**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

KATIA TEIXEIRA DE MEIROZ GRILO

**Determinação da concentração de hemoglobina livre em concentrados de hemácias pela
espectrofotometria direta: método de Harboe**

Ribeirão Preto

2016

KATIA TEIXEIRA DE MEIROZ GRILO

**Determinação da concentração de hemoglobina livre em concentrados de hemácias pela
espectrofotometria direta: método de Harboe**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de Mestre
em Hemoterapia.

Área de Concentração: Hemoterapia
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Kelen Cristina Ribeiro
Malmegrim de Farias

**Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da
Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da
USP (BDTD).**

Ribeirão Preto

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA
FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

G858d

Grilo, Katia Teixeira de Meiroz

Determinação da concentração de hemoglobina livre em concentrados
de hemácias pela espectrofotometria direta: método de Harboe./ Katia
Teixeira de Meiroz Grilo – Ribeirão Preto, 2016.

115f.; il. 30cm

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Área de concentração: Hemoterapia e Medicina Transfusional
Orientadora: Kelen Cristina Ribeiro Malmegrim de Farias

1. Concentrado de hemácias. 2. Hemoglobina livre. 3.
Espectrofotometria direta. 4. Hemólise

CDU 616.15

FOLHA DE APROVAÇÃO

Katia Teixeira de Meiroz Grilo

Determinação da concentração de hemoglobina livre em concentrados de hemácias pela espectrofotometria direta: método de Harboe

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Mestrado Profissional em Hemoterapia e Biotecnologia para obtenção do título de Mestre em Hemoterapia.

Aprovado em: 25 de novembro de 2016.

Banca Examinadora

Prof.^a Dr.^a Cleni Mara Marzocchi Machado

Assinatura

Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Ribeirão Preto, Universidade de São
Paulo (FCFRP-USP)

Prof.^a Dr.^a Elisa Maria de Sousa Russo

Assinatura

Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Ribeirão Preto, Universidade de São
Paulo (FCFRP-USP)

Prof.^a Dr.^a Maria Suely Soares Leonart

Assinatura

Instituição: Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências da Saúde, Departamento de
Análises Clínicas (UFPR)

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu pai Abdon, à minha mãe Marta e aos meus filhos Isabela e Bruno.

Agradecimentos

A realização desta dissertação envolveu um número considerável de pessoas. A todos que direta ou indiretamente, às vezes de maneira anônima, contribuíram para a conclusão deste projeto, apresento meus agradecimentos.

Ao Governo do Estado do Paraná e à Secretaria de Estado da Saúde, representados pelo governador Carlos Alberto Richa e pelo secretário da Saúde Michele Caputo, os quais, em razão da política de governo que prioriza a formação educacional dos servidores públicos estaduais, viabilizaram a minha participação no curso de mestrado.

À Coordenação Geral do Sangue e Hemoderivados do Ministério da Saúde, por proporcionar aos profissionais da hemorrede pública nacional o primeiro mestrado profissional em hemoterapia em parceria com a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, e o Hemocentro de Ribeirão Preto.

Ao coordenador do Programa de Pós-graduação em Hemoterapia e Biotecnologia, professor doutor Rodrigo Tocantins Calado, ao vice-coordenador, professor doutor Dimas Tadeu Covas e à coordenadora da Área de Hemoterapia, doutora Eugênia Maria Amorim Ubiali, pela realização de um mestrado de excelência.

À equipe profissional do Centro de Educação do Hemocentro de Ribeirão Preto – CEDUC, pela organização do curso de mestrado, acompanhamento e suporte aos alunos mestrandos.

Aos docentes responsáveis pelas disciplinas do programa curricular do mestrado, pelo repasse de informações especializadas das várias áreas da hemoterapia, proporcionando aos mestrandos um sólido embasamento teórico e prático.

À professora doutora Kelen Cristina Ribeiro Malmegrim de Farias, pela valiosa orientação da pesquisa, formulação de ideias, apoio e consolidação deste projeto.

Estendo meus agradecimentos à doutora Maria Ângela Pignata Ottoboni, detentora de vasto conhecimento na área do controle de qualidade de hemocomponentes, pela coorientação deste

trabalho, pelos ensinamentos e disponibilização do laboratório para a realização dos testes comparativos desta pesquisa.

À professora doutora Ana Luísa Lacava Lordello, do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná, que me recebeu várias vezes para esclarecimentos teóricos sobre espectrofotometria, absortividade e entendimento das fórmulas, além de disponibilizar importantes referências bibliográficas de sua biblioteca pessoal.

Ao Instituto de Tecnologia do Paraná – TECPAR, representado pelo químico Israel Mendes, coordenador do Laboratório de Alimentos, por disponibilizar o laboratório e o espectrofotômetro para as dosagens deste estudo.

Ao farmacêutico-bioquímico Paulo Roberto Hatschbach, diretor do HEMEPAR e à farmacêutica-bioquímica Anália Maria Breckenfeld Machado, chefe da Divisão de Produção, pela amizade, apoio e confiança de sempre.

Ao farmacêutico-bioquímico Milton Augusto Túlio, a quem eu chamo carinhosamente de Professor Pardal, pela parceria no desenvolvimento do tema deste estudo, pela amizade e pela dedicação imensurável ao controle de qualidade de hemocomponentes do HEMEPAR.

À Liliane Fromholz e Selma Oliveira, colegas de longa data no laboratório de controle de qualidade de hemocomponentes do HEMEPAR, pela amizade, competência e prestatividade.

Aos farmacêuticos-bioquímicos Adriana de Araújo Buchmann e Jacson Candioto, que assumiram o laboratório de controle de qualidade de hemocomponentes quando deste me afastei, em 2013, para nova empreitada na Divisão de Pesquisa Técnica e Científica do HEMEPAR.

A todos os amigos e colegas da Divisão de Produção do HEMEPAR, especialmente da Área do Processamento do Sangue.

À socióloga Alzira Hommerding e à farmacêutica-bioquímica Marli Jacober Pasqualin, companheiras da Divisão de Gestão da Pesquisa Técnica e Científica do HEMEPAR, pela

amizade, incentivo e por assumirem a responsabilidade da DVPTC nas minhas ausências durante o período de aulas do curso regular de mestrado.

À biomédica Letícia Sarni Roque, do Laboratório de Controle de Qualidade do Hemocentro de Ribeirão Preto, pela execução das dosagens da hemoglobina plasmática para análise comparativa deste projeto.

À bióloga Andréa Fernanda Origa, autoridade em controle de qualidade de hemocomponentes e coordenadora do Laboratório de Controle de Qualidade de Hemocomponentes do Hemocentro de Campinas - UNICAMP, pela realização de ensaios para a verificação de resultados.

À doutora Flávia Naves Givisiez e à farmacêutica-bioquímica Gabriela Coelho Rezende, expertises em controle de qualidade de hemocomponentes, da Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais – HEMOMINAS, pela realização de ensaios para a conferência de resultados.

À doutora Ruby Pietersz, do Banco de Sangue de Sanquin em Amsterdam pelas indicações de literatura e presteza em responder meus e-mails.

À pesquisadora tecnologista Iakyrá Borrakuens Couceiro, chefe da Divisão de Metrologia Óptica do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), pelo fornecimento de informações relevantes acerca de calibração de espectrofotômetros.

Ao fotógrafo Venilton Kuchler, da Assessoria de Comunicação da Secretaria de Estado da Saúde do Paraná, pelas fotografias em alta resolução que ilustraram o trabalho e que compõem o Guia visual para avaliação da hemólise.

Às bibliotecárias Marjory Cristina Donato, da Biblioteca do Hemocentro de Ribeirão Preto e Helenice Hannemann, da Biblioteca do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pela prontidão na disponibilização de artigos científicos.

À doutora Miriam Ribas Zambenedetti, farmacêutica-bioquímica responsável pelo Controle de Qualidade da Sorologia e do NAT do HEMEPAR, especialista em biologia molecular, pela

candura, apoio e afeto que foram fundamentais para a superação de minhas dificuldades na elaboração desta dissertação.

Ao professor doutor Aguinaldo José do Nascimento, professor aposentado do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, engenheiro agrônomo com amplos conhecimentos em bioquímica e bioestatística para a área da saúde, pela enorme solicitude, não apenas na elaboração da análise estatística dos resultados, como também na revisão do texto da dissertação.

À professora doutora Maria Suely Soares Leonart, pelos ensinamentos transmitidos ao longo de três décadas, desde a faculdade (1983), quando foi minha professora de hematologia, e até hoje, já aposentada da docência universitária, pela inestimável ajuda, demonstrada na permanente disponibilidade para o auxílio no ordenamento e revisão deste trabalho.

RESUMO

Grilo, K. T. de M. **Determinação da concentração de hemoglobina livre em concentrados de hemácias pela espectrofotometria direta: método de Harboe**. 2016. 115p. Dissertação (Mestrado Profissional) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

O grau de hemólise (GH) é um dos parâmetros de qualidade de concentrados de hemácias (CH). Conforme a Portaria 158/2016, ao menos 1% da produção mensal de CH deve ser controlada para o GH e 75% desta parcela deve apresentar resultado inferior a 0,8% de hemólise em relação à massa eritrocitária no último dia de validade do CH. O GH é definido como a porcentagem de hemoglobina livre (HbL) em relação à hemoglobina total (HbT) com a devida correção do volume globular do CH. O método analítico utilizado para a dosagem da HbL pela maioria dos hemocentros da rede pública nacional não referencia a fonte bibliográfica consultada. A hemoglobina liberada dos eritrócitos devido à hemólise é tóxica e desencadeia reações fisiopatológicas, resultando em implicações clínicas com gravidade que varia em função do grau de hemólise e do volume de hemácias transfundidas. O objetivo deste estudo foi avaliar os resultados de três metodologias analíticas espectrofotométricas para a determinação da HbL. Foram comparados o método de espectrofotometria direta de Harboe, o método de espectrofotometria direta de Cinco comprimentos de onda (5CO) e o método espectrofotométrico de Primeira derivada (1ªD). Os métodos de Harboe e de 5CO utilizam fórmulas matemáticas que convertem diretamente as absorbâncias lidas no espectrofotômetro UV/Visível em concentração de HbL. O método de 1ªD requer espectrofotômetro de varredura para a visualização dos espectros e a concentração da HbL é dada pelo valor referente à distância entre o vale e o pico de absorção da hemoglobina e do fator de correção, resultante de curva de calibração. Nesse estudo foram testados os sobrenadantes de 187 CH com CPDA-1 e CH com solução aditiva de SAG-Manitol. As amostras foram diluídas segundo o aspecto visual de hemólise do sobrenadante. A cada corrida analítica foram incluídas amostras controle preparadas *in-house* a partir de CH com concentração de HbT conhecida. O método de Harboe emprega leituras espectrofotométricas em 380, 415 e 450 nm. Para o método de 5 CO as absorbâncias são lidas em 370, 415, 510, 577 e 600 nm. O método da 1ªD utiliza o espectro de absorção analisado em 568 nm e 580 nm. A correlação entre as três metodologias testadas foi considerada ótima, evidenciando a equivalência entre os métodos. O método de Harboe mostrou-se compatível para a dosagem de baixas e de altas concentrações de HbL. O intervalo de linearidade espectrofotométrica oscilou de 0,00041 a 0,06075 g/dL. Entretanto, para resultados confiáveis de HbL, é imprescindível que o espectrofotômetro tenha especificação de largura da banda espectral igual ou inferior a 5 nm. O método de Harboe é embasado cientificamente, de fácil execução e baixo custo. Este método proporciona resultados fidedignos, reprodutíveis e padronizados, além de dispensar o uso de substâncias químicas perigosas. Complementarmente, disponibilizou-se um Procedimento Operacional Padrão para a determinação da HbL pelo método de Harboe e um Guia visual de hemólise para assessorar os profissionais que atuam na área de controle de qualidade de hemocomponentes em hemocentros nacionais.

Palavras-chave: concentrado de hemácias; hemoglobina livre; espectrofotometria, hemólise.

ABSTRACT

Grilo, K. T. de M. **Determination of free hemoglobin concentration in red cell concentrates by direct spectrophotometry: Harboe method.** 2016. 115p. Master dissertation – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

The hemolysis is one of the parameters of the red cell concentrate (RCC) control quality. According to the Brazilian Ordinance 158/2016, at least 1% of the monthly production of RCC should be controlled regarding hemolysis and 75% of this amount should present below than 0.8% of hemolysis in relation to the red cell mass at end of RCC storage. The hemolysis is defined as the percentage of free hemoglobin (Fhb), relative to the total hemoglobin (THb), with the appropriate correction of the RCC hematocrit. The analytical method used by most the national public healthcare blood centers to dosage Fhb does not reference the bibliography that has been consulted. Hemoglobin released from the erythrocytes due to hemolysis is toxic and triggers pathophysiological reactions, resulting in clinical implications whose severity varies depending on the hemolysis grade and the amount of transfused RCC. The aim of this study was to evaluate the results of three spectrophotometric analytical methodologies for the determination of Fhb. The Harboe spectrophotometry method, the method of five wavelengths direct spectrophotometry (5Wa) and the first derivative spectrophotometric method (1stD) were compared to each other. The Harboe and the 5Wa methods use mathematical formulas that directly convert the absorbance read from the UV/visible spectrophotometer in Fhb concentration. The 1stD method requires scanning spectrophotometer to visualize the spectra and concentration of the Fhb is given by the value calculated from the distance between the valley and the peak absorption of hemoglobin and a correction factor, resulting from the calibration curve. One hundred eighty-seven (187) RCC supernatants with CPDA-1 and RCC with SAG-mannitol additive solution were tested in this study. The samples were diluted according to the visual appearance of supernatants hemolysis. For each analytical run in-house control samples, prepared from RCC with known THb concentration, were included. The Harboe method employs spectrophotometric readings at 380, 415 and 450 nm. Absorbance is read at 370, 415, 510, 577 and 600 nm with the 5 Wa method. In the 1stD method the absorption spectrum is analyzed at 568 and 580 nm. There was correlation between the three tested methodologies that were tested, demonstrating equivalence between the methods. The Harboe method was compatible for dosage of low and high Fhb concentrations. The spectrophotometer linear range varied from 0.00041 to 0.06075 g/dL. However, in order to achieve reliable Fhb dosages it is imperative that the spectrophotometer has a spectral bandwidth equal to 5 nm or below. The Harboe method is scientifically based, easy to perform and inexpensive. It provides reliable, reproducible and standardized results, dismissing the use of dangerous chemical substances. In addition, this study has provided an Operational Procedure to determine Fhb by the Harboe method and a Visual Guide of hemolysis to assist professionals working in the quality control of blood products.

Keywords: red cell concentrate; free hemoglobin; spectrophotometry; hemolysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01	Estrutura química do grupo heme, modelo da estrutura quaternária da hemoglobina, desenvolvimento das cadeias globínicas	20
Figura 02	Avaliação da hemólise pela observação do sobrenadante nas bolsas de concentrados de hemácias	50
Figura 03	Correlação entre os métodos de Harboe e de 5 CO em Concentrados de Hemácias CPDA-1	57
Figura 04	Correlação entre os métodos de Harboe e de 5 CO em Concentrados de Hemácias SAd	59
Figura 05	Correlação entre os métodos de Harboe e de Primeira derivada em Concentrados de Hemácias CPDA-1	60
Figura 06	Correlação entre os métodos de Harboe e de Primeira derivada em Concentrados de Hemácias SAd	61
Figura 07	Correlação entre os métodos de Primeira derivada e de 5 CO em Concentrados de Hemácias CPDA-1	62
Figura 08	Correlação entre os métodos de Primeira derivada e de 5 CO em Concentrados de Hemácias SAd	63
Figura 09	Concentração de hemoglobina livre de acordo com o aspecto visual do sobrenadante dos CH	68
Figura 10	Correspondência entre o aspecto visual e a concentração de hemoglobina livre / percentual de hemólise	69
Figura 11	Hemoglobina livre de concentrados de hemácias com sobrenadante de aspecto lipêmico e não lipêmico	71
Figura 12	Aspecto visual do sobrenadante lipêmico e sem lipemia	72
Figura 13	Concentração de hemoglobina das amostras controle	72
Figura 14	Concentração de hemoglobina das amostras controle	73
Figura 15	Curva de calibração e faixa de linearidade espectrofotométrica	74
Figura 16	Intervalo de linearidade para a hemoglobina em relação à absorbância lida a 415 nm	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Valores de referência dos parâmetros do controle de qualidade de concentrado de hemácias	27
Tabela 02	Diluição das amostras de sobrenadantes de CH em solução fisiológica	45
Tabela 03	Variação do percentual de hemólise concentrados de hemácias CPDA-1 ..	51
Tabela 04	Concentrações de hemoglobina livre para a construção da tabela de escala de cores de concentrados de hemácias CPDA-1	52
Tabela 05	Variação do percentual de hemólise em concentrados de hemácias SAd ...	53
Tabela 06	Concentrações de hemoglobina livre para a construção da tabela de escala de cores de concentrados de hemácias SAd	53
Tabela 07	Valores dos Coeficientes de Correlação e de Determinação e do Erro Casual entre os métodos de Harboe, de Cinco comprimentos de onda e de Primeira derivada	56
Tabela 08	Hemoglobina Livre e Percentual de Hemólise em concentrados de hemácias CPDA-1 no período I de validade	63
Tabela 09	Hemoglobina Livre e Percentual de Hemólise em concentrados de hemácias CPDA-1 no período II de validade	63
Tabela 10	Hemoglobina Livre e Percentual de Hemólise em concentrados de hemácias CPDA-1 no período III de validade	64
Tabela 11	Hemoglobina Livre e Percentual de Hemólise em concentrados de hemácias CPDA-1 no período IV de validade	64
Tabela 12	Hemoglobina Livre e Percentual de Hemólise em concentrados de hemácias SAd no período I de validade	64
Tabela 13	Hemoglobina Livre e Percentual de Hemólise em concentrados de hemácias SAd no período II de validade	64
Tabela 14	Hemoglobina Livre e Percentual de Hemólise em concentrados de hemácias SAd no período III de validade	65
Tabela 15	Hemoglobina Livre e Percentual de Hemólise em concentrados de hemácias SAd no período IV de validade	65
Tabela 16	Hemoglobina Livre e Percentual de Hemólise em concentrados de hemácias CPDA-1 e SAd no período I de validade	65

Tabela 17	Hemoglobina Livre e Percentual de Hemólise em concentrados de hemácias CPDA-1 e SAd no período II de validade	66
Tabela 18	Hemoglobina Livre e Percentual de Hemólise em concentrados de hemácias CPDA-1 e SAd no período III de validade	66
Tabela 19	Hemoglobina Livre e Percentual de Hemólise em concentrados de hemácias CPDA-1 e SAd no período IV de validade	67
Tabela 20	Hemoglobina Livre e Percentual de Hemólise em CH SAd e CPDA-1 com sobrenadante “Límpido”	69
Tabela 21	Hemoglobina Livre e Percentual de Hemólise em CH SAd e CPDA-1 com sobrenadante “Hemolisado 1+”	69
Tabela 22	Hemoglobina Livre e Percentual de Hemólise em CH SAd e CPDA-1 com sobrenadante “Hemolisado 2+”	70
Tabela 23	Hemoglobina Livre e Percentual de Hemólise em CH SAd e CPDA-1 com sobrenadante “Hemolisado 3+”	70
Tabela 24	Hemoglobina Livre e Percentual de Hemólise em CH SAd e CPDA-1 com sobrenadante “Hemolisado 3+ e 4+”	70
Tabela 25	Largura da banda espectral dos espectrofotômetros utilizados no ensaio entre laboratórios	75
Tabela 26	Índice de Concordância Intraclasse (ICC) entre os laboratórios A, B, C, D	76
Tabela 27	Resultados da hemoglobina livre, pelos métodos de Harboe e 5 CO, nos laboratórios A, B, C	76
Tabela 28	Resultados da hemoglobina livre, pelos métodos de Harboe e 5 CO, nos laboratórios A, B, D	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,3-DPG	2,3-Difosfoglicerato
5 CO	Método espectrofotométrico de cinco comprimentos de onda
AABB	American Association of Blood Banks
AS-1	Solução aditiva Adsol
AS-3	Solução aditiva Nutricel
AS-5	Solução aditiva Optisol
ASTM	American Society for Testing and Materials
ATP	Adenosina Trifosfato
CH	Concentrado de hemácias
CPD	Citrato-fosfato-dextrose
CPDA-1	Citrato-fosfato-dextrose-adenina
dL	Decilitro
DP	Desvio padrão
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
g	Gramas
HbL	Hemoglobina livre
HEMEPAR	Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná
HEMOMINAS	Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
L	Litro
LS	Líquido sobrenadante
mg	Miligramas
N/A	Não aplicável
nm	Nanômetros
RBC	Rede Brasileira de Calibração
SAd	Solução aditiva
SESA	Secretaria de Estado da Saúde do Paraná
SF	Soro fisiológico
TECPAR	Instituto de Tecnologia do Paraná
UNICAMP	Universidade de Campinas
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
2.	ESTADO DA ARTE	19
2.1	Hemoglobina	19
2.2	Coleta do sangue para doação	21
2.3	Processamento do sangue	21
2.4	Armazenamento dos hemocomponentes	22
2.5	Soluções anticoagulantes e preservantes para hemácias	23
2.6	Concentrados de hemácias	24
2.7	Lesões de estocagem das hemácias	25
2.8	Controle de qualidade de concentrados de hemácias	26
2.9	Hemólise em concentrados de hemácias	27
2.10	Hemólise não imune	29
2.11	Hemoglobina livre no paciente	30
2.12	Determinação da hemoglobina livre	31
2.13	Considerações sobre espectrometria	32
2.14	Calibração do espectrofotômetro	34
2.15	Método espectrométrico de Harboe	35
2.16	Método espectrométrico de Cinco comprimentos de onda	37
2.17	Método espectrofotométrico de Primeira derivada	38
3.	JUSTIFICATIVA	39
4.	HIPÓTESE	40
5.	OBJETIVOS	41
5.1	Objetivo geral	41
5.2	Objetivos específicos	41
6.	CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	41
6.1	Delineamento do estudo	41
6.2	Casuística	42
6.3	Métodos de determinação da hemoglobina livre, hemoglobina total e volume globular	42
6.4	Coleta da amostra	43
6.5	Avaliação do aspecto visual da amostra	44

