antes e após a liofilização e o peso do soro liofilizado.

Da mesma forma realizada para a aliquotagem do soro liofilizado SP, foi estimada a quantidade de soluto remanescente e a quantidade de água retirada no processo de liofilização, para o soro CP.

$$\begin{array}{rcl}
 49,78 \text{ g} & \text{-----} & 100\% \\
 4,79 \text{ g} & \text{-----} & x \\
 & & x = 9,62\%
 \end{array}$$

Para 50 mL de soro liofilizado a quantidade de soluto recuperado foi de 9,62%, significando que 90,38% de água foi retirada. Utilizando a massa (calculada pela fórmula da densidade) para 5,0 mL de soro reconstituído obtemos:

$$\begin{array}{rcl}
 5,13 \text{ g} & \text{-----} & 100\% \\
 x' & \text{-----} & 9,62\% \\
 & & x' = 0,49 \text{ g}
 \end{array}$$

3.5.2.2.1 Aliquotagem do soro liofilizado com preservante (CP)

Foram pesados 0,49g do soro liofilizado CP e aliquotados em frascos âmbar. Foram bem vedados e mantidos refrigerados a 2 - 8°C.

3.5.3 Reconstituição dos soros liofilizados

O soro liofilizado foi reconstituído com água tipo I (resistividade maior ou igual a 10 megaohm/cm e condutividade menor ou igual a 0,1 mS/cm a 25°C - CLSI) utilizando um purificador Milli-Q plus, em balão volumétrico de 5,0 mL. Após a reconstituição aguardou-se 30 minutos e então foram novamente aliquotados (1,0 mL) em tubo criogênicos e congelados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$, sendo após reconstituição utilizados por 5 dias; após a utilização um novo frasco com o soro liofilizado era reconstituído. As amostras foram utilizadas por 300 dias.

3.5.4 Determinação dos analitos

3.5.4.1 Determinação dos analitos nos pools de soro

Antes da realização do processo de liofilização e congelamento das amostras, os analitos foram determinados no soro líquido SP e CP para comparação posterior com os resultados obtidos (T_i).

3.5.4.2 Determinação dos analitos após conservação

O soro em tubo criogênico foi retirado do freezer e deixado a temperatura ambiente para total descongelamento (aproximadamente 30 minutos); no soro liofilizado conforme descrito no item 3.5.3. Após este tempo, os volumes adequados foram utilizados no equipamento Labmax 240 e Eletrodo Seletivo para determinação dos analitos.

3.5.5 Esquema da análise das amostras

As determinações foram realizadas nas amostras líquidas de soro SP e CP submetidos a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ e $\leq -80^{\circ}\text{C}$; e para os soros a 2 - 8°C – liofilizados, após sua reconstituição. O quadro 1 mostra a denominação dos tempos em que as análises foram realizadas.

Denominação	Intervalo de tempo das análises
T _{Inicial} (T _i)	Determinação em quadruplicada das concentrações dos analitos (Xm iniciais) nos pools de soro SP e CP, antes de serem submetidos a qualquer processo de conservação.
T ₀	Determinação diária por 30 dias (1º mês) e cálculo das Xm, s e CV.
T ₁	Determinação no 38º dia (5ª semana).
T ₂	Determinação no 45º dia (6ª semana).
T ₃	Determinação no 52º dia (7ª semana).
T ₄	Determinação no 60º dia (2º mês).
T ₅	Determinação no 75º dia (10ª semana).
T ₆	Determinação no 90º dia (3º mês).
T ₇	Determinação no 120º dia (4º mês).
T ₈	Determinação no 150º dia (5º mês).
T ₉	Determinação no 180º dia (6º mês).
T ₁₀	Determinação no 210º dia (7º mês).
T ₁₁	Determinação no 240º dia (8º mês).
T ₁₂	Determinação no 270º dia (9º mês).
T ₁₃	Determinação no 300º dia (10º mês).

Quadro 1 – Esquema de trabalho durante os 300 dias de monitoramento.

3.5.6 Comitê de Ética

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara – São Paulo (nº 15/2010), (Anexo).

3.5.7 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo test t, utilizando o software Minitab 15, considerando um nível de significância estatística de 95% ($p \geq 0,05$).

Foram confeccionados gráficos *box-plot* para representar a distribuição dos dados das variáveis. Consiste de uma “caixa” (um retângulo) com o nível superior definido pelo terceiro quartil (Q3) e o nível inferior definido pelo primeiro quartil (Q1). A mediana é representada por um traço no interior da caixa, e os pontos máximo e mínimo são unidos à caixa por seguimentos de reta. Observações fora desses limites são considerados como *outliers* (pontos fora do padrão geral e, portanto, sujeitos a uma análise para verificar sua correção e possível desconsideração), e são indicadas por asteriscos (*) (BRAZ, 2008). Para os resultados individuais das amostras-controle foram utilizados os mapas de Levey-Jennings.

4. Resultados

Neste trabalho produzimos amostras-controle para parâmetros bioquímicos do Laboratório de Análises Clínicas, com materiais líquidos congelados e sólidos liofilizados. Do mesmo pool de soro foram separadas duas alíquotas, onde em uma delas foi adicionado como preservante penicilina G, sulfato de estreptomicina e cloranfenicol. Cada pool dos soros SP e CP foi subdividido e conservado às temperaturas $\leq -18^{\circ}\text{C}$, $\leq -80^{\circ}\text{C}$ ou $2 - 8^{\circ}\text{C}$ após liofilização.

Foram determinados os níveis dos analitos nas amostras dos soros SP e CP antes do processamento para conservação. Após o processamento para conservação, os níveis dos analitos nas seis amostras de soro foram determinados diariamente no 1º mês; semanalmente no 2º mês; quinzenalmente no 3º mês, e mensalmente até completar 10 meses.

Para cada analito foi calculada a média aritmética (X_m), desvio padrão (s) e coeficiente de variação (CV), nos soros SP e CP conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$, $\leq -80^{\circ}\text{C}$ ou $2 - 8^{\circ}\text{C}$ - liofilizados após reconstituição, nos tempos: T_i (antes do processamento para conservação), T_0 (representando a média nos 30 primeiros dias, com determinações diárias) e T_{13} (representando a média cumulada dos 300 dias). As tabelas 3 e 4 (anexo) apresentam os valores de X_m e s nos soros SP e CP, respectivamente.

A tabela 5 apresenta os valores de p e a aplicação do teste t entre os soros SP e CP em T_i e mostra que somente os níveis de colesterol, creatinina, GGT e sódio apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). A tabela mostra também a comparação dos valores de p para os níveis dos analitos entre T_i e T_0 . Cada processo de conservação por sua vez já mostra diferenças estatísticas significativas para a maioria dos parâmetros bioquímicos analisados (79,8%). Os níveis dos analitos conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ foram semelhantes apenas para 5 analitos tanto no soro SP como no CP, dos quais são comuns somente LD e uréia. Esta mesma análise, para a $\leq -80^{\circ}\text{C}$ mostra 6 analitos no soro SP e 5 analitos no soro CP, dos quais foram comuns ALP, ALT, GGT e uréia; para o processo de liofilização e conservação a $2 - 8^{\circ}\text{C}$, os níveis dos analitos foram semelhantes para 3 analitos no soro SP e 4 analitos no soro CP, tendo em comum a ALT, bil. direta e triglicérides.

A tabela 6 apresenta os valores de p e a aplicação do teste t para os níveis dos analitos durante 300 dias de monitoramento e nos diferentes processos de conservação, ou seja, entre T_0 e T_{13} . Nesta tabela observamos que dos 23 analitos monitorados apenas os níveis de LD foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) entre T_0 e T_{13} quando conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ para os soros SP e CP. Os demais analitos monitorados apresentaram níveis semelhantes estatisticamente significativos ($p \geq 0,05$) entre si, independente da presença ou não de

preservante e do processo de conservação como líquidos congelados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ ou $\leq -80^{\circ}\text{C}$ ou sólidos refrigerados entre $2 - 8^{\circ}\text{C}$.

No 300º dia de monitoramento (T_{13}) observamos que os diferentes processos de conservação para os soros SP e CP alteraram as semelhanças da média cumulada dos níveis dos analitos, observado pelos valores de p (tabela 7). Nos estados de líquidos congelados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ ou $\leq -80^{\circ}\text{C}$, tanto o soro SP como CP apresentaram 14 analitos com níveis semelhantes ($p \geq 0,05$) e 9 com níveis com diferenças significativas ($p < 0,05$), porém apresentaram este comportamento em comum: ácido úrico, albumina, amilase, bil. direta, cálcio, CLLF, creatinina, col.-HDL, K^+ e triglicérides.

Da mesma forma, a análise entre os soros SP e CP conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ apresentou 14 analitos com semelhança significativas ($p \geq 0,05$) e 9 com diferenças significativas ($p < 0,05$) e a $\leq -80^{\circ}\text{C}$, 15 analitos com semelhanças estatísticas ($p \geq 0,05$) e 8 com diferenças estatísticas ($p < 0,05$) tendo este comportamento em comum os seguintes analitos: albumina, ALP, ALT, amilase, AST, bil. direta, bil. total, cálcio, CLLF, LD, K^+ e uréia. Assim, podemos observar que 6 analitos nos soros líquidos congelados, ou seja, albumina, amilase, bil. direta, cálcio, CLLF e K^+ , não sofreram a interferência do processo de conservação e nem da adição de preservante e, que 17 analitos tiveram comportamentos diferentes em decorrência do processo de conservação e/ou da adição de preservante.

Observando ainda na tabela 7, nos soros sólidos refrigerados 11 analitos apresentaram semelhanças significativas ($p \geq 0,05$) entre os soros SP e CP: ácido úrico, ALP, AST, cálcio, colesterol, fósforo, GGT, glicose, col.-HDL, LD, uréia, ou seja, para os demais analitos o processo de liofilização associado com a adição de preservante alterou significativamente os níveis desses analitos. Apenas o cálcio apresentou comportamento com semelhança significativa ($p \geq 0,05$) nos soros líquidos congelados e/ou sólidos refrigerados com a adição ou não do preservante, portanto observa-se que os demais analitos sofreram algum tipo de interferência pela adição do preservante e/ou temperaturas e/ou processo de conservação.

Tabela 5 - Valores de p para os níveis dos analitos em T_i entre os soros sem preservante (SP) e com preservante (CP) e entre o T_i e T_0 (amostras-controle conservadas durante 30 dias). Nível de confiança de 95% ($p \geq 0,05$).

Analito	T_i	SP			CP		
		SP e CP	2-8 °C-			2-8 °C-	
			$\leq -18^\circ\text{C}$	$\leq -80^\circ\text{C}$	Liof.	$\leq -18^\circ\text{C}$	$\leq -80^\circ\text{C}$
Ácido úrico	0,735*		0,020	0,120♦	0,020	0,003	0,000
Albumina	0,244*		0,000	0,000	0,010	0,000	0,000
ALP	0,629*		0,018	0,544♦	0,000	0,042	0,397♦
ALT	0,678*		0,001	0,423♦	0,192♦	0,041	0,419♦
Amilase	0,287*		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
AST	0,529*		0,008	0,006	0,006	0,028	0,011
Bil. Direta	0,761*		0,000	0,000	0,109♦	0,051♦	0,034
Bil. Total	0,446*		0,002	0,000	0,000	0,002	0,000
Cálcio	0,592*		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
CLLF	0,386*		0,001	0,001	0,000	0,018	0,034
Colesterol	0,029		0,104♦	0,375♦	0,020	0,001	0,003
Creatinina	0,023		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Ferro	1,000*		0,003	0,041	0,013	0,051♦	0,081♦
Fósforo	0,976*		0,000	0,001	0,000	0,001	0,001
GGT	0,030		0,051♦	0,211♦	0,000	0,013	0,226♦
Glicose	1,000*		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Col.-HDL	0,058*		0,000	0,001	0,000	0,028	0,030
LD	0,443*		0,846♦	0,000	0,000	0,470♦	0,000
Potássio	0,598*		0,027	0,003	0,000	0,053♦	0,037
Prot. Totais	0,507*		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Sódio	0,003		0,051♦	0,003	0,000	0,044	0,021
Triglicérides	0,270*		0,004	0,006	0,175♦	0,015	0,017
Uréia	0,312*		0,453♦	0,180♦	0,032	0,297♦	0,899♦

* (T_i) – Comparação dos níveis de T_i nos soros SP e CP, $p \geq 0,05$.

♦ - Comparação dos níveis entre T_i e T_0 , $p \geq 0,05$; para cada processo de conservação.

Tabela 6 - Valores de p para os níveis dos analitos nos soros sem preservante (SP) e com preservante (CP) entre T_0 (amostras-controlas conservadas durante 30 dias) e T_{13} após 300 dias de monitoramento. Nível de confiança de 95% ($p \geq 0,05$).

Analito	SP			CP		
	$\leq -18^\circ\text{C}$	$\leq -80^\circ\text{C}$	2-8 °C-	$\leq -18^\circ\text{C}$	$\leq -80^\circ\text{C}$	2-8 °C-
			Liof.			Liof.
Ácido úrico	0,516*	0,551*	0,869*	0,533*	0,992*	0,752*
Albumina	0,141*	0,741*	0,994*	0,869*	0,886*	0,880*
ALP	0,611*	0,565*	0,481*	0,474*	0,936*	0,599*
ALT	0,150*	0,262*	0,507*	0,052*	0,367*	0,899*
Amilase	0,970*	0,772*	0,553*	0,606*	0,680*	0,590*
AST	0,359*	0,709*	0,813*	0,864*	0,443*	0,702*
Bil. Direta	0,059*	0,518*	0,399*	0,117*	0,737*	0,932*
Bil. Total	0,582*	0,731*	0,961*	0,301*	0,762*	0,401*
Cálcio	0,965*	0,779*	0,587*	0,804*	0,752*	0,657*
CLLF	0,145*	0,140*	0,149*	0,124*	0,112*	0,476*
Colesterol	0,839*	0,621*	0,805*	0,701*	0,714*	0,809*
Creatinina	0,853*	0,183*	0,634*	0,697*	0,302*	0,362*
Ferro	0,842*	0,874*	0,281*	0,117*	0,473*	0,829*
Fósforo	0,979*	0,291*	0,683*	0,712*	0,986*	0,848*
GGT	0,110*	0,778*	0,143*	0,238*	0,444*	0,627*
Glicose	0,543*	0,918*	0,232*	0,529*	0,799*	0,771*
Col. HDL	0,500*	0,203*	0,301*	0,980*	0,858*	0,640*
LD	0,011	0,522*	0,504*	0,013	0,582*	0,761*
Potássio	0,995*	0,952*	0,793*	0,731*	0,982*	0,985*
Prot. Totais	0,700*	0,791*	0,629*	0,661*	0,759*	0,534*
Sódio	0,524*	0,883*	0,949*	0,931*	0,527*	0,717*
Triglicérides	0,331*	0,498*	0,637*	0,975*	0,846*	0,781*
Uréia	0,434*	0,983*	0,650*	0,399*	0,722*	0,577*

* - Comparação dos níveis entre T_0 e T_{13} , $p \geq 0,05$; para cada processo de conservação.

Tabela 7 - Valores de p para a comparação dos níveis dos analitos entre os processos de conservação após 300 dias de monitoramento (T_{13}). Nível de confiança de 95%.

Analito	SP	CP	$\leq -18^{\circ}\text{C}$	$\leq -80^{\circ}\text{C}$	2-8 °C-Liof.
	$\leq -18^{\circ}\text{C e } \leq -80^{\circ}\text{C}$	$\leq -18^{\circ}\text{C e } \leq -80^{\circ}\text{C}$	SP e CP	SP e CP	SP e CP
Ácido úrico	0,236*	0,288*	0,000	0,000	0,587*
Albumina	0,375*	0,402*	0,210*	0,844*	0,000
ALP	0,002	0,063*	0,856*	0,276*	1,000*
ALT	0,000	0,000	0,674*	0,749*	0,001
Amilase	1,000*	0,104*	0,503*	0,307*	0,014
AST	0,256*	0,002	0,055*	0,713*	0,389*
Bil. Direta	0,273*	0,221*	0,685*	0,413*	0,000
Bil. Total	0,100*	0,010	0,922*	0,461*	0,000
Cálcio	0,324*	0,450*	0,128*	0,210*	0,084*
CLLF	0,840*	0,681*	0,328*	0,284*	0,000
Colesterol	0,005	0,002	0,000	0,000	0,063*
Creatinina	0,863*	0,308*	0,040	0,184*	0,041
Ferro	0,030	0,137*	0,001	0,001	0,000
Fósforo	0,048	0,472*	0,556*	0,000	0,126*
GGT	0,151*	0,009	0,002	0,428*	0,874*
Glicose	0,030	0,152*	0,039	0,393*	0,063*
Col.-HDL	0,062*	0,862*	0,002	0,000	0,102*
LD	0,000	0,000	0,469*	0,956*	0,649*
Potássio	0,253*	0,163*	0,841*	0,405*	0,000
Prot. Totais	0,000	0,004	0,053*	0,027	0,000
Sódio	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000
Triglicérides	0,493*	0,571*	0,000	0,000	0,000
Uréia	0,112*	0,001	0,134*	1,000*	0,822*

* - Valores com $p \geq 0,05$ dos níveis dos analitos em T_{13} entre os processos de conservação.

Para todos os analitos foram utilizadas as especificações da qualidade mínima, desejável ou ótima para a imprecisão analítica (CV) baseado nos componentes da variação biológica (FRASER, 2001); exceto para a ALP onde foi usado o requisito da CLIA'88 como especificação da qualidade (WESTGARD et al., 2004). A tabela 8 apresenta os CV dos analitos nos soros SP e CP nos diferentes processos de conservação, após 300 dias de monitoramento.

Tabela 8 - Valores dos CV dos analitos nos soros sem preservante (SP) e com preservante (CP) nos diferentes processos de conservação, após 300 dias de monitoramento.

Analito	SP (%)							CP (%)						
	T _i	≤ -18°C		≤ -80°C		2 - 8 °C - Liof.		T _i	≤ -18°C		≤ -80°C		2 - 8 °C - Liof.	
		T ₀	T ₁₃	T ₀	T ₁₃	T ₀	T ₁₃		T ₀	T ₁₃	T ₀	T ₁₃	T ₀	T ₁₃
Ácido úrico	0,60	1,70	2,35	1,68	1,87	0,57	0,55	0,60	0,57	0,56	0,58	0,60	0,48	0,49
Albumina	0,49	1,07	2,24	1,16	1,22	1,08	1,10	0,49	0,39	0,43	1,05	1,04	0,64	0,62
ALP	2,17	6,68	7,83	6,45	7,04	8,43	8,95	3,80	7,74	9,12	7,10	8,33	6,25	6,94
ALT	5,79	11,85	18,83	6,05	12,94	10,21	10,30	8,89	11,59	21,83	8,46	13,77	4,61	4,25
Amilase	1,09	0,98	1,04	1,40	1,47	2,31	2,42	1,27	1,07	1,37	1,40	1,44	2,00	2,25
AST	4,96	3,18	4,79	4,24	4,00	4,41	4,42	5,26	4,27	5,04	4,74	4,98	4,04	3,98
Bil. Direta	6,67	4,93	14,35	7,75	8,15	8,38	8,90	6,67	6,18	12,68	6,40	6,36	8,11	8,76
Bil. Total	4,88	6,38	6,58	7,92	7,94	8,56	8,15	17,02	7,34	7,89	5,67	5,50	7,91	7,65
Cálcio	0,98	1,11	1,15	1,50	1,51	1,05	1,58	0,98	1,17	1,47	0,97	1,17	1,38	1,49
CLLF	1,71	3,04	4,20	3,41	4,96	5,12	5,80	1,81	3,25	4,38	2,63	4,50	5,98	7,12
Colesterol	3,55	2,86	3,70	2,90	3,06	1,02	1,02	1,49	2,68	3,09	1,21	1,27	1,03	1,18
Creatinina	1,41	3,07	6,05	2,28	4,02	2,15	3,21	1,37	1,40	4,55	1,95	4,44	1,76	4,02
Ferro	2,59	6,22	5,77	2,07	2,58	1,47	1,95	2,03	1,63	2,11	2,19	2,43	1,22	1,21
Fósforo	3,76	3,26	4,23	2,17	2,67	1,28	1,33	3,44	1,59	1,76	1,48	1,44	0,85	0,83
GGT	1,36	2,29	2,70	1,64	2,11	3,65	4,41	1,32	2,21	2,86	2,43	2,67	5,11	4,54
Glicose	0,68	1,08	1,31	1,43	1,52	1,49	1,72	0,68	1,23	1,22	0,96	0,92	1,42	1,46
Col.-HDL	2,15	6,03	5,81	2,79	3,29	7,03	7,45	4,31	5,27	5,51	5,57	5,13	5,75	5,22
LD	0,94	2,93	6,26	1,64	2,69	2,57	3,46	0,70	2,52	6,80	1,46	2,36	2,25	2,17
Potássio	0,22	0,80	0,81	1,10	0,97	0,90	0,84	0,44	0,38	0,45	0,33	0,32	0,68	0,60
Prot. Totais	0,72	0,76	1,07	0,67	0,71	1,11	1,16	0,43	1,27	1,39	0,72	0,80	0,61	0,64
Sódio	0,29	0,21	0,23	0,36	0,34	0,39	0,34	0,47	0,37	0,36	0,29	0,30	0,27	0,26
Triglicérides	2,70	2,49	3,32	3,45	3,77	3,10	2,93	3,30	2,55	2,61	2,00	2,24	2,32	2,28
Uréia	3,40	4,19	4,46	3,71	3,74	3,52	3,56	5,13	2,67	3,16	2,49	3,92	4,07	4,43

T_i: CV sem os processos de conservação investigados; T₀: CV das determinações diárias por 30 dias; T₁₃: CV cumulativos dos 300 dias de monitoramento.

4.1 Ácido Úrico

A figura 6(a,b) mostra para o ácido úrico as médias, medianas e variações dos dados dos soros SP e CP após os processos de conservação. Observa-se para os soros SP conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ ou $\leq -80^{\circ}\text{C}$ um desvio padrão maior quando comparados com o valor daqueles conservados a $2 - 8^{\circ}\text{C}$ - liofilizados, incluindo um ponto "outlier" para o soro a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ (tabela 3, anexo).

A adição do preservante e/ou a conservação a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ e $\leq -80^{\circ}\text{C}$ interferiu nas concentrações de ácido úrico, desde que em T_i a comparação entre os soros SP e CP mostram $p \geq 0,05$ e entre T_i e T_0 $p \geq 0,05$ somente para $\leq -80^{\circ}\text{C}$ no soro SP (tabela 5). Esta interferência foi um aumento de 8% nos níveis de ácido úrico (tabela 4, anexo), não ocorrendo o mesmo com a liofilização onde não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$) entre os soros SP e CP (figura 6a,b e tabela 7).

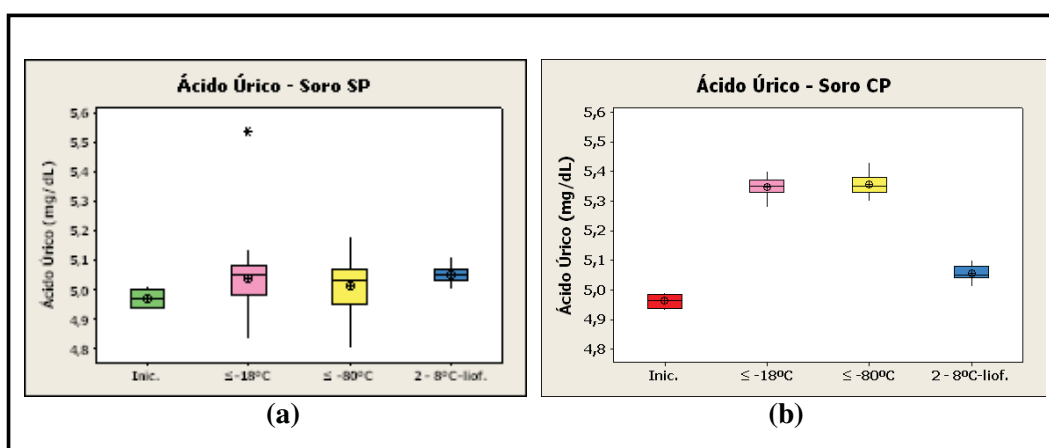


Figura 6 – Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de ácido úrico em amostras de soro conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$; $\leq -80^{\circ}\text{C}$ e entre $2 - 8^{\circ}\text{C}$ - liofilizados.

- Soro SP inicial (T_i)
- Soro CP inicial (T_i)
- Temperatura $\leq -18^{\circ}\text{C}$ (T_{13})
- Temperatura $\leq -80^{\circ}\text{C}$ (T_{13})
- 2 - 8°C - liofilizados (T_{13})
- ⊕ Média
- * Outlier

Os CV para os níveis do ácido úrico após 300 dias e para todas as condições de preservação investigadas ficaram abaixo da especificação ótima da qualidade (2,2%), exceto para o soro SP conservado a $\leq -18^{\circ}\text{C}$, onde o CV ficou abaixo da especificação desejável de 4,3% (tabela 8).

As figuras 7 (a, b, c) e 8 (a, b, c) mostram o gráfico de Levey-Jennings para o ácido úrico e a ocorrência mais importante para cada processo de conservação, durante os 300 dias de monitoramento.

Figura 7 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para o ácido úrico no soro SP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).

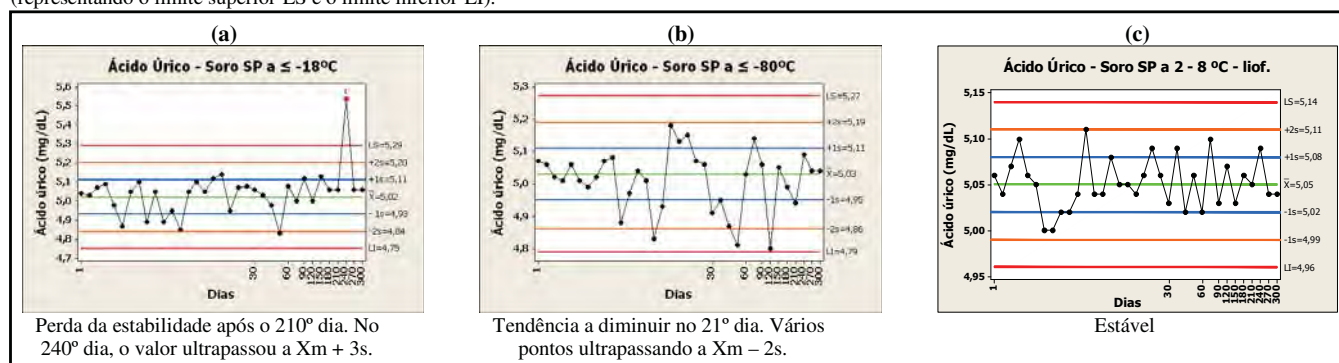
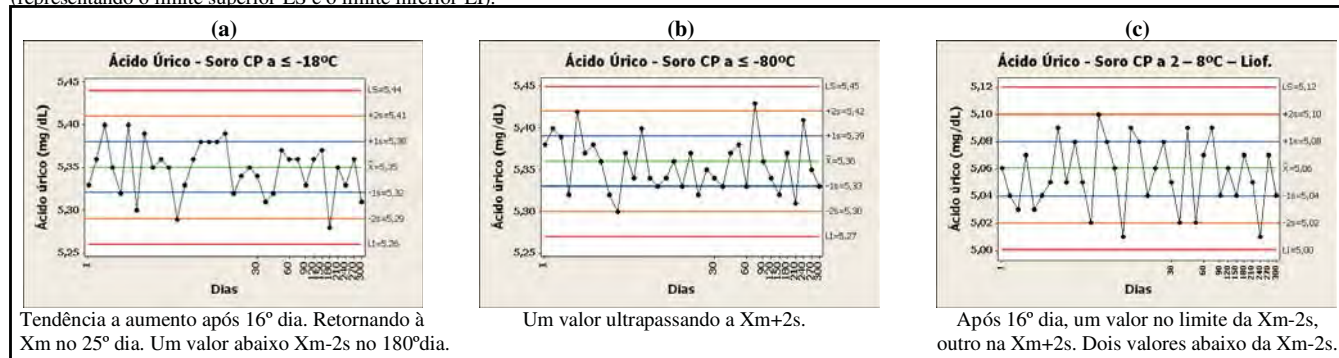


Figura 8 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para o ácido úrico no soro CP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).



4.2 Albumina

A figura 9(a) mostra para a albumina no soro SP conservado a $\leq -18^{\circ}\text{C}$, quatro valores "outliers", ou seja, pontos que estão fora do padrão geral. Os desvios padrão no soro CP foram menores quando comparados com o soro SP, onde no soro CP a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ obtivemos o menor CV (figura 9b e tabela 8). Nos soros CP a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ e 2 - 8°C - liofilizados, os CV mantiveram abaixo do CV ótimo, 0,8% e os demais abaixo do CV desejável de 1,6% (tabela 8).

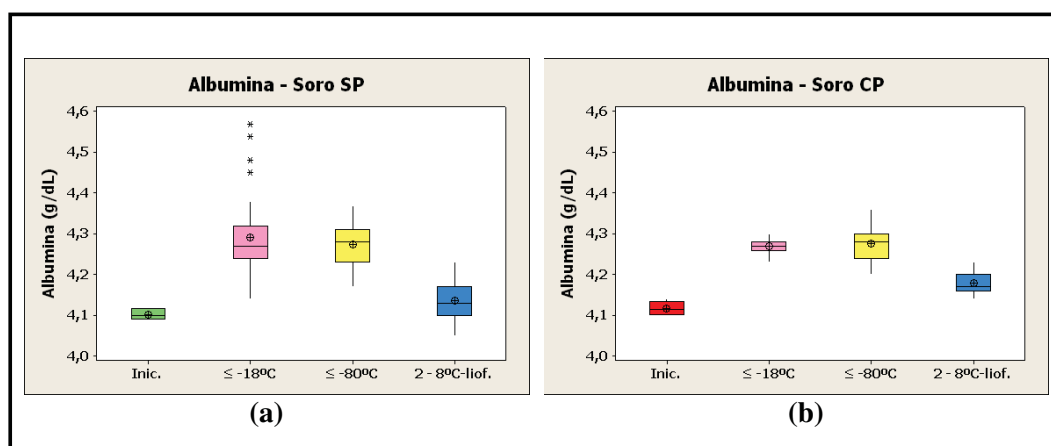


Figura 9 – Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de albumina em amostras de soro conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$; $\leq -80^{\circ}\text{C}$ e entre 2 - 8°C - liofilizados.

- Soro SP inicial (T_i)
- Soro CP inicial (T_i)
- Temperatura $\leq -18^{\circ}\text{C}$ (T_{13})
- Temperatura $\leq -80^{\circ}\text{C}$ (T_{13})
- 2 - 8°C - liofilizados (T_{13})
- ⊕ Média
- * Outlier

Os processos de conservação em ambas as temperaturas $\leq -18^{\circ}\text{C}$ e $\leq -80^{\circ}\text{C}$ foram responsáveis pelo aumento da concentração de albumina de $\sim 4,4\%$ no soro SP e $\sim 3,8\%$ no soro CP, em relação suas médias iniciais, sendo menos acentuado ($\sim 1,2\%$) no processo de liofilização.

As figuras 10 (a, b, c) e 11 (a, b, c) mostram o gráfico de Levey-Jennings para a albumina e a ocorrência mais importante para cada processo de conservação, durante os 300 dias de monitoramento.

Figura 10 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para a albumina no soro SP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).