6.6	Diluição das amostras de sobrenadantes	44
6.7	Preparo das amostras controle	45
6.8	Leitura em espectrofotômetro	46
6.9	Fórmula para o cálculo da concentração da hemoglobina livre pelo método de Harboe	46
6.10	Fórmulas para o cálculo da concentração da hemoglobina livre pelo método de Cinco comprimentos de onda	47
6.11	Fórmulas para o cálculo da concentração da hemoglobina livre pelo método de Primeira derivada	48
6.12	Cálculos	48
6.13	Linearidade espectrofotométrica	48
6.14	Ensaio comparativo para verificação da exatidão.....	49
6.15	Construção do guia visual para avaliação da hemólise	49
6.15.1	Guia visual de hemólise em CH CPDA-1	50
6.15.2	Guia visual de hemólise em CH com Solução Aditiva	52
6.16	Análise estatística dos resultados	54
7.	RESULTADOS	55
7.1	Resultados da concentração de hemoglobina livre em relação aos meios de preservação utilizados e aos tempos de validade de concentrados de hemácias	55
7.2	Resultados da concentração de hemoglobina livre em concentrados de hemácias com líquido sobrenadante de aspecto hemolizado	67
7.3	Resultados da concentração de hemoglobina livre em concentrados de hemácias com líquido sobrenadante de aspecto lipêmico	70
7.4	Resultados das amostras controle	72
7.5	Resultados da linearidade espectrofotométrica	73
7.6	Resultados do ensaio comparativo para verificação da exatidão.....	75
7.7	Guia visual de hemólise em CH CPDA-1	77
7.8	Guia visual de hemólise em CH Solução aditiva	78
7.9	Procedimento Operacional Padrão (POP) para a determinação da hemoglobina livre pelo método de Harboe	79
7.10	Resumo dos resultados	82
8.	DISCUSSÃO	83
8.1	Concentração de hemoglobina livre nos três métodos testados	83

8.2	Concentração de hemoglobina livre em concentrados de hemácias com líquido sobrenadante lipêmico	88
8.3	Amostras controle	89
8.4	Linearidade espectrofotométrica	89
8.5	Ensaio comparativo entre laboratórios para verificação da exatidão.....	90
8.6	Guia visual de hemólise em concentrado de hemácias	91
9.	CONCLUSÕES	92
	REFERÊNCIAS	93
	APÊNDICES E ANEXOS	98

1. INTRODUÇÃO

A transfusão sanguínea deve ser utilizada criteriosamente na prática médica, uma vez que toda transfusão traz em si um risco ao receptor, seja imediato ou tardio. A indicação de transfusão de sangue deverá ser objeto de análise e aprovação pela equipe do serviço de hemoterapia (BRASIL, 2016).

Atualmente, a hemoterapia é seletiva e baseada no preceito da transfusão racional, em que se transfunde apenas a fração do sangue indicada para o paciente, sem a necessidade de transfusão do sangue total. Deste modo, a partir de uma doação de sangue e do seu processamento são obtidas frações do sangue, denominadas hemocomponentes.

O concentrado de hemácias (CH) consiste no hemocomponente indicado primordialmente para o aumento do aporte de oxigênio tecidual em anemias crônicas e agudas. Sob este prisma, a manutenção dos parâmetros de controle de qualidade deste hemocomponente é imprescindível para garantia da eficácia e segurança transfusional. Sabe-se que durante o armazenamento do concentrado de hemácias ocorrem alterações bioquímicas decorrentes do metabolismo celular, denominadas lesões de estocagem. O conhecimento destas alterações das hemácias consiste numa etapa importante do controle de qualidade devido a sua correlação com a eficácia do tratamento (CHIN-YEE, 1997).

Os princípios e diretrizes da Política Nacional de Sangue, Componentes e Hemoderivados do Ministério da Saúde regulamentam a atividade hemoterápica no país por meio da Portaria Ministerial 158/2016. A legislação determina aos serviços de hemoterapia a realização do controle de qualidade sistemático de todos os tipos de componentes sanguíneos produzidos. Na referida Portaria, o controle de qualidade dos concentrados de hemácias deve ser realizado em pelo menos 1% da produção ou 10 (dez) unidades por mês (o que for maior), sendo que o percentual de conformidade para cada item verificado seja igual ou superior a 75%. Os parâmetros de qualidade para os concentrados de hemácias, bem como os valores de referência, estão listados no Anexo VI da Portaria 158/2016.

O “grau de hemólise” em concentrados de hemácias deve ser inferior a 0,8% da massa eritrocitária no último dia de armazenamento da unidade hemoterápica. A mesma especificação é necessária para os concentrados de hemácias modificados, tais como: concentrados de hemácias lavadas, CH desleucocitadas/filtradas, CH congeladas e CH com a camada leucoplaquetária removida (BRASIL, 2016).

O grau de hemólise é definido como a porcentagem de hemoglobina livre em relação à hemoglobina total com a devida correção do volume globular (AABB, 2011). No cálculo do percentual de hemólise empregam-se os valores do hematócrito (Ht) ou do volume globular (VG), da hemoglobina total (HbT) e da hemoglobina livre (HbL) na equação (HÖGMAN, 1981; SOWEMIMO-COKER, 2002): *Grau de Hemólise (%) = [100 - Ht x (HbL / HbT)]*.

Este trabalho foi elaborado para comparação dos resultados da hemoglobina livre por três métodos analíticos diferentes, sendo dois métodos de espectrofotometria direta – método de Harboe e método de Cinco comprimentos de onda e o terceiro método espectrofotométrico de Primeira derivada.

2. ESTADO DA ARTE

2.1 Hemoglobina

A hemoglobina (Hb) é uma metalo-proteína responsável por carrear o oxigênio no interior dos eritrócitos, permitindo o transporte de oxigênio pelo sistema respiratório. A molécula de hemoglobina é constituída por um tetrâmero formado por quatro subunidades de cadeias globínicas e cada uma das subunidades possui um grupo heme. Este é constituído pelo anel porfirínico ligado a um átomo de ferro central que é responsável pela ligação com o oxigênio. Assim, cada molécula de hemoglobina carrega quatro moléculas de oxigênio. As cadeias polipeptídicas das globinas são compostas por uma sequência de aminoácidos, tendo as cadeias alfa 141 aminoácidos (aa) e as cadeias não alfa, 146 aa. As combinações entre as diversas cadeias de proteínas dão origem às diferentes hemoglobinas presentes nos eritrócitos desde o período embrionário e fetal até a fase adulta, produzidas no decorrer do desenvolvimento humano (**Figura 1**). Os eritrócitos do adulto normal contêm predominância de hemoglobina A, constituída por duas cadeias alfa e duas cadeias beta ($\alpha_2\beta_2$). Cerca de 2 a 3% da hemoglobina nos adultos é de hemoglobina A2, formada por duas cadeias alfa e duas cadeias delta ($\alpha_2\delta_2$) e uma pequena quantidade é de hemoglobina fetal (HbF), que persiste após o nascimento e é formada por duas cadeias alfa e duas cadeias gama ($\alpha_2\gamma_2$). (PERUTZ, 1998; GREER, 2003).

A hemoglobina é uma molécula alostérica, uma vez que a ligação e a liberação do oxigênio são reguladas pelas alterações na estrutura da proteína. No entanto, a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio também depende de mecanismos de controle e regulação, dos quais os mais importantes são a pressão parcial do oxigênio - PO_2 , o pH, a temperatura e a

concentração de 2,3-difosfoglicerato (2,3 DPG). A relação entre a PO_2 e a saturação de oxigênio é descrita por uma curva sigmóide de dissociação entre oxigênio e hemoglobina. No estado desoxigenado da hemoglobina, a molécula de 2,3-DPG insere-se entre as subunidades de β -globina da estrutura tetramérica da Hb, reduz a sua afinidade pelo oxigênio e aumenta o fornecimento de oxigênio para os tecidos (GREER, 2003).

Figura 1: (A) Estrutura química do grupo heme e a sua união com a globina. Quatro subunidades de globina formam a hemoglobina (adaptado de Greer, 2003). (B) Modelo da estrutura quaternária da hemoglobina A com as cadeias alfa e beta em segmentos helicoidais e os grupos heme suspensos em fendas apolares entre as hélices (adaptado de Griffiths, 2000). (C) Desenvolvimento das cadeias de globinas humanas (α , β , γ , δ) do período embrionário e fetal aos seis meses de vida (adaptado de Fernandes, 2010).

Em suma, a hemoglobina faz parte de um eficiente mecanismo fisiológico respiratório e, para tal, é essencial a sua localização no interior do eritrócito. Nos distúrbios patológicos que levam à hemólise com o extravasamento da hemoglobina intracelular, como também, na transfusão inadvertida de hemácias hemolisadas, a hemoglobina livre no plasma é tóxica e desencadeia reações fisiopatológicas para sua eliminação pelo organismo. Os mecanismos de captura dos dímeros de hemoglobina liberados dos eritrócitos devido à hemólise decorrem da hemoglobina extracelular ser desprovida da proteção antioxidante existente no interior das células vermelhas do sangue. Para neutralizar os efeitos tóxicos da hemoglobina livre e da heme (heme liberados na degradação da molécula de hemoglobina); proteínas “limpadoras”

do plasma, como a haptoglobina e a hemopexina, sequestram os radicais tóxicos e os levam para compartimentos onde heme-oxigenases quebram a hemina em metabólitos menos tóxicos. No entanto, quando estes mecanismos protetores ficam sobrecarregados pela hemólise excessiva, ocorrem efeitos clínicos adversos como distúrbios vasculares, hipertensão, inflamação, trombose e insuficiência renal (SCHAER, 2013).

2.2 Coleta do sangue para doação

O candidato à doação de sangue, após atender aos pré-requisitos que o habilitam a doar efetivamente, é encaminhado para a área de coleta do sangue. O sangue é obtido por punção venosa do braço, dando-se preferência à veia cubital mediana. O sangue é coletado em bolsa plástica, descartável, estéril e apirogênica.

O sistema de bolsas de coleta é especialmente confeccionado para a coleta, a separação e a conservação do sangue e seus hemocomponentes. O *kit* de bolsas é composto pela bolsa principal ou bolsa de coleta, tubo de coleta com agulha, tubos de conexão e bolsas satélites. Conforme o número de bolsas satélites, acopladas à bolsa principal, as bolsas para coleta de sangue são classificadas em bolsas duplas, triplas ou quádruplas. A bolsa principal contém a solução anticoagulante e preservante. O volume desta solução varia de 60 a 65 ml e é suficiente para a coleta do volume padrão de doação, correspondendo a $450 \pm 10\%$ (405 a 495) ml de sangue.

A coleta do sangue transcorre em 10 a 15 minutos, com monitoramento do volume coletado e homogeneização constante da bolsa em equipamento adequado. No decurso da coleta são transferidas para tubos amostras de sangue destinadas aos testes laboratoriais, assim como são informados ao doador os cuidados necessários para a sua pronta recuperação e bem-estar após a doação de sangue. Ao término da coleta, antes mesmo de sair do serviço de hemoterapia, o doador é estimulado a se alimentar e a ingerir líquidos em abundância, enquanto permanece no local em observação por, no mínimo, 15 minutos (BRASIL, 2016).

2.3 Processamento do sangue

A bolsa de sangue total é levada à área de processamento do sangue para a obtenção das frações eritrocitária, plaquetária e plasmática do sangue, designadas hemocomponentes e obtidas por métodos físicos. Estes métodos consistem em centrifugação, separação, congelamento e descongelamento. O sangue total é separado em hemocomponentes por meio

de diferentes protocolos de centrifugação. A separação das frações celulares e do plasma ocorre pela densidade específica dos componentes sanguíneos. Após a centrifugação, a bolsa é prensada e o plasma sobrenadante transferido, sob pressão, da bolsa principal para uma bolsa satélite, em circuito fechado, ou seja, sem quebra da esterilidade dos hemocomponentes obtidos. Os hemocomponentes equivalem a frações do sangue e são conservados em condições apropriadas à preservação de suas características terapêuticas específicas (AABB, 2011).

A partir do processamento do sangue total são obtidos até quatro hemocomponentes primários compostos pelo concentrado de hemácias (CH), pelo concentrado de plaquetas (CP) e o pelo plasma fresco congelado (PFC). A partir do descongelamento e centrifugação do PFC são obtidos o crioprecipitado (CRIO) e o plasma isento de crio (PIC).

A Portaria 158/16 define os hemocomponentes primários como segue: *Concentrados de hemácias* são os eritrócitos que permanecem na bolsa depois que esta é centrifugada e o plasma extraído para uma bolsa-satélite. *Concentrado de plaquetas*, obtido a partir do sangue total, é uma suspensão de plaquetas em plasma, preparado mediante dupla centrifugação de uma unidade de sangue total, coletada em tempo não maior que 15 (quinze) minutos. *Plasma fresco congelado* é o plasma separado de uma unidade de sangue total por centrifugação e congelado completamente (até atingir temperatura igual ou inferior a -30°C), em até oito horas depois da coleta. *Crioprecipitado* é a fração de plasma insolúvel em frio, obtida a partir do plasma fresco congelado, contendo glicoproteínas de alto peso molecular, principalmente fator VIII, fator de Von Willebrand, fator XIII e fibrinogênio.

Os hemoderivados, por sua vez, são produtos hemoterápicos produzidos a partir do plasma, por métodos físico-químicos e em escala industrial.

2.4 Armazenamento dos hemocomponentes

A conservação ou armazenamento dos hemocomponentes deve atender às condições específicas e apropriadas à preservação de suas características para a efetividade terapêutica após a transfusão.

O concentrado de plaquetas é armazenado à temperatura ambiente, sob agitação constante em homogeneizadores, em câmara ambientadora para plaquetas com manutenção da temperatura entre 20°C e 24°C . Nestas condições, a validade do CP é de 5 (cinco) dias.

Os hemocomponentes plasmáticos PFC, PIC e CRIO são conservados em *freezers* com temperatura de -20°C (vinte graus Celsius negativos), sendo recomendada, quando

possível, temperatura igual ou inferior a -30°C (trinta graus Celsius negativos). Conforme a legislação vigente, a validade destes hemocomponentes é de 12 (doze) meses, se armazenados em temperatura entre -20°C (vinte graus Celsius negativos) e -30°C (trinta graus Celsius negativos); e de 24 (vinte e quatro) meses, se armazenados à temperatura inferior à -30°C (trinta graus Celsius negativos) (BRASIL, 2016).

A estocagem do concentrado de hemácias é feita em refrigerador apropriado para o armazenamento do sangue, com temperatura controlada entre 2°C e 6°C . O objetivo do armazenamento é a manutenção da viabilidade e funcionalidade das hemácias, de tal forma que, no mínimo, 75% das hemácias transfundidas estejam viáveis após 24 horas da transfusão (SIMON, 1987; COVAS, 2007).

As câmaras para conservação de concentrados de hemácias devem possuir sistema de ventilação para circulação de ar e temperatura uniformemente distribuída em todos os seus compartimentos. É recomendável que possuam registrador gráfico contínuo de temperatura e sistema de alarme sonoro e visual que serão ativados a uma temperatura que permita a execução das condutas apropriadas para evitar que os CH sofram danos devido à temperatura incorreta (BRASIL, 2016).

Hess (2014) relatou a importância decisiva da temperatura de armazenamento das hemácias. Segundo esse estudo, o metabolismo das hemácias a 25°C é 10 vezes mais acelerado que a 4°C . O consumo de ATP e a glicólise diminuem consideravelmente a 4°C (HESS, 2014).

2.5 Soluções anticoagulantes e preservantes para hemácias

As soluções anticoagulantes e preservantes utilizadas nas bolsas de coleta de sangue visam impedir a coagulação do sangue após a coleta e, também, a conservação das hemácias *in vitro*, durante o armazenamento. As primeiras soluções utilizadas foram a de ACD (ácido cítrico, citrato, dextrose) e a de CPD (citrato, fosfato, dextrose) e que conferem viabilidade de 21 dias às hemácias. Em 1978, o FDA aprovou a introdução da adenina à fórmula da solução CPD resultando na solução CPDA-1 e o prazo de validade dos glóbulos vermelhos se estendeu para 35 dias. Posteriormente, com a adição de soluções nutritivas diretamente às hemácias, foram produzidas as soluções aditivas (SAd) que prolongaram mais ainda a viabilidade das hemácias armazenadas (SIMON, 1987). A solução aditiva é adicionada ao CH após a retirada total do plasma sobrenadante e confere o armazenamento das hemácias por 42 dias. Excepcionalmente, as soluções aditivas podem ser adicionadas em até 72 horas, se

recomendado pelo fabricante da bolsa (AABB, 2011). As soluções aditivas minimizam a hemólise durante o armazenamento das hemácias e lhes conferem mais fluidez, facilitando a infusão endovenosa (COVAS, 2007).

2.6 Concentrado de hemácias

O concentrado de hemácias primário é proveniente da remoção da maior parte do plasma sobrenadante e contém 100% das hemácias do sangue total correspondente. A partir de concentrados de hemácias primários, uma variedade de concentrados de hemácias modificados elencam outras categorias do hemocomponente, destinados às condições clínicas específicas, como: concentrado de hemácias criopreservadas, concentrado de hemácias leucorreduzidas, concentrado de hemácias irradiadas, concentrado de hemácias lavadas e concentrado de hemácias desglicerolizadas. Os concentrados de hemácias podem ser coletados também por meio de máquinas separadoras de aférese (AABB, 2011).

Com referência à indicação clínica para a transfusão de concentrado de hemácias, esta consiste, fundamentalmente, no aumento de eritrócitos para fornecimento de oxigênio aos tecidos (HARMENING, 1992; SWEENEY, 1999; BRASIL, 2010). A transfusão de concentrado de hemácias, ao invés do sangue total, foi iniciada a partir de 1937, por Castellanos, que acreditava ser mais lógico transfundir suspensão de hemácias, evitando causar agravos ao volume de sangue circulante do paciente (KLEIN, 2005). Atualmente, a proporção de transfusão de concentrado de hemácias é superior à de todos os outros hemocomponentes. Em publicação da Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados (CGSH), os serviços de hemoterapia (públicos e privados) do país realizaram 1.813.441 transfusões de concentrados de hemácias em 2012. Este montante representou 57,98 % do total de transfusões/ano. O percentual de transfusão de concentrados de plaquetas correspondeu a 18,55 %, seguido da transfusão de plasma fresco na ordem de 13,79 % (BRASIL, 2014).

Sob o aspecto de constituição do concentrado de hemácias, a quantidade de hemoglobina por bolsa de CH pode oscilar devido à variação do nível de hemoglobina do doador e ao volume de sangue coletado. Os regulamentos técnicos de procedimentos hemoterápicos, vigentes no Brasil e Europa, preconizam teor de hemoglobina no concentrado de hemácias superior a 45 gramas/bolsa (BRASIL, 2016, COUNCIL OF EUROPE, 2011). Nos Estados Unidos, o limite mínimo de hemoglobina por CH não foi estabelecido, tendo em vista a variabilidade dos níveis de hemoglobina e peso de doador para doador. No entanto, a

padronização do limite mínimo de hemoglobina por bolsa de CH em 50g/CH foi defendida por Claes Högman, em artigo científico publicado em 2006 na *Transfusion* (AABB, 2011).

A quantidade de hemoglobina é diminuída nos concentrados de hemácias leucorreduzidos (filtrados) e concentrados de hemácias lavadas, sendo o limite mínimo aceitável de 40 g/unidade nestes hemocomponentes. A legislação vigente preconiza a identificação de bolsas de CH provenientes de coletas de 300 a 404 ml de sangue total, com os dizeres “Unidade de baixo volume de concentrado de hemácias”. Vale lembrar que estas unidades podem apresentar concentração de hemoglobina/CH inferior ao limite mínimo preconizado e, por isso, todas devem ser avaliadas para o teor de hemoglobina antes de serem liberadas para transfusão (AABB, 2011).

O intervalo desejável para o hematócrito em concentrados de hemácias com CPDA-1 é de 65 a 80%. Para os concentrados de hemácias com soluções aditivas é de 50 a 70% (BRASIL, 2016). A maior parte dos leucócitos do sangue total permanece remanescente no concentrado de hemácias num total de $2,5$ a $3,0 \times 10^9$ leucócitos por unidade. O conteúdo de plaquetas remanescentes, entretanto, pode oscilar em virtude do protocolo de centrifugação utilizado no processamento do sangue (COUNCIL OF EUROPE, 2011).

2.7 Lesões de estocagem das hemácias

Durante o armazenamento dos concentrados de hemácias ocorrem alterações bioquímicas e morfológicas decorrentes do metabolismo celular, denominadas “lesões de estocagem”. O conhecimento destas alterações nas hemácias consiste numa etapa importante do controle de qualidade devido a sua correlação com a eficácia do tratamento (CHIN-YEE, 1997).

As alterações bioquímicas mais relevantes são a acidose pelo acúmulo de ácido láctico e o consumo de glicose, devidos à necessidade de providenciar energia para a manutenção das bombas NaK e CaMg, mas que acabam redundando na queda dos níveis de adenosina trifosfato (ATP). Estas mudanças estão relacionadas com as alterações morfológicas das hemácias. O nível de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) é marcadamente reduzido ao final do armazenamento das hemácias, porém, após a transfusão, ocorre o restabelecimento do seu nível normal em 12 a 24 horas. Ocorre também acúmulo de íons potássio no meio extracelular (AABB, 2011).

As alterações morfológicas das hemácias incluem a perda da forma de disco bicôncavo, formação de equinócitos e, em seguida, de esferócitos, a forma pré-hemolítica.

Quando a membrana celular é rompida por hemólise, há aumento da hemoglobina livre (HESS, 2014).

As alterações ocorridas nas hemácias armazenadas também são devidas à variabilidade de plastificantes, anticoagulantes e soluções aditivas das bolsas plásticas. Neste sentido, as lesões de armazenamento podem determinar a validade dos concentrados de hemácias nas diferentes soluções utilizadas. A concentração média de hemoglobina livre em concentrados de hemácias com CPDA-1 no “dia 0” é 78 mg/dL e chega a 658 mg/dL no 35º dia de validade. Este fato é decorrente do baixo volume de plasma nestes hemocomponentes. Em concentrados de hemácias com solução aditiva AS-3, a hemoglobina livre média no 42º dia de validade é 386 mg/dL (AABB, 2011).

Em um estudo conduzido por Simon *et al.* (1987), comparando-se as alterações bioquímicas ocorridas nas hemácias preservadas com soluções aditivas, demonstrou-se que com a solução AS-1 as hemácias foram mais bem preservadas em relação à hemólise do que com a solução AS-3. Após 49 dias de armazenamento, os valores médios de HbL e de % de hemólise com solução AS-3 foram de 308 mg/dL e 0,70%, respectivamente; enquanto com solução AS-1 foram de 163 mg/dL e 0,38%. A diferença na composição das duas soluções aditivas está na concentração de dextrose e na presença de manitol. A solução AS-3 possui 1,10 g/dL de dextrose, entre outros componentes, enquanto a solução aditiva AS-1 contém 2,20 g/dL de dextrose e 0,75g/dL de manitol. Embora a solução AS-1 tenha sido aprovada, originalmente, para manutenção das hemácias por 49 dias, recomendou-se a redução do período de armazenamento para 42 dias.

2.8 Controle de qualidade de concentrados de hemácias

Os serviços de hemoterapia visam o fornecimento de produtos terapeuticamente efetivos ao receptor de sangue. Para isto, buscam a excelência da qualidade em todas as etapas do “ciclo do sangue”, que abrange a captação de doadores, a coleta, o processamento, o armazenamento, a distribuição, o transporte do sangue e, ainda, a realização de testes sorológicos e imunohematológicos das amostras do sangue doado.

O controle de qualidade (CQ) possibilita o monitoramento do processo produtivo e a identificação precoce de eventuais “não conformidades”, que devem ser evidenciadas como oportunidade para a busca da melhoria contínua. A Portaria 158/16 do Ministério da Saúde preconiza que o controle de qualidade dos hemocomponentes seja realizado em uma amostragem de, no mínimo, 1% da produção mensal ou 10 (o que for maior). Os parâmetros

de qualidade recomendados para os concentrados de hemácias são: teor de hemoglobina, hematócrito, grau de hemólise e análise microbiológica, sendo que cada item verificado deverá apresentar percentual de conformidade igual ou superior a 75%. Somente o controle microbiológico deverá evidenciar conformidade superior a 99,5%.

Os valores de referência dos parâmetros analisados no CQ de concentrados de hemácias, de acordo com as normas vigentes no Brasil, Estados Unidos e Europa, podem ser comparados na **Tabela 01**.

Tabela 01 - Valores de referência dos parâmetros do controle de qualidade de concentrado de hemácias no Brasil, Estados Unidos e Europa (adaptado de Council of Europe, 2006; AABB, 2011; BRASIL, 2016).

Parâmetro	Brasil	Valores de referência		
		Estados Unidos	Europa	
CH CPDA-1	Amostragem	Testar, no mínimo, 1% da produção ou 10 unidades por mês	Nenhum	Testar, no mínimo, 4 unidades por mês
	Teor de hemoglobina	Maior que 45g/unidade	Nenhum	Maior que 45g/unidade
	Hematócrito	65 a 80%	Nenhum	65 a 75%
	Grau de hemólise	Menor que 0,8% (no último dia de armazenamento)	Nenhum	Menor 0,8% (no último dia de armazenamento)
	Volume	Nenhum	Nenhum	450 mL $\pm$ 10%
CH com solução aditiva	Amostragem	Testar, no mínimo, 1% da produção ou 10 unidades por mês	Nenhum	Testar, no mínimo, 4 unidades por mês
	Teor de hemoglobina	Maior que 45g/unidade	Nenhum	Maior que 45g/unidade
	Hematócrito	50 a 70%	Nenhum	65 a 75%
	Grau de hemólise	Menor que 0,8% (no último dia de armazenamento)	Nenhum	Menor que 0,8% (no último dia de armazenamento)
	Volume	Nenhum	Nenhum	Volume difere devido à solução aditiva usada
CH Filtrada	Leucócitos residuais	Menor que $5,0 \times 10^6$ /unidade	Menor que $5,0 \times 10^6$ /unidade	Menor que $1,0 \times 10^6$ /unidade
	Recuperação de hemácias	Nenhuma	Maior que 85%	Nenhuma

2.9 Hemólise em concentrados de hemácias

O valor de referência para o grau de hemólise em porcentagem deve ser inferior a 0,8% da massa eritrocitária, ao final do período de validade do concentrado de hemácias (COUNCIL OF EUROPE, 2011; BRASIL, 2016). A American Association of Blood Banks (AABB), instituição responsável pela regulamentação das atividades hemoterápicas nos Estados Unidos, embora não estabeleça valores de referência para a hemólise, enfatiza a

importância de controle de qualidade rigoroso dos processos envolvidos na preparação dos concentrados de hemácias, visando minimizar a ocorrência de hemólise. A Food and Drug Administration (FDA) só aprova para comercialização as soluções anticoagulantes e preservantes das bolsas de sangue que assegurem hemólise inferior a 1% durante o armazenamento das hemácias pelos testes de biocompatibilidade (AABB, 2011).

A hemólise das hemácias preservadas foi mencionada como importante alteração de qualidade desde o desenvolvimento da primeira solução preservante para hemácias, por Rous e Turner, em 1916 (HESS, 2009). No início do século XX, estes pesquisadores demonstraram que hemácias preservadas em solução contendo citrato de sódio e dextrose permaneciam viáveis por até 14 dias e, ao serem infundidas em coelhos, provocavam a melhora dos sintomas de anemia. Por outro lado, hemácias conservadas apenas com citrato de sódio, sem adição de açúcar, por 14 dias, apresentaram hemólise e, ao serem infundidas no coelho, causavam queda na contagem de hemácias, diminuição da concentração de hemoglobina e aumento de reticulócitos, indicando que as células conservadas desapareceram da circulação do animal e a medula óssea foi ativada para reparação do prejuízo (ROUS, 1916).

O grau de hemólise é definido como a porcentagem de hemoglobina livre em relação à hemoglobina total com a devida correção do hematócrito (AABB, 2011). A hemólise expressa em percentual é calculada pela fórmula 1 (HÖGMAN, 1981; SOWEMIMO-COKER, 2002):

$$\text{Grau de hemólise (\%)} = [100 - \text{Ht} \times (\text{HbL} / \text{HbT})] \quad (1)$$

Ht – hematócrito (em %)

HbL – hemoglobina livre (em g/dL)

HbT – hemoglobina total (em g/dL)

A avaliação visual da hemólise em bolsas de concentrados de hemácias consiste numa prática usual antes da transfusão e da realização dos testes pré transfusionais para compatibilidade. A inspeção consiste na observação da coloração do plasma residual/líquido sobrenadante na região próxima às hemácias do tubo de conexão da bolsa e/ou na própria bolsa. O aspecto eritrocômico do meio livre (coloração avermelhada) é decorrente do predomínio de oxi-hemoglobina liberada pelas hemácias hemolisadas. Entretanto, esta avaliação normalmente é enganosa, não representativa, e tende a superestimar o grau de

hemólise, ocasionando o descarte desnecessário de bolsas de concentrados de hemácias (JANATPOUR, 2004; AABB, 2011).

A inspeção visual também não é útil como critério de qualidade em percentagem de hemólise, porque a intensidade da cor vermelha é apenas indicativa da concentração de hemoglobina livre do plasma residual/líquido sobrenadante (HAN, 2009).

2.10 Hemólise não imune

A hemólise de etiologia não imune é uma categoria de reação transfusional, cuja causa é a transfusão de hemácias destruídas por ações físicas ou químicas. Sua incidência é rara, porém, a gravidade dos sintomas varia em função do grau de hemólise e da quantidade de hemácias transfundidas (AABB, 2011).

As implicações clínicas decorrentes da transfusão de sangue ou concentrado de hemácias com hemólise são causadas pela dissociação da hemoglobina em dímeros que têm de se ligar à haptoglobina para serem removidos pelo sistema reticuloendotelial. Uma vez que a capacidade de ligação da haptoglobina é excedida, ocorre a hemoglobinemia, que pode ser interpretada como sinal de hemólise intravascular pelo organismo, resultando em insuficiência renal grave (SOWEMIMO-COKER, 2002).

Os procedimentos realizados durante a coleta e o processamento do sangue podem contribuir para a hemólise, tais como: a homogeneização vigorosa do sangue com as soluções anticoagulante/aditiva, a velocidade de centrifugação, a “ordenha” do sangue através dos tubos e *ports* da bolsa, além da exposição das hemácias a temperaturas extremas. Ainda podem causar hemólise, bactérias contaminantes presentes na bolsa, defeitos na membrana das hemácias do doador, altas concentrações de drogas como penicilina e vitamina C, além de leucócitos que liberam enzimas hemolíticas (HAN, 2009).

Dentre as causas mais frequentes de destruição de hemácias estão o congelamento e o aquecimento excessivos da bolsa. Os casos mais comuns de acidentes são relacionados com o superaquecimento das bolsas de sangue em recipientes contendo água quente e em forno micro-ondas na intenção de aquecer o sangue à temperatura corporal do paciente. Casos de reações graves pela transfusão inadvertida de sangue com hemólise foram relatados por Mollison (KLEIN, 2005).

Um destes casos ocorreu após a transfusão de cerca de 2500 ml de sangue acidentalmente superaquecido, causando insuficiência renal irreversível e morte de um paciente (J Wallace, comunicação pessoal).

Em outro relato, três bolsas de sangue autólogo, coletadas a 2 e 4 semanas antes, foram acidentalmente congeladas a -20°C e transfundidos durante uma cirurgia de quadril. Seis horas depois o paciente apresentou hemoglobinúria e oligúria, sem sinais de choque. Foram realizadas repetidas sessões de hemodiálise e o paciente acabou se recuperando (Lanore *et al.* 1989).

Howard e Perkins referiram, em 1976, um acidente ocorrido após a doação de plaquetas por aférese, na qual o doador apresentou hemoglobinúria. Ao ser investigada a causa do imprevisto, constatou-se que o sangue havia sido bombeado por tubo parcialmente obstruído da máquina de coleta por aférese de fluxo contínuo.

Bowman e Pollack notificaram, em 1980, a ocorrência da morte inesperada de vários bebês após a transfusão intrauterina. A análise do procedimento revelou que o catéter, habitualmente usado para a infusão, havia sido substituído por um modelo com abertura lateral muito menor, ocasionando hemólise substancial das hemácias injetadas através do novo tipo de catéter.

Outra modalidade de hemólise acidental ocorreu na filtração de concentrados de hemácias para retirada de leucócitos (leucorredução) em que a bolsa foi pressionada e o sangue forçado através do filtro, resultando em hemoglobinúria no receptor (Gambino *et al.*, 1992).

A infusão de concentrados de hemácias simultaneamente e na mesma via de acesso venoso com soluções hipotônicas ou medicamentos também pode causar hemólise osmótica. Para evitar a hemólise, estes tratamentos devem ser administrados em vias diferentes e em momentos alternados.

Na ocorrência de qualquer evento adverso, a transfusão deve ser interrompida imediatamente e o paciente atendido prontamente pelo médico. Na hipótese de reação transfusional por hemólise não imune, além dos procedimentos iniciais, a conduta laboratorial consiste na realização do teste de hemólise na unidade de concentrado de hemácias em questão. Ao ser confirmada a hemólise como causa da reação, buscar eliminá-la para impedir novos casos (AABB, 2011).

2.11 Hemoglobina livre no paciente

A transfusão de unidades de hemácias com hemólise podem causar sérias implicações clínicas aos receptores. Isto é devido à dissociação da hemoglobina livre em dímeros, os quais têm de se ligar à haptoglobina para serem removidos pelo sistema reticuloendotelial. O

excesso de hemoglobina livre no plasma pode exceder a capacidade de ligação da haptoglobina, ocasionando a hemoglobinemia, que pode de ser interpretada como sinal de hemólise intravascular pelo organismo, resultando em insuficiência renal grave (SOWEMIMO-COKER, 2002; SCHAER, 2013).

O valor normal da hemoglobina livre em adultos é de 5 a 50 mg/L, sendo o valor de 16 mg/L o nível de decisão médica para a detecção de hemólise intravascular (NOE, 1984). Na detecção da hemoglobinemia por método espectrofotométrico, podem ser considerados significativos valores superiores a 4,0 mg/L de hemoglobina livre (KAHN, 1981; GENETET, 1984; AABB, 2011). Na hemólise intravascular, são sintomáticas a presença de hemoglobina na urina (hemoglobinúria) e no plasma (hemoglobinemia) com concentrações superiores a 50 mg/L (FAIRBANKS, 1992; CHALMERS, 1993).

A determinação da concentração da hemoglobina livre presente no plasma ou soro de pacientes é importante para o monitoramento do grau de hemólise em portadores de doenças hemolíticas graves com hemólise intravascular e no acompanhamento de pacientes submetidos à cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea.

A coleta da amostra do paciente para a determinação da hemoglobina livre deve ser realizada cuidadosamente para minimizar a hemólise artificialmente causada durante o procedimento. Na venopunção, a estase sanguínea deve ser evitada, o uso de agulha de grande calibre é ideal, a primeira porção de sangue coletada (cerca de 5 ml) deve ser descartada e a porção restante transferida, delicadamente, para tubo de vidro siliconizado contendo solução anticoagulante (HARBOE, 1959; GENETET, 1984). Adicionalmente, em virtude da concentração da hemoglobina livre no sangue total ser inferior a 0,05%, os métodos para a sua dosagem precisam ser muito sensíveis (KAHN, 1981).

2.12 Determinação da hemoglobina livre

Vários métodos são descritos na literatura para a determinação da hemoglobina livre. No entanto, não há protocolo ou método amplamente aceito para a medição da concentração da hemoglobina livre ou plasmática. Em uma pesquisa conduzida por Malinauskas (1997) foi relatada a existência de mais de vinte diferentes técnicas que foram desenvolvidas para a determinação clínica da concentração da hemoglobina livre no plasma.

A espectrofotometria direta, como o método de Harboe e da Fórmula Policromática, foi usada rotineiramente para medir a concentração da hemoglobina no soro ou no plasma. Entretanto, devido ao método estar sujeito à interferência da bilirrubina, normalmente

presente em estados hemolíticos, o método colorimétrico da benzidina foi preferido por muitos anos. Em consequência da restrição do uso da benzidina, pelo seu efeito carcinogênico, pela *Occupational Safety & Health Administration* (Administração de Segurança e Saúde Ocupacional) nos Estados Unidos, a espectrofotometria direta voltou a ser utilizada.

Outros ensaios cromogênicos, substitutos da benzidina, foram disponibilizados, como: p-aminobenzoato (descrito por Nazario, em 1956), o-toluidina (descrito por Lewis, em 1965), método da Tetrametilbenzidina (descrita por Standefer, em 1977), método verde leucomalaquita e o-dianisidina (descritos por Ahlquist, em 1975); e atividade da peroxidase empregando o 2,2'-azino di-(3-etilbenzotiazolina sulfonato), descrita em 1978, por Marklund. Em 1979 foram introduzidas técnicas imunoquímicas, descritas por Engler e Gadsden (KAHN, 1981; NOE, 1984; FAIRBANKS, 1992).

Além dos métodos referidos, os métodos da espectrofotometria derivada, da cianometahemoglobina (método de Drabkin) e o método fotométrico automatizado Plasma Low Hb Hemocue® são utilizados para a determinação da concentração da hemoglobina livre. Os analisadores hematológicos automatizados não são indicados para a dosagem da hemoglobina livre. O impedimento se dá em razão da baixa concentração de hemoglobina presente no plasma ou no meio extracelular, aquém da sensibilidade mínima para a dosagem da hemoglobina nestes equipamentos (CARDIGAN, 2002; HAN, 2009).

Entretanto, não existe até o momento um método totalmente aceito e padronizado para a determinação da concentração da hemoglobina livre e da hemólise. Em um estudo comparativo realizado entre 14 laboratórios da Europa e Estados Unidos foi demonstrado coeficiente de variação de 55% nos resultados da hemólise. Atribuiu-se como causa da variação o fato de cada parâmetro utilizado na fórmula da hemólise poder ser medido de diferentes maneiras (HESS, 2009).

2.13 Considerações sobre espectrofotometria

A espectrofotometria consiste em técnica analítica amplamente utilizada em laboratórios de análises clínicas para a determinação da concentração de soluções e para a identificação de componentes desconhecidos de uma solução, por meio de seus espectros característicos nas regiões do espectro eletromagnético. As regiões do ultravioleta (UV) e do visível (VIS) vão de 190 nm a 800 nm. Os comprimentos de onda são expressos em nanômetros, sendo que 1 nm corresponde a 10^{-9} m (PAVIA, 2010).

A absorção molecular na região do ultravioleta e do visível do espectro depende da estrutura eletrônica da molécula. A absorção de energia é quantificada e conduz à passagem dos elétrons de orbitais do estado de energia mais baixo - estado inicial ou fundamental, para orbitais de maior energia - estado excitado. A radiação eletromagnética absorvida tem energia igual à diferença de energia entre os estados excitado e fundamental (SILVERSTEIN, 1994).

O espectrofotômetro é o instrumento de análise e medição da quantidade de luz absorvida e transmitida em uma determinada amostra. Este equipamento é composto de uma fonte de luz (ou de radiação), de um monocromador e de um detector. A luz, habitualmente fornecida por lâmpada de deutério, emite radiação eletromagnética na região ultravioleta do espectro. Uma segunda fonte de luz, fornecida por lâmpada de tungstênio, é usada para comprimentos de onda na região visível do espectro. O monocromador ou rede de difração separa o feixe de luz nos comprimentos de onda componentes. Um sistema de fendas focaliza o comprimento de onda selecionado para a cela (cubeta) contendo a amostra. A luz que atravessa a cubeta é medida pelo detector em valores numéricos de absorbância, proporcional à concentração da amostra (PAVIA, 2010).

Segundo os princípios da espectrometria de absorção, quanto maior for o número de moléculas capazes de absorver luz em um determinado comprimento de onda, maior será a extensão desta absorção. Além disto, quanto maior for a eficiência de uma molécula de absorver luz em determinado comprimento de onda, maior será a extensão desta absorção. Com base nestes preceitos, foi formulada a Lei de Beer-Lambert, fórmula 2.

$$A = \text{Log} (I_0 / I) = \epsilon c l \quad (2)$$

A – absorbância (ou densidade ótica)

I_0 – intensidade de luz incidindo na cubeta

I – intensidade de luz saindo na cubeta

ϵ – absortividade molar

c – concentração molar do soluto

l – comprimento do caminho ótico (=1 cm)

A absortividade molar (ou coeficiente de extinção molar) é uma propriedade de cada molécula, ou seja, um parâmetro característico do material absorvente que passa por uma transição eletrônica. Os fatores que controlam a absortividade são as dimensões do sistema absorvente e a probabilidade da transição eletrônica ocorrer (PAVIA, 2010). A absortividade

é expressa em absorvidade molar (ϵ) quando a concentração do soluto é definida em moles por litro, e expressa em absorvidade (a) quando a concentração for definida em gramas por litro (SILVERSTEIN, 1994).

No espectro eletromagnético, a oxihemoglobina apresenta curvas de absorção máxima e características em 415, 540 e 578 nm (FAIRBANKS, 1992).