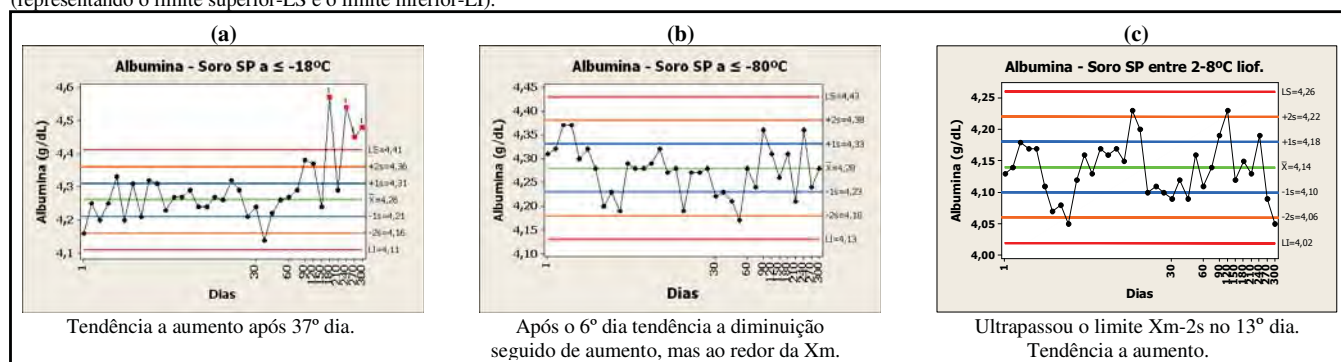
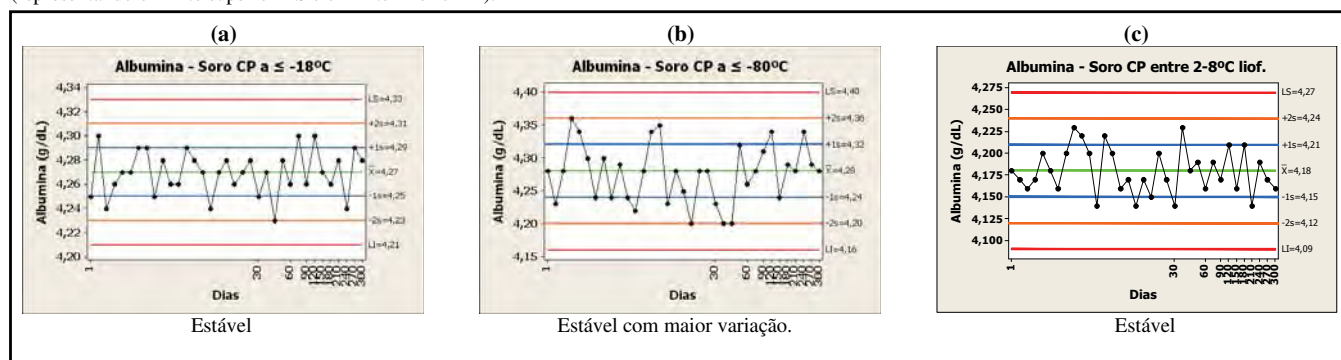


Figura 11 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para a albumina no soro CP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).



4.3 Fosfatase Alcalina (ALP)

A figura 12 (a, b) mostra que para a ALP houve uma diminuição da média em seus níveis nos soros conservados a 2 - 8°C – liofilizados em relação aos demais processos de conservação, e mesmo em relação ao T_i .

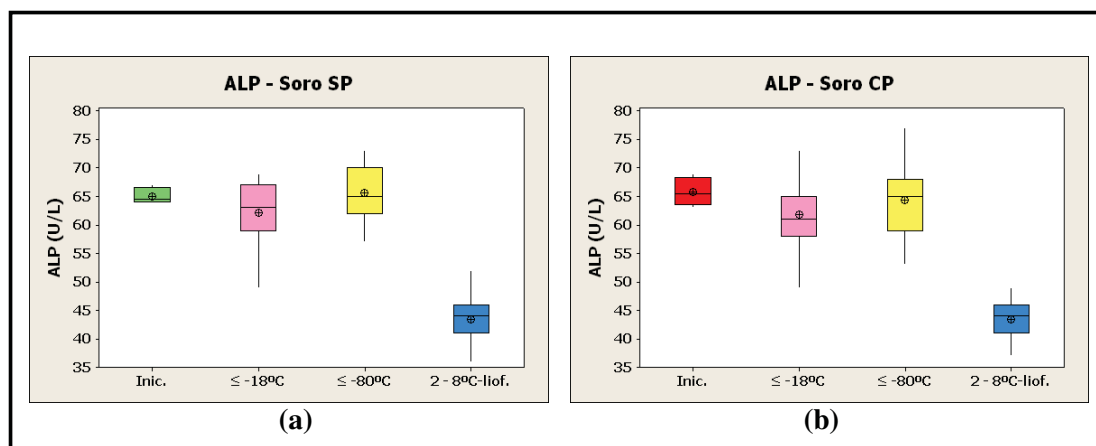


Figura 12 – Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de ALP em amostras de soro conservados a $\leq -18^\circ\text{C}$; $\leq -80^\circ\text{C}$ e entre 2 - 8°C - liofilizados.

- Soro SP inicial (T_i)
 - Soro CP inicial (T_i)
 - Temperatura $\leq -18^\circ\text{C}$ (T_{13})
 - Temperatura $\leq -80^\circ\text{C}$ (T_{13})
 - 2 - 8°C - liofilizados (T_{13})
- $\oplus$ Média

Como podemos observar para a ALP, os soros SP a $\leq -18^\circ\text{C}$ e CP a $\leq -80^\circ\text{C}$ e $\leq -18^\circ\text{C}$ apresentaram maiores desvios padrão em relação aos demais soros. As hastes inferiores e superiores indicam as concentrações que mais se afastaram do quartil inferior e superior, respectivamente. Nenhum processo de conservação tanto para o soro SP como para o soro CP alcançaram a especificação da qualidade baseada na variação biológica mínima para a ALP. Contudo, utilizando os requisitos da CLIA'88, o desempenho aceitável para a ALP é a $X_m \pm 30\%$ (WESTGARD et al., 2004), o que pode ser observado nas figuras 13 e 14, pois todas as amostras de soro nos diferentes processos de conservação permaneceram dentro destes limites.

Podemos concluir que os processos de conservação a $\leq -18^\circ\text{C}$ e 2 - 8°C – liofilizado reduzem a concentração de ALP dos soros, sendo mais acentuado quando as amostras sofrem liofilização. A adição do preservante não interferiu nas determinações de ALP (tabela 7).

As figuras 13 (a, b, c) e 14 (a, b, c) mostram o gráfico de Levey-Jennings para a ALP, com os limites superior e inferior ($X_m \pm 30\%$) e dois desvios padrão com a ocorrência mais importante para cada processo de conservação, durante os 300 dias de monitoramento.

Figura 13 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para a ALP no soro SP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).

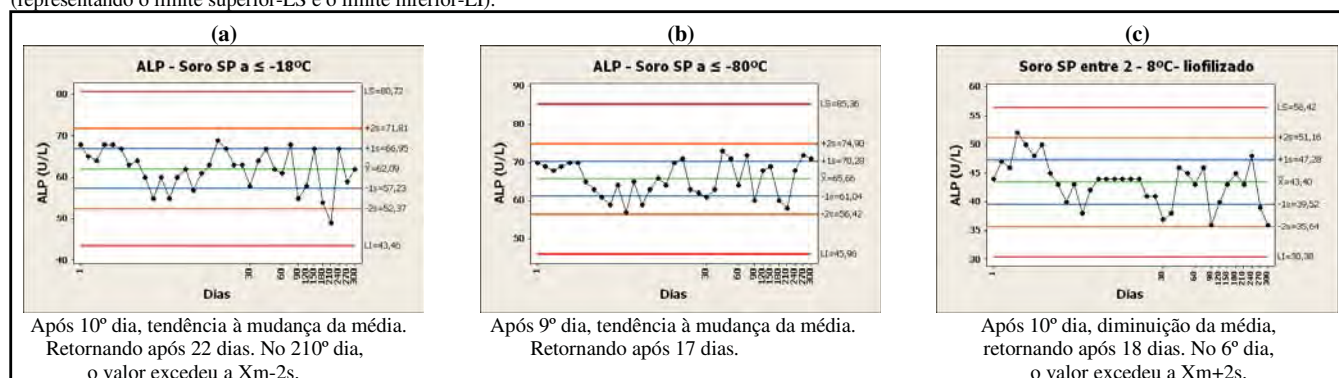
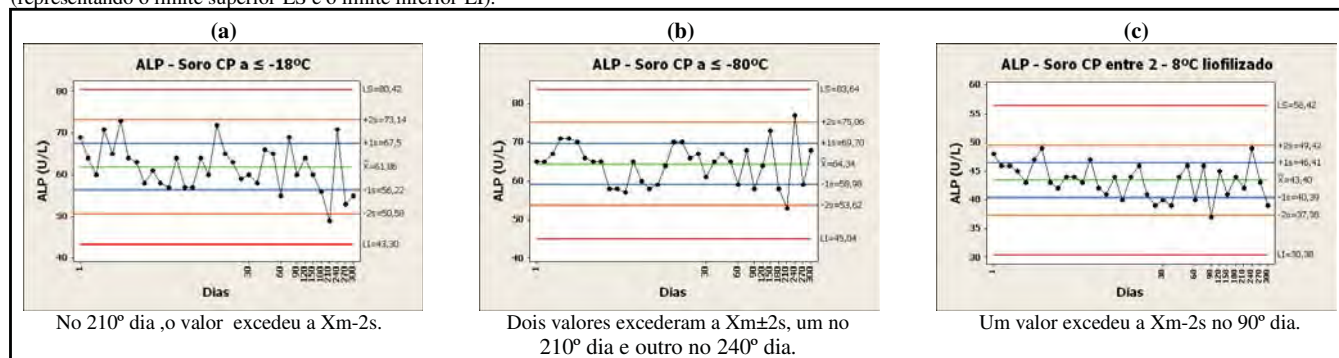


Figura 14 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para a ALP no soro CP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).



4.4 Alanina Aminotransferase (ALT)

A figura 15 (a, b) mostra para a ALT, pontos "outliers" nos soros SP e CP nos processos de conservação a $\leq -80^{\circ}\text{C}$ e $\leq -18^{\circ}\text{C}$, com perda da estabilidade, pois os valores de seus níveis diminuíram após 30 dias de monitoramento, conforme observado nas tabelas 3 e 4 em anexo ($T_{13} < T_0$).

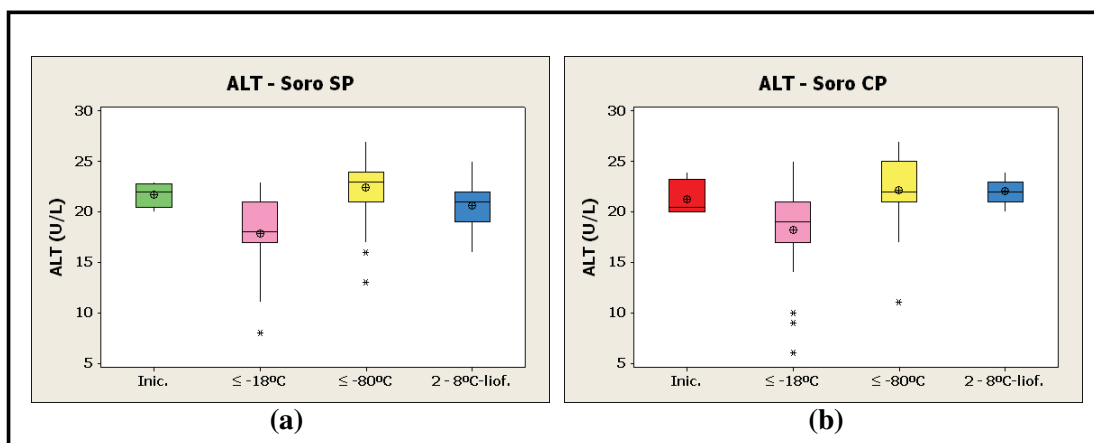


Figura 15 – Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de ALT em amostras de soro conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$; $\leq -80^{\circ}\text{C}$ e entre 2 - 8°C - liofilizados.

- Soro SP inicial (T_i)
- Soro CP inicial (T_i)
- Temperatura $\leq -18^{\circ}\text{C}$ (T_{13})
- Temperatura $\leq -80^{\circ}\text{C}$ (T_{13})
- 2 - 8°C - liofilizados (T_{13})
- ⊕ Média
- * Outlier

Ainda na figura 15 observamos que os desvios padrão para a ALT nos soros SP e CP submetidos a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ foram maiores quando comparados com os outros processos de conservação e conseqüentemente apresentaram maior CV. Verificando a tabela 8, os níveis de ALT, para os soros liofilizados foram os que apresentaram melhor desempenho em relação ao CV, sendo que o soro CP apresentou menor CV, ficando abaixo da especificação ótima da qualidade de 6,1%. Da mesma forma o CV no soro SP liofilizado atendeu a especificação desejável de 12,2% após 300 dias de monitoramento.

Os processos de conservação a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ e $\leq -80^{\circ}\text{C}$ provocaram perda da estabilidade no decorrer do tempo, sendo mais acentuada a $\leq -18^{\circ}\text{C}$. O processo de liofilização e a adição do preservante provocaram um aumento da estabilidade no decorrer do tempo (figuras 16 e 17).

As figuras 16 (a, b, c) e 17 (a, b, c) mostram o gráfico de Levey-Jennings para a ALT e a ocorrência mais importante para cada processo de conservação, durante os 300 dias de monitoramento.

Figura 16 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para a ALT no soro SP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).

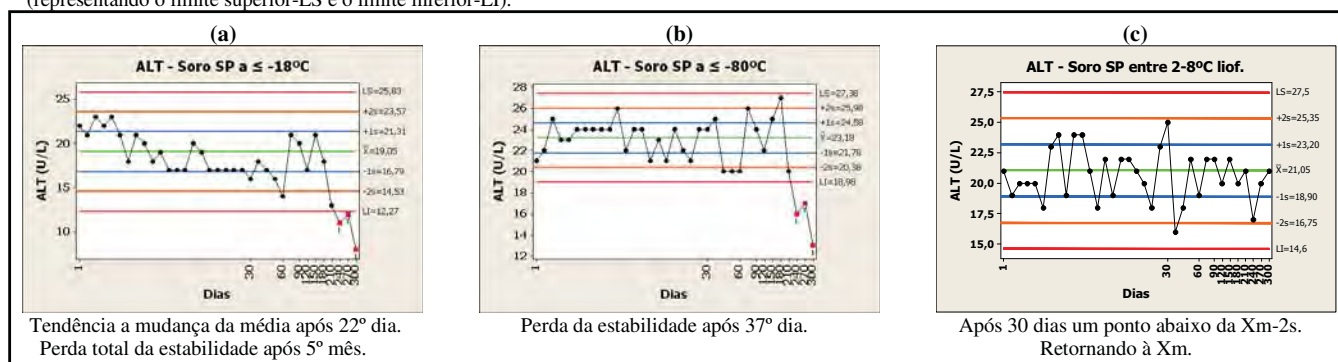
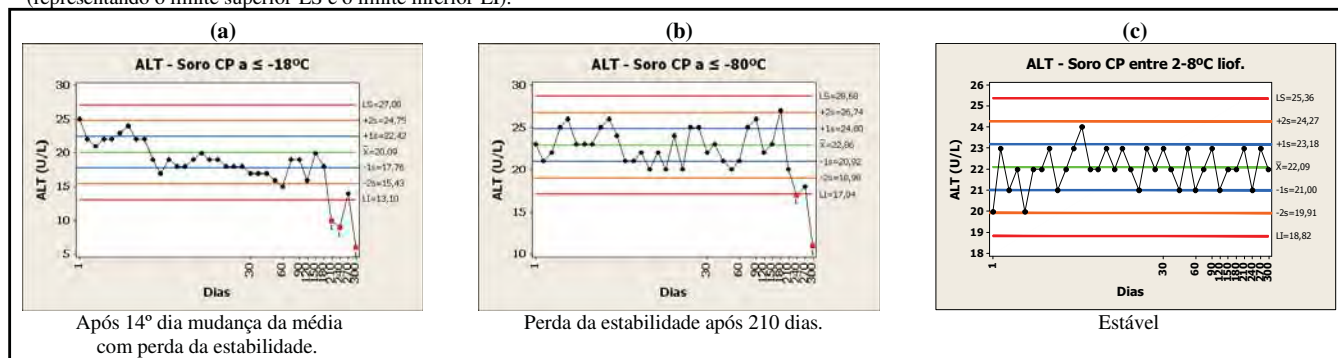


Figura 17 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para a ALT no soro CP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).



4.5 Amilase

Analisando a figura 18 (a, b), podemos observar os soros liofilizados com médias menores do que aqueles submetidos a $\leq -80^{\circ}\text{C}$ ou $\leq -18^{\circ}\text{C}$.

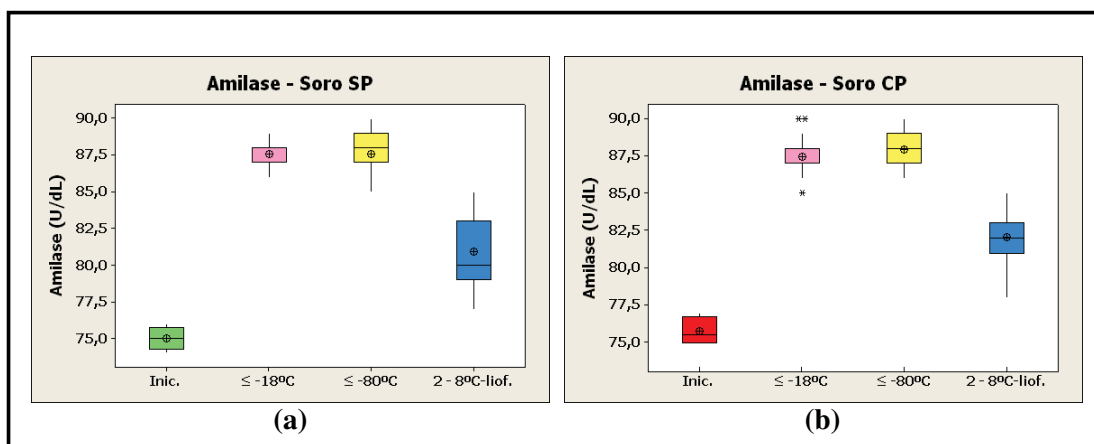


Figura 18 – Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de amilase em amostras de soro conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$; $\leq -80^{\circ}\text{C}$ e entre 2 - 8°C - liofilizados.

- Soro SP inicial (T_i)
- Soro CP inicial (T_i)
- Temperatura $\leq -18^{\circ}\text{C}$ (T_{13})
- Temperatura $\leq -80^{\circ}\text{C}$ (T_{13})
- 2 - 8°C - liofilizados (T_{13})
- ⊕ Média
- * Outlier

No soro CP conservado a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ (figura 18b) obtivemos três pontos "outliers" ocorridos a partir do 210º dia do experimento com perda da estabilidade. Nesta mesma figura podemos observar que nos soros a $\leq -80^{\circ}\text{C}$ e 2 - 8°C - liofilizado, as médias e medianas foram iguais com distribuição equivalente dos valores acima e abaixo da média, sendo que o CV do soro a $\leq -80^{\circ}\text{C}$ apresentou-se menor que o 2 - 8°C - liofilizado. Os CV para os níveis de amilase em todas as amostras ficaram abaixo da especificação ótima da qualidade de 2,4% (tabela 8).

Podemos ainda observar na figura 18 (a, b) que os processos de conservação afetaram a concentração da amilase com aumento da média em relação à média inicial, sendo menos acentuado para os soros conservados a 2 - 8°C - liofilizados. A adição do preservante diminuiu os CV nos processos de conservações a $\leq -80^{\circ}\text{C}$ e 2 - 8°C - liofilizado.

As figuras 19 (a, b, c) e 20 (a, b, c) mostram o gráfico de Levey-Jennings para a amilase e a ocorrência mais importante para cada processo de conservação, durante os 300 dias de monitoramento.

Figura 19 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para a amilase no soro SP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).

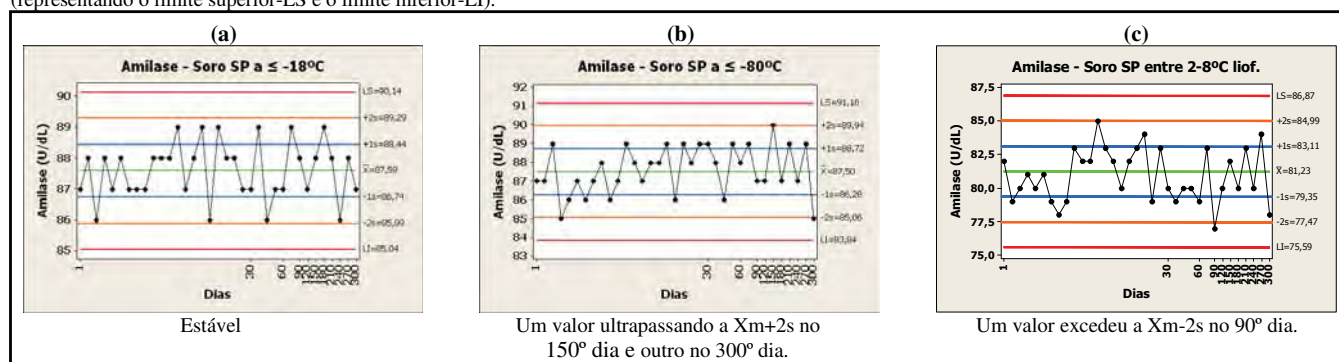
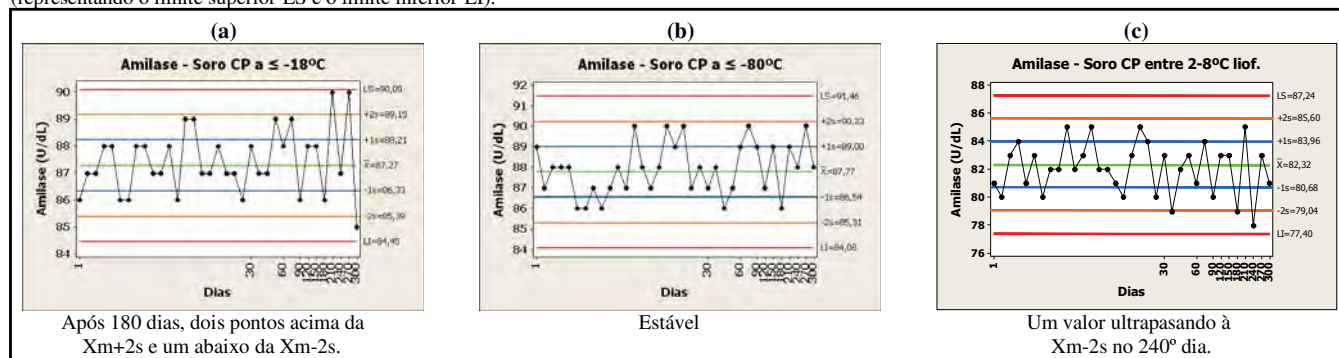


Figura 20 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para a amilase no soro CP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).



4.6 Aspartato Aminotransferase (AST)

Na figura 21(a, b), podemos observar para os níveis de AST que nos soros SP conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ e $\leq -80^{\circ}\text{C}$ ocorreu uma menor variação dos dados ao redor das médias, conseqüentemente um menor desvio padrão e CV, quando comparados às mesmas condições no soro CP. O soro CP a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ e $\leq -80^{\circ}\text{C}$ apresentou as hastes superiores e inferiores maiores, significando a presença de dados mais distantes tanto acima como abaixo da média. Para os soros conservados entre $2 - 8^{\circ}\text{C}$ - liofilizados, ocorreu o inverso, onde o soro SP apresentou um maior desvio padrão e CV quando comparados ao soro CP. No entanto, a distribuição dos dados ao redor da média foi mais uniforme e obteve-se a igualdade da média e mediana. Ocorreu aumento dos níveis de AST em todas as seis amostras em relação às suas médias iniciais. O comportamento deste aumento foi equivalente tanto para o soro SP como para o CP, significando que esta diferença pode ser atribuída aos processos de conservação.

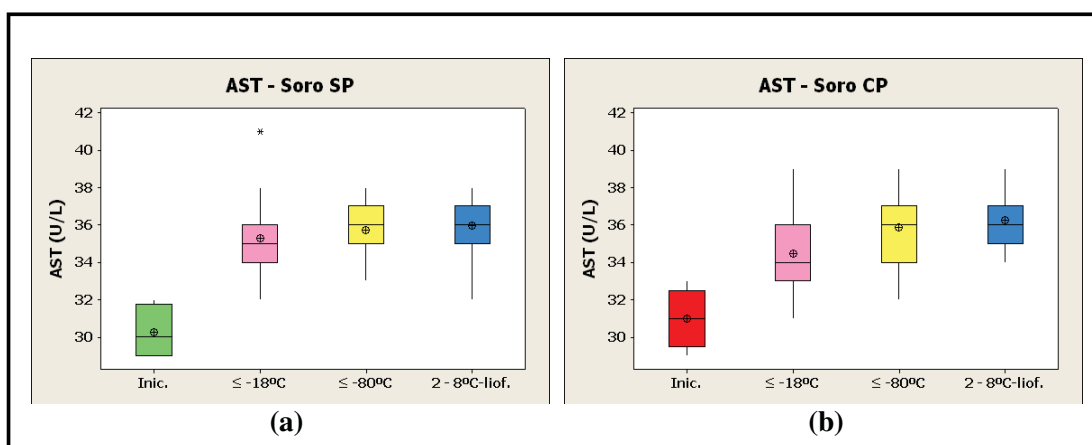


Figura 21 – Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de AST em amostras de soro conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$; $\leq -80^{\circ}\text{C}$ e entre $2 - 8^{\circ}\text{C}$ - liofilizados.

- Soro SP inicial (T_i)
- Soro CP inicial (T_i)
- Temperatura $\leq -18^{\circ}\text{C}$ (T_{13})
- Temperatura $\leq -80^{\circ}\text{C}$ (T_{13})
- $2 - 8^{\circ}\text{C}$ - liofilizados (T_{13})
- ⊕ Média
- * Outlier

Conforme a tabela 8, os CV de AST para todas as amostras mantiveram-se abaixo dos valores desejáveis da variação biológica de 6,0%.

As figuras 22 (a, b, c) e 23 (a, b, c) mostram o gráfico de Levey-Jennings para a AST e a ocorrência mais importante para cada processo de conservação, durante os 300 dias de monitoramento. No 300º dia os níveis do soro SP conservado a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ aumentou, passando da $X_m + 3s$ evidenciando um ponto “outlier”.

Figura 22 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para a AST no soro SP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).

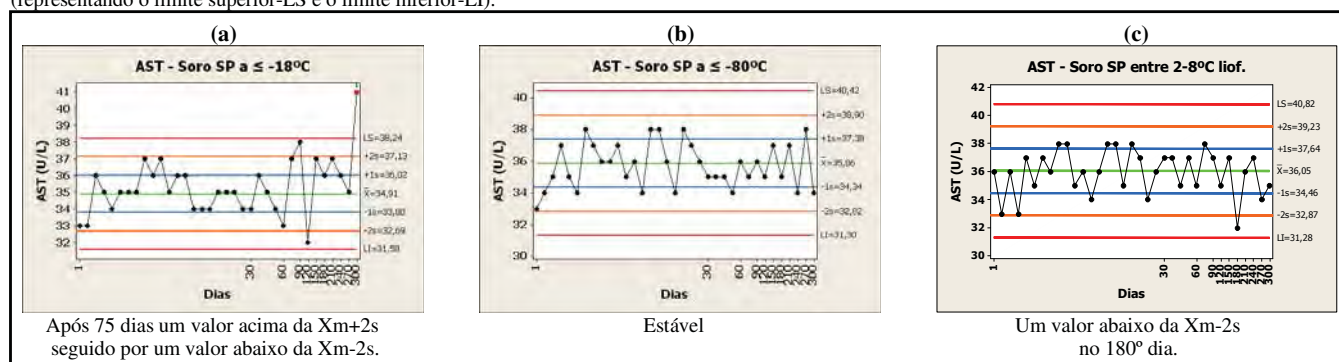
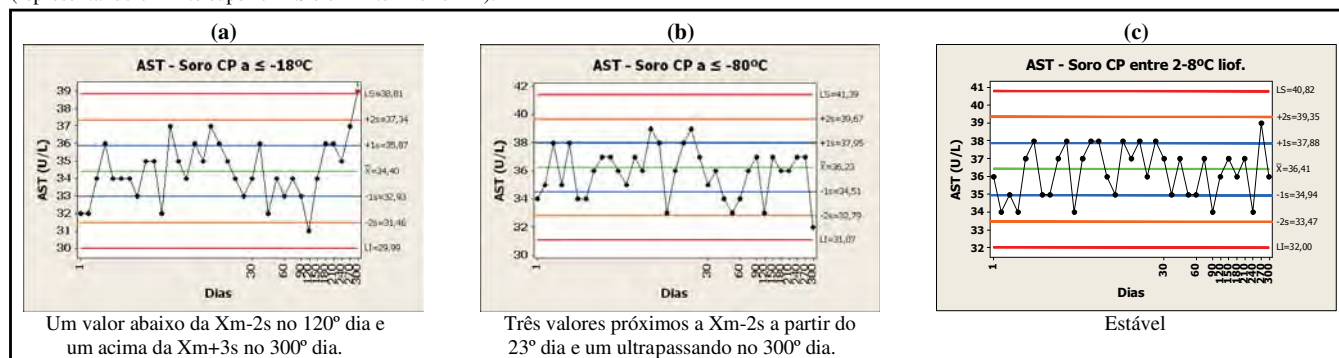


Figura 23 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para a AST no soro CP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).



4.7 Bilirrubina Direta (Bil. Direta)

Observando a figura 24 (a, b) e a tabela 5, os soros conservados entre 2 - 8°C – liofilizados e o soro CP a $\leq -18^\circ\text{C}$ tiveram suas médias sem diferença significativa ($p \geq 0,05$) em relação suas médias iniciais correspondentes. Entretanto a conservação a $\leq -80^\circ\text{C}$ interfere com os níveis de bil. direta tanto no soro SP como CP.

Podemos ainda observar a perda da estabilidade da bil. direta nos soros SP e CP quando conservados a $\leq -18^\circ\text{C}$ (após 180 dias de monitoramento), com um declínio da concentração, evidenciado também na figura 24 (a, b) com a presença de vários pontos "outliers" nesta condição de conservação. Ocorreu um aumento dos desvios padrão e CV, quando comparados ao T_0 e em relação aos demais processos de conservação (Figura 24 a,b e tabela 8).

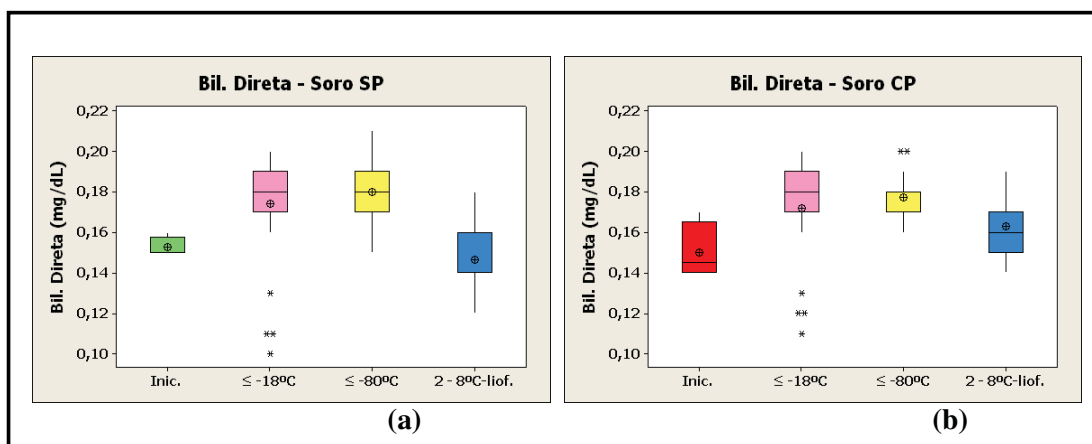


Figura 24 – Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de bilirrubina direta em amostras de soro conservados a $\leq -18^\circ\text{C}$; $\leq -80^\circ\text{C}$ e entre 2 - 8°C - liofilizados.