2.14 Calibração do espectrofotômetro

Considerando-se ser o espectrofotômetro o instrumento de medição para as análises espectrofotométricas, é imprescindível a manutenção da rastreabilidade de suas medições por meio da verificação periódica do seu desempenho. Para a verificação, são empregados materiais de referência padrão. Estes se dividem em duas categorias: materiais de referência para verificação e calibração da escala fotométrica de espectrofotômetros e materiais de referência empregados na verificação e calibração da escala de comprimento de onda. Para orientação das verificações estão disponíveis algumas normas como: ASTM E275, ASTM 387, ASTM E925, ASTM E958 e ASTM E1866 (GOMES *et al.*, 2008).

As análises realizadas nas escalas fotométricas (de transmitância e de absorbância) são feitas utilizando-se os valores padronizados de materiais de referência. Os materiais de referência são filtros neutros, cujos valores de transmitância (ou absorbância) são pouco variáveis em função do comprimento de onda. Através da análise da variação de valores desses padrões podem-se verificar alguns fatores que indicam o comportamento do espectrofotômetro, como: correção da linha de base realizada no *software* do instrumento, linearidade de resposta, ruído fotométrico, estabilidade fotométrica, repetitividade fotométrica, luz espalhada e exatidão de resultados.

Já para a verificação da escala de comprimento de onda utilizam-se padrões de referência com bandas de absorção específicas em distintos intervalos de comprimento de onda. São indicados principalmente os filtros de vidro de didímio e de óxido de hólmio. Os fatores analisados para a verificação da escala de comprimento de onda que mais influenciam nos resultados de medição são: a velocidade de varredura, a largura de fenda espectral e exatidão do comprimento de onda original (GOMES, 2008; INMETRO, 2008).

O *site* do INMETRO disponibiliza a listagem de laboratórios acreditados pela Rede Brasileira de Acreditação (RBC) que realizam a calibração de espectrofotômetros. Disponível

em: www.inmetro.gov.br/laboratorios/rbc/lista_laboratorios.asp?acao=consulta (informação pessoal)¹.

2.15 Método espectrofotométrico de Harboe

O método de M. Harboe foi publicado na revista *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, em 1959, com o título “A method for determination of hemoglobin in plasma by near-ultraviolet spectrophotometry”. O artigo é o mais citado quando se trata de avaliação da hemoglobina livre por espectrofotometria direta, tal como os estudos de Malinauskas *et al.* (1997), Cookson *et al.* (2004), Han *et al.* (2009), Adamzik *et al.* (2012), Boehm (2014), entre outros (GRILO, 2016).

O método de determinação de pequenas quantidades de hemoglobina, como na hemoglobina livre, por espectrofotometria na região ultravioleta próximo (UV próximo) do espectro eletromagnético é mais sensível e preciso, pois a absorção da oxihemoglobina na banda de Soret, que se estende de 420 a 432 nm, é mais intensa do que as bandas de absorção na região visível (HARBOE, 1959). Além disto, segundo Harboe, a diferença marcante entre a banda de Soret de oxihemoglobina e carboxihemoglobina é usada para identificar a absorção pela oxihemoglobina.

Na pesquisa, Harboe dosou a hemoglobina no plasma diluído a 1:10 em solução 0,01% de bicarbonato de sódio. A densidade óptica foi medida no pico da banda de Soret (415 nm), a 380 e a 450 nm, em espectrofotômetro Beckman®, modelo DU, com lâmpada de tungstênio, em cubetas de quartzo de vidro de 10 mm (1 cm) de comprimento óptico. A concentração da oxihemoglobina foi calculada diretamente por meio da fórmula que segue:

$$\text{mg HbO}_2/100 \text{ ml} = \frac{2 D_{415} - (D_{380} + D_{450})}{1,655} \times \frac{\text{diluição} \cdot 1000}{E} \quad (3)$$

A primeira parte do cálculo “ $2 D_{415} - (D_{380} + D_{450})$ ” consiste na correção da absorção devido às impurezas presentes na solução de hemoglobina. Desta forma, as absorções devidas à turbidez e ao plasma *per se* são eliminadas. No entanto, a fórmula não corrige a interferência causada pela bilirrubina em plasma/soro icterico (HARBOE, 1959). Para esta correção, Harboe se baseou na equação proposta por Rimington (1950) para o cálculo da

¹ Couceiro, I. B. Mensagem recebida por hemepar.pesquisa@sesa.pr.gov.br, em 9 de maio de 2016.

absorção da uroporfirina em soluções impuras. Para a obtenção dos valores “1,655” e de “*E*” da fórmula, Harboe baseou-se em estudo de Donaldson *et al* (1951) para a determinação dos coeficientes de extinção da oxihemoglobina em espectrofotômetro entre 430 e 700 nm. O coeficiente de extinção *E* (1g/100mL/1cm) corresponde à concentração padrão de 1 g de hemoglobina por 100 ml. Valendo-se de cálculos, Harboe (1959, p. 68) relata que

[...] O valor 1,655 foi calculado pela determinação de 10 diferentes soluções de oxihemoglobina. O valor *E* foi determinado pela análise de 13 diferentes soluções de HbO₂. 500 µl de cada solução foram adicionados a 10 ml de Na₂CO₃ 0,01% e a densidade óptica determinada a 543 mµ. 50 µl de cada solução foram adicionados a 10 ml de Na₂CO₃ 0,01% para determinação da densidade óptica a 415 mµ e a relação D415/D543 foi calculada. D543 foi primeiramente multiplicada por 21/201 para correção da diferença na concentração. A média das 13 determinações foi 9,24 (erro padrão da média = 0,013). O valor de *E* a 415 mµ: $E (1g/100mL/1cm) = 8,60 \times 9,24 = 79,46$.

Em 1984, Noe *et al.* compararam os métodos de Harboe e da Fórmula Policromática, ambos para a determinação da hemoglobina livre por espectrofotometria direta, cujas fórmulas utilizam a correção de Allen para minimizar efeitos de substâncias interferentes. A bilirrubina e os triglicerídeos são as fontes mais impactantes de interferência nos métodos de espectrofotometria direta para a hemoglobina livre. A técnica de Harboe, conforme descrito anteriormente, utiliza medições em 380, 415 e 450 nm. Pela fórmula policromática, desenvolvida por Hahn (1979), foram usadas medições de absorbância em 380, 415 e 470 nm. A fórmula para o cálculo da concentração de hemoglobina (em mg/L) pelo método de Harboe, apresentada no artigo de Noe *et al* (1984), tem o seguinte formato:

$$\frac{2 A_{415} - A_{380} - A_{450}}{2 aHb_{415} - aHb_{380} - aHb_{450}} \times 1 / \text{diluição} \quad (4)$$

A_{380} – absorbância lida em unidades de miliabsorbância a 380 nm

A_{415} – absorbância lida em unidades de miliabsorbância a 415 nm

A_{450} – absorbância lida em unidades de miliabsorbância a 450 nm

aHb_{380} – absortividade da hemoglobina em miliabsorbância por mg de Hb/L a 380 nm

aHb_{415} – absortividade da hemoglobina em miliabsorbância por mg de Hb/L a 415 nm

aHb_{450} – absortividade da hemoglobina em miliabsorbância por mg de Hb/L a 450 nm

As absortividades da hemoglobina, em miliabsorbância / (mg/L) a 380, 415 e 450 nm são 2,08; 7,47 e 0,90, respectivamente. Substituindo estes valores na fórmula (4), tem-se:

$$\text{Concentração de Hb (mg/L)} = 1,68 A_{415} - 0,84 A_{380} - 0,84 A_{450} \quad (5)$$

Posteriormente, estudos comparativos entre métodos para a dosagem da hemoglobina livre descreveram a fórmula de Harboe pela seguinte equação (MALINAUSKAS, 1997; COOKSON, 2004):

$$\text{Hb (g/L)} = [k (167,2 \times A_{415} - 83,6 \times A_{380} - 83,6 \times A_{450})] / 1000 \quad (6)$$

Sendo o coeficiente de calibração (k) igual a 1.

Em 2009, Han *et al.* desenvolveram um estudo comparativo entre métodos utilizados para as determinações da hemoglobina livre, hemoglobina total e hematócrito para o cálculo do percentual de hemólise. A fórmula que converte os valores de absorbância diretamente em concentração de hemoglobina, pelo método de Harboe foi transcrita literalmente como segue (HAN, 2009):

$$\text{Hb (g/L)} = 167,2 \times A_{415} - 83,6 \times A_{380} - 83,6 \times A_{450} \times 1/1000 \times 1/\text{diluição} \quad (7)$$

2.16 Método espectrofotométrico de Cinco comprimentos de onda

Na determinação da hemoglobina livre pelo método espectrofotométrico de Cinco comprimentos de onda (5 CO) são empregados os comprimentos de onda 370, 415, 510, 577 e 600 nm. Se a absorbância a 415 nm apresentar resultado “inferior a 1,5”, utilizam-se as absorbâncias a 510, 415 e 370 nm para o cálculo da concentração de hemoglobina com as equações da Fórmula 1. Caso a absorbância a 415 nm apresente resultado “superior a 1,5”, utilizam-se as absorbâncias a 510, 577 e 600 nm para o cálculo da concentração de hemoglobina com as equações da Fórmula 2. O resultado da hemoglobina livre é dado em g/dL (PRÓ-SANGUE, 1995; REDSANG-SIBRATEC, 2011). As equações das fórmulas 1 e 2 são (8) e (9), respectivamente:

Fórmula 1

$$\begin{aligned} X &= \text{Abs } 510 + [(\text{Abs } 370 - \text{Abs } 510) \times 0,68] \\ Y &= \text{Abs } 415 - X \\ \text{HbL} &= Y/113,22 \times 16125 / D \end{aligned} \quad (8)$$

Abs 510 – Absorbância a 510 nm

Abs370 – Absorbância a 370 nm

Abs 415 – Absorbância a 415 nm

HbL – Hemoglobina livre

D – Caminho ótico (1 cm)

Fórmula 2

$$\begin{aligned} X &= \text{Abs } 600 + [\text{Abs } 510 - \text{Abs } 600] \times 0,26 \\ Y &= \text{Abs } 577 - X \\ \text{HbL} &= Y / 13,64 \times 1,6125 / D \end{aligned} \quad (9)$$

Abs 600 – Absorbância a 600 nm

Abs 510 – Absorbância a 510 nm

Abs 577 – Absorbância a 577 nm

HbL – Hemoglobina livre

D – Caminho óptico (1 cm)

2.17 Método espectrofotométrico de Primeira derivada

A espectrofotometria derivada consiste na transformação do espectro normal por derivação. Assim, os espectros derivados são obtidos utilizando as informações contidas no espectro clássico ou de ordem zero. A derivação individualiza melhor os constituintes pelo aumento do número de bandas de absorção. Além disto, o método suprime as bandas largas, realça as bandas estreitas, melhorando a detectabilidade das pequenas características espectrais, como os “ombros”. A espectrofotometria derivada é indicada para determinação de misturas de componentes, que na espectrofotometria nas regiões do ultravioleta – visível está relacionada com o *overlapping*, que é a sobreposição das bandas (SOLONI, 1986; COPELAND, 1989).

O espectrofotômetro adequado para esta metodologia é o de varredura, interfaceado a um *software* para visualização dos espectros. A Primeira derivada é a razão entre a variação da absorbância versus a variação do comprimento de onda (COPELAND, 1989).

A construção de uma curva de calibração é necessária para se determinar a faixa de linearidade do método, os limites de detecção e estabelecer um fator de correção, por meio da aplicação da Lei de Lambert-Beer. Para a construção da curva de calibração, são utilizadas soluções diluídas obtidas a partir de uma solução padrão de hemoglobina livre. As soluções

padrão diluídas são lidas entre 550 e 600 nm. A Primeira derivada de absorbância corresponde à distância (D) entre o vale a 568 nm e o pico a 580 nm. A curva de calibração é traçada relacionando a distância D em mm (568:580) com a concentração de hemoglobina (mg/dL).

Para a determinação da concentração de hemoglobina livre de amostra desconhecida, utilizam-se as fórmulas (SOLONI, 1986).

$$\text{Fator de correção (f)} = \frac{\text{Concentração Hb padrão}}{D (568:580) \text{ padrão}} \quad (10)$$

$$\text{HbL amostra (mg/dL)} = (f) \times D (568:580) \text{ amostra} \quad (11)$$

Em que:

D (568:580) - distância (em mm) entre o vale a 568 nm e o pico a 580 nm.

3. JUSTIFICATIVA

O Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná – HEMEPAR começou a implantação do controle de qualidade sistemático dos hemocomponentes em 1990. Naquela época, a Fundação Pró-Sangue de São Paulo já possuía laboratório de controle de qualidade de hemocomponentes (CQH) bem estruturado, bem como manuais de procedimentos técnico-operacionais. Sendo assim, o HEMEPAR buscou subsídios nessa instituição de excelência para a viabilização do projeto de CQH. Vários procedimentos técnicos da Fundação Pró-Sangue foram reproduzidos e adotados no controle de qualidade de hemocomponentes do HEMEPAR, como, por exemplo, o protocolo para a determinação da hemoglobina livre em concentrados de hemácias. Neste protocolo, a determinação da hemoglobina livre é espectrofotométrica com leituras das absorbâncias das amostras em cinco comprimentos de onda – 370, 415, 510, 577 e 600 nm. A concentração da hemoglobina livre é dada em g/dL após cálculos em equações matemáticas da “fórmula 1” ou da “fórmula 2” (PRÓ- SANGUE, 1995; REDSANG-SIBRATEC, 2011). Doravante, o protocolo para a determinação da hemoglobina livre será referido como método espectrofotométrico de Cinco comprimentos de onda – 5 CO.

Lamentavelmente, o procedimento 5 CO não possui referência bibliográfica e este fato despertou interesse sobre a fonte de consulta. Segundo Ruby Pietersz, nos anos 80 o Banco de Sangue de Sanquin, em Amsterdã, realizava a determinação da hemoglobina livre por método

espectrométrico com leituras em 370, 412 e 500 nm. Este método foi mencionado brevemente em dois artigos publicados na revista *Vox Sanguinis*, pelos pesquisadores Diepenhorsrt (1972) e por Vogelaar (1972), porém, a fonte bibliográfica utilizada não foi citada em nenhum dos artigos. A pesquisadora informou, também, que naquele tempo, devido à dificuldade de acesso à bibliografia, as informações eram trocadas informalmente e normalmente os métodos descritos nos manuais técnicos não referiam a fonte original (informação pessoal)².

Em outubro de 2014, traçou-se um panorama da metodologia adotada nos hemocentros públicos nacionais para a determinação da hemoglobina livre. Foram consultados onze hemocentros, dos quais 73% relataram utilizar o método 5 CO, sendo eles: HEMOSC (Santa Catarina), Fundação PRÓ-SANGUE - Hemocentro de São Paulo (São Paulo), Hemocentro de Marília – FAMEMA (São Paulo), Hemocentro de Campinas - UNICAMP (São Paulo), HEMOMINAS (Minas Gerais), HEMOCE (Ceará), HEMOAM (Amazonas), FUNDAÇÃO HEMOCENTRO DE BRASÍLIA (Distrito Federal) e HEMEPAR (Paraná). O Hemocentro de Ribeirão Preto (São Paulo) utiliza o método espectrofotométrico de Primeira derivada. Os Hemocentros HEMOPA (Pará) e HEMORIO (Rio de Janeiro) utilizam a metodologia automatizada PlasmaLow Hb®.

O cenário mostrado acima reforça a ausência de padronização dos procedimentos em laboratórios de controle de qualidade de hemocomponentes no Brasil. Além disso, conforme já mencionado, a transfusão de unidades de hemácias com hemólise traz sérias implicações clínicas aos receptores devido à toxicidade da hemoglobina livre. Adicionalmente a este risco, a avaliação visual da hemólise em bolsas de concentrados de hemácias consiste numa prática laboratorial usual, que normalmente é enganosa e tende a superestimar o grau de hemólise, ocasionando o descarte desnecessário de bolsas de concentrados de hemácias.

Neste contexto, considerando-se todos os inconvenientes expostos, tais como a ausência de referência bibliográfica do procedimento técnico nacional para a determinação da HbL, a toxicidade da infusão de concentrados de hemácias com hemólise e a subjetividade da avaliação visual da hemólise, justifica-se a padronização de um método adequado para ser empregado no controle de qualidade de hemocomponentes no Brasil.

4. HIPÓTESE

Nossa hipótese é que a padronização de um método analítico para a dosagem de hemoglobina livre, reprodutível, de baixo custo, de fácil execução e sem utilização de

² Pietersz, R. Mensagem recebida por ktmgrilo@yahoo.com.br, em 15 de maio de 2014.

substâncias químicas nocivas, seja possível. Pressupõe-se, também, que a disponibilização de um Procedimento Operacional Padrão para a determinação da hemoglobina livre embasado cientificamente e de um Guia visual de hemólise em concentrados de hemácias, melhorará a confiabilidade e segurança dos resultados de hemoglobina livre e permitirá a comparação dos resultados entre diferentes Serviços de Hemoterapia.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Padronizar uma metodologia espectrofotométrica direta para a determinação da concentração de hemoglobina livre em concentrados de hemácias, com embasamento científico, de simples execução, de baixo custo e reprodutível.

5.2 Objetivos Específicos

- Comparar a metodologia espectrofotométrica direta de Harboe para a determinação da concentração de hemoglobina livre em concentrados de hemácias, com as metodologias espectrofotométrica direta de Cinco comprimentos de onda e espectrofotométrica de Primeira derivada.
- Fornecer subsídios para a utilização da metodologia espectrofotométrica direta de Harboe proposta pela elaboração de Procedimento Operacional Padrão (POP).
- Elaborar um Guia visual de hemólise, com base na cor do plasma residual / líquido sobrenadante, para a avaliação do grau de hemólise em concentrados de hemácias com solução aditiva (CH com CPD-SAG Manitol) e em concentrados de hemácias sem solução aditiva (CH com CPD ou CH com CPDA-1).

6 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Delineamento do estudo

Este trabalho consta de uma pesquisa aplicada, analítica, quantitativa e transversal (BOISSEL, 2004) com o objetivo de propor uma metodologia espectrofotométrica direta para a determinação da concentração de hemoglobina livre em concentrados de hemácias.

As quantificações de hemoglobina livre foram realizadas no Laboratório de Alimentos do Instituto de Tecnologia do Paraná – TECPAR (Curitiba, Paraná) e no Laboratório de Controle da Qualidade do Hemocentro de Ribeirão Preto do HCFMRP USP (Ribeirão Preto, São Paulo).

O projeto de pesquisa foi submetido para apreciação pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do Hospital do Trabalhador/Secretaria de Saúde do Paraná e do Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. O projeto foi aprovado em março de 2015, com parecer de número 999816 e Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) número 42609215.1.0000.5225.

6.2 Casuística

Foram analisadas 187 amostras de concentrados de hemácias (CH) coletados em bolsas para coleta de sangue CPDA-1 e em bolsas para coleta de sangue CPD/SAG-M (Fresenius Kabi, São Paulo, Brasil), provenientes do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná - HEMEPAR e do Hemocentro de Ribeirão Preto. Estas amostras integravam a amostragem de rotina do controle de qualidade de hemocomponentes, ou seja, não foi necessária a coleta de amostras adicionais para esse estudo. As amostras controle foram também obtidas “*in house*” a partir de concentrados de hemácias.

Os concentrados de hemácias utilizados para as dosagens continham solução anticoagulante e preservante CPDA-1 (n = 58) ou solução anticoagulante e aditiva CPD/SAG-Manitol (n = 129). Todos se encontravam estocados em refrigeradores para armazenamento de sangue, com temperatura monitorada por todo o período de estocagem e constante entre a faixa de 2°C e 6°C. Os concentrados de hemácias com CPDA-1 e CPD/SAG-Manitol estavam com 4 a 35 dias de armazenamento e 2 a 42 dias, respectivamente.

O meio extracelular dos CH CPDA-1 contém plasma residual (35 mL, em média) e solução anticoagulante/preservante residual (15 mL, em média). Já o meio extracelular dos CH CPD/SAG-Manitol é constituído por mínima quantidade de plasma e solução anticoagulante/preservante residuais e solução aditiva de manitol (100 mL). Sendo assim, o meio extracelular de ambos os CH (CH CPDA-1 e CH SAd) será referido como líquido sobrenadante (LS) ou, simplesmente, como sobrenadante.

6.3 Métodos de determinação da hemoglobina livre, hemoglobina total e volume globular

As determinações espectrofotométricas pelas metodologias Harboe e 5 CO foram realizadas em espectrofotômetro Micronal, modelo AJX-3000PC, no Laboratório de Alimentos do Instituto de Tecnologia do Paraná - TECPAR.

As determinações espectrofotométricas pela metodologia Primeira derivada foram realizadas em espectrofotômetro Spectronic® Genesys™ 2PC, de varredura, interfaceado o *software* para visualização do espectro, no Laboratório de Controle da Qualidade do Hemocentro de Ribeirão Preto.

As determinações de hemoglobina total e volume globular dos concentrados de hemácias foram realizadas em analisador hematológico automatizado Sysmex®, modelo XS1000i, no Laboratório de Controle de Qualidade de Hemocomponentes do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná - HEMEPAR.

Para a dosagem da hemoglobina total, o Sysmex® utiliza o reagente lauril sulfato de sódio (SLS). O SLS, isento de cianeto, lisa os eritrócitos, liga-se ao grupo heme, forma um complexo colorido (SLS-Hb) que é quantificado por método fotométrico, proporcionalmente à concentração de hemoglobina presente na amostra. A determinação do volume globular é fornecida, pelo analisador hematológico Sysmex®, pela medida do valor cumulativo das amplitudes dos impulsos de cada eritrócito (SYSMEX, 2012).

6.4 Coleta da amostra

As alíquotas de concentrados de hemácias foram obtidas por coleta não destrutiva das bolsas de CH, por meio de equipamento para conexão estéril (TCD® Sterile Tube Welder, Genesis BPS), para bolsas de transferência de sangue (Fresenius® Kabi Brasil, 150 mL). A homogeneização da bolsa de CH foi realizada manualmente, por meio de vinte inversões, para a garantia de coleta de amostra representativa do conteúdo original. Ao sítio de inserção de equipo da bolsa de transferência adaptou-se um dispositivo estéril para coleta de amostras (Sampling Site Coupler® Baxter) e coletou-se 10,0 mL de CH com auxílio de seringa acoplada à agulha. Deste volume, 5,0 mL foram transferidos para tubo com anticoagulante EDTA e 5,0 mL foram transferidos para tubo sem anticoagulante, com gel separador.

Para a determinação da hemoglobina total e do volume globular utilizou-se a amostra íntegra de CH, coletada com anticoagulante. Para a determinação da HbL utilizou-se o sobrenadante das amostras de CH, coletado em tubo sem anticoagulante, com gel separador. Estes tubos foram centrifugados a 1070 g, por 10 minutos (centrífuga Hermle®, modelo

Z206A). Com auxílio de micropipeta, transferiu-se cerca de 1,0 ml do sobrenadante para tubo de ensaio plástico seco e limpo.

6.5 Avaliação do aspecto visual da amostra

Os líquidos sobrenadantes dos concentrados de hemácias foram classificados, quanto ao aspecto visual, em três categorias de aparência: límpido, lipêmico e/ou hemolisado. O sobrenadante límpido correspondeu àquele de coloração amarelada. Considerou-se lipêmico o sobrenadante com aspecto turvo ou opalescente. Os concentrados de hemácias com líquido sobrenadante de aparência hemolisada foram classificados em número de cruzes de hemólise, de acordo com a intensidade da coloração avermelhada do sobrenadante, a seguir: coloração rósea tênue, levemente avermelhada, avermelhada e vermelha intensa corresponderam à hemólise 1+, hemólise 2+, hemólise 3+ e hemólise 4+/5+, respectivamente.

Os concentrados de hemácias com sobrenadante de aparência lipêmica não devem ser utilizados para transfusão. Consequentemente, as cinco amostras de CH lipêmicas incluídas neste estudo não integravam o estoque destinado à transfusão. Elas foram analisadas quanto à concentração de HbL e os resultados foram comparados com amostras de CH sem lipemia, com tempo de validade semelhante.

6.6 Diluição das amostras de sobrenadantes

As amostras foram diluídas de acordo com o aspecto visual do líquido sobrenadante (límpido, lipêmico e/ou hemolisado), visando a obtenção de resultado proporcional à concentração de HbL da amostra e absorbância lida dentro da faixa de linearidade espectrofotométrica. Para a diluição das amostras utilizou-se solução fisiológica (SF) para volume final de 2000 ou 3000 µl, conforme a **Tabela 02**:

Tabela 02 - Diluição das amostras de sobrenadantes de CH em solução fisiológica

Aspecto visual do sobrenadante	Diluição	Volume de sobrenadante (µl)	Volume de SF (µl)
Límpido	1:2	1000	1000
Límpido	1:5	400	1600
Hemólise 1+ e/ou Lipemia 1+	1:5	400	1600
Hemólise 1+ e/ou Lipemia 1+	1:10	200	1800
Hemólise 2+ e/ou Lipemia 2+	1:20	100	1900
Hemólise 2+ e/ou Lipemia 2+	1:50	40	1960
Hemólise 3+ e/ou Lipemia 3+	1:50	40	1960
Hemólise 3+ e/ou Lipemia 3+	1:100	20	1980
Hemólise 4+ e/ou Lipemia 4+	1:100	20	1980
Hemólise 4+ e/ou Lipemia 4+	1:200	10	1990
Hemólise 5+ e/ou Lipemia 5+	1:200	10	1990
Hemólise 5+ e/ou Lipemia 5+	1:300	10	2990

6.7 Preparo das amostras controle

Devido à indisponibilidade de solução padrão de hemoglobina livre produzida comercialmente, amostras controle foram preparadas *in-house* a partir de concentrados de hemácias (CH) com concentração de hemoglobina total conhecida, medida em analisador hematológico automatizado Sysmex®, modelo XS1000i. As amostras controle foram incluídas em cada corrida analítica e analisadas da mesma forma que as amostras teste.

Para o preparo da amostra controle, selecionou-se concentrado de hemácias recentemente coletado, até dois dias após a coleta. Para a remoção de substâncias interferentes, eventualmente presentes no CH, as hemácias foram lavadas com solução fisiológica, por três vezes. Após a remoção do sobrenadante da 3ª lavagem, o sedimento de hemácias foi homogeneizado e, em seguida, determinou-se a concentração de hemoglobina, em triplicata, pelo método automatizado Sysmex XS-1000i®, considerado como referência. Considerou-se como resultado da Hb da amostra controle (em g/dL) aquele reproduzido ao menos duas vezes nas três determinações realizadas. Vale ressaltar que o analisador hematológico automatizado utilizado é checado diariamente com amostras controle de qualidade, disponíveis comercialmente.

Para a liberação do conteúdo de hemoglobina do interior dos eritrócitos, provocou-se a hemólise pela adição de água deionizada às hemácias, na proporção de 1:100 (20 µl de sedimento de hemácias para 1980 µl de água destilada) e homogeneização vigorosa do tubo.

Para a sedimentação do estroma celular, o hemolisado foi centrifugado a 1070 g, por 10 minutos (centrífuga Hermle®, modelo Z 206 A). Após a centrifugação, o sobrenadante foi

transferido para um tubo de hemólise seco e limpo, com auxílio de micropipeta. O hemolisado resultante se constituiu na amostra controle da determinação da hemoglobina livre.

6.8 Leitura em espectrofotômetro

As determinações espectrofotométricas pelas metodologias Harboe e 5 CO foram realizadas em espectrofotômetro Micronal®, modelo AJX-3000PC, cujas manutenções preventivas e calibração encontravam-se válidas, conforme preconizado pela Rede Brasileira de Calibração (RBC). De acordo com a recomendação do manual de utilização do espectrofotômetro, o equipamento foi mantido ligado por 15 minutos antes do início das dosagens (MICRONAL, 2013).

Para a determinação da HbL pelo método de Harboe realizaram-se as leituras das absorbâncias em 380 nm, 415 nm e 450 nm. Para o método de 5 CO foram lidas as absorbâncias em 370 nm, 415 nm, 510 nm, 577 nm e 600 nm. Utilizou-se solução fisiológica como “branco” para zerar cada comprimento de onda selecionado.

Os valores das absorbâncias lidas para cada amostra testada, em todos os comprimentos de onda utilizados, foram devidamente transcritos para um formulário de registro de resultados.

Na determinação da HbL pelo método de Primeira derivada utilizou-se espectrofotômetro Spectronic® Genesys™ 2PC, de varredura, interfaceado a *software* para visualização das curvas dos espectros de absorção. Previamente às dosagens, o espectrofotômetro foi mantido ligado por 15 minutos. A leitura por varredura foi feita no intervalo entre 550 nm e 650 nm e o espectro de absorção de hemoglobina é visto na faixa de 580 nm a 600 nm. Os espectros e o valor das leituras de cada amostra testada foram impressos em formulário de papel.

6.9 Fórmula para o cálculo da concentração da hemoglobina livre pelo método de Harboe

A fórmula para o cálculo da HbL (em g/L) pelo método de Harboe apresentada por Han (2009) foi transcrita literalmente, a seguir:

$$\text{Hb (g/L)} = 167,2 \times A_{415} - 83,6 \times A_{380} - 83,6 \times A_{450} \times 1/1000 \times 1/\text{diluição} \quad (7)$$

No entanto, ao utilizar a fórmula para calcular a HbL das amostras do estudo, constatou-se que o fator de diluição deveria ser apresentado como “x diluição”, ao invés de “x 1/diluição”. Por conseguinte, a fórmula utilizada para o cálculo da concentração da hemoglobina livre nesse trabalho foi a seguinte (8):

$$\text{Hb (g/L)} = 167,2 \times A_{415} - 83,6 \times A_{380} - 83,6 \times A_{450} \times 1/1000 \times \text{diluição} \quad (8)$$

A_{415} – Absorbância a 415 nm

A_{380} – Absorbância a 380 nm

A_{450} – Absorbância a 450 nm

6.10 Fórmulas para o cálculo da concentração da hemoglobina livre pelo método de Cinco comprimentos de onda

Fórmula 1

$$\begin{aligned} X &= \text{Abs } 510 + [(\text{Abs } 370 - \text{Abs } 510) \times 0,68] \\ Y &= \text{Abs } 415 - X \\ \text{HbL} &= Y/113,22 \times 16125 / D \end{aligned} \quad (9)$$

Abs 510 – Absorbância a 510 nm

Abs370 – Absorbância a 370 nm

Abs 415 – Absorbância a 415 nm

HbL – Hemoglobina livre

D – Caminho ótico (1 cm)

Fórmula 2

$$\begin{aligned} X &= \text{Abs } 600 + [\text{Abs } 510 - \text{Abs } 600) \times 0,26] \\ Y &= \text{Abs } 577 - X \\ \text{HbL} &= Y/13,64 \times 1,6125 / D \end{aligned} \quad (10)$$

Abs 600 – Absorbância a 600 nm

Abs 510 – Absorbância a 510 nm

Abs 577 – Absorbância a 577 nm

HbL – Hemoglobina livre

D – Caminho ótico (1 cm)

6.11 Fórmulas para o cálculo da concentração da hemoglobina livre pelo método de Primeira derivada

Para o cálculo da HbL pelo método espectrofotométrico de Primeira derivada utiliza-se a Primeira derivada de absorbância que corresponde à distância (D) entre o vale a 568 nm e o pico a 580 nm do espectro de absorção da hemoglobina nesta região. O fator de correção (f) é determinado por meio de curva de calibração relacionando a distância D em mm (568:580) e a concentração de hemoglobina (mg/dL) de soluções padrão de hemoglobina diluídas.

Para a determinação da concentração de hemoglobina livre de uma amostra desconhecida, utilizam-se as fórmulas (10) e (11):

$$\text{Fator de correção (f)} = \frac{\text{Concentração Hb padrão}}{D (568:580) \text{ padrão}} \quad (11)$$

$$\text{HbL amostra (mg/dL)} = (f) \times D (568:580) \text{ amostra} \quad (12)$$

D (568:580) - distância (em mm) entre o vale a 568 nm e o pico a 580 nm.

6.12 Cálculos

Os cálculos da concentração da HbL foram obtidos por meio da inserção das fórmulas no programa Microsoft Office Excel. Para os métodos de Harboe, 5 CO e Primeira derivada foram utilizadas as fórmulas (8), (9), (10), (11) e (12).

6.13 Linearidade espectrofotométrica

A faixa de linearidade de leitura espectrofotométrica da hemoglobina livre no espectrofotômetro utilizado neste estudo foi determinada por meio da construção de curva de calibração.

Utilizou-se como amostra controle uma suspensão de hemácias com hemoglobina total conhecida e igual a 24,3 g/dL e para o seu preparo procedeu-se conforme descrito no item 3.7. O hemolisado resultante foi diluído em duplicata com solução fisiológica a 1:600, 1:400, 1:200, 1:100, 1:50, 1:20, 1:10, 1:8, 1:4, 1:2 e 1:1. As leituras espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro Micronal® AJX-3000PC, em 380, 415 e 450 nm. Posteriormente, as concentrações de HbL das amostras diluídas foram calculadas por meio da fórmula (8). O resultado médio das amostras em duplicata foi utilizado para a construção da curva de calibração.

É importante salientar que cada espectrofotômetro possui características próprias e, conseqüentemente, todo serviço deverá definir a faixa de leitura linear espectrofotométrica para a determinação da hemoglobina livre especificamente para o equipamento utilizado.

6.14 Ensaio comparativo para verificação da exatidão

Com a finalidade de avaliar a exatidão e reprodutibilidade dos resultados em espectrofotômetros de marca e modelo distintos do espectrofotômetro utilizado neste estudo, assim como identificar eventuais desvios relacionados à sistemática da dosagem da HbL pelo método de Harboe, foram realizados ensaios comparativos entre quatro laboratórios de controle de qualidade de hemocomponentes. Para os ensaios, amostras-controle idênticas foram analisadas em espectrofotômetros distintos destes laboratórios. As amostras controle foram analisadas pelos métodos de Harboe e de 5 CO, conforme descrito nos itens 3.8, 3.9 e 3.10.

Os laboratórios, codificados A, B, C e D, utilizaram os espectrofotômetros Micronal® AJX-3000PC, Shimadzu® UV 160 IPC, Shimadzu® UV Mini 1240 e Femto® 600S, respectivamente. Todos os espectrofotômetros se encontravam calibrados e com as manutenções preventivas realizadas.

6.15 Construção do guia visual de hemólise

Para o cálculo do percentual de hemólise do CH são empregados três valores do controle de qualidade do concentrado de hemácias (volume globular, hemoglobina total e hemoglobina livre). Como os resultados dos parâmetros de qualidade podem variar em uma faixa aceitável, o percentual de hemólise também pode variar, conforme mostrado nas

Tabelas 3 e 5. Desta forma, optou-se pela construção do guia visual de hemólise baseado no valor da hemoglobina livre do CH, já que este se apresenta com um resultado fixo.

Por conseguinte, a verificação da tonalidade do sobrenadante do CH, no limite entre as hemácias e a parte líquida na bolsa, norteará o profissional na avaliação visual do nível de hemólise do concentrado de hemácias (**Figura 02**).

Figura 02 – Avaliação da hemólise pela observação do sobrenadante nas bolsas de concentrados de hemácias. Percentual de hemólise CH A = 0,11%, Percentual de hemólise CH B = 0,36% e Percentual de hemólise CH C = 1,14% (adaptado de Canadian Blood Services, 2009).

6.15.1 Guia visual de hemólise em CH CPDA-1

Os critérios adotados para a construção do guia visual de hemólise em CH CPDA-1 basearam-se nos parâmetros das especificações técnicas deste hemocomponente, nos níveis do volume globular/hematócrito e hemoglobina do doador, assim como no volume de sangue coletado. Em razão do valor mínimo aceitável do VG e Hb do candidato à doação ser, respectivamente, 38% e 12,5g/dL para mulheres, estes valores foram adotados para a confecção dos cálculos. A partir dos limites mínimo e máximo aceitáveis do VG do CH CPDA-1 (65 a 80%), do VG (38 a 54%) / Hb da doadora (12,5 a 18,0 g/dL) e, adicionalmente, do volume mínimo de coleta do ST para a obtenção de CH com Hb superior a 45 g/bolsa (360 ml), calculou-se a faixa de hemoglobina e volume factíveis para CH CPDA-1. Como resultado, a Hb/CH pode variar de 21,4 g/dL a 26,7 g/dL e o volume do CH pode oscilar de 171 a 411 ml.

Em virtude do amplo intervalo permitido para VG e Hb em CH CPDA-1, o percentual de hemólise poderá variar consideravelmente. Ao compararmos, por exemplo, dois concentrados de hemácias com valores de hemoglobina livre igual a 0,50 g/dL, sendo um dos concentrados de hemácias CH (1) com VG=65% e Hb=21,4 g/dL, o percentual de hemólise será 0,82%, valor superior ao máximo permitido. No entanto, o outro concentrado de hemácias CH (2) com o mesmo valor de HbL=0,50 g/dL; VG=80 % e Hb=26,7 g/dL terá percentual de hemólise igual a 0,37%, resultado dentro do limite aceitável. A **Tabela 03** mostra a variação dos resultados exemplificados:

Tabela 03 – Variação do percentual de hemólise devido aos valores mutáveis do Volume Globular (VG) e da Hemoglobina Total (HbT) em concentrados de hemácias CPDA-1 CH (1) e CH (2).

	HbL (g/dL)	VG (%)	HbT (g/dL)	Hemólise (%)
CH (1)	0,50	65	21,4	0,82
CH (2)	0,50	80	26,7	0,37

Neste contexto, para a construção do guia visual de hemólise utilizaram-se os valores médios de VG e de Hb permitidos em CH CPDA-1. Para o VG, usou-se 72,5% (valor médio entre 65 e 80) e para a Hb usou-se 24,05 g/dL (valor médio entre 21,4 e 26,7).

Primeiramente foi construída uma tabela (**Tabela 04**) com valores crescentes de HbL e valores fixos de Hb e VG. O percentual de hemólise correspondente foi calculado pela Fórmula (1). Posteriormente, foram produzidas as amostras com concentrações de HbL correspondentes aos tubos 01 a 10, a partir de concentrado de CH com hemoglobina conhecida. Para a obtenção das concentrações de HbL aplicou-se a equação para diluição de soluções, Fórmula (12):

$$C \times V = C' \times V' \quad (12)$$

C – Concentração inicial de HbL (em g/dL)

V – Volume inicial da solução (em ml)

C' – Concentração final de HbL (em g/dL)

V' – Volume final da solução (em ml)

Tabela 04 – Concentrações de hemoglobina livre para a construção do Guia visual de hemólise em concentrados de hemácias CPDA-1.

Parâmetros do concentrado de hemácias CPDA-1				
Tubo	VG médio do CH (%)	HbT média do CH (g/dL)	Concentração de HbL (g/dL)	Percentual de hemólise (%)
01	72,5	24,05	0,044	0,050
02	72,5	24,05	0,175	0,200
03	72,5	24,05	0,262	0,300
04	72,5	24,05	0,350	0,400
05	72,5	24,05	0,437	0,500
06	72,5	24,05	0,525	0,600
07	72,5	24,05	0,612	0,700
08	72,5	24,05	0,700	0,800
09	72,5	24,05	0,787	0,900
10	72,5	24,05	0,874	1,000

Ao final do preparo das concentrações das amostras, os tubos de hemólise foram fotografados em alta resolução com máquina fotográfica Nikon® D 610 para reprodução fiel das nuances de coloração das concentrações de HbL. A imagem, as instruções para utilização e a interpretação das cores foram transcritas em formato Microsoft® Word. O Guia Visual de hemólise será disponibilizado para utilização dos profissionais nas bancadas de trabalho.

6.15.2 Guia visual de hemólise em CH com solução aditiva (CH SAd)

Os critérios empregados na construção do guia visual de hemólise em concentrados de hemácias com solução aditiva foram os mesmos adotados para CH CPDA-1. Com base nos limites mínimo e máximo aceitáveis do VG do CH SAd (50 a 70%), do VG da doadora (38 a 54%) / Hb da doadora (12,5 a 18,0 g/dL) e, adicionalmente, do volume mínimo de coleta do ST para a obtenção de CH com Hb superior a 45 g/bolsa (360 ml), calculou-se a faixa de variação da concentração da hemoglobina total e do volume da bolsa de CH SAd que podem variar de 16,4 g/dL a 23,3 g/dL e de 195 a 535 ml, respectivamente.

Similarmente ao descrito para o CH CPDA-1, devido aos intervalos possíveis de VG e Hb em CH SAd, ao compararmos, por exemplo, dois concentrados de hemácias com valores de hemoglobina livre igual a 0,30 g/dL, sendo um dos concentrados de hemácias CH(1) com VG=50% e Hb=16,4 g/dL, o percentual de hemólise será igual a 0,91%, valor superior ao máximo permitido. No entanto, outro concentrado de hemácias CH(2) com o mesmo valor de HbL=0,30 g/dL; VG=70 % e Hb=23,3 g/dL terá percentual de hemólise igual a 0,39%,

resultado dentro do limite aceitável. A **Tabela 05** mostra a variação dos resultados exemplificados:

Tabela 05 – Variação do percentual de hemólise devido aos valores mutáveis do Volume Globular (VG) e da Hemoglobina Total (HbT) em concentrados de hemácias com solução aditiva CH (1) e CH (2).

	HbL (g/dL)	VG (%)	HbT (g/dL)	Hemólise (%)
CH (1)	0,30	50	16,4	0,91
CH (2)	0,30	70	23,3	0,39

Nesta perspectiva, para a construção do guia visual de hemólise, foram utilizados os valores médios de VG e de Hb encontrados nos CH SAd. Para o VG foi usado 60% (valor médio entre 50 e 70) e para a Hb, 19,85 g/dL (valor médio entre 16,4 e 23,3).

Primeiramente, foi construída tabela (**Tabela 06**) com valores crescentes de HbL e valores fixos de Hb e VG. O percentual de hemólise correspondente foi calculado pela Fórmula (1). Posteriormente, foram produzidas as amostras com concentrações de HbL correspondentes aos tubos 01 a 10, a partir de concentrado de CH com hemoglobina conhecida, da mesma forma que para CH CPDA-1.