- Soro SP inicial (T_i)
- Soro CP inicial (T_i)
- Temperatura $\leq -18^\circ\text{C}$ (T_{13})
- Temperatura $\leq -80^\circ\text{C}$ (T_{13})
- 2 - 8°C - liofilizados (T_{13})
- ⊕ Média
- * Outlier

O soro CP para os níveis de bil. Direta, conservado a $\leq -80^\circ\text{C}$ também apresentou dois pontos "outliers" acima da média. Na figura 24(a), os soros SP conservados a $\leq -80^\circ\text{C}$ ou 2 - 8°C – liofilizados, apresentaram as hastes superiores e inferiores maiores em decorrência de valores nos limites da $X_m \pm 3s$, também observado na figura 24(b) para o soro CP conservados a 2 - 8°C – liofilizados, onde ocorreu um valor no limite da $X_m + 3s$. Isto se torna mais evidente quando analisamos as figuras 25(b, c) e figura 26(c).

Os soros SP e CP conservados a $\leq -80^\circ\text{C}$ e 2 - 8°C – liofilizados tiveram os CV para a bil. direta abaixo das especificações ótimas da qualidade de 9,2%, enquanto os soros conservados a $\leq -18^\circ\text{C}$ ficaram dentro da especificação desejável de 18,8% (tabela 8).

As figuras 25 (a, b, c) e 26 (a, b, c) mostram o gráfico de Levey-Jennings para a bil. direta e a ocorrência mais importante para cada processo de conservação, durante os 300 dias de monitoramento.

Figura 25 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para a bil. direta no soro SP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).

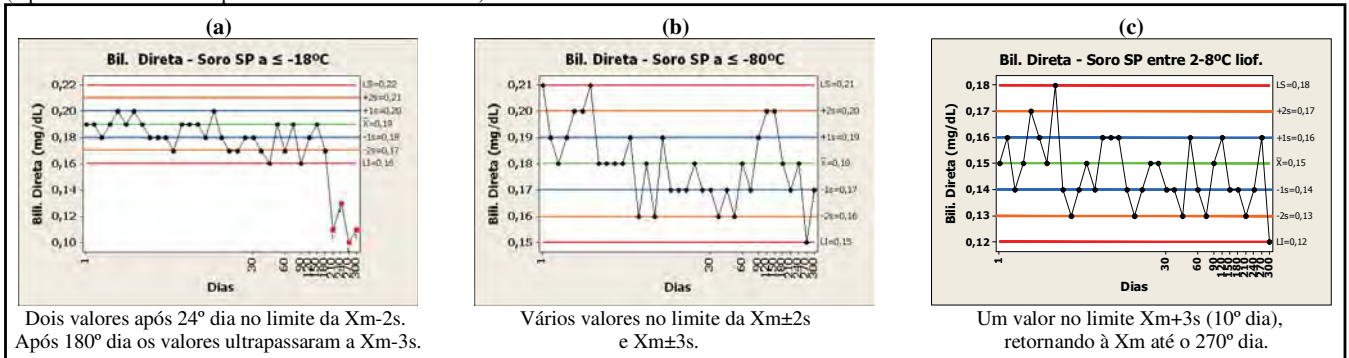
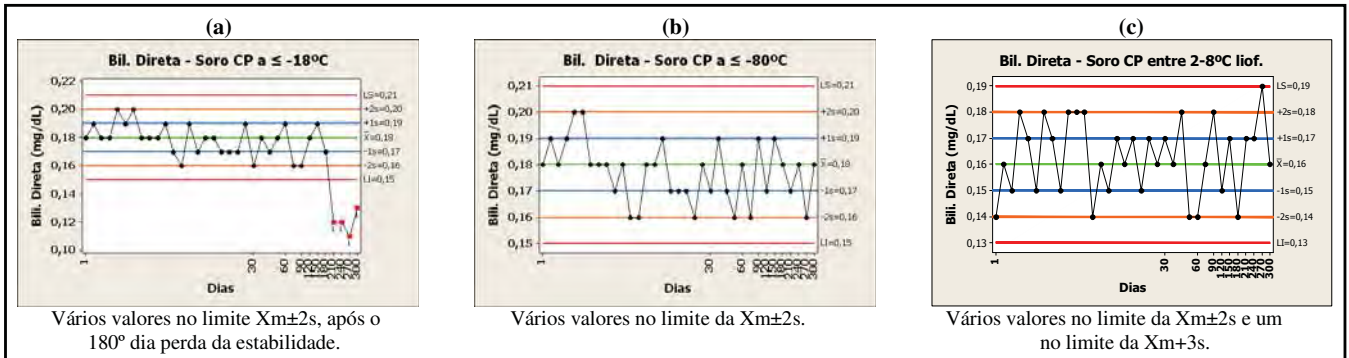


Figura 26 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para a bil. direta no soro CP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).



4.8 Bilirrubina Total (Bil. Total)

A figura 27 (a, b) mostra o aumento nos níveis de bil. total nas amostras após sofrerem o processo de liofilização. Podemos ainda observar para os níveis de bil. total na figura 27(a, b) que os soros SP e CP a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ e $\leq -80^{\circ}\text{C}$ tiveram as médias iguais as medianas, significando uma distribuição uniforme dos dados ao redor da média, o mesmo ocorrendo com o soro inicial SP. Em todas as amostras o desvio padrão se manteve o mesmo após 30 dias (T_0) até os 300 dias de monitoramento (T_{13}). Os soros que obtiveram um desvio padrão maior foram aqueles conservados entre 2 - 8°C – liofilizados e conseqüentemente um maior CV, podendo ser observado pelo tamanho dos quartis na figura.

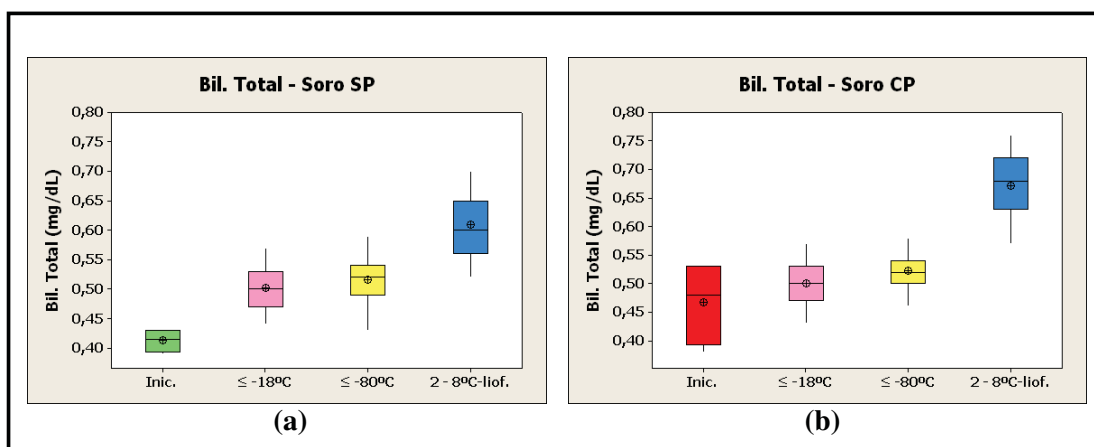


Figura 27 – Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de bilirrubina total em amostras de soro conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$; $\leq -80^{\circ}\text{C}$ e entre 2 - 8°C - liofilizados.

- Soro SP inicial (T_i)
 - Soro CP inicial (T_i)
 - Temperatura $\leq -18^{\circ}\text{C}$ (T_{13})
 - Temperatura $\leq -80^{\circ}\text{C}$ (T_{13})
 - 2 - 8°C - liofilizados (T_{13})
- ⊕ Média

Os CV para a bil. total dos soros nos diferentes processos de conservação ficaram abaixo da especificação desejável da qualidade (12,8%), sendo que o soro CP a $\leq -80^{\circ}\text{C}$ se encaixa dentro da especificação ótima da qualidade de 6,4% (figura 27b e tabela 8).

Os estados de conservação afetaram os níveis da bil. total com um aumento da média em relação aos soros iniciais (tabela 5). A associação da adição do preservante com o processo de liofilização resultou em um aumento da média do soro CP em relação ao SP com $p < 0,05$, concluindo-se que as médias são estatisticamente diferentes (tabela 7).

As figuras 28 (a, b, c) e 29 (a, b, c) mostram o gráfico de Levey-Jennings para a bil. total e a ocorrência mais importante para cada processo de conservação, durante os 300 dias de monitoramento.

Figura 28 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para a bil. total no soro SP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).

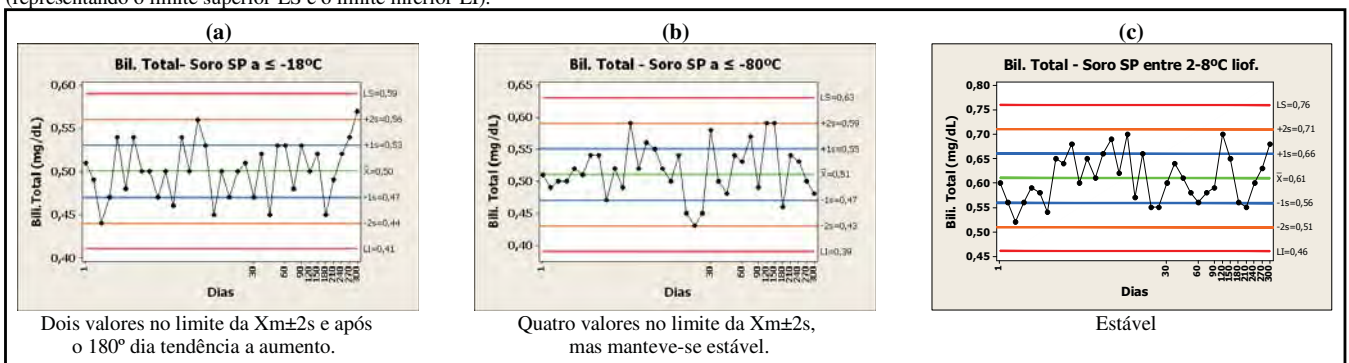
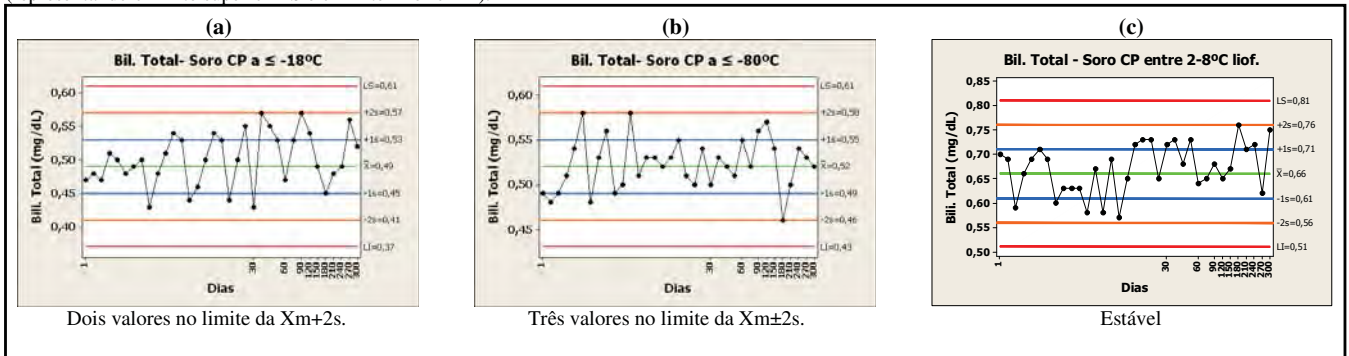


Figura 29 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para a bil. total no soro CP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).



4.9 Cálcio

Na figura 30 (a, b) observamos que os níveis de cálcio nos soros conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ e no soro SP entre $2 - 8^{\circ}\text{C}$ - liofilizado ocorreram valores "outliers". As médias dos níveis de cálcio nos processos de conservação a $\leq -80^{\circ}\text{C}$ e $\leq -18^{\circ}\text{C}$ nos soros SP e CP se mantiveram sem diferenças significativas com $p \geq 0,05$ (tabela 6), o mesmo não ocorrendo em relação as concentrações iniciais correspondentes (tabela 5). Os soros conservados a $2 - 8^{\circ}\text{C}$ - liofilizados e o soro SP a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ obtiveram um maior CV após 300 dias, sendo que nenhuma amostra alcançou a especificação desejável da qualidade de 1,0%, ficando dentro da especificação mínima de 1,9% (tabela 8).

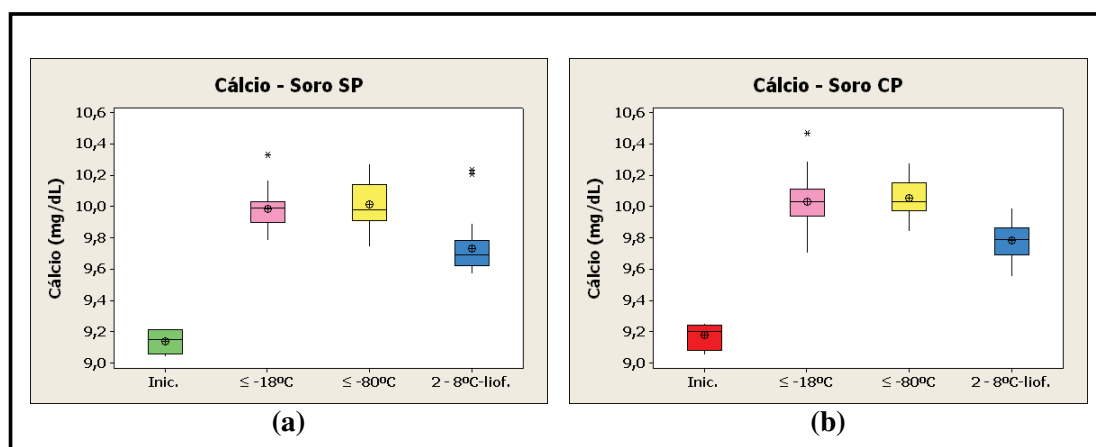


Figura 30 – Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de cálcio em amostras de soro conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$; $\leq -80^{\circ}\text{C}$ e entre $2 - 8^{\circ}\text{C}$ - liofilizados.

- Soro SP inicial (T_i)
- Soro CP inicial (T_i)
- Temperatura $\leq -18^{\circ}\text{C}$ (T_{13})
- Temperatura $\leq -80^{\circ}\text{C}$ (T_{13})
- $2 - 8^{\circ}\text{C}$ - liofilizados (T_{13})
- ⊕ Média
- * Outlier

Após serem submetidos aos processos de conservação observamos que houve um aumento nas médias os soros SP e CP, em relação aos níveis iniciais. Da mesma forma associando o preservante com a conservação a $\leq -80^{\circ}\text{C}$ e entre $2 - 8^{\circ}\text{C}$ - liofilizado ocorreu uma melhora no desempenho, visualizado por meio do CV apresentado na tabela 8.

As figuras 31 (a, b, c) e 32 (a, b, c) mostram o gráfico de Levey-Jennings para o cálcio e a ocorrência mais importante para cada processo de conservação, durante os 300 dias de monitoramento.

Figura 31 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para o cálcio no soro SP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).

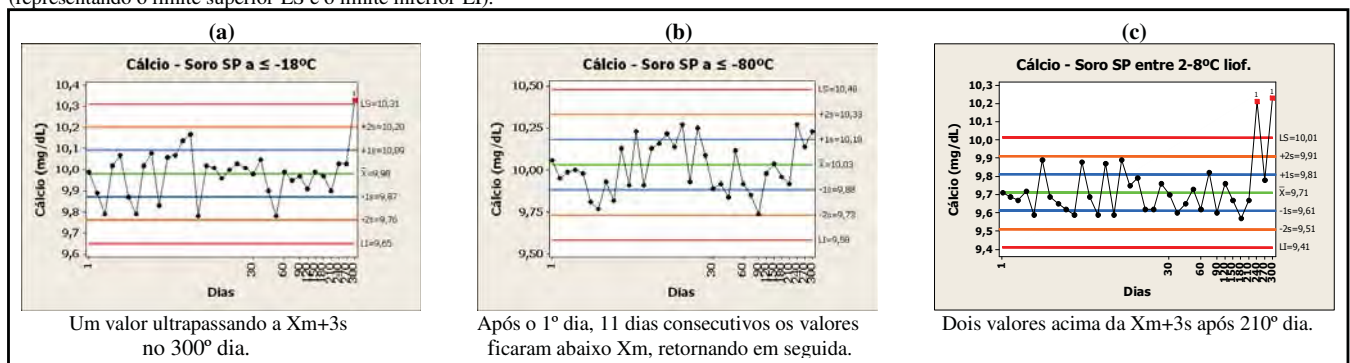
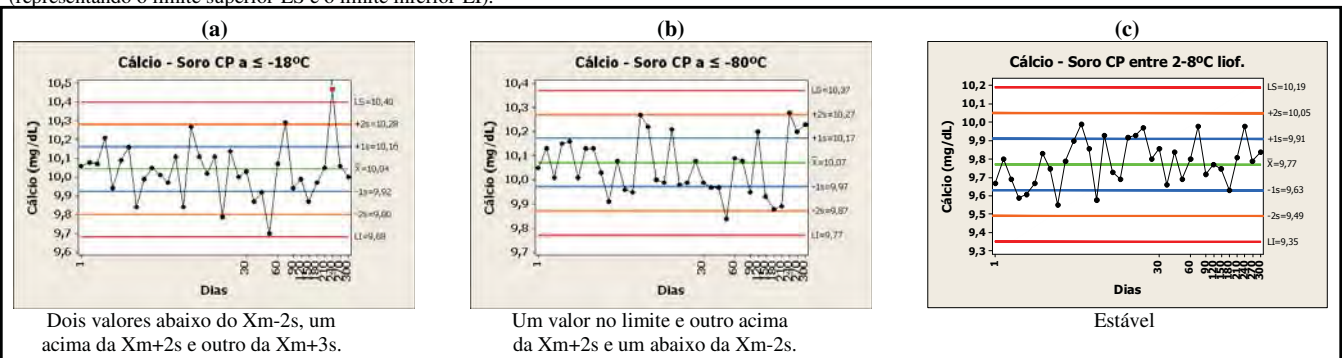


Figura 32 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para o cálcio no soro CP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).



4.10 Capacidade Latente de Ligação do Ferro (CLLF)

A figura 33 (a, b) apresenta os níveis de CLLF e observamos que seus níveis diminuíram nos soros conservados a 2 - 8°C – liofilizados, bem como a ocorrência de um ponto "outlier" para o soro CP conservado a $\leq -80^{\circ}\text{C}$. No soro SP conservado a $\leq -80^{\circ}\text{C}$ obtivemos o maior desvio padrão dos dados (tabela 3, anexo) após 300 dias de monitoramento. Entretanto os maiores CV foram observados nos soros conservados a 2 - 8°C – liofilizados, sendo mais acentuado no soro CP (tabela 8). Em todas as amostras ocorreu um aumento do desvio padrão no decorrer do tempo quando comparados aos trinta primeiros dias (T_0), o mesmo ocorrendo para os CV (tabelas 3 e 4, anexo e tabela 8).

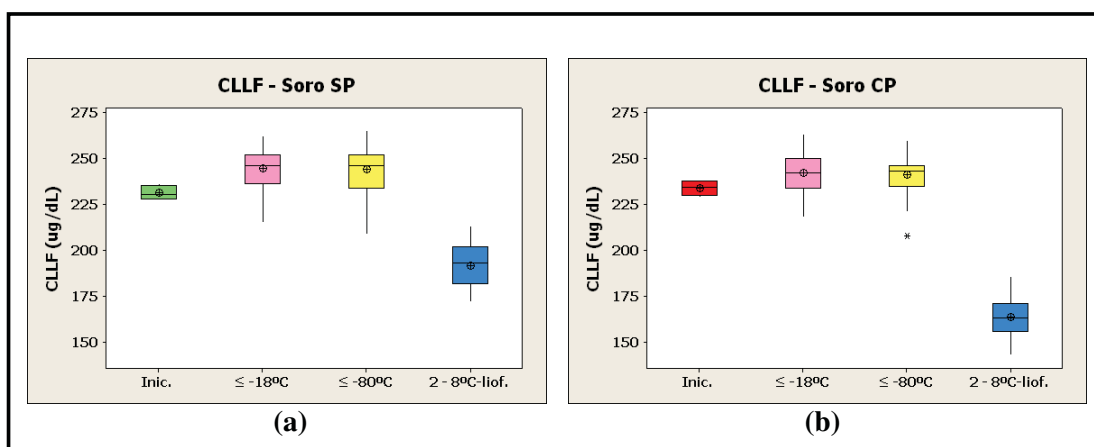


Figura 33 – Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de CLLF em amostras de soro conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$; $\leq -80^{\circ}\text{C}$ e entre 2 - 8°C - liofilizados.

- Soro SP inicial (T_i)
- Soro CP inicial (T_i)
- Temperatura $\leq -18^{\circ}\text{C}$ (T_{13})
- Temperatura $\leq -80^{\circ}\text{C}$ (T_{13})
- 2 - 8°C - liofilizados (T_{13})
- ⊕ Média
- * Outlier

Os soros conservados a 2 - 8°C – liofilizados e o soro CP a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ tiveram suas médias iguais às medianas, isto em decorrência da distribuição de valores das concentrações nos dois lados da média. Em todas as amostras conservadas, as médias foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) em relação às médias iniciais correspondentes (figura 33 e tabela 5). Entretanto quando comparamos as médias entre os processos de conservação a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ e $\leq -80^{\circ}\text{C}$ e entre os soros SP e CP observamos que não há diferença significativa ($p \geq 0,05$) entre as amostras (tabela 7).

Ainda observamos que, a diferença nas concentrações médias dos soros submetidos aos processos de conservação a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ e $\leq -80^{\circ}\text{C}$ foram atribuídas apenas ao processo de

conservação. Entretanto para os soros que passaram pelo processo de liofilização houve uma redução das médias acentuando-se mais ainda com a adição do preservante (figura 33).

Os valores de CV para a CLLF nos seis tipos de amostras de soro ficaram entre 2,63 e 7,12% (tabela 8). Não existe especificação da qualidade baseados na variação biológica ou da CLIA'88. Na rotina laboratorial deve-se acompanhar o CV das amostras-controle do CIQ com a AEQ, controlando assim a imprecisão e inexatidão do teste.

As figuras 34 (a, b, c) e 35 (a, b, c) mostram o gráfico de Levey-Jennings para a CLLF e a ocorrência mais importante para cada processo de conservação, durante os 300 dias de monitoramento.

Figura 34 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para a CLLF no soro SP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).

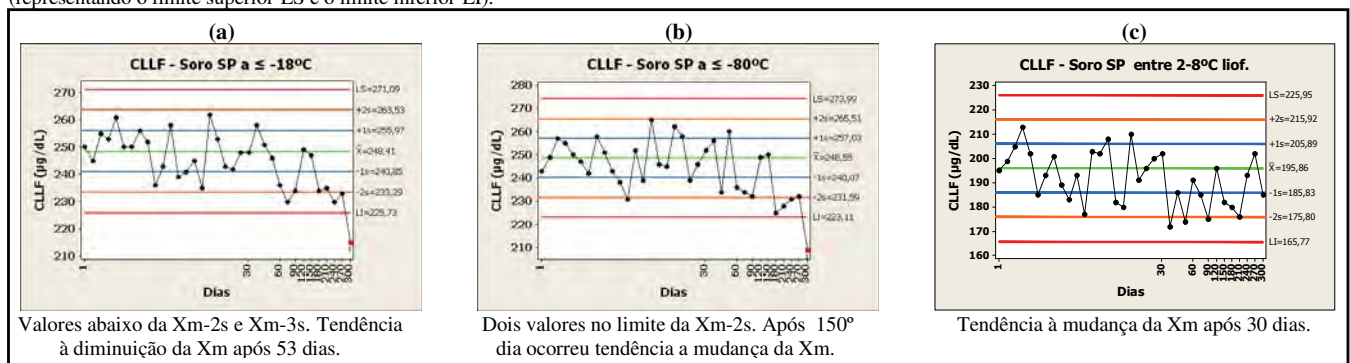
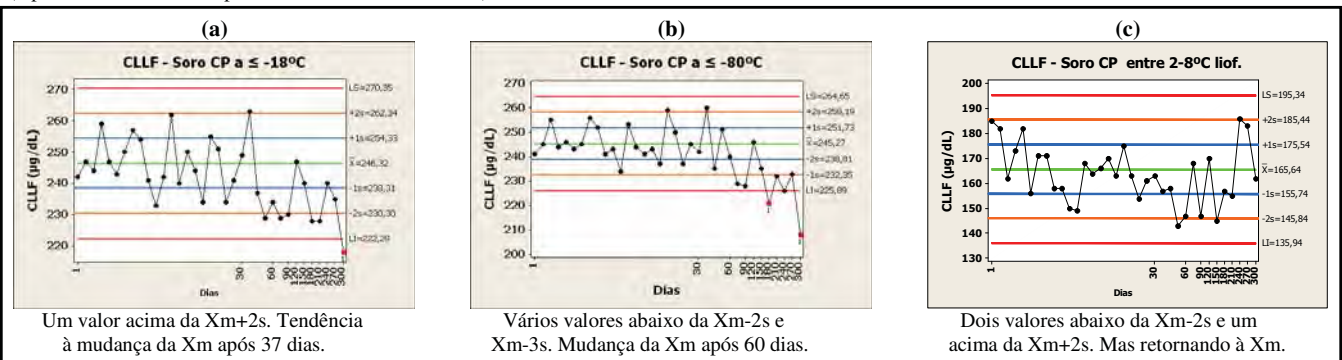


Figura 35 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para a CLLF no soro CP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).



4.11 Colesterol

A figura 36 (a, b) apresenta as médias, medianas e variação dos níveis do colesterol nos soros SP e CP nos diferentes processos de conservação; ocorreu uma diminuição na concentração média do colesterol dos soros após o processo de conservação a 2 - 8°C – liofilizados. Nos soros submetidos à conservação de $\leq -18^{\circ}\text{C}$ e para o soro SP a $\leq -80^{\circ}\text{C}$ ocorreu maior variação dos dados evidenciados pelo desvio padrão e CV, quando comparados aos outros processos de conservação (tabelas 3 e 4, anexo e tabela 8).

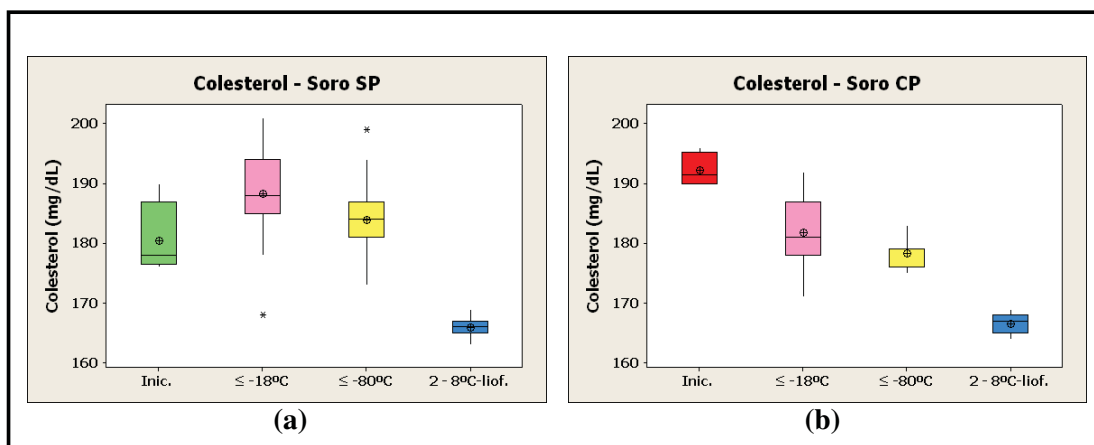


Figura 36 – Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de colesterol em amostras de soro conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$; $\leq -80^{\circ}\text{C}$ e entre 2 - 8°C - liofilizados.

- Soro SP inicial (T_i)
- Soro CP inicial (T_i)
- Temperatura $\leq -18^{\circ}\text{C}$ (T_{13})
- Temperatura $\leq -80^{\circ}\text{C}$ (T_{13})
- 2 - 8°C - liofilizados (T_{13})
- ⊕ Média
- * Outlier

Na figura 36 (a) observamos a presença de pontos "outliers" nos soros SP conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ e $\leq -80^{\circ}\text{C}$. Os soros SP e CP conservados a 2 - 8°C – liofilizados tiveram semelhanças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$), todavia os demais soros apresentaram diferenças estatisticamente significativas nas médias e entre os processos de conservação (tabela 7). Os menores CV encontrados foram nos soros conservados a 2 - 8°C – liofilizados, sendo que o soro SP foi que apresentou melhor desempenho (tabela 8).

Os CV para o colesterol demonstrado na tabela 8 podem ser enquadrados em dois níveis de especificação da qualidade baseados na variação biológica, ou seja: (i) soros SP conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ e $\leq -80^{\circ}\text{C}$ e soro CP a $\leq -18^{\circ}\text{C}$, especificação mínima (4,5%); (ii) soros conservados entre 2 - 8°C – liofilizados e soro CP a $\leq -80^{\circ}\text{C}$, especificação ótima, com CV menor que 1,5%.

A adição de preservante já na amostra inicial (T_i) alterou a concentração média do colesterol, sendo que houve diferença significativa entre os soros SP e CP iniciais com $p < 0,05$ (tabela 5). Os processos de conservação a $\leq -18^\circ\text{C}$ e $\leq -80^\circ\text{C}$ não afetaram as médias do colesterol no decorrer do tempo em relação às médias iniciais no soro SP, no entanto o processo de liofilização provocou uma diminuição significativa na concentração do colesterol tanto no soro SP como CP. Observamos também que o preservante e os processos de conservação a $\leq -18^\circ\text{C}$ e $\leq -80^\circ\text{C}$ alteram os níveis de colesterol, mas quando associado a adição do preservante com o processo de liofilização não ocorreu diferenças significativas (tabela 7).

As figuras 37 (a, b, c) e 38 (a, b, c) mostram o gráfico de Levey-Jennings para o colesterol e a ocorrência mais importante para cada processo de conservação, durante os 300 dias de monitoramento.

Figura 37 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para o colesterol no soro SP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).

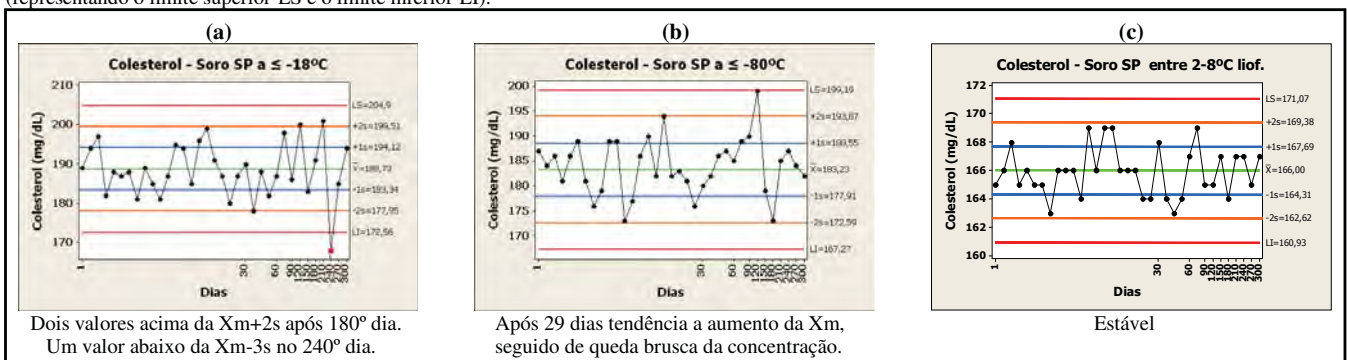
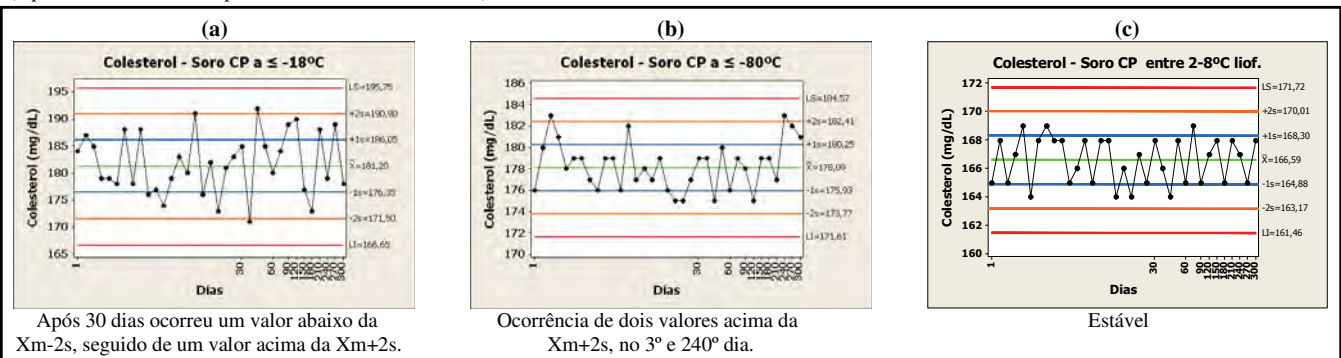


Figura 38 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s o colesterol no soro CP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).



4.12 Creatinina

Na figura 39 (a, b) observamos para a creatinina a presença de vários pontos "outliers" nos soros conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ e $\leq -80^{\circ}\text{C}$ após 180 dias de monitoramento, o que é melhor observado nas figuras 40 (a, b, c) e 41 (a, b).

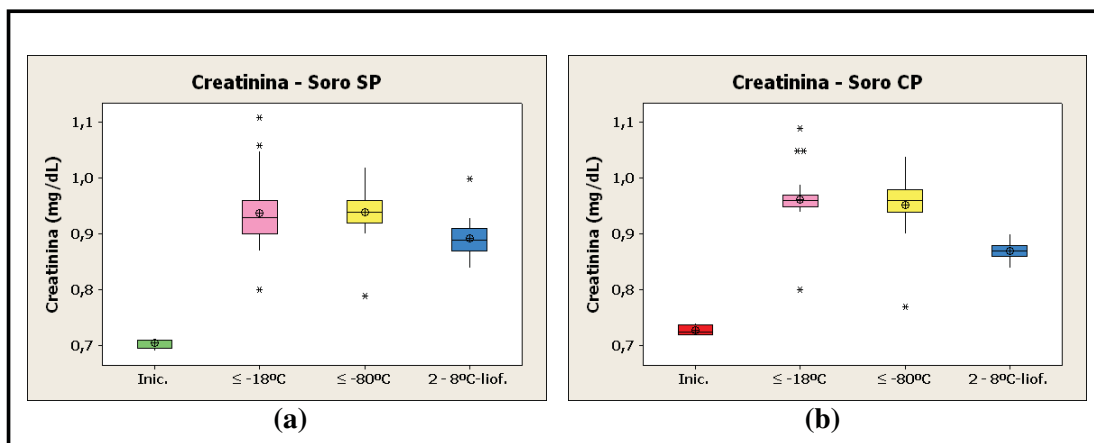


Figura 39 – Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de creatinina em amostras de soro conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$; $\leq -80^{\circ}\text{C}$ e entre 2 - 8°C - liofilizados.

- Soro SP inicial (T_i)
- Soro CP inicial (T_i)
- Temperatura $\leq -18^{\circ}\text{C}$ (T_{13})
- Temperatura $\leq -80^{\circ}\text{C}$ (T_{13})
- 2 - 8°C - liofilizados (T_{13})

- ⊕ Média
- * Outlier

Em todas as amostras testadas houve um aumento do desvio padrão após 30 dias de monitoramento, conforme observado nas tabelas 3 e 4 (anexo). Nos soros conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ obtivemos o maior CV em relação aos demais processos de conservação (tabela 8). Nos soros conservados a 2 - 8°C – liofilizados observamos o melhor desempenho e distribuição normal das concentrações com igualdade entre a média e mediana, embora o soro SP conservados a 2 - 8°C – liofilizado apresentou um ponto "outlier" e vários valores no limite da $X_m \pm 2s$, conforme apresentado na figura 40(c).

Os CV após 300 dias de monitoramento para os níveis de creatinina ficaram acima da especificação desejável (2,2%), no entanto se encontram abaixo da especificação mínima de 4,3%, com exceção do soro SP conservado a $\leq -18^{\circ}\text{C}$, onde após o 180 dias ocorreu aumento do CV, não atendendo nem a especificação mínima da qualidade (tabela 8).

A adição do preservativo associado com os processos de conservação interferiu nas concentrações de creatinina, pois apresentaram diferenças estatísticas com $p < 0,05$ nos soros iniciais e quando comparadas com os processos de conservação (tabela 5 e figura 39). Entre os processos de conservação, os soros SP e CP apresentaram semelhança estatisticamente significativa ($p \geq 0,05$), exceto para os soros conservados a 2 - 8°C – liofilizados (tabela 7 e

figura 39), onde observamos que a associação da adição do preservante com o processo de liofilização interferiu com a concentração de creatinina.

As figuras 40 (a, b, c) e 41 (a, b, c) mostram o gráfico de Levey-Jennings para a creatinina e a ocorrência mais importante para cada processo de conservação, durante os 300 dias de monitoramento.

Figura 40 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para a creatinina no soro SP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).

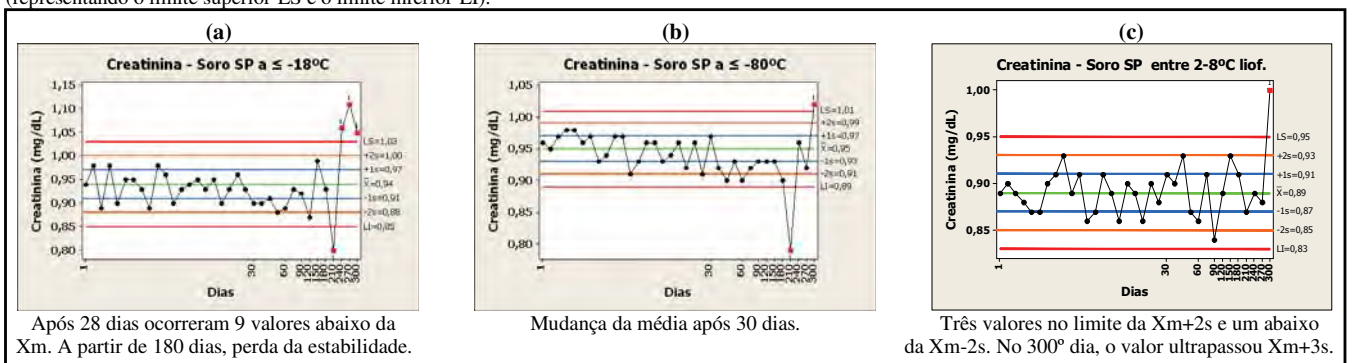
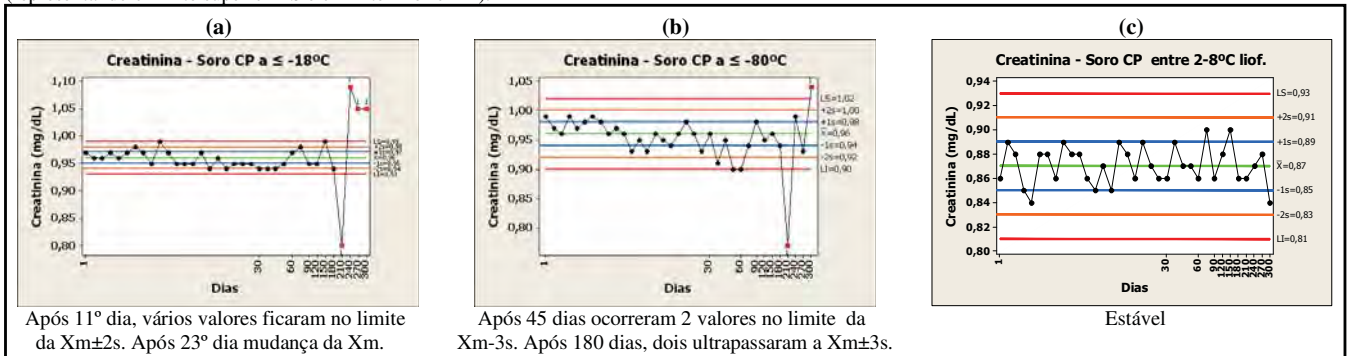


Figura 41 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para a creatinina no soro CP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).



4.13 Ferro

Na tabela 3 observamos que os níveis de ferro no soro SP conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ foi o que sofreu maior variação, sendo mais acentuada nos 30 primeiros dias de monitoramento (T_0) contudo com o decorrer do tempo, houve diminuição do desvio padrão de T_{13} (após 300 dias de monitoramento) em relação a T_0 . Alguns pontos "outliers" são observados na figura 42 (a, b) ocorridos em maior frequência no soro SP conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$.

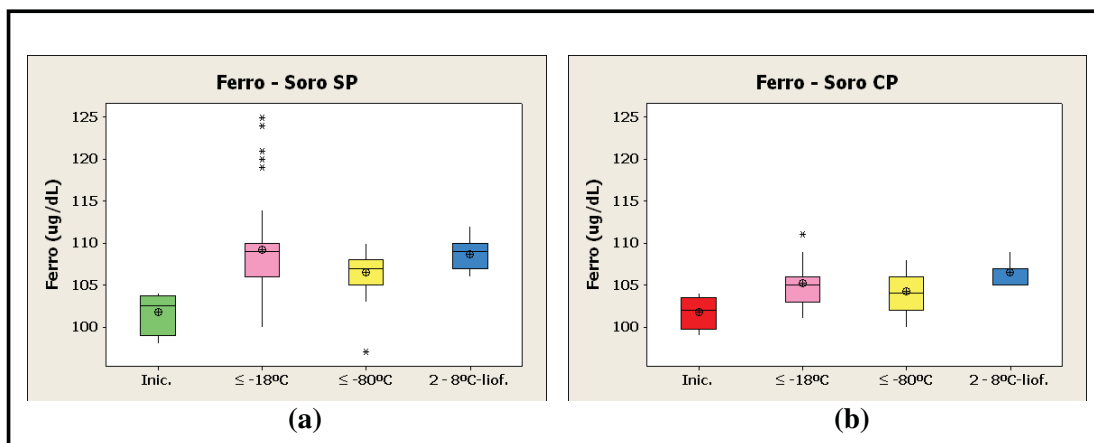


Figura 42 – Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de ferro em amostras de soro conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$; $\leq -80^{\circ}\text{C}$ e entre 2 - 8°C - liofilizados.

- Soro SP inicial (T_i)
- Soro CP inicial (T_i)
- Temperatura $\leq -18^{\circ}\text{C}$ (T_{13})
- Temperatura $\leq -80^{\circ}\text{C}$ (T_{13})
- 2 - 8°C - liofilizados (T_{13})
- ⊕ Média
- * Outlier

O menor CV observado para o ferro foi no soro CP conservados a 2 - 8°C – liofilizado (tabela 8), entretanto a mediana e média não foram iguais e a maioria dos valores ficaram abaixo da mediana - quartil superior igual à mediana (figura 42b). Os CV após 300 dias de monitoramento mantiveram abaixo da especificação ótima da qualidade de 6,6%. Entretanto o soro SP conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ foi que apresentou o pior desempenho (tabela 8).

Os estados de conservação alteram as concentrações de ferro nas amostras, mas quando associado com a adição do preservante, nos processos de conservação a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ e $\leq -80^{\circ}\text{C}$ mantém a média inicial (tabela 5 e figura 42). Entretanto para o soro CP conservados entre 2 - 8°C – liofilizado ocorreu uma diminuição da média com a adição do preservante quando comparado com o soro SP na mesma condição de conservação (tabela 3 e 4, anexo e figura 42).

As figuras 43 (a, b, c) e 44 (a, b, c) mostram o gráfico de Levey-Jennings para o ferro e a ocorrência mais importante para cada processo de conservação, durante os 300 dias de monitoramento.

Figura 43 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para o ferro no soro SP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).

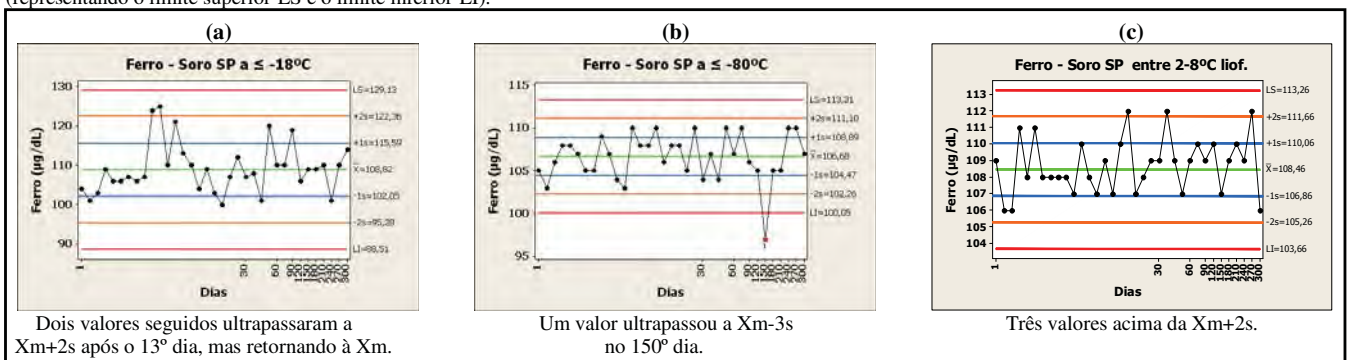
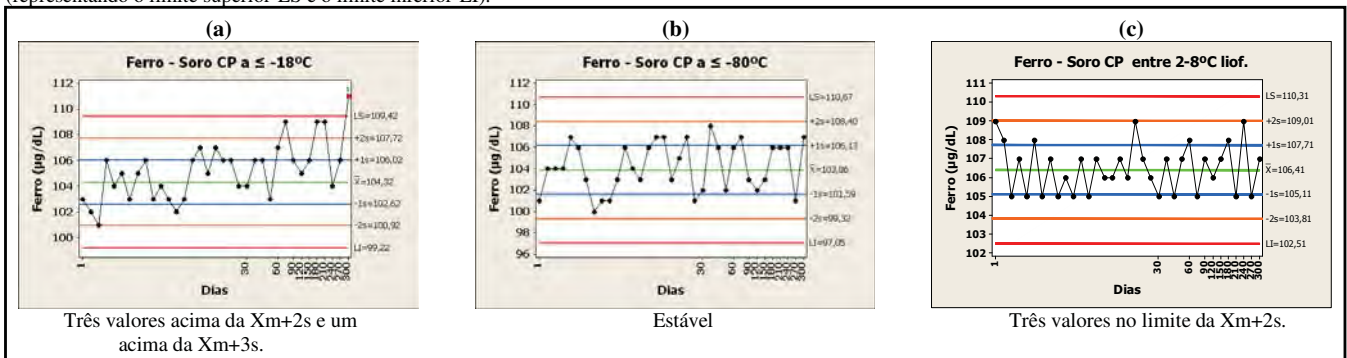


Figura 44 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para o ferro no soro CP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).



4.14 Fósforo

A figura 45 (a, b), mostra para os níveis de fósforo nos soros SP e CP um aumento mais acentuado das médias após sofrerem o processo de liofilização, quando comparadas aos outros processos de conservação.

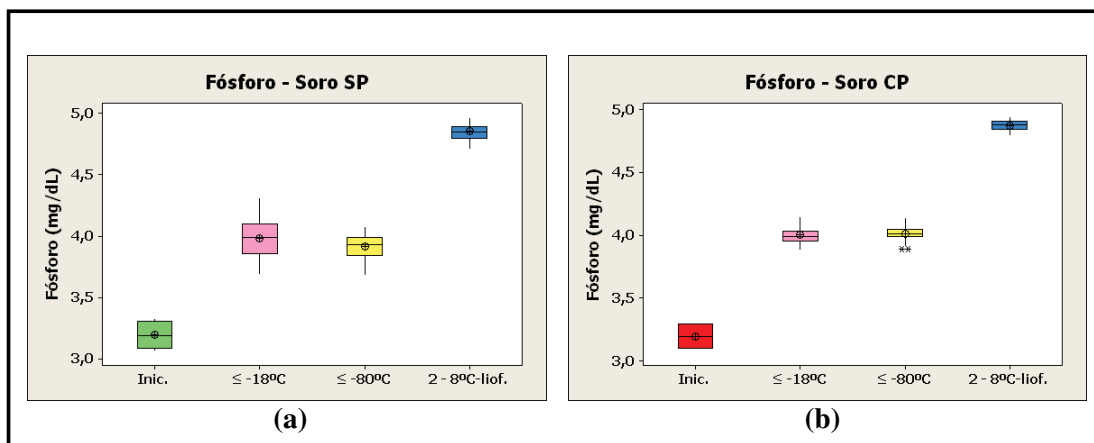


Figura 45 – Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de fósforo em amostras de soro conservados a $\leq -80^{\circ}\text{C}$; $\leq -18^{\circ}\text{C}$ e entre $2 - 8^{\circ}\text{C}$ - liofilizados.

- Soro SP inicial (T_i)
- Soro CP inicial (T_i)
- Temperatura $\leq -18^{\circ}\text{C}$ (T_{13})
- Temperatura $\leq -80^{\circ}\text{C}$ (T_{13})
- $2 - 8^{\circ}\text{C}$ - liofilizados (T_{13})
- ⊕ Média
- * Outlier

Na tabela 7 observamos que os soros SP e CP conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ não tiveram diferenças significativas entre as médias ($p \geq 0,05$), o mesmo ocorrendo para os soros CP conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ e $\leq -80^{\circ}\text{C}$ e para os soros SP e CP conservados a $2 - 8^{\circ}\text{C}$ – liofilizado após os 300 dias de monitoramento. Na figura 45(b) se observa a presença de dois pontos "outliers" no soro CP conservados a $\leq -80^{\circ}\text{C}$ evidenciados na figura 47b no limite da $X_m - 2s$. Como a média e mediana são iguais houve uma distribuição uniforme ao redor da média concentrando a maioria dos pontos no limite da $X_m \pm 1s$.

Os CV para o fósforo após os 300 dias de monitoramento mantiveram abaixo da especificação ótima da qualidade (2,1%), exceto para os soros SP conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ e $\leq -80^{\circ}\text{C}$ que ficaram dentro da especificação desejável de 4,3%. O melhor desempenho observado foi no soro CP conservado a $2 - 8^{\circ}\text{C}$ – liofilizado, onde o CV após 300 dias foi 0,83% menor que o T_0 (tabela 8).

Ainda observamos na figura 45 que no soro SP conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$, uma tendência a aumento da concentração após 120 dias de monitoramento com aumento do desvio padrão em relação ao T_0 (tabela 3, anexo e figura 46a).

Podemos atribuir o aumento das concentrações médias do fósforo em relação às médias iniciais após os 300 dias de monitoramento aos processos de conservação, sendo mais acentuada nos soros que foram submetidos à liofilização (tabela 5 e figura 45). A adição do preservante melhorou a estabilidade do fósforo no decorrer do tempo.

As figuras 46 (a, b, c) e 47 (a, b, c) mostram o gráfico de Levey-Jennings para o fósforo e a ocorrência mais importante para cada processo de conservação, durante os 300 dias de monitoramento.

Figura 46 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para o fósforo no soro SP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).

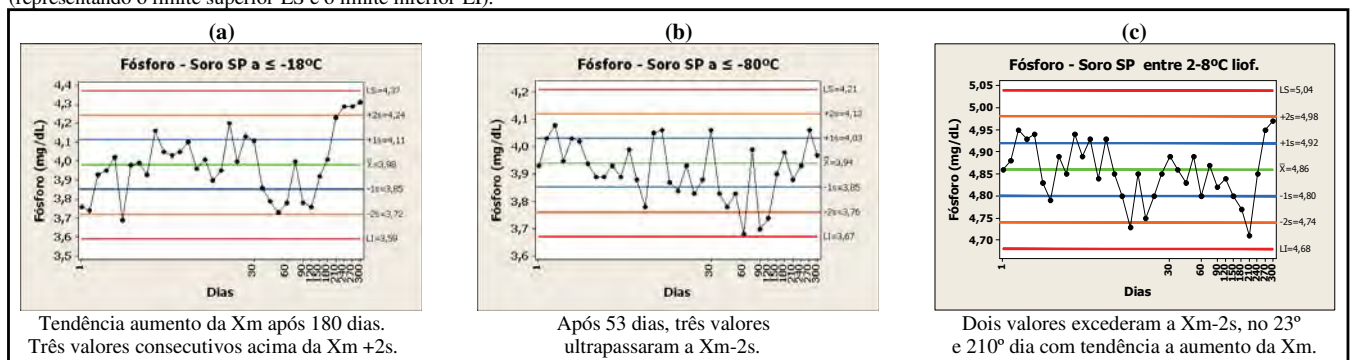
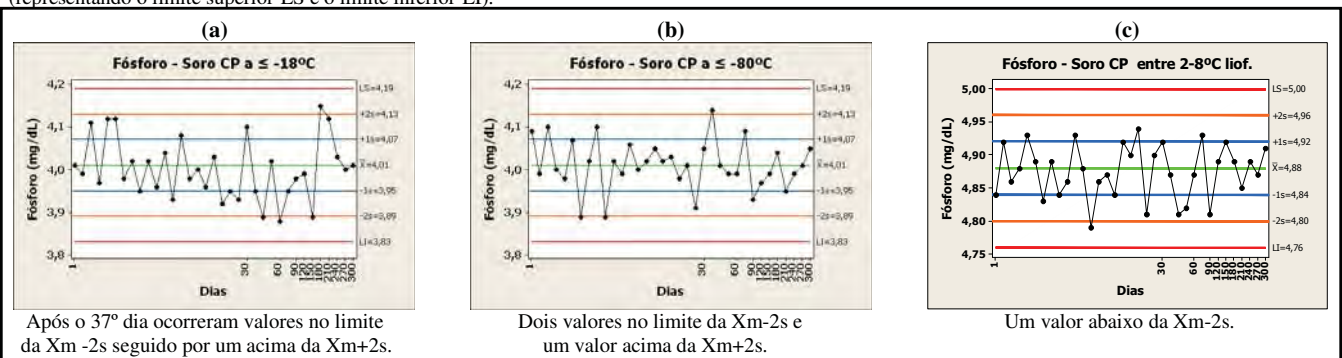


Figura 47 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para o fósforo no soro CP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).



4.15 Gama-Glutamil Transferase (GGT)

Na figura 48, observamos que ocorreu diminuição nas concentrações médias de GGT nos soros conservados a 2 - 8°C – liofilizados em relação aos demais processos de conservação.

Houve um aumento no nível de GGT com a adição do preservante, pois as médias iniciais (T_0) apresentaram diferenças estatísticas com $p < 0,05$. Após serem submetidas aos processos de conservação as médias dos soros SP conservados a $\leq -18^\circ\text{C}$ e $\leq -80^\circ\text{C}$, e o soro CP conservado a $\leq -80^\circ\text{C}$ não apresentaram diferenças significativas ($p \geq 0,05$) quando comparadas com as médias iniciais correspondentes (tabela 5 e figura 48).

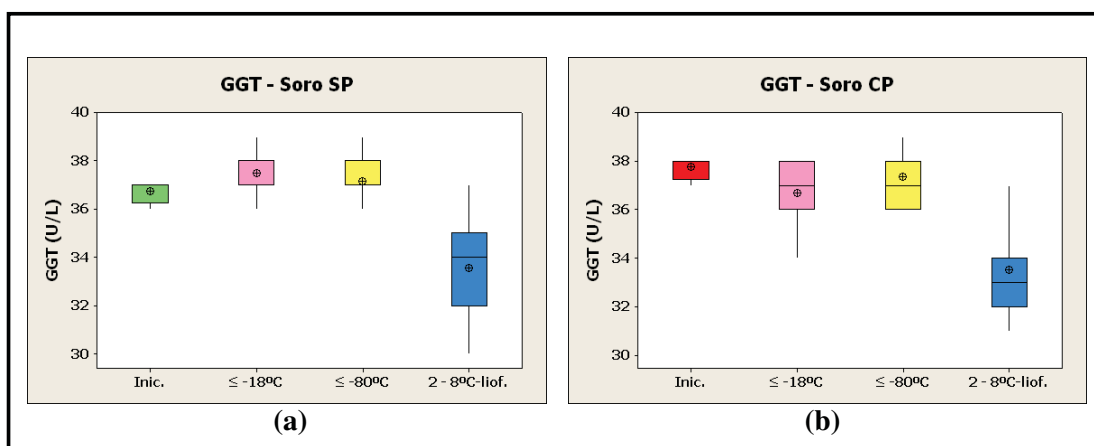


Figura 48 – Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de GGT em amostras de soro conservados a $\leq -18^\circ\text{C}$; $\leq -80^\circ\text{C}$ e entre 2 - 8°C - liofilizados.

- Soro SP inicial (T_i)
 - Soro CP inicial (T_i)
 - Temperatura $\leq -18^\circ\text{C}$ (T_{13})
 - Temperatura $\leq -80^\circ\text{C}$ (T_{13})
 - 2 - 8°C - liofilizados (T_{13})
- ⊕ Média

Ocorreu uma maior variação nas concentrações de GGT nos soros submetidos ao processo de liofilização e conservados entre 2 – 8°C, observados na tabela 8 onde mostra os CV encontrados. Entretanto os desvios padrão diminuíram após 30 dias (T_0 – tabela 3 e 4, anexo), entretanto observamos após 300 dias de monitoramento, que o processo de liofilização diminuiu consideravelmente a concentração do GGT. Entretanto a adição de preservante não alterou o comportamento para este processo de conservação, pois não houve diferença significativa entre os soros SP e CP conservados a 2 – 8°C - liofilizados (tabela 7 e figura 48), o mesmo ocorrendo para o processo de conservação a $\leq -80^\circ\text{C}$. Entretanto a adição do preservante com a conservação a $\leq -18^\circ\text{C}$ ocorre mudança significativa da média entre os soros SP e CP, com $p < 0,05$.

Os CV para os soros liofilizados atenderam as especificações desejáveis da qualidade de 6,9%, enquanto nos outros processos de conservação ficaram abaixo da especificação ótima da qualidade de 3,5%.

As figuras 49 (a, b, c) e 50 (a, b, c) mostram o gráfico de Levey-Jennings para o GGT e a ocorrência mais importante para cada processo de conservação, durante os 300 dias de monitoramento.

Figura 49 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para o GGT no soro SP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).

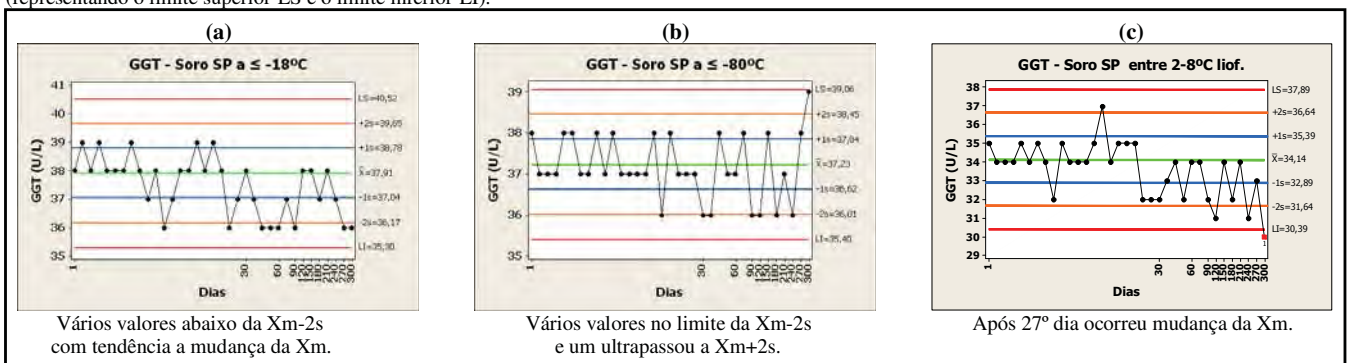
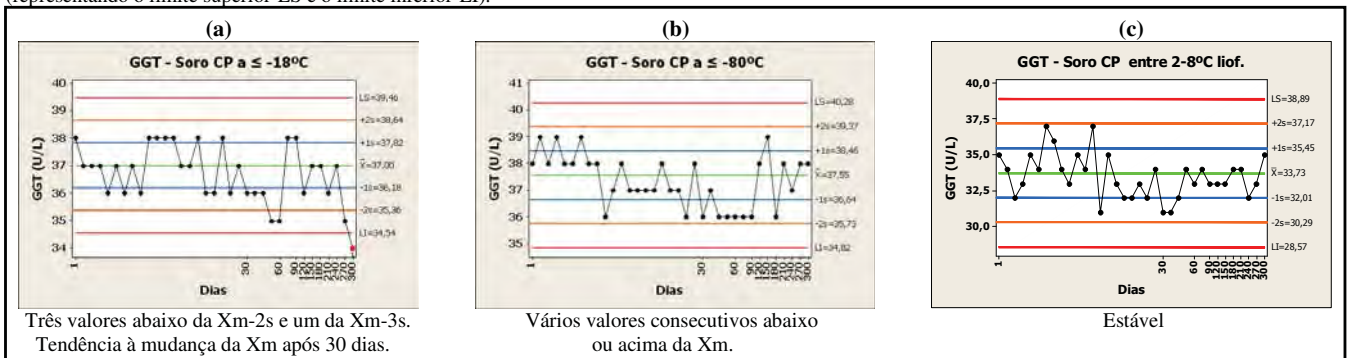


Figura 50 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para o GGT no soro CP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).



4.16 Glicose

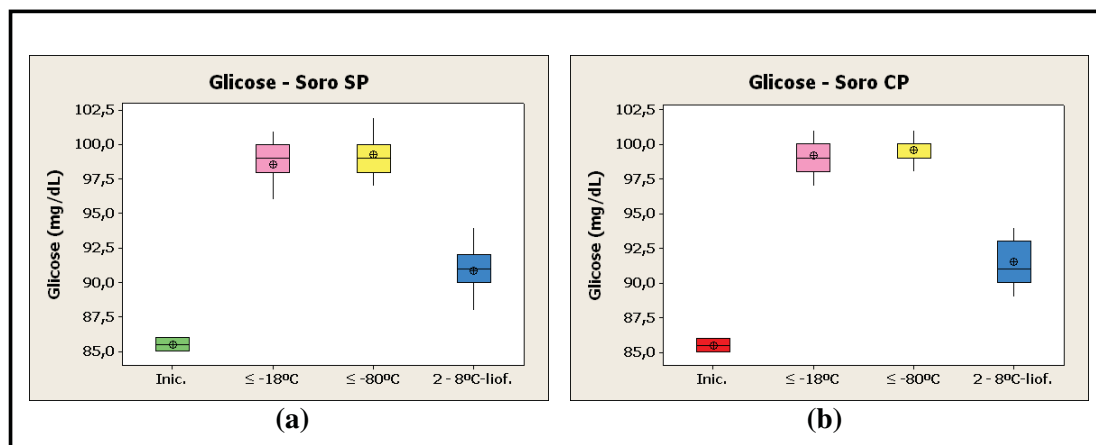


Figura 51 – Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de glicose em amostras de soro conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$; $\leq -80^{\circ}\text{C}$ e entre $2 - 8^{\circ}\text{C}$ - liofilizados.