Tabela 06 – Concentrações de hemoglobina livre para a construção do guia visual de hemólise em concentrados de hemácias com solução aditiva.

Parâmetros do concentrado de hemácias SAd				
Tubo	VG médio do CH (%)	HbT média do CH (g/dL)	Concentração de HbL (g/dL)	Percentual de hemólise (%)
01	60	19,85	0,025	0,050
02	60	19,85	0,099	0,200
03	60	19,85	0,150	0,300
04	60	19,85	0,198	0,400
05	60	19,85	0,248	0,500
06	60	19,85	0,298	0,600
07	60	19,85	0,345	0,700
08	60	19,85	0,397	0,800
09	60	19,85	0,446	0,900
10	60	19,85	0,496	1,000

Ao final do preparo das concentrações das amostras, os tubos de hemólise foram fotografados em alta resolução, da mesma forma que para CH CPDA-1 e o Guia Visual de hemólise será disponibilizado para utilização dos profissionais nas bancadas de trabalho.

6.16 Análise estatística dos resultados

As análises estatísticas e os gráficos dos resultados dos ensaios sobre a concentração da hemoglobina livre pelas metodologias empregadas foram realizados pelo método de correlação entre cada duas metodologias e os resultados apresentados como gráficos de dispersão, valores dos coeficientes de correlação (R) e de determinação (R^2), do erro casual ($1-R^2$) e da significância da correlação pelo valor de p para a hipótese nulidade.

A concentração de hemoglobina livre e o aspecto visual do líquido sobrenadante dos concentrados de hemácias foram avaliados pela análise de variância Kruskal-Wallis ANOVA, e apresentados em gráficos *BoxPlot*, com caixas indicando a média e o desvio padrão e barras referentes aos limites de 95% de confiança.

Os resultados da hemoglobina livre de concentrados de hemácias com líquido sobrenadante de aspecto lipêmico (anormal) e não lipêmico (normal) foram igualmente avaliados pelo método não paramétrico de Kruskal-Wallis.

A análise estatística do ensaio comparativo entre laboratórios foi realizada por meio do Índice de Concordância Intra-classe (ICC). As análises foram realizadas com o uso do pacote estatístico on-line da Universidade de Hong Kong no seguinte endereço: http://department.obg.cuhk.edu.hk/researchsupport/IntraClass_correlation.asp.

As análises das amostras controle pelo Teste t foram realizadas com o uso do pacote estatístico Statistica 10.0 (StatSoft). A significância estatística foi considerada para $p < 0,05$.

A estatística descritiva representada pela média, o desvio padrão, o valor máximo e o valor mínimo por grupos de dados, foi realizada por meio do programa Excel 2013 (Microsoft®).

7. RESULTADOS

Com o objetivo de facilitar a exposição dos resultados da concentração de hemoglobina livre nos três métodos testados, os concentrados de hemácias foram divididos em categorias de meio de preservação, de tempo de validade e de aspecto visual.

Deste modo, conforme o meio de preservação utilizado, os concentrados de hemácias foram separados em CH CPDA-1 e CH SAd.

Os tempos de validade dos CH CPDA-1 e CH SAd foram estratificados em quatro períodos: período I (1º ao 10º dia), período II (11º ao 20º dia), período III (21º ao 30º dia) e período IV (31º ao 42º dia).

Por fim, os concentrados de hemácias foram classificados, de acordo com o aspecto visual do líquido sobrenadante em límpido, hemolisado e/ou lipêmico.

7.1 Resultados da concentração de hemoglobina livre em relação aos meios de preservação utilizados e aos tempos de validade dos concentrados de hemácias

Do total de concentrados de hemácias testados ($n = 187$), 31% corresponderam aos concentrados de hemácias CPDA-1 ($n = 58$) e 69 % aos CH SAd ($n = 129$).

Os ensaios sobre a concentração de hemoglobina livre dos concentrados de hemácias foram analisados pelo método de correlação entre cada duas metodologias testadas e os resultados apresentados em gráficos de dispersão, em valores dos coeficientes de correlação (R) e de determinação (R^2), do erro casual ($1-R^2$) e da significância da correlação pelo valor de (p) para a hipótese nulidade. Estes valores estão descritos na **Tabela 07**.

O erro casual entre as metodologias de Harboe e 5 CO variou de 0,01 a 0,06% em CH CPDA-1 e de 0,10 a 1,57% em CH SAd. Entre as metodologias de Harboe e 1ª derivada, o erro casual variou de 1,24 a 12,71% em CH CPDA-1 e de 2,94 a 9,79% em CH SAd. Finalmente, entre os métodos de 1ª derivada e 5 CO, o erro casual variou de 0,52 a 13,21% em CH CPDA-1 e de 3,17 a 11,17% em CH SAd.

Com relação ao erro sistemático, as regressões de reta linear observadas nas **Figuras 03, 04, 05, 06, 07 e 08** mostram que os valores dos coeficientes lineares são próximos de 0 e os coeficientes angulares são próximos de 1. Isso significa que os erros sistemáticos que ocorreram são irrelevantes e os dados de hemoglobina livres ensaiadas nas três metodologias são equivalentes. Todas as correlações (R) foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Os valores calculados para a hemoglobina livre nas três metodologias foram altamente correlacionados. Entre os métodos de Harboe e 5 CO, CH CPDA-1 e CH SAd apresentaram correlações $R^2=0,9986$ e $R^2=0,9842$; respectivamente. Entre os métodos de Harboe e 1ª derivada, CH CPDA-1 e CH SAd as correlações $R^2=0,8729$ e $R^2=0,9021$; nesta ordem. E, finalmente, as correlações R^2 entre os métodos 1ª derivada e 5 CO em CH CPDA-1 e CH SAd foram, por esta ordem, $R^2=0,8679$ e $R^2=0,8883$.

Tabela 07 – Valores do coeficiente de correlação (R), coeficiente de determinação (R^2) e do erro casual ($1-R^2$) entre os métodos de Harboe, de Cinco comprimentos de onda e de Primeira derivada para dosagem de hemoglobina livre em concentrados de hemácias, de acordo com o meio de preservação e o tempo de armazenamento dos Concentrados de Hemácias.

Métodos	Meio preservação	Tempo de armazenamento (dias)	R	R^2	Erro casual ($1-R^2$) (%)
Harboe e 5 CO	CPDA-1	1 a 10	0,9998	0,9996	0,04
		11 a 20	0,9999	0,9999	0,02
		21 a 30	0,9997	0,9994	0,06
		> 30	0,9993	0,9986	0,01
	SAd	1 a 10	0,9968	0,9937	0,64
		11 a 20	0,9921	0,9842	1,57
		21 a 30	0,9995	0,9989	0,10
		> 30	0,9988	0,9975	0,24
Harboe e 1ª derivada	CPDA-1	1 a 10	0,9665	0,9342	6,59
		11 a 20	0,9968	0,9937	1,24
		21 a 30	0,9343	0,8729	12,71
		> 30	0,9429	0,8891	11,09
	SAd	1 a 10	0,9498	0,9021	9,79
		11 a 20	0,9852	0,9707	2,94
		21 a 30	0,9800	0,9604	3,96
		> 30	0,9711	0,9431	5,70
1ª derivada e 5 CO	CPDA-1	1 a 10	0,9676	0,9363	12,09
		11 a 20	0,9974	0,9948	0,52
		21 a 30	0,9316	0,8679	13,21
		> 30	0,9469	0,8967	10,43
	SAd	1 a 10	0,9425	0,8883	11,17
		11 a 20	0,9638	0,9289	7,11
		21 a 30	0,9840	0,9683	3,17
		> 30	0,9707	0,9422	5,77

Nota: n = 187. Todas as correlações (R) foram estatisticamente significativas ($p<0,05$).

Figura 03 – Correlação entre os métodos de Harboe e 5 CO em CH CPDA-1, **(A)** no período I de validade (1 a 10 dias), **(B)** no período II de validade (11 a 21 dias), **(C)** no período III de validade (21 a 30 dias) e **(D)** no período IV de validade (31 a 35 dias). Todas as correlações (R) foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Figura 04 – Correlação entre os métodos de Harboe e 5 CO em CH SAD, **(A)** no período I de validade (1 a 10 dias), **(B)** no período II de validade (11 a 21 dias), **(C)** no período III de validade (21 a 30 dias) e **(D)** no período IV de validade (31 a 42 dias). Todas as correlações (R) foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Figura 05 – Correlação entre os métodos de Harboe e Primeira derivada em CH CPDA-1, **(A)** no período I de validade (1 a 10 dias), **(B)** no período II de validade (11 a 21 dias), **(C)** no período III de validade (21 a 30 dias) e **(D)** no período IV de validade (31 a 35 dias). Todas as correlações (R) foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Figura 06 – Correlação entre os métodos de Harboe e Primeira derivada em CH SAd, **(A)** no período I de validade (1 a 10 dias), **(B)** no período II de validade (11 a 21 dias), **(C)** no período III de validade (21 a 30 dias) e **(D)** no período IV de validade (31 a 42 dias). Todas as correlações (R) foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Figura 07 – Correlação entre os métodos de Primeira derivada e 5 CO em CH CPDA-1 (**A**) no período I de validade (1 a 10 dias), (**B**) no período II de validade (11 a 21 dias), (**C**) no período III de validade (21 a 30 dias) e (**D**) no período IV de validade (31 a 35 dias). Todas as correlações (R) foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Figura 08 – Correlação entre os métodos de Primeira derivada e 5 CO em CH SAd **(A)** no período I de validade (1 a 10 dias), **(B)** no período II de validade (11 a 21 dias), **(C)** no período III de validade (21 a 30 dias) e **(D)** no período IV de validade (31 a 42 dias). Todas as correlações (R) foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

As **Tabelas 08, 09, 10 e 11** mostram os valores da média, do desvio padrão, máximo e mínimo da concentração de hemoglobina livre (em g/dL) e do percentual de hemólise (em %) dos Concentrados de Hemácias CPDA-1 (n=58), nas três metodologias testadas, por períodos de validade dos Concentrados de Hemácias.

Nas **Tabelas 12, 13, 14 e 15** encontram-se os resultados da hemoglobina livre e do percentual de hemólise dos Concentrados de Hemácias SAd (n = 129), nas três metodologias testadas, por períodos de validade dos CH, em valores da média, do desvio padrão, máximo e mínimo.

Com o intuito de relacionar as diferenças entre os resultados da hemoglobina livre (em g/dL) e do percentual de hemólise (em %) dos concentrados de hemácias CPDA-1 e SAd, os valores da média, do desvio padrão, do máximo e do mínimo estão representados emparelhados nas **Tabelas 16, 17, 18 e 19**.

Tabela 08: Hemoglobina Livre e Percentual de Hemólise em Concentrados de Hemácias CPDA-1 no período I de validade (1º ao 10º dia), n = 29.

Parâmetro	Método usado para a dosagem da concentração da HbL					
	Método Harboe		Método 5 CO		Método 1ª derivada	
	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)
Média	0,080	0,10	0,073	0,09	0,060	0,08
Desvio padrão	0,056	0,07	0,050	0,06	0,042	0,05
Máximo	0,227	0,27	0,204	0,24	0,172	0,21
Mínimo	0,010	0,01	0,008	0,01	0,004	0,00

Tabela 09: Hemoglobina Livre e Percentual de Hemólise em Concentrados de Hemácias CPDA-1 no período II de validade (11º ao 20º dia), n = 06.

Parâmetro	Método usado para a dosagem da concentração da HbL					
	Método Harboe		Método 5 CO		Método 1ª derivada	
	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)
Média	0,185	0,22	0,166	0,20	0,146	0,17
Desvio padrão	0,137	0,16	0,121	0,14	0,107	0,12
Máximo	0,446	0,50	0,396	0,44	0,345	0,39
Mínimo	0,076	0,10	0,068	0,09	0,047	0,06

Tabela 10: Hemoglobina Livre e Percentual de Hemólise em Concentrados de Hemácias CPDA-1 no período III de validade (21° ao 30° dia), n = 06.

Parâmetro	Método usado para a dosagem da concentração da HbL					
	Método Harboe		Método 5 CO		Método 1ª derivada	
	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)
Média	0,363	0,41	0,324	0,36	0,303	0,35
Desvio padrão	0,146	0,16	0,129	0,14	0,172	0,22
Máximo	0,562	0,71	0,499	0,63	0,614	0,77
Mínimo	0,134	0,32	0,121	0,28	0,096	0,23

Tabela 11: Hemoglobina Livre e Percentual de Hemólise em Concentrados de Hemácias CPDA-1 no período IV de validade (31° ao 35° dia), n = 17.

Parâmetro	Método usado para a dosagem da concentração da HbL					
	Método Harboe		Método 5 CO		Método 1ª derivada	
	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)
Média	0,301	0,35	0,270	0,31	0,236	0,28
Desvio padrão	0,146	0,15	0,130	0,13	0,117	0,14
Máximo	0,655	0,61	0,574	0,54	0,479	0,58
Mínimo	0,080	0,08	0,073	0,07	0,061	0,08

Tabela 12: Hemoglobina Livre e Percentual de Hemólise em Concentrados de Hemácias SAD no período I de validade (1° ao 10° dia), n = 38.

Parâmetro	Método usado para a dosagem da concentração da HbL					
	Método Harboe		Método 5 CO		Método 1ª derivada	
	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)
Média	0,045	0,11	0,041	0,10	0,036	0,09
Desvio padrão	0,027	0,06	0,024	0,06	0,018	0,04
Máximo	0,138	0,33	0,126	0,30	0,089	0,19
Mínimo	0,015	0,04	0,014	0,04	0,012	0,03

Tabela 13: Hemoglobina Livre e Percentual de Hemólise em Concentrados de Hemácias SAD no período II de validade (11° ao 20° dia), n = 21.

Parâmetro	Método usado para a dosagem da concentração da HbL					
	Método Harboe		Método 5 CO		Método 1ª derivada	
	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)
Média	0,068	0,15	0,062	0,14	0,055	0,12
Desvio padrão	0,040	0,08	0,034	0,07	0,033	0,07
Máximo	0,181	0,42	0,148	0,34	0,163	0,37
Mínimo	0,019	0,05	0,020	0,06	0,022	0,05

Tabela 14: Hemoglobina Livre e Percentual de Hemólise em Concentrados de Hemácias SAd no período III de validade (21° ao 30° dia), n = 13.

Parâmetro	Método usado para a dosagem da concentração da HbL					
	Método Harboe		Método 5 CO		Método 1ª derivada	
	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)
Média	0,121	0,25	0,109	0,23	0,086	0,18
Desvio padrão	0,102	0,21	0,091	0,19	0,066	0,14
Máximo	0,354	0,73	0,314	0,65	0,211	0,44
Mínimo	0,023	0,05	0,023	0,06	0,022	0,05

Tabela 15: Hemoglobina Livre e Percentual de Hemólise em Concentrados de Hemácias SAd no período IV de validade (31° ao 42° dia), n = 57.

Parâmetro	Método usado para a dosagem da concentração da HbL					
	Método Harboe		Método 5 CO		Método 1ª derivada	
	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)
Média	0,166	0,35	0,147	0,31	0,132	0,28
Desvio padrão	0,084	0,19	0,074	0,17	0,069	0,16
Máximo	0,352	0,89	0,315	0,79	0,313	0,69
Mínimo	0,050	0,12	0,045	0,10	0,040	0,09

Tabela 16: Hemoglobina Livre e Percentual de Hemólise em Concentrados de Hemácias CPDA-1 e SAd no período I de validade (1° ao 10° dia), n = 67.

Parâmetro		Método usado para a dosagem da concentração da HbL					
		Método Harboe		Método 5 CO		Método 1ª derivada	
		HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)
CPDA-1	Média	0,080	0,10	0,073	0,09	0,060	0,08
SAd	Média	0,045	0,11	0,041	0,10	0,036	0,09
CPDA-1	DP	0,056	0,07	0,050	0,06	0,042	0,05
SAd	DP	0,027	0,06	0,024	0,06	0,018	0,04
CPDA-1	Máximo	0,227	0,27	0,204	0,24	0,172	0,21
SAd	Máximo	0,138	0,33	0,126	0,30	0,089	0,19
CPDA-1	Mínimo	0,010	0,01	0,008	0,01	0,004	0,00
SAd	Mínimo	0,015	0,04	0,014	0,04	0,012	0,03

Tabela 17: Hemoglobina Livre e Percentual de Hemólise em Concentrados de Hemácias CPDA-1 e SAd no período II de validade (11º ao 20º dia), n = 27.

Parâmetro		Método usado para a dosagem da concentração da HbL					
		Método Harboe		Método 5 CO		Método 1ª derivada	
		HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)
CPDA-1	Média	0,185	0,22	0,166	0,20	0,146	0,17
SAd	Média	0,068	0,15	0,062	0,14	0,055	0,12
CPDA-1	DP	0,137	0,16	0,121	0,14	0,107	0,12
SAd	DP	0,040	0,08	0,034	0,07	0,033	0,07
CPDA-1	Máximo	0,446	0,50	0,396	0,44	0,345	0,39
SAd	Máximo	0,181	0,42	0,148	0,34	0,163	0,37
CPDA-1	Mínimo	0,076	0,10	0,068	0,09	0,047	0,06
SAd	Mínimo	0,019	0,05	0,020	0,06	0,022	0,05

Tabela 18: Hemoglobina Livre e Percentual de Hemólise em Concentrados de Hemácias CPDA-1 e SAd no período III de validade (21º ao 30º dia), n = 19.

Parâmetro		Método usado para a dosagem da concentração da HbL					
		Método Harboe		Método 5 CO		Método 1ª derivada	
		HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)
CPDA-1	Média	0,363	0,41	0,324	0,36	0,303	0,35
SAd	Média	0,121	0,25	0,109	0,23	0,086	0,18
CPDA-1	DP	0,146	0,16	0,129	0,14	0,172	0,22
SAd	DP	0,102	0,21	0,091	0,19	0,066	0,14
CPDA-1	Máximo	0,562	0,71	0,499	0,63	0,614	0,77
SAd	Máximo	0,354	0,73	0,314	0,65	0,211	0,44
CPDA-1	Mínimo	0,134	0,32	0,121	0,28	0,096	0,23
SAd	Mínimo	0,023	0,05	0,023	0,06	0,022	0,05

Tabela 19: Hemoglobina Livre e Percentual de Hemólise em Concentrados de Hemácias CPDA-1 e SAd no período IV de validade (31° ao 35° dia e 31° ao 42° dia), n = 74.

Parâmetro		Método usado para a dosagem da concentração da HbL					
		Método Harboe		Método 5 CO		Método 1ª derivada	
		HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)
CPDA-1	Média	0,301	0,35	0,270	0,31	0,236	0,28
SAd	Média	0,166	0,35	0,147	0,31	0,132	0,28
CPDA-1	DP	0,146	0,15	0,130	0,13	0,117	0,14
SAd	DP	0,084	0,19	0,074	0,17	0,069	0,16
CPDA-1	Máximo	0,655	0,61	0,574	0,54	0,479	0,58
SAd	Máximo	0,352	0,89	0,315	0,79	0,313	0,69
CPDA-1	Mínimo	0,080	0,08	0,073	0,07	0,061	0,08
SAd	Mínimo	0,050	0,12	0,045	0,10	0,040	0,09

7.2 Resultados da concentração de hemoglobina livre em concentrados de hemácias com líquido sobrenadante de aspecto hemolizado

O aspecto visual do líquido sobrenadante límpido e hemolizado dos concentrados de hemácias foram avaliados, em relação à concentração de hemoglobina livre para cada metodologia testada, conforme ilustrado nos gráficos *BoxPlot* da **Figura 09**.

Pelas metodologias de Harboe e 5 CO os sobrenadantes “límpido”, “hemolizado 1+” e “hemolizado 2+” foram estatisticamente diferentes de “hemolizado 3+” e “hemolizado 4+”. Na metodologia de Primeira derivada, os sobrenadantes “límpido”, “hemolizado 1+” e “hemolizado 2+” foram estatisticamente diferentes de “hemolizado 4+” e “hemolizado 3+” e “hemolizado 4+” são diferentes entre si (Kuskal-Wallis ANOVA, $p < 0,05$).

A correspondência entre o número de cruces de hemólise atribuído ao aspecto visual de quatro líquidos sobrenadantes de CH e as respectivas concentrações de HbL está ilustrada na **Figura 09**.

As **Tabelas 20, 21, 22, 23 e 24** mostram os valores da média, do desvio padrão, do máximo e do mínimo das concentrações da hemoglobina livre e do percentual de hemólise, relacionados aos aspectos visuais dos sobrenadantes de concentrados de hemácias.

A

B

C

Média

Média ± DP

Média ± 1,96*DP

Figura 09 – Concentração de hemoglobina livre de acordo com o aspecto visual do líquido sobrenadante dos concentrados de hemácias. (A) método de Harboe, (B) método 5 CO e (C) método de Primeira derivada.

Tubos	1	2	3	4
Aspecto visual	Hemólise 3+	Hemólise 3+	Hemólise 4+	Hemólise 5+
HbL (g/dL)	0,247	0,278	0,427	0,675
% de hemólise	0,7	0,6	0,9	1,0

Figura 10 – Correspondência entre o aspecto visual e a concentração de hemoglobina livre e percentual de hemólise do sobrenadante de concentrados de hemácias (Tubos 1, 2, 3 e 4).