- Soro SP inicial (T_i)
 - Soro CP inicial (T_i)
 - Temperatura $\leq -18^{\circ}\text{C}$ (T_{13})
 - Temperatura $\leq -80^{\circ}\text{C}$ (T_{13})
 - $2 - 8^{\circ}\text{C}$ - liofilizados (T_{13})
- ⊕ Média

Observamos na figura 51 (a, b), o efeito do processo de liofilização sobre a concentração de glicose, onde as médias diminuíram em relação aos processos de conservação a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ e $\leq -80^{\circ}\text{C}$.

Comparando as médias iniciais entre os soros SP e CP observamos que não houve diferença significativa com $p \geq 0,05$ (tabela 5). Entretanto ocorreu aumento da concentração de glicose em relação às médias iniciais após os processos de conservação e se manteve ao longo do tempo. Nos soros SP e no soro CP conservados a $2 - 8^{\circ}\text{C}$ - liofilizado ocorreu um aumento do desvio padrão após 300 dias de monitoramento (T_{13}) quando comparados aos 30 primeiros dias (T_0), entretanto este aumento não foi estatisticamente significativo com $p \geq 0,05$ (tabela 6).

Analisando a tabela 8, podemos observar que o CV para a glicose se manteve abaixo da especificação ótima da qualidade (1,43%) nos soros conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ e no soro CP a $\leq -80^{\circ}\text{C}$. Para os soros conservados a $2 - 8^{\circ}\text{C}$ - liofilizados e o soro SP a $\leq -80^{\circ}\text{C}$, o CV encontrado permaneceu abaixo da especificação desejável de 2,85% nos 300 dias de monitoramento.

Os processos de conservação alteram os níveis de glicose em relação às médias iniciais e a adição do preservante melhorou a distribuição das concentrações ao redor da

média e a estabilidade no decorrer do tempo nos soros conservados a $\leq -80^{\circ}\text{C}$ e entre $2 - 8^{\circ}\text{C}$ - liofilizados (Figuras 52 e 53).

As figuras 52 (a, b, c) e 53 (a, b, c) mostram o gráfico de Levey-Jennings para a glicose e a ocorrência mais importante para cada processo de conservação, durante os 300 dias de monitoramento.

Figura 52 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para a glicose no soro SP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).

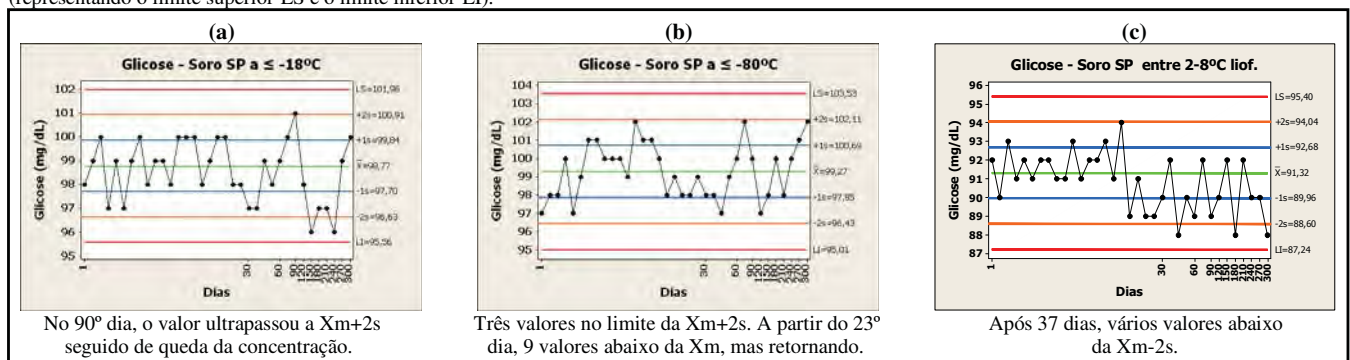
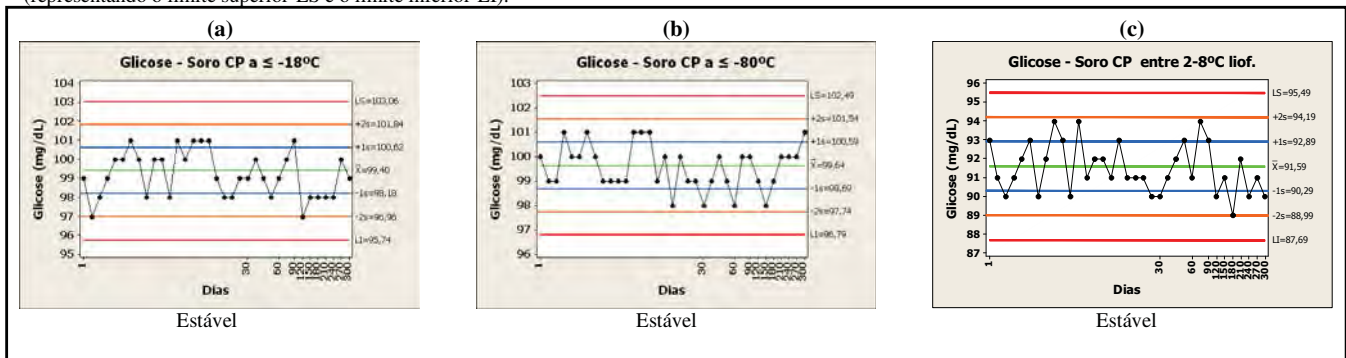


Figura 53 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para a glicose no soro CP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).



4.17 Colesterol-HDL (Col.-HDL)

A figura 54 (a, b) mostra as médias, medianas e variação dos níveis do col.-HDL nos soros SP e CP após os processos de conservação. As médias iniciais (T_i) entre os soros SP e CP não apresentaram diferenças significativas ($p \geq 0,05$), entretanto somente o soro CP conservado entre 2 – 8°C - liofilizados manteve a média quando comparada com a média inicial do soro correspondente (tabela 5 e figura 54b).

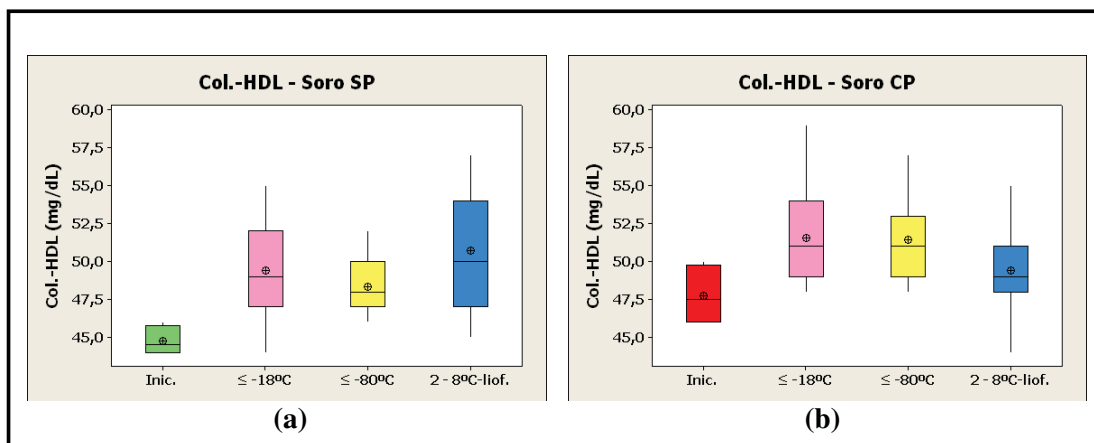


Figura 54 – Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de col.-HDL em amostras de soro conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$; $\leq -80^{\circ}\text{C}$ e entre 2 – 8°C - liofilizados.

- Soro SP inicial (T_i)
 - Soro CP inicial (T_i)
 - Temperatura $\leq -18^{\circ}\text{C}$ (T_{13})
 - Temperatura $\leq -80^{\circ}\text{C}$ (T_{13})
 - 2 – 8°C - liofilizados (T_{13})
- ⊕ Média

O menor desvio padrão foi observado no soro SP conservado a $\leq -80^{\circ}\text{C}$ enquanto que no soro SP conservado a 2 – 8°C - liofilizado foi encontrado o maior desvio padrão (tabela 3, anexo). Observando a tabela 8, o único soro que manteve o CV abaixo da especificação desejável da qualidade (3,6%) foi o soro SP conservado a $\leq -80^{\circ}\text{C}$; os demais, com exceção do soro SP conservado a 2 – 8°C - liofilizado, ficou abaixo da especificação mínima da qualidade de 7,1%.

O soro CP conservado entre 2 – 8°C - liofilizado foi o único que manteve a média inicial (tabela 5) e, quando comparamos os soros SP conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ e $\leq -80^{\circ}\text{C}$ não houve diferenças estatísticas entre as médias ($p \geq 0,05$), o mesmo acontecendo para o soro CP; entretanto quando comparamos o mesmo processo de conservação os soros SP e CP ocorrem diferenças significativas (tabela 7). Portanto, a adição de preservante associado ao processo de liofilização melhorou o desempenho do col.-HDL no decorrer de 300 dias de monitoramento.

As figuras 55 (a, b, c) e 56 (a, b, c) mostram o gráfico de Levey-Jennings para o col.-HDL e a ocorrências mais importante para cada processo de conservação, durante os 300 dias de monitoramento.

Figura 55 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para o col.-HDL no soro SP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).

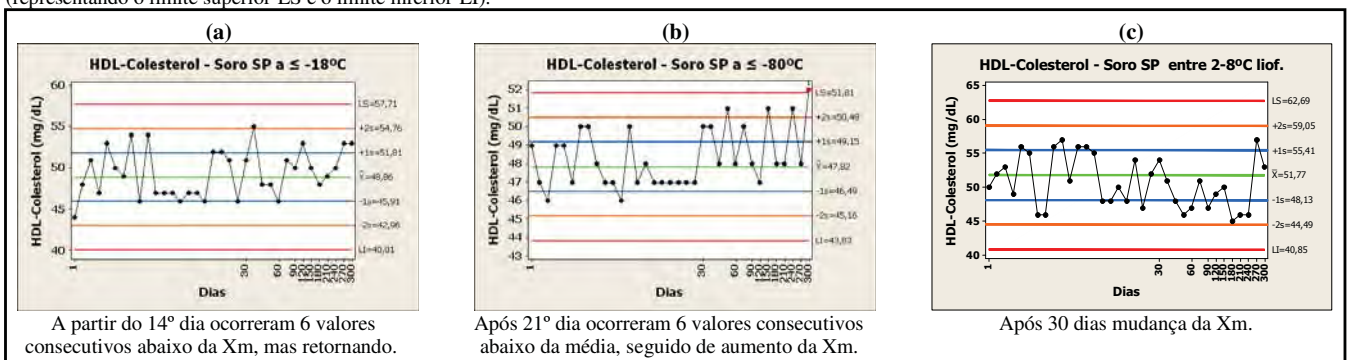
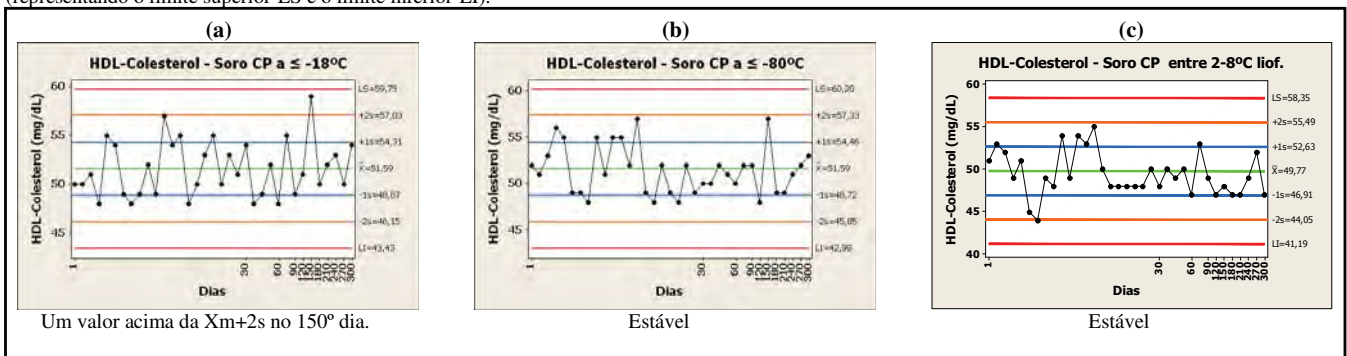


Figura 56 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para o col.-HDL no soro CP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).



4.18 Desidrogenase láctica (LD)

A figura 57 (a, b), mostra a variação dos níveis da LD nas amostras-controle dos soros SP e CP e observamos uma diminuição dos seus níveis nos soros que passaram pelo processo de liofilização. As hastes inferiores nos soros SP e CP conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ são maiores que nos outros processos de conservação significando que há pontos com valores muito distantes da média, ocorrendo uma tendência a diminuição da média, após o 15º dia (figura 58a e 59a). Os soros conservados a $\leq -80^{\circ}\text{C}$ e o soro CP conservado a 2 – 8°C - liofilizado tiveram as médias iguais às medianas significando uma distribuição normal ao redor da média. Observa-se a presença de dois pontos “outliers” no soro SP conservado a 2 – 8°C - liofilizado e no soro CP a $\leq -80^{\circ}\text{C}$.

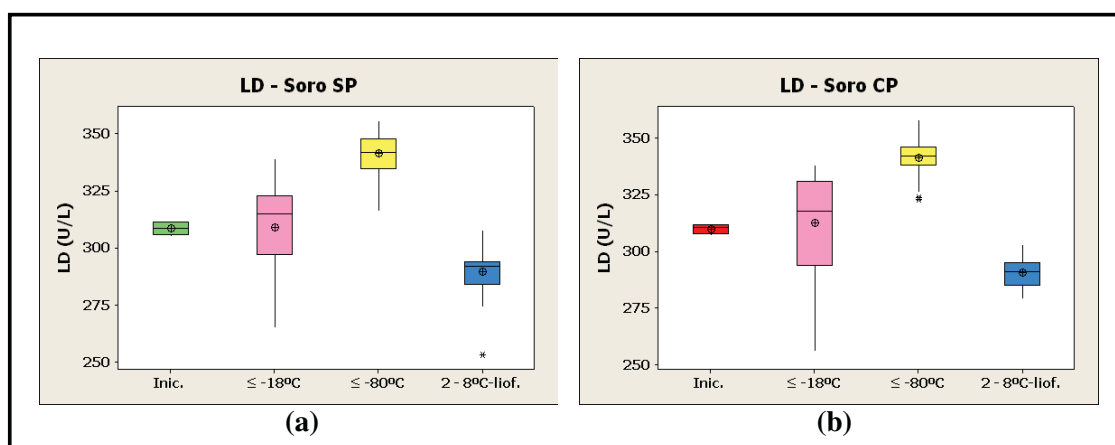


Figura 57 – Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de LD em amostras de soro conservados a $\leq -80^{\circ}\text{C}$; $\leq -18^{\circ}\text{C}$ e entre 2 - 8°C - liofilizados.

- Soro SP inicial (T_i)
- Soro CP inicial (T_i)
- Temperatura $\leq -18^{\circ}\text{C}$ (T_{13})
- Temperatura $\leq -80^{\circ}\text{C}$ (T_{13})
- 2 - 8°C - liofilizados (T_{13})
- ⊕ Média
- * Outlier

As médias iniciais entre os soros SP e CP não apresentaram diferenças significativas ($p \geq 0,05$), o mesmo ocorrendo quando comparamos os soros conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ após 30 dias monitoramento com as médias iniciais correspondentes; entretanto nos processos de conservação a $\leq -80^{\circ}\text{C}$ e 2 – 8°C – liofilizado, observamos em T_0 , diferenças estatísticas significativas quando comparadas com seus T_i correspondentes (tabela 5). Em todos os soros ocorreu aumento do CV após 30 dias de monitoramento, ou seja, os CV no T_{13} se apresentaram maiores que T_0 correspondentes, significando que houve uma maior variação dos dados no decorrer do tempo, com exceção do soro CP conservados a 2 – 8°C – liofilizado, onde ocorreu uma diminuição do CV mantendo a estabilidade. Todos os processos de

conservação mantiveram seus CV abaixo da especificação desejável da qualidade de 4,3%, exceto quando conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ (tabela 8).

Após a adição do preservante não houve aumento dos níveis de LD nas amostras, mas nos soros conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ ocorreu perda da estabilidade após 15 dias de monitoramento (figuras 58a e 59a). Não ocorreram diferenças estatísticas significativas nas médias entre os soros SP e CP nos processos de conservação a $\leq -18^{\circ}\text{C}$, $\leq -80^{\circ}\text{C}$ e entre 2 – 8°C – liofilizado (tabela 7 e figura 57), significando que os processos de conservação interferem com as concentrações de LD no soro, mas a adição do preservante melhora a estabilidade no decorrer do tempo.

As figuras 58 (a, b, c) e 59 (a, b, c) mostram o gráfico de Levey-Jennings para a LD e a ocorrência mais importante para cada processo de conservação, durante os 300 dias de monitoramento.

Figura 58 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para a LD no soro SP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).

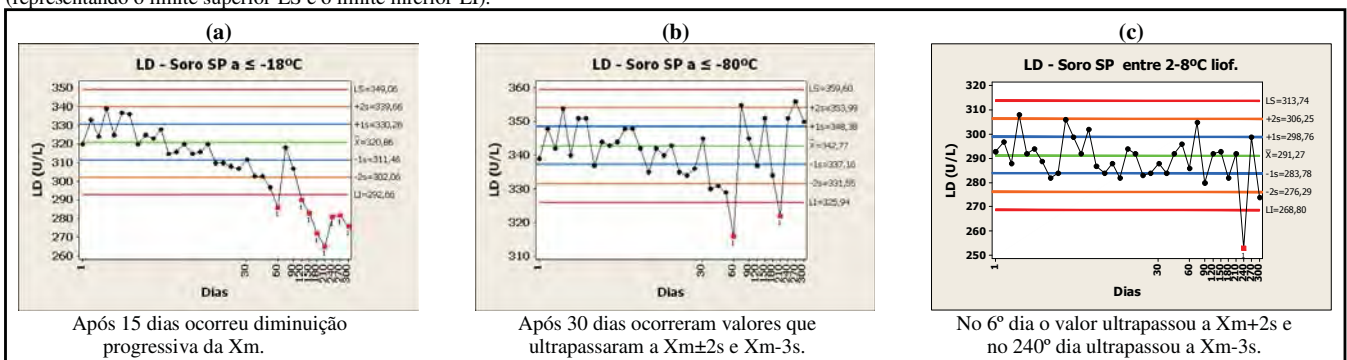
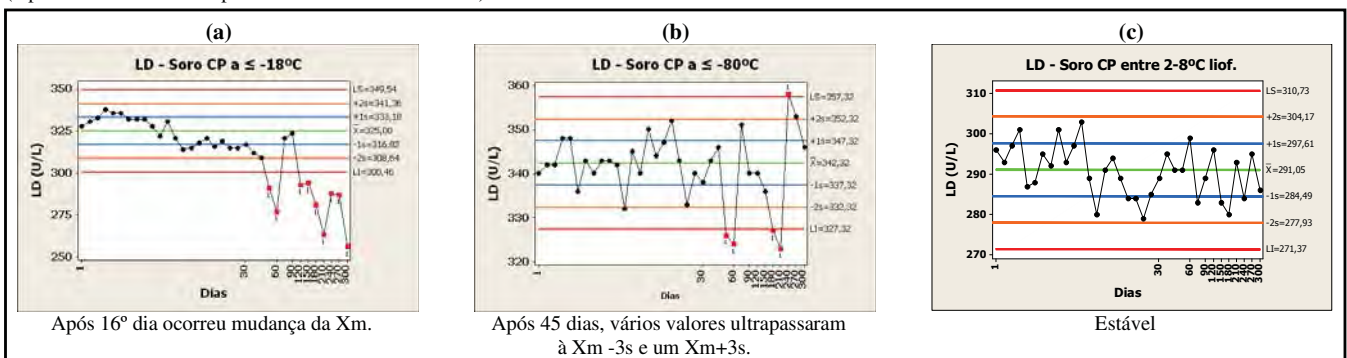


Figura 59 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para a LD no soro CP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).



4.19 Potássio (K^+)

Observando a figura 60 (a, b), os níveis médios de K^+ diminuíram após os soros serem submetidos ao processo de liofilização, sendo esta diminuição mais acentuada no soro SP. As médias iniciais se mantiveram após a adição do preservante, entretanto somente o soro CP conservado a $\leq -18^\circ\text{C}$ manteve a média no decorrer do tempo (tabela 5). Após os processos de conservação, as médias entre os soros SP e CP entre os processos de conservação a $\leq -18^\circ\text{C}$ e $\leq -80^\circ\text{C}$ não mostraram diferenças significativas com $p \geq 0,05$; o mesmo não ocorrendo para os soros SP e CP conservados a $2 - 8^\circ\text{C}$ - liofilizados (tabela 7).

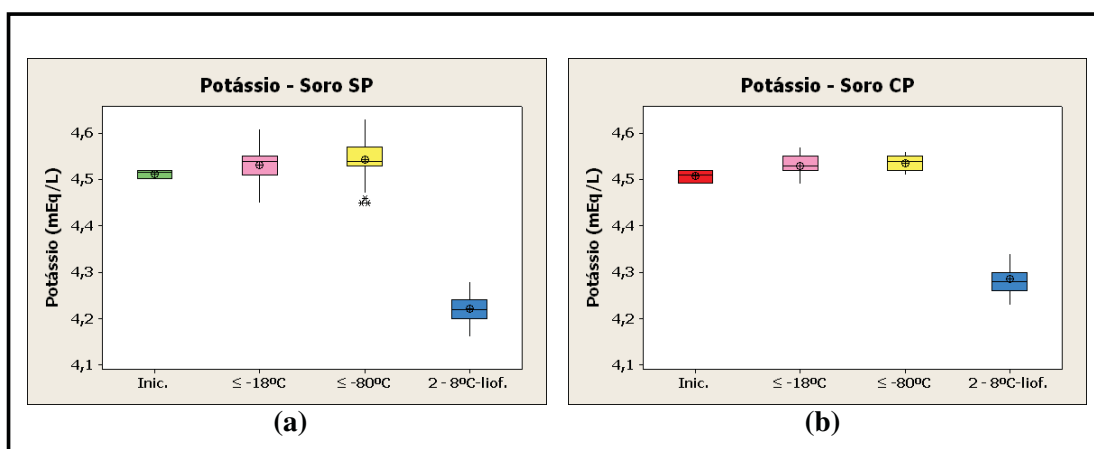


Figura 60 – Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de potássio em amostras de soro conservados a $\leq -18^\circ\text{C}$; $\leq -80^\circ\text{C}$ e entre $2 - 8^\circ\text{C}$ - liofilizados.

- Soro SP inicial (T_i)
- Soro CP inicial (T_i)
- Temperatura $\leq -18^\circ\text{C}$ (T_{13})
- Temperatura $\leq -80^\circ\text{C}$ (T_{13})
- 2 - 8°C - liofilizados (T_{13})
- ⊕ Média
- * Outlier

Os desvios padrão das concentrações foram menores no soro CP quando comparados ao soro SP (figura 60 e tabela 3 e 4, anexo). No soro SP conservado a $\leq -80^\circ\text{C}$ observamos a presença de três pontos “outliers”, como mostra à figura 60 (a). As seis amostras testadas tiveram seus CV abaixo da especificação ótima da qualidade de 1,2% (Tabela 8), entretanto os soros CP apresentaram melhor desempenho.

As figuras 61 (a, b, c) e 62 (a, b, c) mostram o gráfico de Levey-Jennings para o K^+ e a ocorrência mais importante para cada processo de conservação, durante os 300 dias de monitoramento.

Figura 61 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para o potássio no soro SP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).

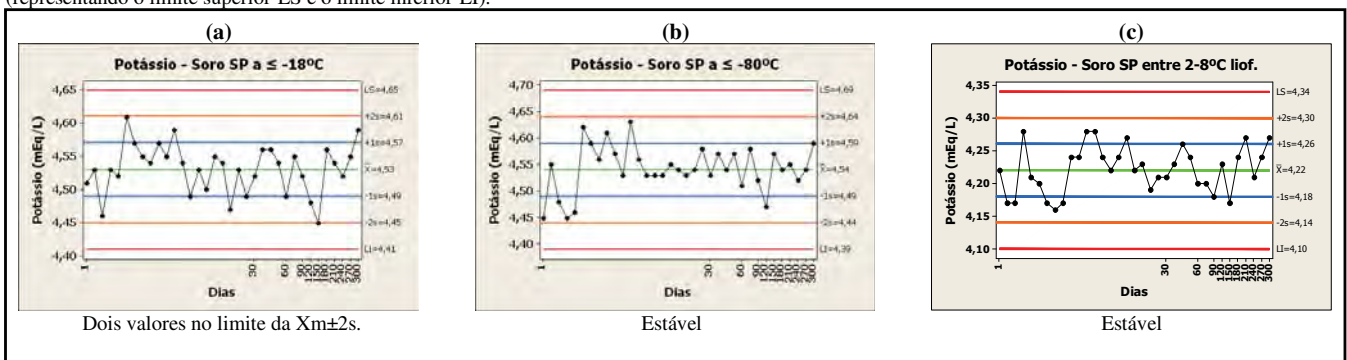
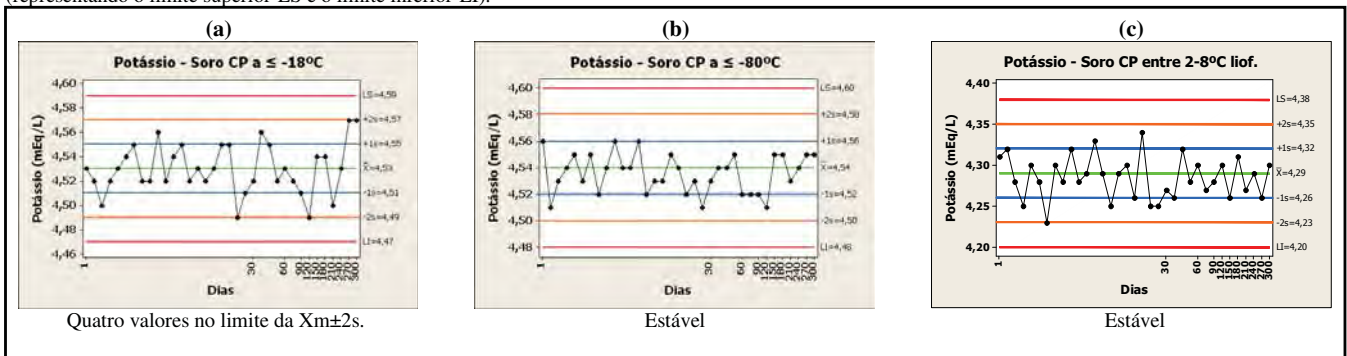


Figura 62 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para o potássio no soro CP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).



4.20 Proteínas Totais (Prot. Totais)

A adição do preservante não alterou os níveis médios iniciais (T_i) de prot. totais nos soros SP e CP com $p \geq 0,05$; entretanto quando comparamos os soros conservados a $\leq -18^\circ\text{C}$, $\leq -80^\circ\text{C}$ e $2 - 8^\circ\text{C}$ - liofilizado, após 30 dias monitoramento (T_0) com seus T_i correspondentes observamos diferenças estatísticas significativas, com $p < 0,05$ (tabela 5 e figura 63).

Observamos na figura 63(a) a presença de dois pontos “outliers” nos soros SP conservados a $\leq -18^\circ\text{C}$ e $\leq -80^\circ\text{C}$. Nos soros SP e CP conservados a $\leq -18^\circ\text{C}$ não houve diferença significativa entre as médias, o que não ocorreu com os soros nos demais processos de conservação (tabela 7). O menor CV encontrado foi no soro CP conservado a $2 - 8^\circ\text{C}$ - liofilizado ficando abaixo da especificação ótima da qualidade de 0,68%. Para os demais soros, os CV atenderam a especificação desejável da qualidade de 1,4% (tabela 8).

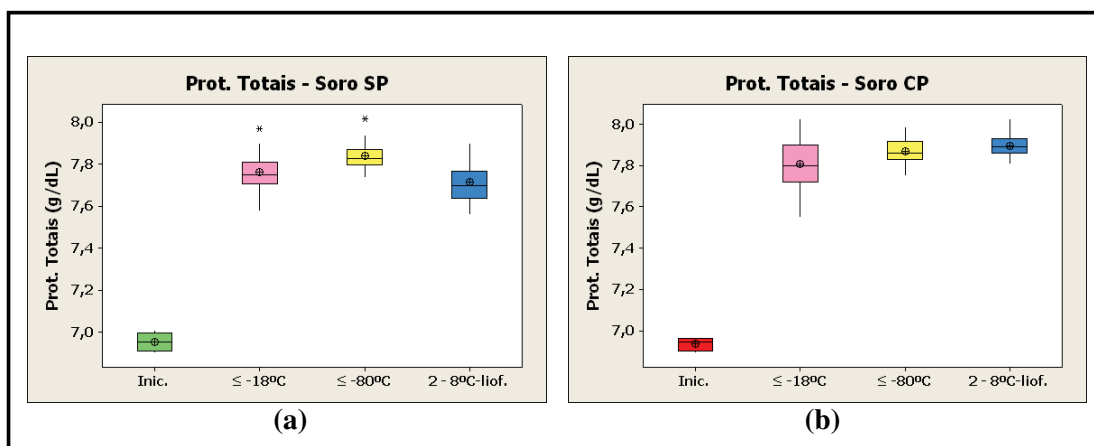


Figura 63 – Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de proteínas totais em amostras de soro conservados a $\leq -18^\circ\text{C}$; $\leq -80^\circ\text{C}$ e entre $2 - 8^\circ\text{C}$ - liofilizados.

- Soro SP inicial (T_i)
- Soro CP inicial (T_i)
- Temperatura $\leq -18^\circ\text{C}$ (T_{13})
- Temperatura $\leq -80^\circ\text{C}$ (T_{13})
- $2 - 8^\circ\text{C}$ - liofilizados (T_{13})
- ⊕ Média
- * Outlier

A adição do preservante não afetou as concentrações de prot. totais no soro, o mesmo não ocorrendo com os processos de conservação. A adição do preservante associada ao processo de liofilização melhora a estabilidade das proteínas totais no soro.

As figuras 64 (a, b, c) e 65 (a, b, c) mostram o gráfico de Levey-Jennings para as prot. totais e a ocorrência mais importante para cada processo de conservação, durante os 300 dias de monitoramento.

Figura 64 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para as prot. totais no soro SP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).

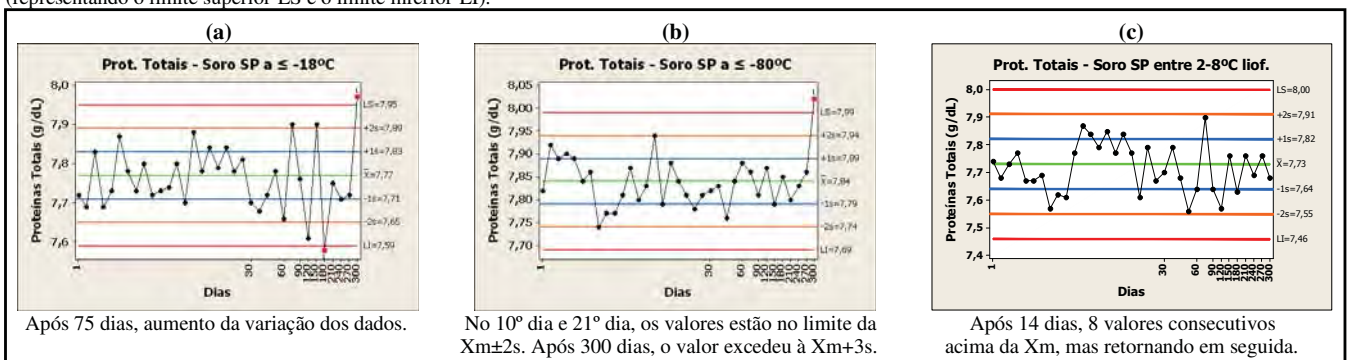
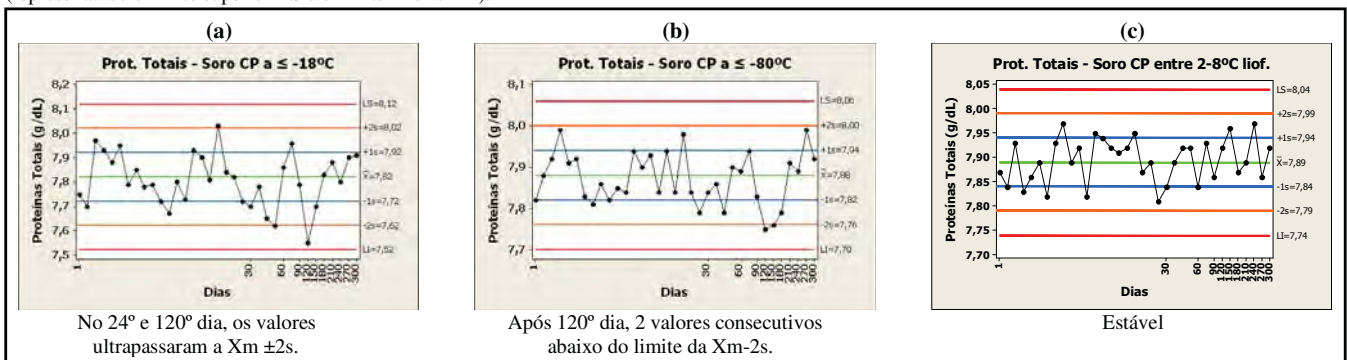


Figura 65 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para as prot. totais no soro CP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).



4.21 Sódio (Na^+)

A tabela 7 e a figura 66 (a, b) mostram que os níveis médios de Na^+ apresentaram comportamentos diferentes com diferenças significativas entre as médias ($p < 0,05$). Observamos diferença estatística significativa nos níveis médios iniciais de Na^+ , exceto para o soro SP conservado a $\leq -18^\circ\text{C}$ em relação à média inicial correspondente (tabela 5). Nos soros conservados entre $2 - 8^\circ\text{C}$ – liofilizados, observamos uma diminuição das médias em relação aos outros processos de conservação (tabela 3 e 4, anexo e figura 66). Ocorreu um aumento da concentração do Na^+ no soro CP em relação ao soro SP em todos os processos de conservação, pois o preservante adicionado continha sódio (benzylpenicillin sodium), aumento este também observado nas tabela 3 e 4 (anexo). Ocorreu um ponto “outlier” no soro SP conservado a $\leq -80^\circ\text{C}$ no 29º dia, evidente na figura 67(b).

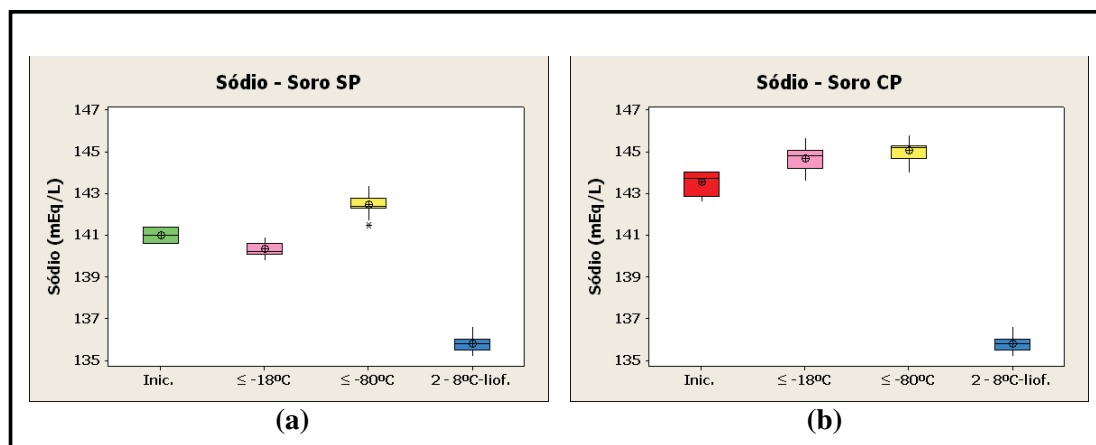


Figura 66 – Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de sódio em amostras de soro conservados a $\leq -18^\circ\text{C}$; $\leq -80^\circ\text{C}$ e entre $2 - 8^\circ\text{C}$ - liofilizados.

- Soro SP inicial (T_i)
- Soro CP inicial (T_i)
- Temperatura $\leq -18^\circ\text{C}$ (T_{13})
- Temperatura $\leq -80^\circ\text{C}$ (T_{13})
- $2 - 8^\circ\text{C}$ - liofilizados (T_{13})
- ⊕ Média
- * Outlier

Para todos os soros, o CV ficou abaixo da especificação desejável da qualidade de 0,4%, entretanto o menor CV encontrado foi no soro SP a $\leq -18^\circ\text{C}$ (tabela 8 e figura 66a).

O preservante e os processos de conservação modificaram as médias dos soros (T_0 e T_{13}) em relação às suas médias iniciais (T_i). Os soros conservados a $2 - 8^\circ\text{C}$ – liofilizados e o soro SP a $\leq -18^\circ\text{C}$ apresentaram um desempenho melhor no decorrer do tempo. O pior desempenho encontrado foi nos soros conservados a $\leq -80^\circ\text{C}$, conforme podemos observar nas figuras 67(b) e 68(b).

As figuras 67 (a, b, c) e 68 (a, b, c) mostram o gráfico de Levey-Jennings para o Na^+ e a ocorrência mais importante para cada processo de conservação, durante os 300 dias de monitoramento.

Figura 67 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para o sódio no soro SP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).

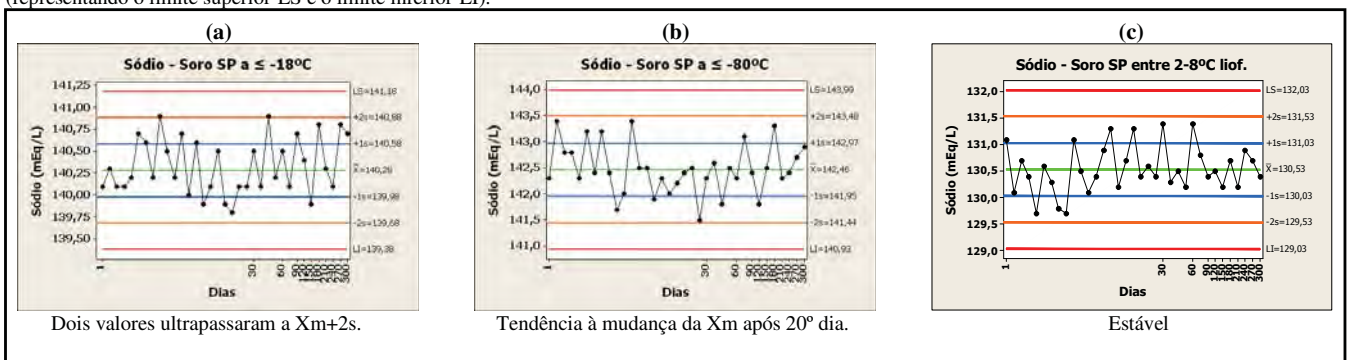
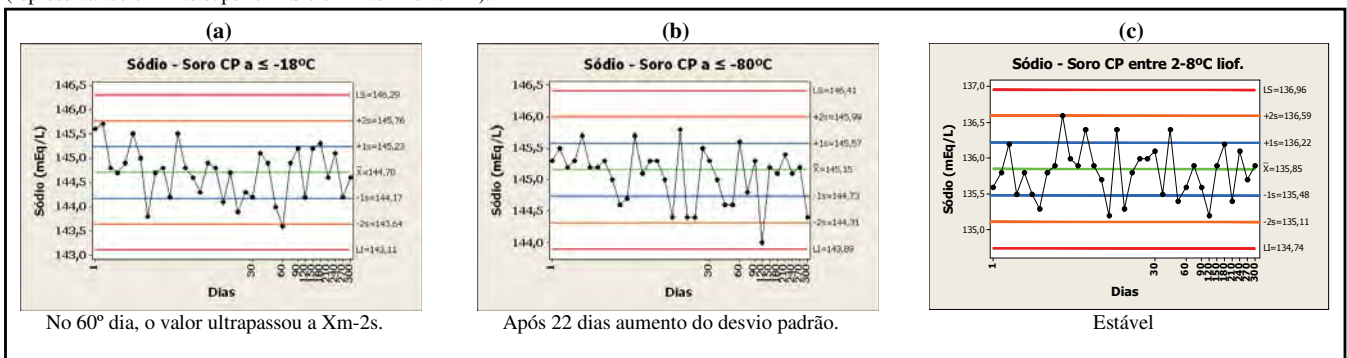


Figura 68 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para o sódio no soro CP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).



4.22 Triglicérides

A figura 69 (a,b), mostra para os triglicérides uma diminuição dos seus níveis após o processo de liofilização e sendo mais acentuada para o soro SP. Observamos que as hastes superiores e inferiores nos soros SP conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ e $\leq -80^{\circ}\text{C}$ se distanciam dos seus quartis correspondentes, significando o maior e menor valor encontrado, respectivamente. Ocorreu a presença de um ponto “outlier” no soro SP a $\leq -80^{\circ}\text{C}$ (figura 69a).

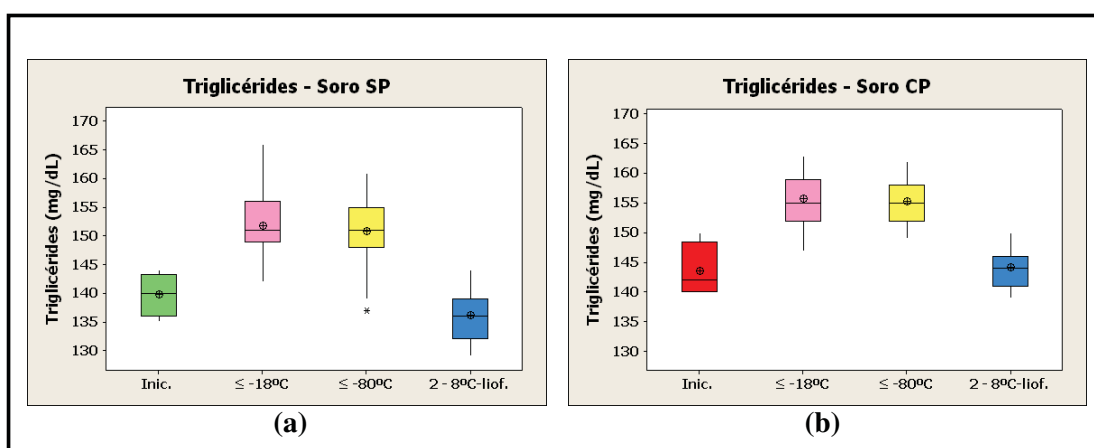


Figura 69 – Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de triglicérides em amostras de soro conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$; $\leq -80^{\circ}\text{C}$ e entre 2 - 8°C - liofilizados.

- Soro SP inicial (T_i)
- Soro CP inicial (T_i)
- Temperatura $\leq -18^{\circ}\text{C}$ (T_{13})
- Temperatura $\leq -80^{\circ}\text{C}$ (T_{13})
- 2 - 8°C - liofilizados (T_{13})
- ⊕ Média
- * Outlier

Não ocorreu variação da média inicial (T_i) após a adição do preservante e as médias nos soros conservados a 2 - 8°C - liofilizados (T_0) não apresentaram diferenças significativas ($p \geq 0,05$) em relação às médias iniciais (T_i) correspondentes (Tabela 5). Da mesma forma, comparando entre os processos de conservação a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ e $\leq -80^{\circ}\text{C}$ no mesmo soro não houve diferenças significativas, mas quando se compara entre os soros no mesmo processo de conservação ocorre mudança das médias com $p < 0,05$ (Tabela 7).

Nos processos de conservação a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ e $\leq -80^{\circ}\text{C}$ ocorreram um aumento do desvio padrão no decorrer do tempo ($T_{13} > T_0$), conforme demonstrado na tabela 3 e 4 (anexo), o mesmo não ocorrendo nos soros conservados entre 2 - 8°C - liofilizados que tiveram seus desvios padrão diminuídos. O soro CP apresentou um CV menor nos três processos de conservação em relação ao soro SP, entretanto todas as seis amostras atenderam a especificação ótima da qualidade para os triglicérides de 5,2% (tabela 8).

O processo de liofilização e a adição do preservante alteraram os níveis dos triglicérides, embora melhore sua estabilidade. Entretanto, os processos de conservação a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ e $\leq -80^{\circ}\text{C}$ aumentam suas concentrações (tabela 7, figuras 69, 70 e 71).

As figuras 70 (a, b, c) e 71 (a, b, c) mostram o gráfico de Levey-Jennings para os triglicérides e a ocorrência mais importante para cada processo de conservação, durante os 300 dias de monitoramento.

Figura 70 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para o triglicérides no soro SP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).

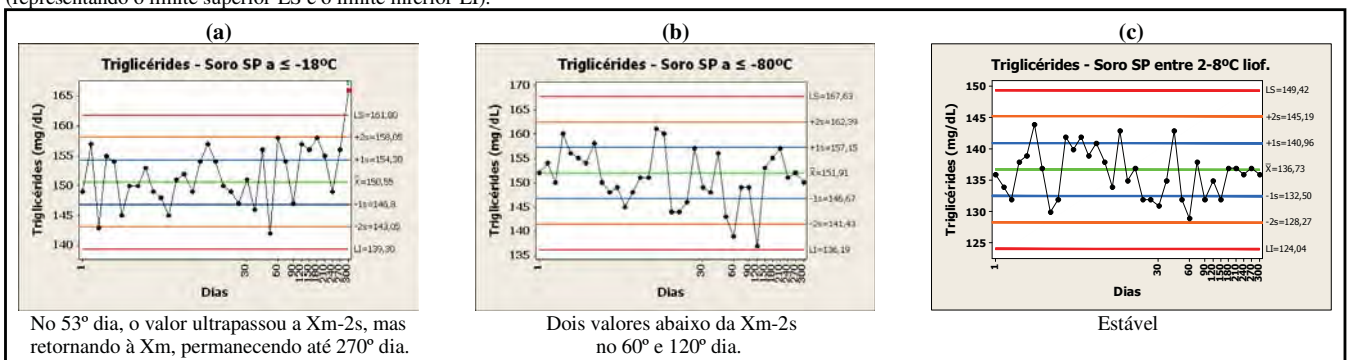
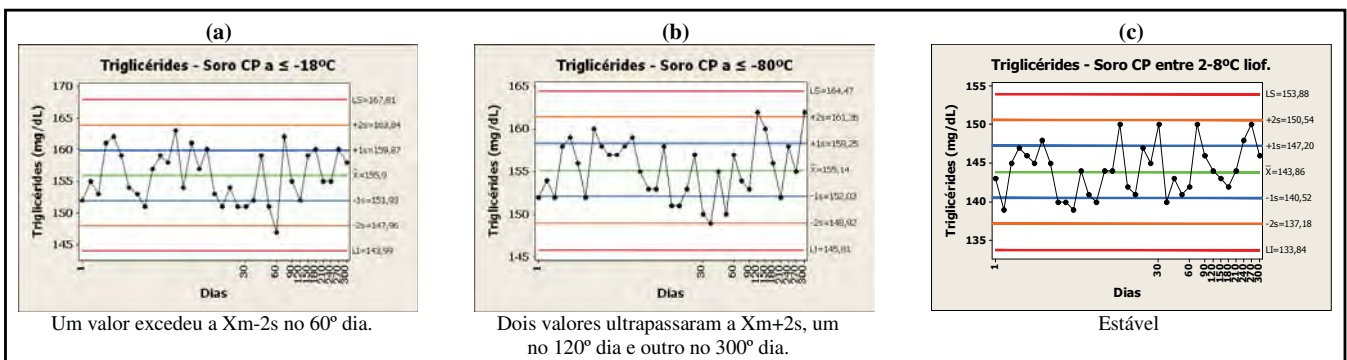


Figura 71 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para o triglicérides no soro CP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).



4.23 Uréia

A figura 72 (a, b) mostra para a uréia a variação dos níveis, a média e mediana dos soros SP e CP nos três processos de conservação. Podemos observar a diminuição de uréia nos soros conservados a 2 – 8°C – liofilizados (figura 72 a,b). Os soros SP (figura 72a) conservado a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ e $\leq -80^{\circ}\text{C}$ apresentaram pontos que ultrapassaram a $X_m - 2s$ e $X_m + 2s$, respectivamente, evidenciados pelas hastes inferiores e superiores dos quartis correspondentes.

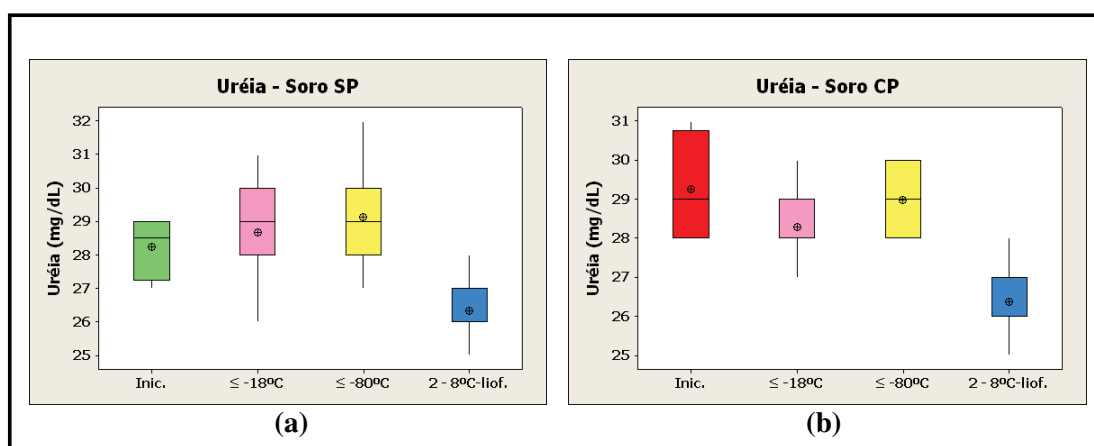


Figura 72 – Comparação entre as médias, medianas e variação dos níveis de uréia em amostras de soro conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$; $\leq -80^{\circ}\text{C}$ e entre 2 - 8°C - liofilizados.

- Soro SP inicial (T_i)
 - Soro CP inicial (T_i)
 - Temperatura $\leq -18^{\circ}\text{C}$ (T_{13})
 - Temperatura $\leq -80^{\circ}\text{C}$ (T_{13})
 - 2 - 8°C - liofilizados (T_{13})
- $\oplus$ Média

Após a adição do preservante, as concentrações médias iniciais (T_i) para a uréia não apresentaram diferenças significativas com $p \geq 0,05$. O mesmo ocorreu para os processos de conservação a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ e $\leq -80^{\circ}\text{C}$ (tabela 5). No soro SP a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ ocorreu uma maior variação dos níveis com aumento do desvio padrão e CV em relação às outras amostras de soros (tabela 8, tabelas 3 e 4-anexo e figura 72).

A figura 72 (b) mostra que o soro CP a $\leq -80^{\circ}\text{C}$ apresentou melhor distribuição dos dados ao redor da média, pois a média e mediana são iguais e ocorreu distribuição uniforme nos quartis superior e inferior.

Os CV para a uréia aumentou após 300 dias de monitoramento (T_{13}) em todos os processos de conservação para os soros SP e CP quando comparados com os primeiros 30 dias (T_0). O soro que apresentou melhor CV foi o soro SP conservado a 2 – 8°C – liofilizado.

Entretanto, todas as amostras de soro tiveram seus CV abaixo da especificação desejável da qualidade de 6,2% (tabela 8).

O processo de liofilização afetou a concentração de uréia em relação aos outros processos de conservação e, a adição do preservante melhorou a estabilidade das amostras no processo de conservação a $\leq -80^{\circ}\text{C}$ e a $2 - 8^{\circ}\text{C}$ – liofilizados.

As figuras 73 (a, b, c) e 74 (a, b, c) mostram o gráfico de Levey-Jennings para a uréia e a ocorrência mais importante para cada processo de conservação, durante os 300 dias de monitoramento.

Figura 73 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para a uréia no soro SP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).

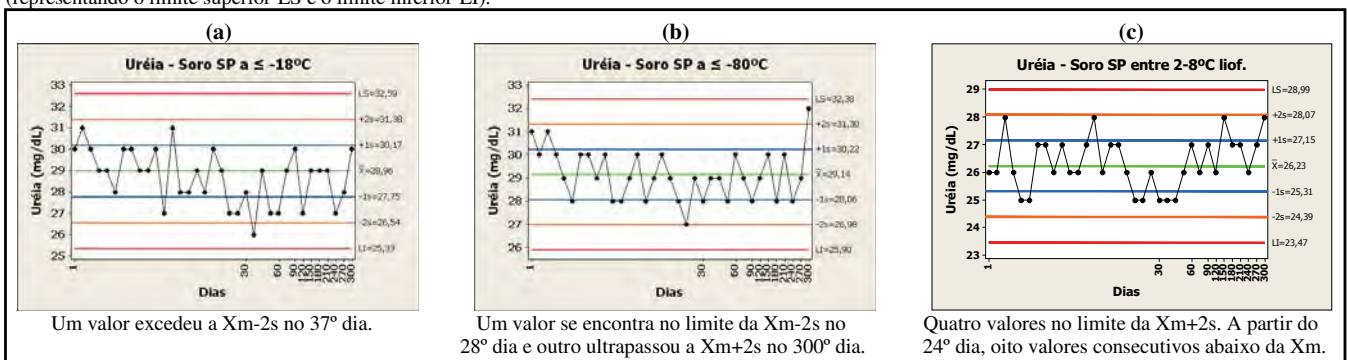
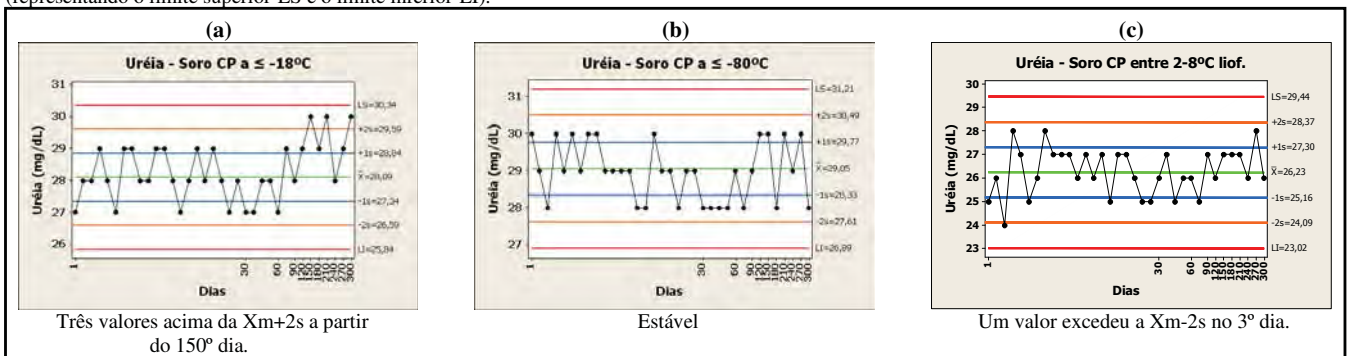


Figura 74 – Gráficos de Levey-Jennings com a $\bar{X}_m$ e os 3s para a uréia no soro CP: verde, $\bar{X}_m$; azul, $\bar{X}_m \pm 1s$; laranja, $\bar{X}_m \pm 2s$; vermelha, $\bar{X}_m \pm 3s$ (representando o limite superior-LS e o limite inferior-LI).



As especificações da qualidade baseada nos componentes da variação biológica (FRASER, 2001) para 123 processos de conservação nos soros SP e CP, 41,3% atenderam as especificações ótima; 38,1%, a desejável; 19,0%, a mínima e 1,6% não atendeu nenhuma especificação.

Para a ALP, cuja especificação utilizada foi o critério da CLIA'88 (WESTGARD et al., 2004), os três processos de conservação nos soros SP e CP permaneceram dentro dos limites da $X_m \pm 30\%$.

A tabela 9 apresenta as classificações dos soros SP e CP quanto às especificações da qualidade baseada nos componentes da variação biológica (ótima, desejável e mínima) e CLIA'88.

Tabela 9 – Classificação dos CV analíticos dos soros SP e CP quanto às EQA baseados nos componentes da variação biológica após 300 dias de monitoramento.

Analitos	Ótima	Desejável	Mínima	Observações
Ácido úrico	(2,2%)* Soro SP à ≤ -80°C e liofilizado e todos nos soros CP	(4,3%)* Soro SP à ≤ -18°C	(6,5%)*	-----
Albumina	(0,8%)* Soro CP à ≤ - 18°C e liofilizado	(1,6%)* Todos nos soros SP e CP à ≤ - 80°C	(2,3%)*	-----
ALP	(1,6%)*	(3,2%)*	(4,8%)*	Xm ± 30% (CLIA'88)
ALT	(6,1%)* Soro CP liofilizado	(12,2%)* Soro SP liofilizado	(18,2%)* Soros SP e CP à ≤ -18°C e ≤ -80°C	-----
Amilase	(2,4%)* Todos nos soros SP e CP	(4,8%)*	(7,1%)*	-----
AST	(3,0%)*	(6,0%)* Todos nos soros SP e CP	(8,9%)*	-----
Bil. Direta	(9,2%)* Soros SP e CP à ≤ -80°C e liofilizado	(18,4%)* Soros SP e CP à ≤ -18°C	(27,6%)*	-----
Bil. Total	(6,4%)* Soro CP à ≤ -80°C	(12,8%)* Todos nos soros SP e soros CP à ≤ -18°C e liofilizado	(19,2%)*	-----
Cálcio	(0,5%)*	(1,0%)*	(1,4%)* Todos nos soros SP e CP	-----
CLLF	-----	-----	-----	Não existe especificação
Colesterol	(1,5%)* Soro CP à ≤ - 80°C e soros SP e CP liofilizados	(3,0%)*	(4,5%)* Soro SP à ≤ - 80°C e soros SP e CP à ≤ - 18°C	-----
Creatinina	(1,1%)*	(2,2%)*	(3,2%)* Soros SP à ≤ - 80°C e liofilizado e todos os soros CP	Soro SP à ≤ - 18°C não atendeu especificação
Ferro	(6,6%)* Todos os soros SP e CP	(13,3%)*	(19,9%)*	-----
Fósforo	(2,1%)* Todos os soros CP e soro SP liofilizado	(4,3%)* Soros SP à ≤ - 18°C e ≤ - 80°C	(6,4%)*	-----
GGT	(3,5%)* Soros SP e CP à ≤ - 18°C e ≤ - 80°C	(6,9%)* Soros SP e CP liofilizados	(10,4%)*	-----
Glicose	(1,43%)* Soros SP e CP à ≤ - 18°C e CP à ≤ - 80°C	(2,85%)* Soros SP e CP liofilizados e SP à ≤ - 80°C	(4,28%)*	-----
Col. - HDL	(1,8%)*	(3,6%)* Soro SP à ≤ -80°C	(5,3%)* Soro SP à ≤ -18°C e todos CP	Soro SP liofilizado não atendeu especificação
LD	(2,2%)*	(4,3%)* Soro SP e CP à ≤ - 80°C e liofilizado	(6,5%)* Soro SP e CP à ≤ -18°C	-----
Potássio	(1,2%)* Todos os soros SP e CP	(2,4%)*	(3,6%)*	-----
Prot. Totais	(0,7%)* Soro CP liofilizado	(1,4%)* Todos os soros SP e soros CP à ≤ - 80°C e liofilizado	(2,0%)*	-----
Sódio	(0,2%)*	(0,4%)* Todos os soros SP e CP	(0,5%)*	-----
Triglicérides	(5,2%)* Todos os soros SP e CP	(10,5%)*	(15,7%)*	-----
Uréia	(3,1%)*	(6,2%)* Todos os soros SP e CP	(9,2%)*	-----

* - CV analítico (ótimo, desejável e mínimo) conforme os componentes da variação biológica (FRASER, 2001).

A tabela 10 mostra a estabilidade em dias observada nos soros SP e CP nos processos de conservação a $\leq -18^{\circ}\text{C}$, $\leq -80^{\circ}\text{C}$ e a $2 - 8^{\circ}\text{C}$ – liofilizado durante 300 dias de monitoramento.

Tabela 10 – Estabilidade dos analitos nos soros sem preservante (SP) e com preservante (CP) nos processos de conservação a $\leq -18^{\circ}\text{C}$, $\leq -80^{\circ}\text{C}$ e a $2 - 8^{\circ}\text{C}$ – liofilizado, após 300 dias de monitoramento.

Analito	SP (dias)			CP (dias)		
	$\leq -18^{\circ}\text{C}$	$\leq -80^{\circ}\text{C}$	Liof.	$\leq -18^{\circ}\text{C}$	$\leq -80^{\circ}\text{C}$	Liof.
Ácido úrico	210	45	300♦	300♦	300♦	240
Albumina	150	300♦	22	300♦	300♦	300♦
ALP	300♦	300♦	300♦	300♦	300♦	300♦
ALT	22	37	300♦	14	210	300♦
Amilase	300♦	300♦	300♦	180	300♦	300♦
AST	75	300♦	300♦	270	300♦	300♦
Bil. Direta	180	Instável	270	180	300♦	300♦
Bil. Total	180	300♦	300♦	300♦	300♦	300♦
Cálcio	270	300♦	210	210	300♦	300♦
CLLF	150	150	30	45	150	300♦
Colesterol	90	29	300♦	30	300♦	300♦
Creatinina	180	30	270	11	30	300♦
Ferro	300♦	300♦	30	60	300♦	300♦
Fósforo	120	53	180	300♦	300♦	300♦
GGT	28	300♦	26	53	300♦	300♦
Glicose	75	300♦	150	300♦	300♦	300♦
Col.-HDL	300♦	30	30	300♦	300♦	300♦
LD	15	30	210♦	16	45	300♦
Potássio	300♦	300♦	300♦	300♦	300♦	300♦
Prot. Totais	60	270	300♦	300♦	300♦	300♦
Sódio	300♦	300♦	300♦	300♦	300♦	300♦
Triglicérides	45	53	300♦	300♦	270	300♦
Uréia	300♦	270	300♦	120	300♦	300♦

♦ - Analitos que apresentaram estabilidade, nos diferentes processos de conservação até 300 dias de monitoramento.

5. Discussão

Os clínicos utilizam os testes laboratoriais como auxílio para o diagnóstico, prognóstico e monitoramento terapêutico de pacientes. A veracidade dos resultados é essencial para o médico em sua decisão clínica. Para tanto, o laboratório clínico deve sempre estar monitorando seu desempenho analítico com a finalidade de reproduzir a precisão e exatidão dos resultados por meio do CIQ (monitoramento da imprecisão) e da AEQ (monitoramento da inexactidão).