Tabela 20: Hemoglobina Livre e Percentual de Hemólise em Concentrados de Hemácias SAD e CPDA-1 com líquido sobrenadante classificado visualmente como “Límpido” (n = 16)

Parâmetro	Método Harboe		Método 5 CO		Método 1ª derivada	
	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)
Média	0,035	0,06	0,033	0,05	0,028	0,05
Desvio padrão	0,011	0,02	0,010	0,02	0,008	0,02
Máximo	0,051	0,10	0,048	0,09	0,040	0,08
Mínimo	0,010	0,01	0,008	0,01	0,008	0,01

Tabela 21: Hemoglobina Livre e Percentual de Hemólise em Concentrados de Hemácias SAD e CPDA-1 com líquido sobrenadante classificado visualmente como “Hemolisado 1+” (n = 51)

Parâmetro	Método Harboe		Método 5 CO		Método 1ª derivada	
	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)
Média	0,056	0,11	0,050	0,10	0,044	0,09
Desvio padrão	0,029	0,06	0,024	0,05	0,024	0,05
Máximo	0,181	0,42	0,148	0,34	0,163	0,37
Mínimo	0,015	0,04	0,014	0,04	0,004	0,00

Tabela 22: Hemoglobina Livre e Percentual de Hemólise em Concentrados de Hemácias SAd e CPDA-1 com líquido sobrenadante classificado visualmente como “Hemolisado 2+” (n = 55)

Parâmetro	Método Harboe		Método 5 CO		Método 1ª derivada	
	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)
Média	0,093	0,18	0,083	0,16	0,072	0,14
Desvio padrão	0,046	0,08	0,041	0,07	0,036	0,06
Máximo	0,223	0,39	0,200	0,35	0,185	0,31
Mínimo	0,019	0,05	0,020	0,05	0,015	0,04

Tabela 23: Hemoglobina Livre e Percentual de Hemólise em Concentrados de Hemácias SAd e CPDA-1 com líquido sobrenadante classificado visualmente como “Hemolisado 3+” (n = 41)

Parâmetro	Método Harboe		Método 5 CO		Método 1ª derivada	
	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)
Média	0,213	0,36	0,190	0,33	0,163	0,28
Desvio padrão	0,095	0,16	0,085	0,14	0,070	0,13
Máximo	0,451	0,73	0,407	0,65	0,345	0,66
Mínimo	0,055	0,08	0,051	0,08	0,045	0,07

Tabela 24: Hemoglobina Livre e Percentual de Hemólise em Concentrados de Hemácias SAd e CPDA-1 com líquido sobrenadante classificado visualmente como “Hemolisado 4+ e 5+” (n = 24)

Parâmetro	Método Harboe		Método 5 CO		Método 1ª derivada	
	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)
Média	0,321	0,49	0,286	0,43	0,263	0,40
Desvio padrão	0,127	0,20	0,112	0,18	0,119	0,19
Máximo	0,655	0,89	0,574	0,79	0,614	0,77
Mínimo	0,112	0,08	0,101	0,07	0,077	0,08

7.3 Resultados da concentração de hemoglobina livre em concentrados de hemácias com líquido sobrenadante de aspecto lipêmico

Os resultados da hemoglobina livre de cinco concentrados de hemácias com sobrenadante de aspecto lipêmico (anormal) em relação aos concentrados de hemácias com sobrenadante não lipêmico (normal), pelas análises dos métodos de Harboe, 5 CO e Primeira derivada, estão representados na **Figura 11**.

A presença de lipídios no líquido sobrenadante confere a este um aspecto visual turvo, opalescente ou leitoso, cuja interferência está representada na **Figura 12**.

Figura 11 – Valores de hemoglobina livre de quatro (A) e de cinco (B) concentrados de hemácias com líquido sobrenadante de aspecto lipêmico (coluna azul) e dos valores médios da HbL de CH com líquido sobrenadante não lipêmico (coluna vermelha) em função do tempo de armazenamento.

Tubos	1	2	3	4
Aspecto visual	Lipemia 3+	Lipemia 2+	Sem lipemia	Lipemia 4+
HbL (g/dL)	0,143	0,208	0,211	1,560
Dia armazenamento	03	12	42	14

Figura 12 – Aspecto visual de sobrenadante lipêmico (tubos 1, 2 e 4) e de sobrenadante sem lipemia (tubo 3). A visualização das letras detrás dos tubos 1, 2 e 4 fica dificultada. A amostra do tubo 3, sem lipemia, permite a visualização da letra “A”.

7.4 Resultados das amostras controle

A correlação (R) das amostras controle, testadas pela metodologia de referência - método automatizado (Sysmex XS-1000i®) e pelo método de Harboe, foi 0,96 (aproximadamente igual a 1). O erro casual entre os valores das duas amostras foi 6,0%. Não houve diferença estatística entre as médias do método automatizado e do método de Harboe (teste t; $p=0,828$; GL=102). As **Figuras 13 e 14** ilustram os resultados das amostras controle analisadas neste estudo.

Figura 13 – Concentração de hemoglobina (Hb), em g/dL das amostras controle testadas pelo método de referência (analisador hematológico automatizado Sysmex XS-1000i®, método colorimétrico, reagente Lauril Sulfato de Sódio - SLS) e pelo método em estudo (método de Harboe).

Figura 14 – Concentração de hemoglobina (em g/dL) das amostras controle testadas pelos métodos de referência (analisador hematológico automatizado Sysmex XS-1000i®, método colorimétrico, reagente Lauril Sulfato de Sódio - SLS) e pelo método em estudo (método de Harboe).

7.5 Resultados da linearidade espectrofotométrica

A curva de calibração e linearidade espectrofotométrica para a hemoglobina, com correlação R^2 0,9998, foi produzida a partir de amostra controle com 24,3 g/dL de hemoglobina, determinada em espectrofotômetro Micronal ® AJX-3000PC. A **Figura 15 (A)** ilustra a concentração de hemoglobina com faixa linear de 0,00041 g/dL a 0,06075 g/dL, correspondente à amostra controle diluída com soro fisiológico a 1:4 e 1:600, respectivamente. Ressalta-se que a amostra havia sido diluída previamente a 1:100 ao ser hemolisada com água deionizada.

Na **Figura 15 (B)** observam-se pontos não lineares, cujos resultados não obedecem à Lei de Lambert Beer, ou seja, não há relação proporcional entre a concentração da hemoglobina e a absorbância lida. Estes pontos se referem à amostra controle diluída a 1:2 e a 1:1 (hemolisado puro).

Os intervalos da absorbância lida em 415 nm e a respectiva faixa da concentração de hemoglobina estão demonstrados na **Figura 16**.

A

B

Figura 15 – Curva de calibração e faixa de linearidade espectrofotométrica para a hemoglobina. Espectrofotômetro Micronal® AJX-3000PC. Hemoglobina da amostra controle 24,3 g/dL.

(A) Faixa linear de 0,00041 g/dL (0,41 mg/dL) a 0,06075 g/dL (60,75 mg/dL).

(B) Pontos circutados, fora da faixa linear em 0,12150 g/dL (121,5 mg/dL) e em 0,24300 g/dL (243 mg/dL).

Figura 16 – Intervalo de linearidade para a hemoglobina, em relação à absorbância lida a 415 nm no espectrofotômetro Micronal ® AJX-3000PC. Limite mínimo 0,007 e limite máximo 4,300.

7.6 Resultados do ensaio comparativo para verificação da exatidão

A exatidão e reprodutibilidade dos resultados da concentração de hemoglobina livre obtida em espectrofotômetros distintos foi avaliada entre os laboratórios A, B, C e D, os quais utilizaram para as medições, respectivamente, espectrofotômetros Micronal® AJX-3000PC, Shimadzu® UV 160 IPC, Shimadzu® UV Mini 1240 e Femto® 600S. A largura da banda espectral de cada espectrofotômetro está relacionada na **Tabela 25**, conforme descrito nos manuais operacionais (MICRONAL, 2013; INSTRUCTION, 1994; INSTRUCTION, 2004; ESPECTROFOTÔMETRO 600 S, 2002). No 1º ensaio, participaram os laboratórios A, B e C testando 10 amostras idênticas e no 2º ensaio participaram os laboratórios A, B e D testando 15 amostras idênticas. Os resultados da hemoglobina livre estão apresentados nas **Tabelas 27 e 28**. Para a análise estatística dos dados, utilizou-se o Índice de Concordância Intraclass (ICC – *intraclass concordance*), mostrados na **Tabela 26**.

Tabela 25 – Largura da banda espectral dos espectrofotômetros utilizados no ensaio entre laboratórios

Laboratório	Espectrofotômetro	Banda espectral
A	Micronal® AJX-3000PC	4 nm
B	Shimadzu® UV 160 IPC	2 nm
C	Shimadzu® UV Mini 1240	5 nm
D	Femto 600S	10 nm

Tabela 26 – Índice de Concordância Intraclass (ICC) entre os laboratórios A, B, C e D.

Ensaio	Método de Harboe	Método de 5 CO
I	0,9888	0,9931
II	0,0440	0,0614

Nota: (I) Ensaio entre os laboratórios A, B e C. (II) Ensaio entre os laboratórios A, B e D.

Tabela 27 – Resultados da hemoglobina livre, pelos métodos de Harboe e 5 CO, nos laboratórios A, B e C.

Nº	Laboratório A		Laboratório B		Laboratório C	
	Harboe HbL (g/dL)	5 CO HbL (g/dL)	Harboe HbL (g/dL)	5 CO HbL (g/dL)	Harboe HbL (g/dL)	5 CO HbL (g/dL)
1	0,068	0,060	0,068	0,060	0,069	0,061
2	0,153	0,137	0,157	0,140	0,153	0,137
3	0,188	0,167	0,185	0,164	0,192	0,170
4	0,275	0,245	0,293	0,259	0,290	0,257
5	0,288	0,258	0,253	0,222	0,321	0,285
6	0,372	0,330	0,385	0,340	0,401	0,356
7	0,448	0,400	0,482	0,426	0,487	0,433
8	0,542	0,482	0,563	0,499	0,572	0,508
9	0,658	0,584	0,700	0,619	0,701	0,624
10	0,707	0,666	0,810	0,717	0,806	0,716

Notas:

1 - Espectrofotômetro Micronal® AJAX-3000PC (Laboratório A), espectrofotômetro Shimadzu® UV 160 IPC (Laboratório B) e espectrofotômetro Shimadzu® UV Mini 1240 (Laboratório C).

2 - Concordância ICC= 0.9888 (Harboe)

3 - Concordância ICC= 0.9931 (5 CO)

Tabela 28 – Resultados da hemoglobina livre, pelos métodos de Harboe e 5 CO, nos laboratórios A, B e D.

Nº	Laboratório A		Laboratório B		Laboratório D	
	Harboe HbL (g/dL)	5 CO HbL (g/dL)	Harboe HbL (g/dL)	5 CO HbL (g/dL)	Harboe HbL (g/dL)	5 CO HbL (g/dL)
1	27,50	24,58	26,89	23,90	18,09	16,78
2	27,27	24,26	25,76	22,86	19,81	18,29
3	25,83	22,90	22,94	20,30	19,19	17,48
4	29,41	26,19	28,79	25,60	18,91	17,44
5	29,28	26,09	27,59	24,48	21,18	19,20
6	27,14	24,10	24,90	22,08	20,01	18,24
7	28,94	25,74	28,38	25,24	18,74	17,18
8	29,61	26,31	27,65	24,54	21,28	19,32
9	27,34	24,31	24,47	21,68	20,04	18,17
10	28,28	25,21	27,35	24,34	18,35	17,06
11	29,69	26,43	28,07	24,92	21,28	19,96
12	26,23	23,27	23,47	20,79	19,51	17,38
13	28,43	25,29	27,38	24,33	18,79	18,35
14	28,83	25,61	27,21	24,13	21,13	19,33
15	26,71	23,67	24,40	21,61	20,01	18,72

Notas:

1 - Espectrofotômetro Micronal® AJAX-3000PC (Laboratório A), espectrofotômetro Shimadzu® UV 160 IPC (Laboratório B) e espectrofotômetro Femto® 600S (Laboratório D).

2 - Concordância ICC= 0.044 (Harboe)

3 - Concordância ICC= 0.061 (5 CO)

7.7 Guia visual de hemólise em CH CPDA-1

Guia visual de hemólise em CH CPDA-1 (observação da tonalidade do líquido sobrenadante na bolsa de CH)

1 2 3 4

Aceitável **Não aceitável**

Tubo	Hemoglobina livre (mg %)	Percentual de hemólise (%)
1	44	0,05
2	175	0,20
3	350	0,40
4	700	0,80

Este guia visual com cores da hemoglobina livre foi desenvolvido para uma avaliação rápida da hemólise em bolsas de concentrados de hemácias com CPDA-1 (*).

Não fornece com exatidão o percentual de hemólise.

(*) Baseada em concentrado de hemácias com hematócrito 72,5% e hemoglobina 24,0 g/dL.

Referência:

GRILLO, K. T. M. Determinação da concentração de hemoglobina livre em concentrados de hemácias pela espectrofotometria direta: Método de Harboe. 115 p. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Tabela CMYK da foto:

1-	2-	3-	4-
C= 31%	C= 22%	C= 23%	C= 26%
M= 46%	M= 81%	M= 97%	M= 100%
Y= 48%	Y= 73%	Y= 99%	Y= 99%
K= 3%	K= 10%	K= 15%	K= 25%

Nota: CMYK – Mistura de cores/pigmentos usada para a impressão, sendo “C” Ciano, “M” Magenta, “Y” Amarelo e “K” Preto.

7.8 Guia visual de hemólise em CH SAd

Guia visual de hemólise em CH SAd

(observação da tonalidade do líquido sobrenadante na bolsa de CH)

1 2 3 4

Aceitável **Não aceitável**

Tubo	Hemoglobina livre (mg %)	Percentual de hemólise (%)
1	25	0,05
2	100	0,20
3	200	0,40
4	400	0,80

Este guia visual com cores da hemoglobina livre foi desenvolvido para uma avaliação rápida da hemólise em bolsas de concentrados de hemácias com SAd (*).

Não fornece com exatidão o percentual de hemólise.

(*) Baseada em concentrado de hemácias com hematócrito 60 % e hemoglobina 19,8 g/dL.

Referência:

GRILLO, K. T. M. Determinação da concentração de hemoglobina livre em concentrados de hemácias pela espectrofotometria direta: Método de Harboe. 115 p. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Tabela CMYK da foto:

1-	2-	3-	4-
C= 30%	C= 26%	C= 20%	C= 22%
M= 36%	M= 62%	M= 82%	M= 99%
Y= 42%	Y= 59%	Y= 77%	Y= 99%
K= 1%	K= 7%	K= 9%	K= 15%

Nota: CMYK – Mistura de cores/pigmentos usada para a impressão, sendo “C” Ciano, “M” Magenta, “Y” Amarelo e “K” Preto.

7.9 Procedimento Operacional Padrão (POP) para a determinação da hemoglobina livre pelo método de Harboe

POP - Determinação da hemoglobina livre – método de Harboe

1. Título do procedimento

Determinação da hemoglobina livre – Método de Harboe

2. Objetivo

Determinar a concentração da hemoglobina livre em concentrados de hemácias (em g/dL).

3. Princípio

Espectrofotometria direta pela absorção da oxihemoglobina na Banda de Soret (415 nm) e utilização de fórmula para a correção da absorção por substâncias interferentes (lipídeos e bilirrubina) com leituras a 380 e 450 nm. As absorbâncias lidas são usadas em fórmula com conversão direta em concentração de hemoglobina.

4. Setor de abrangência

Laboratório de controle de qualidade de hemocomponentes

5. Amostra

Líquido sobrenadante de concentrado de hemácias.

6. Materiais e reagentes

6.1 Cubetas de vidro para espectrofotômetro (comprimento óptico = 1 mm)

6.2 Estante para tubos

6.3 Pipetas automáticas

6.4 Ponteiros descartáveis

6.5 Tubos de ensaio

6.6 Soro fisiológico

6.7 Água destilada (ou deionizada)

7. Equipamentos

7.1 Centrífuga sorológica para tubos

7.2 Espectrofotômetro UV Visível (com fenda espectral de 5 nm ou menos)

7.3 Analisador hematológico automatizado

7.4 Equipamento para conexão estéril de tubos de bolsas (opcional)

8. Procedimentos

8.1 Coleta da amostra

8.1.1 Realizar coleta não destrutiva do concentrado de hemácias (CH), por meio de dispositivo de conexão estéril, para uma bolsa de transferência, após homogeneização efetiva da bolsa.

8.1.2 Coletar 5,0 ml de hemácias em tubo sem anticoagulante.

8.1.3 Centrifugar o tubo a 1070 g, por 10 minutos, em centrífuga sorológica.

8.1.4 Separar 1,0 ml do sobrenadante, evitando contaminação por hemácias. Caso ocorra contaminação, centrifugar novamente.

8.1.5 Transferir o sobrenadante isento de hemácias para tubo limpo e seco com auxílio de micropipeta.

8.2 Diluição das amostras de sobrenadantes de CH

8.2.1 Diluir as amostras com soro fisiológico, de acordo com o aspecto visual do sobrenadante, conforme descrito na Tabela 01.

Tabela 01 - Diluição das amostras de sobrenadantes de CH em solução fisiológica

Aspecto visual do sobrenadante	Diluição	Volume de sobrenadante (μl)	Volume de SF (μl)
Límpido	1:2	1000	1000
Límpido	1:5	400	1600
Hemólise 1+ e/ou Lipemia 1+	1:5	400	1600
Hemólise 1+ e/ou Lipemia 1+	1:10	200	1800
Hemólise 2+ e/ou Lipemia 2+	1:20	100	1900
Hemólise 2+ e/ou Lipemia 2+	1:50	40	1960
Hemólise 3+ e/ou Lipemia 3+	1:50	40	1960
Hemólise 3+ e/ou Lipemia 3+	1:100	20	1980
Hemólise 4+ e/ou Lipemia 4+	1:100	20	1980
Hemólise 4+ e/ou Lipemia 4+	1:200	10	1990
Hemólise 5+ e/ou Lipemia 5+	1:200	10	1990
Hemólise 5+ e/ou Lipemia 5+	1:300	10	2990

8.3 Leitura em espectrofotômetro

8.3.1 Ligar o equipamento 15 minutos antes do início das dosagens.

8.3.2 Zerar cada comprimento de onda selecionado com soro fisiológico (branco).

8.3.3 Ler as absorbâncias das amostras diluídas em 380 nm, 415 nm e 450 nm.

8.3.4 Registrar os valores e calcular a concentração de HbL, conforme item 9.1.

8.4 Preparo da amostra controle

8.4.1 Coletar 0,5 a 1,0 mL de hemácias de um CH com até dois dias de coleta.

8.4.2 Lavar as hemácias com solução fisiológica, por três vezes.

8.4.3 Remover totalmente o sobrenadante da 3ª lavagem.

8.4.4 Dosar a concentração da hemoglobina total em analisador hematológico automatizado.

8.4.5 Provocar a hemólise pela adição de água deionizada às hemácias (diluição a 1:100).

Nota: A concentração da hemoglobina livre no hemolisado será igual ao valor dosado no item 8.4.4 dividido pelo fator diluição (=100).

8.4.6 Centrifugar o tubo, contendo o hemolisado, a 1070 g, por 10 minutos (para sedimentação do estroma celular).

8.4.7 Transferir o sobrenadante para um tubo de hemólise seco e limpo, com auxílio de micropipeta.

8.4.8 Diluir o hemolisado, conforme descrito no item 8.2.

8.4.9 Realizar a leitura em espectrofotômetro, conforme descrito no item 8.3.

8.4.10 Registrar os valores e calcular a concentração de HbL, conforme item 9.1.

9 Cálculos

9.1 Fórmula para cálculo da hemoglobina livre (HAN, 2009).

$$\text{Hb (g/L)} = 167,2 \times A_{415} - 83,6 \times A_{380} - 83,6 \times A_{450} \times 1/1000 \times \text{diluição}$$

A_{415} – Absorbância em 415 nm

A_{380} – Absorbância em 380 nm

A_{450} – Absorbância em 450 nm

Resultado: Expresso em g/L. Para resultado em g/dL dividir o resultado obtido em g/L por 10.

9.2 Fórmula para cálculo do percentual de hemólise (HÖGMAN, 1981).

$$\text{Grau de Hemólise (\%)} = [100 - \text{VG} \cdot (\text{HbL} / \text{HbT})]$$

VG – Volume globular do concentrado de hemácias (em %)

HbL – Hemoglobina livre do concentrado de hemácias (em g/dL)

HbT – Hemoglobina total do concentrado de hemácias (em g/dL)

Resultado: Expresso em percentual (%)

10 Especificação requerida (Grau de hemólise em concentrados de hemácias)

Menor que 0,8% da massa eritrocitária (no último dia de armazenamento).

11 Referências

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria Nº 158, de 4 de fevereiro de 2016**. Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos. Publicada no Diário Oficial da União nº 25, de 05/02/2016.

HAN, V.; SERRANO, K.; DEVINE, D. V. **A comparative study of common techniques used to measure haemolysis in stored red cell concentrates**, Canadian Blood Services, Research and Development and the Centre for Blood Research, University of British Columbia, Vancouver, Canada, Vox Sanguinis (2009)

HARBOE M., **A method for determination of hemoglobin in plasma by near-ultraviolet spectrophotometry**. Scand J Clin Lab Invest 11, 66-70 (1959).