Está já bem aceito pela literatura (KROLL et al., 1989; BAADENHUIJSEN et al., 1995; RANDOLPH, 1997; WESTGARD e KLEE, 2006) que os processos associados com a liofilização podem por exemplo, desnaturar constituintes das lipoproteínas e alterar as características da matriz de tal forma que eles não são comparáveis com as amostras dos pacientes. A liofilização pode afetar algumas ou todas as classes de lipoproteínas. Muitas proteínas são termodinamicamente instáveis em baixas temperaturas, enquanto que outras podem ser danificadas por altas concentrações de sal, interações de superfície, variações de pH induzidas pelo congelamento e, durante a pressão de secagem. O pool de soro liofilizado após reconstituição em geral é mais turvo que os materiais não tratados ou congelados. A turbidez pode representar simplesmente uma mudança no tamanho e forma das lipoproteínas devido a uma diminuição na solubilidade causada por denaturação das proteínas por liofilização, o que dificulta a disponibilidade de lipoproteínas para os procedimentos enzimáticos utilizando esterases e oxidases. O passo crucial no processo de liofilização pode ser o congelamento inicial do soro. Cristais são eventualmente formados de solvente puro. O fluido intermolecular torna-se super resfriado, podendo cristalizar-se, muitas vezes com cristais de diferente natureza química. O processo de secagem após o passo de congelamento não causa muitas mudanças físicas ou químicas, mas pode ser a causa dos efeitos adversos da liofilização. Além destas modificações físicas e químicas que ocorrem, outros problemas relacionados ao produto liofilizado é o volume de água a ser adicionado para a reconstituição e a variação frasco a frasco das concentrações dos analitos, atribuídas essencialmente a pipetagem do volume reconstituído. Em nosso trabalho a massa para o volume a ser reconstituído foi calculada por meio da densidade do soro e a reconstituição realizada em balão volumétrico, eliminando a variação frasco a frasco, minimizando estes problemas de forma que as alterações apresentadas possam apenas ser atribuídas ao processo de liofilização.

Outro fator que pode afetar a exatidão dos resultados em amostras-controle é a adição de preservantes nos pools de soro. Por exemplo, a presença de grupos fenólicos nos preservantes interagem com certos reagentes do ácido úrico. O método da uricase que é substrato específico para o ácido úrico está sujeito a dois tipos de interferência: (i)

interferência espectral causada pelo preservante que absorve próximo ao comprimento de onda do pico de absorção do cromóforo da reação e, (ii) interferência devido a inibidores da uricase (SINGH et al., 1972). O urato em meio alcalino (pH 8,5) por vários meses é convertido em um potente inibidor da uricase, o oxonato (FRIDOVICH, 1965). Nós observamos esta interferência nas determinações de ácido úrico no soro CP quando comparadas com o soro SP, onde a concentração de ácido úrico aumentou 6,2%, 7,0% e 0,2% nos processos de conservação $\leq -18^{\circ}\text{C}$ e $\leq -80^{\circ}\text{C}$ e entre $2 - 8^{\circ}\text{C}$ - liofilizado, respectivamente. Para o soro conservado entre $2 - 8^{\circ}\text{C}$ – liofilizado, os resultados indicam uma conversão menor em oxonato, apresentando o menor CV e com valores atendendo a especificação ótima da qualidade baseada na variação biológica de 2,2% .

Comparando as médias dos analitos após 300 dias (T_{13}) em relação as médias iniciais (T_i), observamos muitas discrepâncias entre os resultados. Uma das prováveis causas pode ser devido às médias iniciais (T_i) terem sido obtidas no mesmo dia (realização dos ensaios em quadruplicata), não sendo influenciadas pelas variações normais que ocorrem no sistema analítico no decorrer do tempo. Para a determinação do valor real de cada analito nas amostras-controle, métodos de referência devem ser utilizados, como por exemplo o método IDMS (Diluição Isotópica e Espectrometria de Massa) que é um método definitivo para a determinação da creatinina calibrado com um material de referência do mais alto nível de qualidade. Estes métodos não estavam disponíveis, como ocorre em geral, mas todos os métodos utilizados em nosso estudo são rastreáveis aos métodos de referência. Para o propósito do CIQ, o material e métodos utilizados permitirão o acompanhamento da imprecisão na rotina laboratorial.

Khan e Khan (2004) e Hartmann et al. (1981), utilizando soro humano líquido estabilizado com etilenoglicol armazenado entre -15°C e -20°C por 10 dias e 55 semanas (385 dias), respectivamente, mostraram estabilidade esperada para os analitos testados, exceto para a uréia e creatinina cuja estabilidade encontrada foi por 10 e 9 meses (300 e 270 dias), respectivamente. Os CV encontrados na grande maioria dos analitos apresentaram-se superiores aos encontrados no presente estudo, no entanto para a uréia, ALP e ALT, nossos CV foram maiores.

Khan e Khan (2004) também compararam os CV do soro líquido “caseiro” preparado com o etilenoglicol, com dois soros-controle comerciais liofilizados (dois níveis). Seus resultados mostraram que os CV nos soros liofilizados foram maiores que do soro “caseiro” e atribuíram este aumento a variação frasco a frasco na hora da reconstituição. Já um estudo realizado por Wilson et al. (1972) com pool de soro humano líquido conservado a -10°C

mostrou estabilidade por 42 dias para 13 analitos testados, porém para o cálcio e fósforo a estabilidade foi determinada em 33 dias, justificando que o aumento do cálcio após 28 dias e posterior diminuição seria atribuída ao armazenamento, amostras não homogeneizadas corretamente ou contaminação dos frascos. Neste estudo os autores também compararam os CV do pool de soro líquido com preservante com um soro comercial liofilizado e seus resultados foram semelhantes aos encontrados por Khan e Khan (2004). Hanok e Kuo (1968), estudaram a estabilidade de 15 analitos em um soro comercial liofilizado reconstituído conservado por 22 dias a 10°C e -15°C, e mostraram que a -15°C, todos os analitos foram estáveis no decorrer do estudo, permanecendo os resultados dentro dos limites da $X_m \pm 2s$. Em nosso estudo, analisando os analitos em comum, apenas 24% dos soros liofilizados apresentaram CV maior que dos soros SP e CP conservados a $\leq -18^\circ\text{C}$, sugerindo que em nossas amostras liofilizadas houve pouca variação frasco a frasco após a reconstituição e/ou aliquotadas e conservadas a $\leq -18^\circ\text{C}$ por 5 dias. Em 43% dos analitos, observamos que nossos CV se apresentaram menores que dos autores.

Gislefoss et al. (2008) avaliaram a estabilidade do sódio, potássio, cálcio, ferro, creatinina, ácido úrico e bilirrubina em amostras de soro de banco de sangue congeladas a -25°C por um mês (30 dias), 2 anos (730 dias) e 25 anos (9125 dias) e os resultados mostraram diferenças significativas nas médias quando as amostras de 25 anos foram comparadas com amostras de um mês (30 dias); sódio (+3,9%), potássio (+26,4%), cálcio (+7,4%), ácido úrico (-7,6%) e, bilirrubina (-59,4%). Entretanto, para a creatinina e ferro não encontraram diferenças estatisticamente significativas. Seus resultados mostraram que as amostras que sofreram aumento em suas concentrações armazenadas por longos períodos de tempo, provavelmente seria em decorrência da evaporação durante o armazenamento. A diminuição do ácido úrico seria devido a degradação do mesmo e da bilirrubina devido a exposição à luz. Os autores concluíram que a bilirrubina e ácido úrico são componentes que sofrem mudanças contínuas durante o armazenamento, e que algumas destas alterações parecem ser dependentes do tempo, cuja causa pode ser a degradação, substituição de grupos funcionais e interferências de outros componentes com a mudança da matriz afetando assim o processo analítico. Tais efeitos em nosso estudo foram observados para a bilirrubina direta nos soros SP e CP conservados a $\leq -18^\circ\text{C}$, onde encontramos diminuição das médias para este analito de 10,5% e 5,6%, respectivamente. Entretanto, para a bilirrubina total ocorreu o inverso, com aumento da média variando de 1,5% a 2,0%, nos soros SP a $\leq -80^\circ\text{C}$ e CP em todos os processos de conservação. Já para o ácido úrico, observamos uma variação da média de 0,4%

no soro SP, com aumento quando conservado a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ e diminuição a $\leq -80^{\circ}\text{C}$ (tabelas 1 e 2).

Poucos estudos foram realizados para a estabilidade de analitos armazenados a -80°C . Henriksen et al. (2004) realizaram um estudo em soros frescos normais congelados a -80°C para verificar a estabilidade dos analitos: ALT, AST, ALP, amilase, bilirrubina, cálcio, colesterol, creatinina, glicose, ferro, LD, fósforo, potássio, proteínas totais, sódio, ácido úrico e triglicérides; mostraram que estes parâmetros séricos foram estáveis por 5 anos quando armazenados a -80°C . Em nosso estudo no soro CP armazenado nas mesmas condições, os analitos que tiveram suas estabilidades menores que 300 dias foram: ALT, CLLF, creatinina, LD e triglicérides. Para a LD, a justificativa é que o rápido congelamento do soro nos frascos ajuda a manter uma homogeneidade aceitável para a determinação da LD total. Isso ocorreria porque a magnitude do rearranjo das subunidades da LD estaria diminuída. Isto poderia ser uma explicação para perda da estabilidade da LD nos soros conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ e $\leq -80^{\circ}\text{C}$ no presente estudo, já que as amostras-controle foram aliquotadas e congeladas de forma convencional.

Vernet-Nyssen (1983), estudou a estabilidade de soros comerciais liofilizados para CTLF, a conclusão foi que o pH do soro reconstituído desempenha um papel importante na precisão de sua quantificação e que este deve ser inferior a 8,5, pois o soro controle alcalino apresenta baixa reprodutibilidade e precisão. Além disso, observou-se que os soros liofilizados reconstituídos para CQ se comportam diferentemente das amostras dos pacientes. Para este mesmo analito, outro estudo foi realizado, onde o comportamento de dois soros comerciais liofilizados para a CTLF e os CV encontrados foram 6,6 e 7,2% (DEVGUN et al., 1982). Nossos CV para CLLF ficaram abaixo dos resultados dos autores para a CTLF. Entretanto, em nossos estudos os CV dos soros liofilizados foram superiores aos encontrados nos soros conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ e $\leq -80^{\circ}\text{C}$, pois também observamos que o pH de nossos soros se encontraram na faixa de 7,0 e 7,5.

Cattozzo et al. (2008) realizou um estudo da avaliação da comutatividade de um calibrador para a LD com 109 amostras de soro fresco de pacientes e 31 materiais de controle comparando dois métodos para a determinação desta enzima (ou seja, no sentido Lactato-Piruvato ou Piruvato-Lactato). O CV encontrado foi de 0 – 2,28% para a reação lactato-piruvato e 0 – 4,17% para a reação piruvato-lactato, onde foi observado que a maior imprecisão analítica foi nos limites dos intervalos de referência. Nosso CV tanto para o soro SP como CP variou na faixa de 2,17 – 3,46% utilizando a reação piruvato-lactato, exceto nos

soros SP e CP conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$, onde os CV encontrados foram 6,26 e 6,80%, respectivamente.

A ALP difere da maioria das enzimas do soro humano, mostrando aumento da atividade ao invés de sua diminuição no soro, quando armazenadas a temperatura ambiente ou de geladeira (MASSION E FRANKENFELD, 1972). Estes mesmos autores estudaram a estabilidade da ALP em soros humanos frescos e congelados a -20°C e amostras-controle liofilizadas. O método utilizado por eles foi o mesmo utilizado em nosso estudo (substrato p-nitrofenilfosfato). O esquema de trabalho nas amostras-controle comerciais liofilizadas foi a reconstituição do soro e divisão em três alíquotas: uma deixada a temperatura ambiente e após 3 e 6 horas determinada a atividade da ALP; a segunda imediatamente refrigerada por 24 horas e repetido o mesmo protocolo e; a terceira congelada por duas semanas e repetido o mesmo protocolo. Eles concluíram que o congelamento não apresenta aumento da atividade da ALP, mas se deixada a temperatura ambiente após o descongelamento ocorre aumento da atividade, em menor proporção. Smith e Fogg (1972) realizaram um experimento semelhante ao anterior, incluindo a liofilização de um pool de soro humano de pacientes, cuja atividade após a liofilização diminuiu aproximadamente 40% quando comparado com a atividade antes da liofilização. Seus resultados mostraram que muita pouca alteração foi obtida após a reconstituição do pool de soro liofilizado quando armazenado a -20°C . Os autores também observaram que não houve alteração da atividade da ALP nos soros humanos frescos ou nos pool de soro armazenados a -20°C . Nossos achados corroboram em relação a diminuição da atividade da ALP após a liofilização (32,0 - 33,4%) e nas amostras congeladas e liofilizadas não houve aumento da atividade. Nossos soros SP e para os três processos de conservação investigados, observamos o mesmo comportamento com uma tendência a diminuição da atividade de ALP após o 10º dia, mas retornando à média aproximadamente no 20º dia.

Vários analitos, incluindo oito enzimas, com um pool de soro de pacientes e adição de cloranfenicol e estreptomicina como preservantes, conservados a -20°C mostraram que a presença destes antibióticos ajudaram na prevenção de formação de amônia decorrente da degradação bacteriana da uréia. Para as enzimas AST, ALT, ALP, LD, GGT e amilase analisadas, os autores concluíram que a ALP foi a menos estável com perda de 7 a 10% da atividade e a LD com perda de 5% da atividade. Todas as enzimas permaneceram estáveis por um ano, com exceção da ALP que manteve sua atividade por oito meses (240 dias) (DUJARDIN e ROIJERS, 1985). Nossos resultados mostram-se discordantes dos autores, com exceção da LD, cuja perda da atividade de 5,7% no soro CP conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ foi semelhante ao resultado apresentado pelos autores, entretanto no soro SP na mesma

conservação apresentou uma diminuição na atividade de 16%. Para a ALP observamos estabilidade de 300 dias, tanto no soro SP como CP conservados a $\leq -18^{\circ}\text{C}$, com perda da atividade de 1,0% e 1,6%, respectivamente no decorrer do tempo. Já para a ALT observamos uma diminuição da atividade bastante acentuada tanto no soro SP como CP (60% e 73%, respectivamente) sendo a estabilidade para este analito de 22 dias para o soro SP e 14 dias para o soro CP. Para a GGT observamos perda da atividade de 5,3% no soro SP e 7,6% no soro CP; para a amilase ocorreu perda de aproximadamente 2,8% no soro CP e para a AST observamos um aumento da atividade de 1,2% e 0,6% nos soros SP e CP, respectivamente. O tempo de estabilidade para estas enzimas se encontram na tabela 5.

Um estudo realizado por dois anos à temperatura - 80°C por Thienpont et al. (2003) em amostras de soro fresco congelado e em soro liofilizado, mostrou que no soro congelado ocorreu um bias maior (+5,2% para o colesterol e + 3,7% para a glicose) do que no soro liofilizado (- 0,80% para o colesterol e + 0,7% para a glicose). Os resultados da glicose tiveram um aumento de 3% no soro (sem processamento) quando comparado com o soro liofilizado e para o colesterol o aumento foi de 6%. Estas diferenças são em decorrência dos efeitos da matriz artificial em materiais processados (adição de aditivos, congelamento e liofilização das amostras).

Evans et al. (1997) estudou o efeito do armazenamento a -70°C nas concentrações de lipídios, lipoproteínas e apolipoproteínas em amostras de soro pelo método de ultracentrifugação em indivíduos normolipêmicos e hiperlipêmicos em 10 dias, 3 meses (90 dias) e 6 meses (180 dias) foi investigado e verificado aumento nas concentrações dos triglicérides e diminuição nas concentrações de colesterol após o armazenamento nestas condições (aproximadamente 2%). Encontraram também diminuição do colesterol-HDL após 3 e 6 meses (90 e 180 dias). Nossos achados no soro CP a -80°C para estes analitos foram um aumento das concentrações de triglicerídeos de aproximadamente 8% e uma diminuição das concentrações de colesterol de aproximadamente 7%; entretanto no soro SP obtivemos um aumento de 1,9% e 8,0% para o triglicérides e colesterol, respectivamente; o CV do estudo foi muito superior ao encontrados por nós. Estes mesmos autores em 1995, realizaram um trabalho nas mesmas condições com soros armazenados a -20°C e encontraram que as concentrações de colesterol e triglicérides se mantem estáveis por um período de 3 meses (90 dias) a -20°C . Entretanto as concentrações de colesterol-HDL diminuíram. As explicações para tais fatos é que as mudanças não foram unicamente pela redistribuição dos lipídios, porque as concentrações de proteínas também mudaram, mas pela ruptura física das partículas de lipoproteínas com diminuição da recuperação de HDL, quando armazenadas a 3 meses a -

20°C (EVANS et al., 1995). Em nossos estudo, utilizando o método direto por inibição seletiva, não observamos esta diminuição do colesterol-HDL mesmo com maior turbidez do soros, nos processos de conservação investigados.

Um estudo do comportamento das concentrações de colesterol e triglicérides em um pool de soro congelado a -20°C e liofilizado por 5 anos (1825 dias), foi observado que houve uma redução nas concentração de colesterol e triglicerídeos após a liofilização quando comparados com seus homólogos do soro congelado a -20°C e tanto os soros congelados como os liofilizados se mantiveram estáveis por 5 anos (1825 dias) (KUCHMAK et al., 1982), mas em outro estudo realizado por Demacker et al. (1982) observou-se que quando o pool de soro armazenado nas mesmas condições, a concentração de colesterol-HDL se manteve estável por 18 meses (540 dias), com CV de 7,4% anual para o soro com concentrações normais de colesterol-HDL. Em nosso estudo houve redução dos níveis de colesterol e triglicérides nos soros SP e CP após a liofilização quando comparados com seus homólogos na conservação à $\leq -18^{\circ}\text{C}$, entretanto a estabilidade encontrada para os soros liofilizados foram de 300 dias, mas para os os soros conservados à $\leq -18^{\circ}\text{C}$ foi de 90 e 30 dias para os soros SP e CP, respectivamente. Para o colesterol-HDL nas mesmas condições, observamos estabilidade de 300 dias para os soros SP e CP conservados à $\leq -18^{\circ}\text{C}$ e soro CP liofilizado, mas para o soro SP liofilizado a estabilidade encontrada foi de 30 dias. Nossos CV para o colesterol-HDL foram menores que do autor. Entretanto, Warnick et al. (1981) observaram que o pool de soro foi estável para estes analitos por 6 meses (180 dias) a -15°C desde que a temperatura de armazenamento não sofresse variações. Do mesmo modo, o comportamento de pool de soros congelados a -20°C, -70°C e liofilizado para a determinação do colesterol em cinco equipamentos diferentes por 270 dias, mostraram diferenças estatisticamente significantes entre os pools congelados e liofilizados, com redução da concentração de colesterol no soro liofilizado, mas nos soros congelados a -20°C e -70°C não houve diferença estatisticamente significativa. Os CV entre os equipamentos variaram de 0,9% a 2,8%, 0,5% a 4,5% e 1,1% a 2,7%, para as conservações a -20°C, -70°C e liofilizadas, respectivamente. Os autores também determinaram a concentração do colesterol por espectrofotometria de massa e não obtiveram diferença estatística entre as médias dos soros congelados e liofilizados, concluindo que nas determinações nos cinco equipamentos ocorreu diferenças de bias entre os métodos no soro liofilizado, portanto o método é matriz-dependente (KROLL et al., 1989). Observamos em nosso estudo que houve diferenças estatisticamente significativas entre os soros SP conservados à $\leq -18^{\circ}\text{C}$ e $\leq -80^{\circ}\text{C}$, onde o soro

conservado à $\leq -80^{\circ}\text{C}$ teve uma redução dos níveis de colesterol de 2,3% em relação ao conservado à $\leq -18^{\circ}\text{C}$, após 300 dias de monitoramento.

Outro estudo realizado por Miller et al. (1991) mostrou que amostras individuais armazenadas a -70°C e após dois ciclos de congelamento e descongelamento não apresentaram mudanças nas concentrações de colesterol após curto períodos de tempo (48 e 96 horas). Eles concluíram que, se não houve mudanças nos níveis de colesterol nos soros individuais congelados, soros de doadores podem ser utilizados após dois ciclos de congelamento e descongelamento para a preparação de grandes pools. Outros trabalhos demonstraram uma melhora significativa na variação inter-reagente para a determinação de colesterol total e uma semelhança mais próxima nos valores do soro liofilizado com os soros fresco ou congelado quando é adicionado sacarose no pool, melhorando assim os efeitos prejudiciais da liofilização (BAADENHUIJSEN et al., 1995).

6. Conclusão

Em nosso estudo concluímos que o pool de soro CP liofilizado pode ser utilizado com boa precisão por 300 dias, com exceção do ácido úrico que permaneceu estável por 240 dias, mas justificável pela interferência ocorrida pela adição do preservante. Os CV encontrados para todos os analitos foram bastante satisfatórios em relação a estudos anteriores.

O importante para a veracidade dos resultados é a realização do CIQ e AEQ, sendo que para o CIQ não basta apenas determinar a média e os limites de controle. Deve-se, além disso, especificar o grau de qualidade desejável por meio de especificações da qualidade analítica, disponíveis por organizações internacionais. O acompanhamento diário do desempenho analítico deve ser feito pela utilização de mapas de Levey-Jennings e definição de regras de controle para julgamento quando o sistema analítico está fora de controle.

7. Referências

ALBERTINI, A.; SIGNORINI, C. The quality assurance system in clinical chemistry. **Ann. Ist. Super. Sanità**, v. 31, n. 1, p. 3-8, 1995.

ALLAIN, C. C.; POON, L. S.; CHAN, C. S. G.; RICHMOND, W.; FU, P. C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clin. Chem.**, v. 20, n. 4, p. 470-475, 1974.

AYROSA, A. M. I. B. Liofilização: ciência ou arte? **FAAP. Revista de engenharia**, v. 44, p. 40-45, 2004.

BAADENHUIJSEN, H.; DEMACKER, N. M.; HESSELS, M.; BOERMA, G. J. M.; PENDERS, T. J. WESKAMP, C. WILLEMS, H. L. Testing the accuracy of total cholesterol assays in an external quality-control program. Effect of adding sucrose to lyophilized control sera compared with use of fresh or frozen sera. **Clin. Chem.**, v. 41, n. 5, p. 724-730, 1995.

BACHORIK, P.S.; ROSS, J. W. National Cholesterol Education Program recommendations for measurement of low-density lipoprotein cholesterol: executive summary. **Clin. Chem.**, v. 41, n. 10, p. 1414 – 1420, 1995.

BADRICK, T. Quality leadership and quality control. **Clin. Biochem.**, v. 24, n. 3, p. 81-93, 2003.

BADRICK, T. The quality control system. **Clin. Biochem.**, v. 29, Suppl (i), p. 67-70, 2008.

BAIS, R. Use of capability index to improve laboratory analytical performance. **Clin. Biochem.**, v. 29, p. 27-31, 2008.

BARWICH, V.; BURKE, S.; LAWN R.; ROPER, P.; WALKER, R. **Applications of reference materials in analytical chemistry**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2001. 147p.

BASQUES, J. C. **Especificações da qualidade analítica**. Lagoa Santa, Minas Gerais. Publicação Técnica Labtest, 2009a. 32 p.

BASQUES, J. C. **Usando controles no laboratório clínico**. Lagoa Santa, Minas Gerais. Publicação Técnica Labtest, 2009b. 54 p.

BECKETT, G.; WALKER, S.; RAE, P.; ASHBY, P. **Lecture notes: clinical biochemistry**. 7th ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2005. p. 1-17.

BERMES, E. W.; YOUNG, D. S. Técnicas gerais de laboratório e procedimentos. In: BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R. **Tietz: Fundamentos de química clínica**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 15-16.

BIÈVRE, P.DE; GUNZLER, H. **Measurement uncertainty in chemical analysis**. New York: Ed. Springer, 2003. 285p.

BIÈVRE, P.DE; GUNZLER, H. **Traceability in chemical measurement**. New York: Springer, 2005. p.1-31.

BINDSCHAEDLER, C. Lyophilization process validation. In: REY, L.; MAY, J. C. (Ed.). **Freeze-drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products**. 2th ed. New York: Informa Healthcare USA, 2007. p. 535-551. v. 137

BOWERS, G. N.; MCCOMB, R. B.; UPRETTI, A. 4-Nitrophenyl Phosphate: Characterization of high-purity materials for measuring alkaline phosphatase activity in human serum. **Clin. Chem.**, v. 27, n. 1, p. 135 – 143, 1981.

BRAGA, E. C. A. **Físico-Química**: apostila de aulas práticas. São Paulo: USP, 2009. p. 1-2.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução RDC nº 302, de 13 de outubro de 2005. Regulamento Técnico para Funcionamento de Laboratórios Clínicos. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 14 out. 2005.

BRAZ, M. A. Ferramentas e gráficos básicos. In: ROTONDARO, R. G. **Seis sigma**: estratégia gerencial para a melhoria de processos, produtos e serviços. 1 ed. São Paulo: Atlas, 2008. p. 150-155.

BRIGGS, A. R., MAXWELL, T. J. Method of preparation of lyophilized biological products. **United States Patent**. , 8 p., Jan. 1976.

BROOKS, Z. C. **Performance-driven quality control**. Washington: American Association for Clinical Chemistry, 2001. 204 p.

CAMARGO, A. C. **Otimização dos procedimentos de preparação, marcação e controle de qualidade do glucarato – ^{99m}Tc para diagnóstico do infarto agudo do miocárdio**. 2007. 60 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear). Instituto de pesquisa Energética e Nucleares – IPEN, São Paulo, 2007.

CATTOZZO, G.; GUERRA, E.; CERIOTTI, F.; FRANZINI, C. Commutable calibrator with value assigned by the IFCC reference procedure to harmonize serum lactate dehydrogenase activity results measured by 2 different methods. **Clin. Chem.**, v. 54, n. 8, p. 1349-1355, 2008.

CEMBROWSKI, G. S. The pursuit of quality in clinical laboratory analyses. **Clin. Chem.**, v. 36, n. 9, p. 1602-1604, 1990.

CEMBROWSKI, G. S. Thoughts on quality-control systems a laboratorian's perspective. **Clin. Chem.**, v. 43, n. 5, p. 886-892, 1997.

CHAWLA, R. **Practical clinical biochemistry: methods and interpretations**. 3rd ed., New Delhi: Jaypee, 2003. p. 14-18.

COSTANTINO, H. R.; PIKAL, M. J. **Lyophilization of biopharmaceuticals**. USA: American Association of Pharmaceutical Scientists, 2004. p. 1-28.

COTLOVE, E.; HARRIS, E. K.; WILLIAMS, G. Z. Biological and analytic components of variation in long-term studies of serum constituents in normal subjects. **Clin. Chem.**, v. 16, n. 12, p. 1028-1032, 1970.

CROSBY, N. T.; DAY, J. A.; HARDCASTLE, W. A.; HOLCOMBE, D. G.; TREBLE, R. D. **Quality in the analytical chemistry laboratory**. New York: John Wiley & Sons, 1995. 307p.

DALY, J. A.; ERTINGSHAUSEN, G. Direct method for determining inorganic phosphate in serum with the "Centrifichem". **Clin. Chem.**, v. 18, n. 3, p. 263-265, 1972.

DEMACKER, P. N. M.; HIJMANS, A. G. M.; VAN SOMMEREN-ZONDAG, D. F.; JANSEN, A. P. Stability of frozen liquid control sera for assay of cholesterol in high-density lipoprotein. **Clin. Chem.**, v. 28, n. 1, p. 155-157, 1982.

DEVGUN, M. S.; FARRELL, L. P.; MANN, G. B. Quality control of measurements of total iron-binding capacity. **Clin. Chem.**, v. 28, n. 3, p. 544-545, 1982.

DOOLEY, K.C. **Frequency of QC: a patient safety perspective**, 2007. Disponível em: <http://www.westgard.com/lesson.htm>. Acesso em: 21 fev.2009.

DUJARDIN, B. C. G.; ROIJERS, A. F. M. Preparation of an optically clear frozen human control serum. **Scand. J. Clin. Lab.**, v. 45, n. 6, p. 569-572, 1985.

DYER, S.A. **Survey of instrumentation and measurement**. New York: John Wiley & Sons, 2001. p. 546-556.

ECKFELDT, J.H.; COPELAND, K. R. Accuracy verification and identification of matrix effects. The College of American Pathologist's protocol. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 117, n. 4, p. 381-388, 1993.

ESTRIDGE, B. H.; REYNOLDS, A. P.; WALTERS, N. J. **Basic medical laboratory techniques**. 4th ed. USA: Thomson Learning, 2000. p. 13-18.

EVANS, K.; MITCHESON, J.; LAKER, M. F. Effect of storage at 4°C and - 20°C on lipid, lipoprotein and apolipoprotein concentrations. **Clin. Chem.**, v. 41, n. 3, p. 392-396, 1995.

EVANS, K.; MITCHESON, J.; LAKER, M. F. Effect of storage at - 70°C on lipid, lipoprotein and apolipoprotein concentrations. **Clin. Chim. Acta.**, v. 258, n. 2, p. 219-229, 1997.

FARRELL JUNIOR, E. C. Phosphorus. In: PESCE, A.J; KAPLAN, L.A. **Methods in clinical chemistry**. 1st ed. Washington: Mosby Company, 1987. p. 1038-1040.

FASCE, C. F.; REJ, R.; COPELAND, W. H.; VANDERLINDE, R. E. A discussion of enzyme reference materials: applications and specifications. **Clin. Chem.**, v. 19, n. 1, p. 5-9, 1973.

FÉRARD, G.; LESSINGER, J-M. Preparation of enzyme calibration materials. **Clin. Chim. Acta**, v. 278, n. 2, p. 151-162, 1998.

FIFIELD, F. W.; KEALEY, D. **Principles and practice of analytical chemistry**. 5th ed. Oxford: Blackwell Science, 2000. p. 9.

FOSSATI, P.; PRENCIPE, L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. **Clin. Chem.**, v. 28, n. 10, p. 2077 - 2080, 1982.

FRANZINI, C.; CERIOTTI, F. Impact of reference materials on accuracy in clinical chemistry. **Clin. Bioch.**, v. 31, n. 6, p. 449-457, 1998.

FRASER, C.G.; PETERSEN, P.H. Desirable standards for laboratory tests if they are to fulfill medical needs. **Clin. Chem.**, v. 39, n. 7, p. 1447-1455, 1993.

FRASER, C.G.; PETERSEN, P.H. Analytical performance characteristics should be judged against objective quality specifications. **Clin. Chem.**, v. 45, n. 3, p. 321-323, 1999.

FRASER, C.G. **Biological variation: from principles to practice.** USA: American Association for Clinical Chemistry, 2001. 151 p.

FRIDOVICH, I. The competitive inhibition of uricase by oxonate and by related derivatives of s-triazines. **J. Biol. Chem.**, v. 240, n. 6, p. 2491-2494, 1965.

GARFIELD, F. M.; KLESTA, E.; HIRSCH, J. **Quality assurance principles for analytical laboratories.** 3rd ed. Gaithersburg, MD USA: AOAC International, 2000. p. 29-46.

GENDLER, S. M. Albumin. In: PESCE, A.J; KAPLAN, L.A. **Methods in clinical chemistry.** Washington: Mosby Company, 1987. p. 1066-1070.

GILLUM, D. R. **Industrial pressure, level, and density measurement.** 2nd ed. USA: Ed. ISA, 2008. p. 26-28.

GISLEFOSS, R. E.; GRIMSRUD, T. K.; MORKRID, L. Long-term stability of serum components in the Janus serum bank. **Scand. J. Clin. Lab.**, v. 68, n. 5, p. 402-409, september 2008.

GOODWIN, J.F.; MURPHY, B.; GUILLEMETTE, M. Direct measurement of serum iron and biling capacity. **Clin. Chem.**, v. 12, n. 2, p. 47 – 57, 1966.

GUBERN, G.; CANALIAS, F., GELLA, F. J. Determination of α -amylase activity: methods comparison and commutability study of several control materials. **Clin. Chem.**, v. 41, n. 3, p. 435-438, 1995.

HALLORAN, P.; ROETERING, H.; PISANI, T. M. S.; VAN DEN BERG, B.; COBBAERT, C. Reference standardization and analytical performance of a liquid homogeneous high-density lipoprotein cholesterol method compared with chemical precipitation method. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 123, n. 4, p. 317-326, 1999.

HANOK, A.; KUO, J. The stability of a reconstituted serum for the assay of fifteen chemistry constituents. **Clin. Chem.**, v. 14, n. 1, p. 58-69, 1968.

HARTMANN, A. E.; JUEL, R. D.; BARNETT, R. N. Long-term stability of a stabilized liquid quality-control serum. **Clin. Chem.**, v. 27, n. 8, p. 1448-1452, 1981.

HENRIKSEN, G. M.; PEDERSEN, M. M.; NORGAARD, I.; BLOM, M.; BLOU, L. BLAABJERGS, O.; ULDALL, A. Minimally processed fresh frozen human reference sera: preparation, testing, and application to international external quality assurance. **Scand. J. Clin. Lab.**, v. 64, n. 4, p. 293-308, 2004.

HIBBERT, D. B. **Quality assurance for the analytical chemistry laboratory**. New York: Oxford University Press, 2007. p. 1-226.

HUI, Y.H.; CLARY, C.; FARID, M. M.; FASINA, O. O.; NOOMHORM, A.; WELTI-CHAMES, J. **Food drying science and technology: Microbiology, chemistry, application**. Lancaster: DEStech Publications, 2008. p. 30.

IFCC: **Primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37°C**. **Clin Chem Lab Med**, v. 40, n. 7, p. 734-738, 2002a.

IFCC: **Primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37°C**. **Clin Chem Lab Med**, v. 40, n. 7, p. 718-724, 2002b.

IFCC: **Primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37°C**. **Clin Chem Lab Med**, v. 40, n. 7, p. 725-733, 2002c.

IFCC: **Primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37°C**. **Clin Chem Lab Med**, v. 40, n. 6, p. 643-648, 2002d.

INMETRO: Comissão técnica de análises clínicas e de patologia – CTLE-04. **BPLC: Boas práticas de laboratórios clínicos e listas de verificação para avaliação**. Rio de Janeiro: Qualitymark, 1997. 226 p.

JESPERSEN, J.; BERTINA, R. M.; HAVERKATE, F. **Laboratory techniques in thrombosis: a manual**. 2nd ed. USA: Kluwer Academic Publishers, 1999. p. 10.

JOHNSON, A. M. Necessity for high-quality reference materials in the harmonization of laboratory assays. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v. 48, n. 6, p. 747-748, 2010.

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.

KAPLAN, L. A. Urea. In: PESCE, A.J; KAPLAN, L.A. **Methods in clinical chemistry**. Washington: Mosby Company, 1987. p. 22-25.

KATEMAN, G.; BUYDENS, L. **Quality control in analytical chemistry**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1993. p. 1-12.

KAZMIERCZAK, S. C.; LOTT, J. A. Alkaline phosphatase. In: PESCE, A.J; KAPLAN, L.A. **Methods in clinical chemistry**. Washington: Mosby Company, 1987. p. 1074-1077.

KENKEL, J. **Analytical chemistry for technicians**. 3rd ed. Flórida: Lewis Publisher, 2003. 554 p.

KHAN, M. A. U.; KHAN, F. A. Low cost quality control human serum: method of preparation, validation of values and its comparison with the commercial control serum. **JPMA.**, v. 54, n. 7, p. 375, 2004.

KOCH, D. D.; ORYALL, J. J.; QUAM, E. F.; FELDBRUEGGE, D. H. DOWD, D. E.; BARRY, P. L.; WESTGARD, J. O. Selection of medically useful quality- control procedures for individual tests done in a multitest analytical system. **Clin. Chem.**, v. 36, n. 2, p. 230-232, 1990.

KOCHSIEK, M.; GLASER, M. **Handbook of metrology**. Weinheim: Wiley-VCH, 2010. p. 148-150.

KOLESKE, J. V. **Paint and coating testing manual**. 14th ed. Philadelphia: American Society for testing and material, 1995. p. 289-297.

KOLLER, A.; KAPLAN, L. A. Total serum protein. In: PESCE, A.J; KAPLAN, L.A. **Methods in clinical chemistry**. Washington: Mosby Company, 1987. p. 1134-1136.

KONIECZKA, P.; NAMIESNIK, J. Quality assurance and quality control in the analytical chemistry laboratory: a practical approach. New Work: Taylor & Francis, LLC, 2009. 233p.

KORZUN, W. J.; MILLER, W. G. Sodium and potassium. In: PESCE, A.J; KAPLAN, L.A. **Methods in clinical chemistry**. Washington: Mosby Company, 1987. p. 86-89.

KROLL, M. H.; CHESLER, R.; ELIN, R. J. Effect of lyophilization on results of five enzymatic methods for cholesterol. **Clin. Chem.**, v. 35, n. 7, p. 1523-1526, 1989.

KUCHMAK, M.; TAYLOR L.; OLANSKY, A. S. Suitability of frozen and lyophilized reference sera for cholesterol and triglyceride determinations. **Clin. Chim. Acta.**, v. 120, p. 261-271, 1982.

LEARY, N. O.; PEMBROKE, A.; DUGGAN, P. F. Single stable reagent (arsenazo III) for optically robust measurement of calcium in serum and plasma. **Clin. Chem.**, v. 38, n. 6, p. 904-907, 1992.

LINKO, S. **Measurement tools for quality assurance in medical laboratories**. 2003. 99f. Dissertation (Academic) - Medical Faculty of the University of Helsinki, Finland, 2003.

MARCOVINA, S. M; ADOLPHSON, J.L.; PARIAVECCHIA, M; ALBERS J.J. Effects of lyophilization of serum on the measurement of apolipoproteins A-I and B. **Clin. Chem.**, v. 36, n. 2, p. 366 - 369, 1990.

MARSHALL, W. J.; BANGERT, K. **Clinical chemistry**. 6th ed., Philadelphia: Elsevier, 2008. p. 1-2.

MASSION, C. G.; FRANKENFELD, J. K. Alkaline phosphatase: lability in fresh and frozen human serum and in lyophilized control material. **Clin. Chem.**, v. 18, n. 4, p. 366-373, 1972.

MATEJTSCHUK, P.; ANDERSEN, M.; PHILLIPS, P. Freeze-drying of biological standards. In: REY, L.; MAY, J. C. (Ed.). **Freeze-drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products**. 2th ed. New York: Informa Healthcare USA, 2007. p. 385-424. v. 137.

MCGOWAN, M. W.; ARTISS, J. D.; STRANDBERG, D. R.; ZAK, B. A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. **Clin. Chem.**, v. 29, n. 3, p. 538-542, 1983.

MENDES, M.E.; GARTNER, M.T.; SUMITA, N.M.; SÁNCHEZ, P. B. **Gestão por processos no laboratório clínico: uma abordagem prática**. São Paulo: EPR, 2007. 224p.

MILLER, W. G.; LEVINE, J. B.; SANTULLI, M.; FLOM, K. J.; GREENBERG, N.; KESSNER, A.; O'NEAL, W. R.; WIEBE, D. A.; ADILETTO, C. Effect of freezing on cholesterol in individual sera. **Clin. Chem.**, v. 37, n. 4, p. 584-585, 1991.

MILLER, W. G. How useful are reference materials? **Clin. Chem.**, v. 42, n. 11, p. 1733-1734, 1996.

MILLER, W. G.; MYERS, G.L.; REJ, R. Why commutability matters. **Clin. Chem.**, v. 52, n. 4, p. 553-554, 2006.

MITRA, S. **Sample preparation techniques in analytical chemistry**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2003. p. 25-36.

MORISHITA, Y.; IINUMA, Y.; NAKASHIMA, N.; MAJIMA, K.; MIZUGUCHI, K.; KAWAMURA, Y. Total and pancreatic amylase measured with 2-chloro-4-nitrophenyl-4-O- β -D-galactopyranosylmaltoside. **Clin. Chem.**, v. 46, n. 7, p. 928-933, 2000.

MULLINS, E. **Statistic for the quality control chemistry laboratory**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2003. p. 1-85.

MUNOZ, M. A.; BALÓN, M.; FERNANDEZ, C. Direct determination of inorganic phosphorus in serum with a single reagent. **Clin. Chem.**, v. 29, n. 2, p. 372 - 374, 1983.

MURRAY, R. L. Alanine aminotransferase. In: PESCE, A.J.; KAPLAN, L.A. **Methods in clinical chemistry**. Washington: Mosby Company, 1987a. p. 1062-1064.

MURRAY, R. L. Aspartate aminotransferase. In: PESCE, A.J.; KAPLAN, L.A. **Methods in clinical chemistry**. Washington: Mosby Company, 1987b. p. 1093-1096.

MURRAY, R. L. Creatinine. In: PESCE, A.J.; KAPLAN, L.A. **Methods in clinical chemistry**. Washington: Mosby Company, 1987c. p. 10-14.

MYERS, G. L.; MILLER, W. G.; CORESH, J.; FLEMING, J.; GREENBERG, N. GREENE, T.; HOSTETTER, T.; LEVEY, A. S.; PANTEGHINI, M.; WELCH, M.; ECKFELDT, J. H. Recommendations for improving serum creatinine measurement: a report from the laboratory working group of the National Kidney Disease Education Program. **Clin. Chem.**, v. 52, n. 1, p. 5 - 18, 2006.

OETJEN, G. W.; HASELEY, P. **Freeze-drying**. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH. Verlag Embt & Co. KGaA, 2004. p. 1-2.

OLIVEIRA, J. C. V. **Vocabulário Internacional de Metrologia**: conceitos fundamentais e gerais e termos associados (VIM 2008). Rio de Janeiro: INMETRO, 2009. 78 p. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/metcientifica>. Acesso em: 08 out. 2010.

PANTEGHINI, M. Application of traceability concepts to analytical quality control may reconcile total error with uncertainty of measurement. **Clin. Chem.**, v. 48, n. 1, p. 7-10, 2010.

PARVIN, C. A. Quality-Control (QC) performance measures and the QC planning process. **Clin. Chem.**, v. 43, n. 4, p. 602-607, 1997.

PARVIN, C. A. Assessing the impact of the frequency of quality control testing on the quality of reported patient results. **Clin. Chem.**, v. 54, n. 12, p. 2049-2054, 2008.

PERROTTA, G. Iron and iron-binding capacity. In: PESCE, A.J; KAPLAN, L.A. **Methods in clinical chemistry**. Washington: Mosby Company, 1987. p. 1258-1260.

PERRY, BW; DOUMAS, B. T.; BAYSE, D. D.; BUTLER, T.; COHEN, A.; FELLOWS, W.; GARBER, C. C.; HOWELL, B.; KOCH, T.; KRISHNAMURTHY, S.; LOUDERBACK, A.; MCCOMB, R. B.; MILLER, R. R.; RAND, R. N.; SCHAFFER, R. A candidate reference method for determination of bilirubin in serum. Test for transferability. **Clin. Chem.**, v. 29, n. 2, p. 297-301, 1983.

PESCE, A.J; Lactate dehydrogenase. In: PESCE, A.J; KAPLAN, L.A. **Methods in clinical chemistry**. Washington: Mosby Company, 1987. p. 903-905.

PESCE, A.J; GENDLER, S. M. Gamma-glutamyl transferase. In: PESCE, A.J; KAPLAN, L.A. **Methods in clinical chemistry**. Washington: Mosby Company, 1987. p. 1120-1122.

PETERSEN, P.H., FRASER, C.G. Setting quality standards in clinical chemistry: can competing models based on analytical, biological, and clinical outcomes be harmonized? **Clin. Chem.**, v. 40, n. 10, p. 1865-1868, 1994.

PETERSEN, P. H.; BLAABJERG, O.; IRJALA, K.; ICÉN, A; BJORO, K. Elements of analytical quality. **Upsala J. Med. Sci.**, v. 99, p. 209-230, 1994.

QUAM, E. F. QC: The materials. In: WESTGARD, J. O. **Basic QC practices**. 3rd ed. Madison: Westgard QC, 2010. 352 p.

RAND, R. N.; PASQUA, A. A new diazo method for the determination of bilirubin. **Clin. Chem.**, v. 8, n. 6, p. 570-578, 1962.

RANDOLPH, T. W. Phase separation of excipients during lyophilization: effects on protein stability. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, n. 11, p. 1198-1203, 1997.

RIFAI, N.; WARNICH, G. R.; DOMINIAZAK, M. H. **Handbook of lipoprotein testing**. 2nd ed. USA: American Association for Clinical Chemistry, 2000. p. 695-715.

RICÓS, C.; JUVANY, R.; ÁLVAREZ, V.; JIMÉNEZ, C. V.; PERICH, C.; MINCHINELA, J.; HERNÁNDEZ, A.; SIMÓN, M.: Commutability between stabilized materials and fresh human serum to improve laboratory performance. **Clin. Chem. Acta**, v. 263, p. 225-238, 1997.

RICÓS, C.; JUVANY, R.; SIMÓN, M.; HERNÁNDEZ, A.; ÁLVAREZ, V.; JIMÉNEZ, C. V.; MINCHINELA, J.; PERICH, C. Commutability and traceability: their repercussions on analytical bias and inaccuracy. **Clin. Chem. Acta**, v. 280, n. 1-2, p. 135-145, 1999.

RODKEY, F.L. Direct spectrophotometric determination of albumin in human serum. **Clin. Chem.**, v. 11, n. 4, p. 478-487, 1965.

RUSSELL, J. B. **Química Geral**. 2.ed. São Paulo: Makron Books do Brasil, 1994. p. 40-42. v. 1.

SADLER, W. A. Imprecision profiling. **Clin Biochem**, v. 29, suppl. (i), p. 33-36, 2008.

SCHULTZ, A. L. Uric acid. In: PESCE, A.J; KAPLAN, L.A. **Methods in clinical chemistry**. Washington: Mosby Company, 1987. p. 27-29.

SHEPHARD, M. D. S.; WHITING, M. Falsely low estimation of triglycerides in lipemic plasma by the enzymatic triglyceride method with modified Trinder's chromogen. **Clin. Chem.**, v. 36, n. 2, p. 325-329, 1990.

SHERWIN, J. E.; OVERNOLTE, R. In: KAPLAN, L.A.; PESCE, A.J. **Química clínica: teoria, análisis y correlacion**. Buenos Aires: Médica-Panamericana, 1986. p. 1458-1468.

SINGH, H. P.; HEBERT, M. A.; GAULT, M. H. Effect of some drugs on clinical laboratory values as determined by the Technicon SMA 12/60. **Clin. Chem.**, v. 18, n. 2, p. 137-144, 1972.

SINGH, S. K. **Industrial instrumentation and control**. 3rd ed. New Delhi: McGraw-Hill, 2009. p. 243-246.

SMITH, A. F.; FOGG, B. A. Possible mechanisms for the increase in alkaline phosphatase activity of lyophilized control material. **Clin. Chem.**, v. 18, n. 12, p. 1518-1523, 1972.

SZASZ, G. A kinetic photometric method for serum γ -glutamyl transpeptidase. **Clin. Chem.**, v. 15, n. 2, p. 124 - 136, 1969.

TABAK, J. **Probability and statistic: the science of uncertainty**. New York: Fast on File Math Library, 2004. p. 154-164.

TAMBWEKAR, S. **Handbook of quality assurance in laboratory medicine**. New Delhi: Ed. BI Publications PVT, 2009. 201p.

TATTINI JUNIOR, V. **Efeito da liofilização sobre a estrutura e mudanças de fase da albumina bovina modificada por reação com metoxi-poli(etilenoglicol)**. 2004. 67 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia da Fermentação). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

TAYLOR, J. K.; CIHON, C. **Statistical techniques for data analysis**. 2nd ed. West Haven: Chapman & Hall/CRC., 2004, 273 p.

THIENPONT, L. M.; STOCKL, D.; FRIEDECKY, B. KRATOCHVILA, J. BUDINA, M. Trueness verification in European external quality assessment schemes: time to care about the quality of the samples. **Scand. J. Clin. Lab.**, v. 63, n. 3, p. 195-202, 2003.

THOMPSON, M., WOOD, R. Harmonized guidelines for internal quality control in analytical chemistry laboratories. **Pure & Appl. Chem.**, v. 67, n. 4, p. 649-666, 1995.

TIBÚRCIO, H. M. **Controle interno da qualidade analítica**. 1995. p. 8–11.

TONKS, D.T. A study of the accuracy and precision of clinical chemistry determinations in 170 canadian laboratories. **Clin. Chem.**, v. 9, n. 2, p. 217-233, 1963.

TRAVNICKOVA, D. Processes assessment and monitoring in a clinical laboratory. **Kvalita Inovácia Prosperita/Quality Innovation Prosperity**, v. 13, n. 1, p. 1-14, 2009.

TRINDER, P. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. **J. Clin. Pathol.**, v. 22, v. 2, p. 158 – 161, 1969.

VARCOE, J. S. **Clinical biochemistry: techniques and instrumentation**. Singapore: Word Scientific Publishing, 2001. p. 5(1)-5(5).

VERNET-NYSSSEN, M. Is commercial serum suitable for quality control of serum total iron-binding capacity? **Clin. Chem.**, v. 29, n. 3, p. 573-574, 1983.

VESPER, H. W.; MILLER, W. G.; MYERS, G. L. Reference materials and commutability. **Clin. Biochem.**, v. 28, p. 139-147, Nov. 2007.

VESPER, H. W.; THIENPONT, L. M. Traceability in laboratory medicine. **Clin. Chem.**, v. 55, n. 6, p. 1067-1075, 2009.

WARNICK, G. R.; MAYFIELD, C.; ALBERS, J. J. Evaluation of quality-control materials for high-density-lipoprotein cholesterol quantitation. **Clin. Chem.**, v. 27, n. 1, p. 116-123, 1981.

WAYMACK, P. P.; MILLER, W. G.; MYERS, G. L. Assay instrument-dependent matrix effects in standardization of cholesterol measurements. **Clin. Chem.**, v. 39, n. 10, p. 2058-2062, 1993.

WESTGARD, J. O.; FALK, H.; GROTH, T. Influence of a between-run component of variation, choice of control limits, and shape of error distribution on the performance characteristic of rules for internal quality control. **Clin. Chem.**, v. 25, n. 3, p. 394-400, 1979.

WESTGARD, J. O.; BARRY, P. L.; HUNT, M. R. A multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry. **Clin. Chem.**, v. 27, n. 3, p. 493-501, 1981.

WESTGARD, J. O.; BURNETT, R. W.; BOWERS, G. N. Quality management science in clinical chemistry: a dynamic framework for continuous improvement of quality. **Clin. Chem.**, v. 36, n. 10, p. 1712-1716, 1990a.

WESTGARD, J. O.; ORYALL, J. J.; KOCH, D. D. Predicting effects of quality control practices on the cost-effective operation of a stable, multitest analytical system. **Clin. Chem.**, v. 36, n. 10, p. 1760-1764, 1990b.

WESTGARD, J.O.; STEIN, B. Automated selection of statistical quality-control procedures to assure meeting clinical or analytical quality requirements. **Clin. Chem.**, v. 43, n. 2, p. 400-403, 1997.

WESTGARD, J. O.; EHRMEYER, S. S.; DARCY, T. P. **CLIA final rules for quality systems**. 5th ed. Wisconsin: Westgard QC, 2004. p.212.

WESTGARD, J. O.; KLEE, G. G. Quality Management. In: BURTIS, C. A.; ASHWOOD E. R.; BRUNS, D. E. (Ed.). **Tietz**: Textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. 4th ed. USA: Elsevier Saunders, 2006. p. 485-529.

WESTGARD, J.O. **Basic QC practices**. 3rd ed. Madison: Westgard, 2010. 352 p.

WILSON, S. S.; GUILLAN, R. A.; HOCKER, E. V. Studies of the stability of 18 chemical constituents of human serum. **Clin. Chem.**, v. 18, n. 12, p. 1498-1503, 1972.

YAMAGUCHI, M.; WAKASUGI, J.; SAKAKIMA, J. Competitive and product inhibition-based α -amylase activity analyses method. **Clin. Bioch.**, v. 41, n. 4-5, p. 325-330, 2008.

YOUNG, D. S.; BERMES, E. W. Colheita e processamento de amostras: fontes de variação biológica. In: BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R. **Tietz**: Fundamentos de química clínica. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 33.

ZSCHUNKE, A. **Reference materials in analytical chemistry**. A guide for Selection and use. New York: Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2000. p. 1-22.

S. Ineros

Tabela 3 - Valores das médias e desvios padrão dos parâmetros bioquímicos para T_i, T₀ e T₁₃ no soro sem preservante (SP) para os diferentes processos de conservação. Nível de confiança de 95%.

Analito	T _i	≤ -18°C		≤ -80°C		2 - 8°C – Liof.	
		T ₀	T ₁₃	T ₀	T ₁₃	T ₀	T ₁₃
Ac. úrico (mg/dL)	4,97 ± 0,03	5,02 ± 0,09	5,04 ± 0,12	5,03 ± 0,08	5,01 ± 0,09	5,05 ± 0,03	5,05 ± 0,03
Albumina (g/dL)	4,10 ± 0,02	4,26 ± 0,05	4,29 ± 0,10	4,28 ± 0,05	4,27 ± 0,05	4,14 ± 0,04	4,14 ± 0,05
ALP (U/L)	65,00 ± 1,41	62,72 ± 4,19	62,09 ± 4,86	64,96 ± 4,19	65,66 ± 4,62	44,14 ± 3,72	43,40 ± 3,88
ALT (U/L)	21,75 ± 1,26	19,05 ± 2,26	17,86 ± 3,36	23,18 ± 1,40	22,43 ± 2,13	21,05 ± 2,15	20,66 ± 2,13
Amilase (U/dL)	75,00 ± 0,82	87,59 ± 0,85	87,60 ± 0,91	87,50 ± 1,22	87,60 ± 1,29	81,23 ± 1,88	80,91 ± 1,96
AST (U/L)	30,25 ± 1,50	34,91 ± 1,11	35,29 ± 1,69	35,86 ± 1,52	35,71 ± 1,43	36,05 ± 1,59	35,94 ± 1,59
Bili. Direta (mg/dL)	0,15 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,17 ± 0,03	0,18 ± 0,01	0,18 ± 0,02	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,01
Bili. Total (mg/dL)	0,41 ± 0,02	0,50 ± 0,03	0,50 ± 0,03	0,51 ± 0,04	0,52 ± 0,04	0,61 ± 0,05	0,61 ± 0,05
Cálcio (mg/dL)	9,14 ± 0,09	9,98 ± 0,11	9,98 ± 0,12	10,03 ± 0,15	10,01 ± 0,15	9,71 ± 0,10	9,73 ± 0,15
Cap. Lig. Ferro (µg/dL)	231,25 ± 3,95	248,41 ± 7,56	244,66 ± 10,28	248,55 ± 8,48	244,11 ± 12,11	195,86 ± 10,03	191,60 ± 11,11
Colesterol (mg/dL)	180,50 ± 6,40	188,73 ± 5,39	188,37 ± 6,97	183,23 ± 5,32	183,97 ± 5,61	166,00 ± 1,69	165,89 ± 1,69
Creatinina (mg/dL)	0,71 ± 0,01	0,94 ± 0,03	0,94 ± 0,06	0,95 ± 0,02	0,94 ± 0,04	0,89 ± 0,02	0,89 ± 0,03
Ferro (µg/dL)	101,75 ± 2,63	108,82 ± 6,77	109,17 ± 6,30	106,68 ± 2,21	106,57 ± 2,75	108,46 ± 1,60	108,71 ± 1,67
Fósforo (mg/dL)	3,19 ± 0,12	3,98 ± 0,13	3,98 ± 0,17	3,94 ± 0,09	3,92 ± 0,10	4,86 ± 0,06	4,86 ± 0,06
GGT (U/L)	36,75 ± 0,50	37,91 ± 0,87	37,49 ± 1,01	37,23 ± 0,61	37,17 ± 0,79	34,14 ± 1,25	33,57 ± 1,00
Glicose (mg/dL)	85,50 ± 0,58	98,77 ± 1,07	98,57 ± 1,29	99,27 ± 1,42	99,31 ± 1,51	91,32 ± 1,36	90,83 ± 1,56
HDL-Col. (mg/dL)	44,75 ± 0,96	48,86 ± 2,95	49,40 ± 2,87	47,82 ± 1,33	48,34 ± 1,59	51,77 ± 3,64	50,71 ± 3,78
LD (U/L)	309,00 ± 2,89	320,86 ± 9,40	309,20 ± 19,3	342,77 ± 5,61	341,37 ± 9,17	291,27 ± 7,49	289,60 ± 10,02
Potássio (mEq/L)	4,51 ± 0,01	4,53 ± 0,04	4,53 ± 0,04	4,54 ± 0,05	4,54 ± 0,04	4,22 ± 0,04	4,22 ± 0,04
Prot. Totais (g/dL)	6,96 ± 0,05	7,77 ± 0,06	7,76 ± 0,08	7,84 ± 0,05	7,84 ± 0,06	7,73 ± 0,09	7,72 ± 0,09
Sódio (mEq/L)	141,00 ± 0,41	140,28 ± 0,30	140,33 ± 0,32	142,46 ± 0,51	142,47 ± 0,48	130,53 ± 0,50	130,54 ± 0,45
Triglicérides (mg/dL)	139,75 ± 3,78	150,55 ± 3,75	151,78 ± 5,04	151,91 ± 5,24	150,89 ± 5,68	136,73 ± 4,23	136,20 ± 3,99
Uréia (mg/dL)	28,25 ± 0,96	28,96 ± 1,21	28,69 ± 1,28	29,14 ± 1,08	29,14 ± 1,09	26,23 ± 0,92	26,34 ± 0,94

T_i: médias e desvios padrão sem os processos investigados; T₀: médias e desvios padrão das determinações diárias por 30 dias; T₁₃: médias e desvios padrão cumulativos dos 300 dias de monitoramento.

Tabela 4 - Valores das médias e desvios padrão dos parâmetros bioquímicos para T_i, T₀ e T₁₃ no soro com preservante (CP) para os diferentes processos de conservação. Nível de confiança de 95%.

Analitos	T _i	≤ -18°C		≤ -80°C		2 - 8°C – Liof.	
		T ₀	T ₁₃	T ₀	T ₁₃	T ₀	T ₁₃
Ac. úrico (mg/dL)	4,96 ± 0,03	5,35 ± 0,03	5,35 ± 0,03	5,36 ± 0,03	5,36 ± 0,03	5,06 ± 0,02	5,06 ± 0,02
Albumina (g/dL)	4,12 ± 0,02	4,27 ± 0,02	4,27 ± 0,02	4,28 ± 0,04	4,28 ± 0,04	4,18 ± 0,03	4,18 ± 0,03
ALP (U/L)	65,75 ± 2,50	62,90 ± 4,87	61,86 ± 5,64	64,46 ± 4,58	64,34 ± 5,36	43,82 ± 2,74	43,40 ± 3,01
ALT (U/L)	21,25 ± 1,89	20,09 ± 2,33	18,23 ± 3,98	22,86 ± 1,94	22,20 ± 3,06	22,09 ± 1,09	22,06 ± 0,94
Aamilase (U/dL)	75,75 ± 0,96	87,27 ± 0,94	87,43 ± 1,20	87,77 ± 1,23	87,91 ± 1,27	82,32 ± 1,64	82,06 ± 1,85
AST (U/L)	31,00 ± 1,63	34,4 ± 1,47	34,49 ± 1,74	36,23 ± 1,72	35,86 ± 1,78	36,41 ± 1,47	36,26 ± 1,44
Bili. Direta (mg/dL)	0,15 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,17 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,16 ± 0,01
Bili. Total (mg/dL)	0,47 ± 0,08	0,49 ± 0,04	0,50 ± 0,04	0,52 ± 0,03	0,52 ± 0,03	0,66 ± 0,05	0,67 ± 0,05
Cálcio (mg/dL)	9,18 ± 0,09	10,04 ± 0,12	10,03 ± 0,15	10,07 ± 0,10	10,06 ± 0,12	9,77 ± 0,14	9,79 ± 0,15
Cap. Lig. Ferro (µg/dL)	234,00 ± 4,24	246,32 ± 8,01	242,20 ± 10,60	245,27 ± 6,46	241,14 ± 10,86	165,64 ± 9,90	163,49 ± 11,64
Colesterol (mg/dL)	192,25 ± 2,87	181,20 ± 4,85	181,74 ± 5,62	178,09 ± 2,16	178,31 ± 2,27	166,59 ± 1,71	166,71 ± 1,96
Creatinina (mg/dL)	0,73 ± 0,01	0,96 ± 0,01	0,96 ± 0,04	0,96 ± 0,02	0,95 ± 0,04	0,87 ± 0,02	0,88 ± 0,04
Ferro (µg/dL)	101,75 ± 2,06	104,32 ± 1,70	105,20 ± 2,22	103,86 ± 2,27	104,23 ± 2,30	106,41 ± 1,30	106,49 ± 1,29
Fósforo (mg/dL)	3,20 ± 0,11	4,01 ± 0,06	4,00 ± 0,07	4,01 ± 0,06	4,01 ± 0,06	4,88 ± 0,04	4,88 ± 0,04
GGT (U/L)	37,75 ± 0,50	37,00 ± 0,82	36,69 ± 1,05	37,55 ± 0,91	37,34 ± 1,00	33,73 ± 1,72	33,51 ± 1,52
Glicose (mg/dL)	85,50 ± 0,58	99,40 ± 1,22	99,20 ± 1,21	99,64 ± 0,95	99,57 ± 0,92	91,59 ± 1,30	91,49 ± 1,34
HDL-Col. (mg/dL)	47,75 ± 2,06	51,59 ± 2,72	51,57 ± 2,84	51,59 ± 2,87	51,46 ± 2,64	49,77 ± 2,86	49,43 ± 2,58
LD (U/L)	310,00 ± 2,16	325,00 ± 8,18	312,74 ± 21,28	342,32 ± 5,00	341,26 ± 8,06	291,05 ± 6,56	290,51 ± 6,29
Potássio (mEq/L)	4,51 ± 0,02	4,53 ± 0,02	4,53 ± 0,02	4,54 ± 0,02	4,54 ± 0,02	4,29 ± 0,03	4,28 ± 0,03
Prot. Totais (g/dL)	6,94 ± 0,03	7,82 ± 0,10	7,81 ± 0,11	7,88 ± 0,06	7,87 ± 0,06	7,89 ± 0,05	7,90 ± 0,05
Sódio (mEq/L)	143,55 ± 0,67	144,70 ± 0,53	144,71 ± 0,53	145,15 ± 0,42	145,07 ± 0,43	135,85 ± 0,37	135,81 ± 0,36
Triglicérides (mg/dL)	143,50 ± 4,73	155,90 ± 3,97	155,83 ± 4,06	155,14 ± 3,11	155,31 ± 3,48	143,86 ± 3,34	144,11 ± 3,28
Uréia (mg/dL)	29,25 ± 1,50	28,09 ± 0,75	28,29 ± 0,89	29,05 ± 0,72	29,14 ± 1,14	26,23 ± 1,07	26,40 ± 1,17

T_i: médias e desvios padrão sem os processos de conservação investigados; T₀: médias e desvios padrão das determinações diárias por 30 dias; T₁₃: médias e desvios padrão cumulativos dos 300 dias de monitoramento.