HÖGMAN, C. F.; HEDLUND, K.; SAHLESTRÖM, Y. **Red Cell Preservation in Protein-Poor Media III. Protection Against in vitro Hemolysis**. Vox Sang. 41: 274-281 (1981).

NOE, D. A.; WEEDN W.; BELL, W. R.; **Direct Spectrophotometry of Serum Hemoglobin: An Allen Correction Compared with a Three-Wavelength Polychromatic Analysis**, Clinical Chemistry, Vol. 30, No. 5, (1984)

Elaborado por: Katia Teixeira de Meiroz Grilo	Revisado por: Maria Ângela Pignata Ottoboni	Aprovado por: Kelen C. R. Malmegrim de Farias
Data:	Data:	Data
Visto	Visto	Visto

7.10 Resumo dos resultados

- Os dados da hemoglobina livre determinados pelos métodos de Harboe, de Cinco comprimentos de onda e de Primeira derivada foram altamente correlacionados e, portanto, estes métodos são equivalentes.
- A interferência dos lipídios nos resultados da hemoglobina livre pelo método de Harboe é intensa. No entanto, esta alteração não é preocupante em controle de qualidade de concentrados de hemácias, visto que hemocomponentes com aspecto lipêmico, normalmente, não são utilizados para transfusão.
- A influência da bilirrubina nos resultados da hemoglobina livre pelo método de Harboe não pôde ser analisada, pois similarmente aos concentrados de hemácias lipêmicos, os hemocomponentes com aspecto icterico não são aproveitados para utilização.
- As amostras controle incluídas na pesquisa apresentaram correlação excelente frente ao método de referência (método automatizado Sysmex XS-1000i®) e a sua inclusão é fundamental para o monitoramento da corrida analítica com amostras a serem testadas.
- O método de Harboe mostrou-se compatível para a dosagem de baixas concentrações de hemoglobina livre, bem como para altas concentrações. O intervalo de linearidade espectrofotométrica oscila de 0,00041 a 0,06075 g/dL.
- Na leitura espectrofotométrica pelo método de Harboe, a absorbância máxima em 415 nm deve ser 4,300. Assim, amostras com absorbância superior a este valor deverão ser mais diluídas e retestadas para a garantia de resultado preciso.
- A largura estreita da banda espectral do espectrofotômetro utilizado para as medições das absorbâncias é fundamental para a obtenção de resultados fidedignos, devendo ser de 5 nm ou menos.
- O procedimento operacional para a determinação da concentração da hemoglobina livre pelo método de Harboe foi descrito de forma sucinta e clara, permitindo a reprodução do procedimento para o controle de qualidade de concentrados de hemácias em serviços de hemoterapia.
- O guia visual de hemólise em concentrados de hemácias constitui uma ferramenta indispensável para a triagem visual deste hemocomponente na bancada de trabalho em serviços de hemoterapia, porém, o valor do percentual de hemólise deve ser confirmado analiticamente.

8. DISCUSSÃO

8.1 Concentração de hemoglobina livre nos três métodos testados

Em um estudo relativamente recente, HAN *et al.* (2009) analisaram diferentes técnicas utilizadas para os parâmetros empregados na determinação do percentual de hemólise em concentrados de hemácias. Dois métodos foram comparados para a quantificação da hemoglobina livre – o método de Drabkin e o método de Harboe. A correlação (R) entre os métodos foi superior a 0,995 e os métodos foram considerados equivalentes. No entanto, o método de Harboe apresentou-se mais linear e preciso em análise de reprodutibilidade de amostras padrão em relação ao método de Drabkin.

Embora em nosso trabalho não tenha sido incluído o método de Drabkin nas metodologias comparadas, as três metodologias testadas foram altamente correlacionadas. Entre os métodos de Harboe e de 5 CO, a correlação foi superior a 0,992; entre os métodos de Harboe e de Primeira derivada, a correlação foi superior a 0,934 e, por fim, a correlação entre os métodos de Primeira derivada e de 5 CO foi superior a 0,931; evidenciando a equivalência entre os três métodos analisados.

Em 2004, COOKSON e colaboradores avaliaram a concentração de hemoglobina livre em concentrados de plaquetas, tendo em vista que altas concentrações de hemoglobina (> 0,1 g/L) nestes hemocomponentes interferem na eficiência da inativação de patógenos, como a do Intercept™, inativador para bactérias, vírus e protozoários em componentes do sangue. Com este propósito, foram avaliadas três metodologias para determinação da concentração da hemoglobina livre – o método espectrofotométrico de Harboe, o método de oxidação da 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) Sigma Diagnósticos e o método Fotométrico Automatizado HemoCue Plasma low-Hb (PLHP). Um quarto método foi testado e que consistiu em uma modificação do método de Harboe na tentativa de avaliar a “absorção irrelevante” pela substituição da leitura espectrofotométrica em 380 nm pela leitura em 340 nm. Os resultados dos métodos avaliados apontaram o método de Harboe convencional como sendo o mais preciso, linear e reprodutível. Em ensaio de reprodutibilidade com amostra padrão no intervalo de 0,050 a 0,150 g/dL de hemoglobina, faixa crítica para o Intercept™, o método de Harboe convencional resultou em 100% de precisão. Por outro lado, o método TMB apresentou subestimação relevante nos resultados, e o método PLHP apresentou resultados superestimados na faixa de 0,050 a 0,500 g/dL de hemoglobina. Ambos os métodos foram considerados inadequados para a dosagem de hemoglobina residual em concentrados

de plaquetas. O método de Harboe modificado mostrou-se vulnerável ao aumento da absorção no espectro UV próximo (340 nm), possivelmente devido à influência de absorção de “ombros” a partir de proteínas do citoesqueleto das plaquetas ou de proteínas resultantes da ativação plaquetária.

Nesta mesma vertente, NOE *et al.* (1984) conduziram um ensaio comparativo entre os métodos de Harboe e da Fórmula Policromática, ambos por espectrofotometria direta para a detecção de hemoglobina plasmática visando o diagnóstico laboratorial da hemólise intravascular aguda. Os dois métodos são de espectrofotometria direta, cujas fórmulas utilizam a “correção de Allen” para minimizar os efeitos das substâncias interferentes, pela subtração da absorbância de fundo ou dos “ombros”, com leituras espectrofotométricas em 380, 415 e 450 nm para o método de Harboe e em 380, 415 e 470 nm para o método da Fórmula Policromática. Foram incluídas no estudo amostras preparadas por contaminação de triglicerídeos e bilirrubina a partir de padrões comerciais. O desempenho da análise policromática foi comparável, mas não melhor que o método de Harboe, com correlação ($R=0,991$). Além disto, o estudo de recuperação analítica demonstrou que os dois métodos são precisos, embora a interferência da turbidez dos triglicerídeos não seja completamente eliminada por qualquer um dos métodos. O intervalo de detecção de hemoglobina, com manutenção de linearidade espectrofotométrica, foi de 8 mg/L a 2000 mg/L (= 0,0008 g/dL a 0,200 g/dL) para ambos os métodos testados. O limite superior de detecção foi determinante por atender às necessidades clínicas de precisão analítica nesta concentração, que é o nível de detecção de hemólise intravascular (NOE, 1984).

No nosso trabalho não foram testadas amostras com interferentes de bilirrubina e nem com altas concentrações de triglicerídeos. Entretanto, os resultados encontrados com amostras “normais” corroboram com os achados de Noe *et al.* (1984) e de Cookson *et al.* (2004) quanto ao limite mínimo de linearidade espectrofotométrica (0,0008 g/dL e 0,050 g/dL, respectivamente).

KAHN *et al.* (1981) utilizaram o método desenvolvido por Blakney e Dinwoodie (1975) para medição da hemoglobina plasmática em laboratório clínico, com o objetivo de avaliar a concentração de hemoglobina liberada no sangue de pacientes com hemólise grave decorrente de cirurgia com circulação extracorpórea. O método utiliza a espectrofotometria de varredura com fracionamento do pico de absorção da hemoglobina na região de 578 nm e é proporcional à concentração de hemoglobina, mesmo na presença de elevados níveis de bilirrubina. No estudo de Kahn, foram comparados os métodos de Blakney, da Benzidina e de Harboe. Dos três métodos testados, o método de Blakney foi o menos afetado pela

concentração de bilirrubina e também apresentou melhor concordância com o método da Benzidina ($R=0,97$) em relação à concordância apresentada entre o método de Harboe e o método da Benzidina ($R=0,95$), provavelmente pela interferência da bilirrubina. Contudo, o intervalo de detecção do método de Blakney foi linear de 5,0 mg/dL a 150 mg/dL (= 0,005 g/dL a 0,150 g/dL) de hemoglobina, não apresentando exatidão e precisão em baixas concentrações de hemoglobina (menos de 2,0 mg/dL), mas o método foi satisfatório e sensível para a rotina clínica.

A inexistência de teste de referência / padrão-ouro para a dosagem da hemoglobina livre instigou FAIRBANKS *et al.* (1992) a reexaminarem e compararem oito métodos para determinar como os resultados eram influenciados pelos interferentes bilirrubina, lipídios e outros pigmentos. Para o estudo, foram utilizadas amostras de sangue de doadores saudáveis, soro de pacientes com altas concentrações de triglicerídeos e bilirrubina e, também, soluções preparadas de hemoglobina, bilirrubina e triglicerídeos, sendo as soluções de hemoglobina produzidas “*in house*” e as soluções de bilirrubina e triglicerídeos produzidas a partir de padrões comerciais. Analisaram-se dois métodos propostos pelo autor (AI e AII), os métodos de Harboe, de Kahn, de Blakney, de Noe, da Peroxidase e da Segunda Derivada. Observou-se boa concordância, linearidade e reprodutibilidade nos oito métodos com amostras ou soluções puras, com baixas concentrações de bilirrubina, pouca ou nenhuma turvação. Os métodos de Blakney e Kahn foram os mais sensíveis e reprodutíveis na detecção de baixas concentrações de hemoglobina ($Hb=0,01$ g/L). Os métodos da Peroxidase e de Segunda Derivada não foram sensíveis à detecção de concentrações de hemoglobina inferiores a 0,04 g/L. A linearidade foi excelente para cada um dos oito métodos entre 0,08 e 2,00 g/L, com recuperação analítica média de 99% (DP 3,6%), sem diferenças significativas entre os métodos. Em soros com altas concentrações de bilirrubina, os valores da hemoglobina foram superestimados nos métodos Harboe, Noe e no método AI do autor. Os métodos de Blakney, Segunda Derivada e Peroxidase foram considerados muito trabalhosos, por requererem análise de gráficos, exatidão no tempo de incubação e múltiplas pipetagens. Além disto, o método da Peroxidase foi impreciso em concentrações normais de hemoglobina livre. Para contornar estas lacunas, o autor sugeriu a medição da hemoglobina pelas metodologias de Kahn e AII, simultaneamente, com leituras em seis comprimentos de onda (415, 450, 562, 578, 598 e 700 nm) para estimar as concentrações da hemoglobina e bilirrubina. Ainda foi sugerida, pelo autor, a análise dos espectros de absorção para ajudar na resolução de discrepâncias entre as absorções devido aos pigmentos totais heme e a oxihemoglobina.

Na mesma linha do estudo desenvolvido por FAIRBANKS *et al.*, MALINAUSKAS (1997) comparou nove métodos distintos para a dosagem da hemoglobina livre, com o objetivo de avaliar a extensão da hemólise causada pelos instrumentos médicos, como oxigenador, bombas de infusão de sangue extracorpórea e catéter de hemodiálise. A análise incluiu amostras contaminadas para avaliação de interferentes. Empregaram-se metodologias baseadas nos picos de absorção da hemoglobina a 415, 540 e 577 nm por espectrofotometria direta (segundo Harboe, Cripps, Porter, e Shinowara), métodos que utilizam substâncias químicas (Cianometahemoglobina e Tetrametilbenzidina), Primeira derivada, Kahn e Fairbanks AII. As metodologias de Cripps, Kahn, Porter, Shinowara e Primeira derivada utilizam amostra pura e medição em 577 nm. Os métodos de Harboe e Fairbanks AII utilizam amostras diluídas e o pico de absorção da hemoglobina em 415 nm. A dosagem da hemoglobina pelo método da Cianometahemoglobina foi baseada na técnica modificada de Moore (1981) para análise da HbL na faixa de 5 a 2000 mg/dL. Para o método Tetrametilbenzidina (TMB) utilizou-se o Kit Sigma, com padrões compostos de hemoglobina diluída em plasma humano. Os autores concluíram que os métodos de espectrofotometria direta de Cripps e Harboe apresentaram melhor precisão e exatidão, além de serem mais seguros e fáceis de serem executados.

Ao compararmos os resultados da hemoglobina livre e do percentual de hemólise dos concentrados de hemácias CPDA-1 e SAd analisados em nosso estudo e expostos nas **Tabelas 16, 17, 18 e 19**, percebe-se que houve uma diminuição significativa dos valores médios da concentração da hemoglobina livre e do percentual de hemólise em concentrados de hemácias com solução aditiva, em relação aos valores médios obtidos em concentrados de hemácias CPDA-1. Este mesmo perfil de resultados foi apresentado no Manual Técnico da AABB (Apêndice L), em que a concentração média de hemoglobina livre em sangue total com CPDA-1 no “dia 0” no valor de 82 mg/dL passa a 461 mg/dL no 35º dia de armazenamento. Por outro lado, em concentrados de hemácias com CPDA-1, o incremento da hemoglobina livre 78 mg/dL no “dia 0” chega a 658 mg/dL no 35º dia de validade. Este fato é decorrente do baixo volume de plasma nestes hemocomponentes. Em concentrados de hemácias com solução aditiva AS-3 a hemoglobina livre média no 42º dia de validade foi de 386 mg/dL.

HÖGMAN (1998) realizou uma revisão sobre diferentes procedimentos para o preparo e a preservação de concentrados de hemácias, no qual referiu a contínua queda do pH durante o armazenamento das hemácias, devido à formação de ácido láctico, sendo que a velocidade desta diminuição resulta da composição e do volume do meio em que os eritrócitos são armazenados. Em sangue total coletado com CPD, por exemplo, a concentração do 2,3-DPG

pode ser mantida a um nível normal durante 1-2 semanas, devido à capacidade tamponante do bicarbonato do plasma. Por outro lado, hemácias armazenadas em soluções aditivas apresentam queda pronunciada de 2,3-DPG dentro de uma semana e completa deleção em 2 semanas. A relevância clínica dos níveis de 2,3-DPG nas hemácias transfundidas não é clara. Postula-se que em pacientes com consumo exagerado de oxigênio que recebem transfusão maciça de CH com baixa concentração de 2,3-DPG e, como consequência, uma alta afinidade de oxigênio, isso pode causar isquemia e prejudicar a oxigenação de órgãos vitais. No entanto, como o 2,3-DPG é restaurado dentro de 48 horas, na maioria das transfusões a sua diminuição não tem importância clínica. Neste contexto, numerosas investigações mostram que as hemácias armazenadas em soluções aditivas podem ser armazenadas por 42 dias, independentemente da quantidade de plasma removido e são recuperadas em mais de 75% após 24 horas de transfusão.

TOMCZAK (2008) analisou os métodos utilizados no controle de qualidade de concentrados de hemácias produzidos no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná e propôs a inclusão de métodos adicionais para o monitoramento do hemocomponente. Dentre eles, a avaliação morfológica das hemácias pela determinação do percentual de discócitos, segundo o critério morfológico de BESSIS (1972) modificado por LEONART (1997) e a dosagem da hemoglobina livre pelo método da Cianometahemoglobina, adaptado por PELISSARI *et al.*, 1993, para baixas concentrações de hemoglobina. Conforme Tomczak, a estabilidade da cianometahemoglobina, formada por ação do reagente de Drabkin, e a adaptação proposta por Pelissari permitem o emprego do método para pequenas concentrações de hemoglobina livre, que ocorrem durante a preservação das hemácias, ou mesmo por hemólise intravascular, em certas situações clínicas.

O método de Harboe, utilizado para dosagem da hemoglobina livre e análise da hemólise, foi adaptado por BOEHM (2014) para avaliação da eritropoiese, mecanismo caracterizado pelo acúmulo de grandes quantidades de hemoglobina. Para a quantificação da hemoglobina a autora se baseou na propriedade de absorção espectrofotométrica da hemoglobina na Banda de Soret e realizou as leituras em 405 nm, sem lise de eritrócitos para as medições. HULKO (2015) também utilizou leitura espectrofotométrica a 405 nm para dosar a HbL causada pelo estresse mecânico das hemácias como efeito adverso às terapias extracorpóreas.

ADAMZIK *et al.* (2012) estudou a influência da hemólise induzida pela sepsis em pacientes graves, por meio da dosagem da hemoglobina livre neste grupo de indivíduos. A concentração de HbL nos pacientes que não sobreviveram por muito tempo era o dobro em

relação à concentração da HbL nos pacientes com maior sobrevida. Assim, os autores inferiram a concentração de HbL como importante preditor de tempo de sobrevivência e prognóstico destes pacientes. Para as análises da HbL foram utilizadas quatro metodologias, sendo três espectrofotométricas com algoritmos descritos por Harboe, Noe e Fairbanks. A metodologia de Harboe foi a que apresentou melhor discriminação dos resultados.

8.2 Concentração de hemoglobina em concentrados de hemácias com líquido sobrenadante lipêmico

Alterações na aparência visual do líquido sobrenadante dos concentrados de hemácias, como a lipemia, inviabilizam a transfusão destes hemocomponentes e o descarte das bolsas se dá já na etapa do processamento do sangue. Excepcionalmente, na necessidade premente da utilização de determinado CH lipêmico, este deverá ser lavado com solução fisiológica para a remoção do líquido sobrenadante. Consequentemente, as cinco amostras de CH lipêmicas incluídas neste estudo não integravam o estoque de bolsas de CH destinado à transfusão.

Em relação à concentração de hemoglobina livre nos CH lipêmicos, observam-se na **Figura 11** valores de HbL consideravelmente superiores nas amostras lipêmicas em comparação aos valores de HbL das amostras não lipêmicas, no mesmo dia de armazenamento. Entretanto, devido ao pequeno tamanho amostral, a análise estatística não pôde ser considerada válida. Realizou-se a análise com o método não paramétrico de Kruskal-Wallis, usado para amostras pequenas, e esta não apresentou nenhuma diferença entre os dois grupos. Igualmente, com relação à diferença de resultados das amostras lipêmicas entre as metodologias testadas, não houve dados suficientes para resultado consistente.

NOE *et al.* (1984) realizaram um estudo comparativo para a determinação da hemoglobina livre entre os métodos por espectrofotometria direta de Harboe e da Fórmula Policromática. O estudo demonstrou que os dois métodos são precisos, embora a interferência da turbidez dos triglicerídeos não tenha sido totalmente eliminada por nenhum dos métodos.

Nas amostras lipêmicas testadas em nosso trabalho, observamos resultados de HbL inferiores pelo método da Primeira derivada em relação aos resultados obtidos pelos métodos de Harboe e de 5CO. Possivelmente, este comportamento seja devido à baixa interferência da lipemia nos resultados da dosagem da hemoglobina livre pelo método de Primeira derivada (SOLONI, 1986 e COPELAND, 1989).

8.3 Amostras controle

Tendo em vista a inexistência de padrão comercialmente disponível que possa ser utilizado como referência para o método de Harboe, em nosso trabalho utilizamos as amostras controle para o monitoramento dos resultados obtidos nas corridas analíticas com as amostras testadas.

COOKSON *et al.* (2004) avaliaram a utilização dos padrões Sigma, especialmente concebidos para o método da Tetrametilbenzidina (TMB), como controle para o método de Harboe. Os resultados obtidos subestimaram 43 a 54% os valores esperados para HbL na faixa de 0,050 a 0,300 g/L. Por conseguinte, os padrões Sigma foram considerados inadequados como controles para o método de Harboe. O autor sugere que cada laboratório produza a sua amostra padrão a partir da medição da hemoglobina do sangue total em hemoglobinômetro ou analisador de hematologia validado para ser usado como amostra em controle de qualidade de rotina ou para gerar um padrão para curva de calibração. Estas amostras, segundo o autor, poderão ser congeladas ou armazenadas a 4°C para dosagem posterior, sem prejuízo da sua precisão.

FAIRBANKS *et al.* (1992), em seu estudo comparativo com nove metodologias para a determinação da hemoglobina livre, preparou a solução padrão de hemoglobina a partir de unidades de hemácias vencidas e com o plasma removido por centrifugação. As hemácias foram lavadas com solução salina isotônica (0,156 mol/L NaCl) e lisadas com água destilada (1 parte de hemácias para 4 partes de água). Após a hemólise, a amostra foi centrifugada para a remoção do estroma. A concentração da hemoglobina no hemolisado foi mensurada pelo método de Drabkin modificado por MOORE *et al.* (1981) e a concentração ajustada para 0,4 g/L com água destilada.

8.4 Linearidade espectrofotométrica

A bula do *kit* para a determinação da hemoglobina livre por três comprimentos de onda, de acordo com Harboe, HEMOGLOBIN (2016) indica a linearidade de seu produto na faixa de 5 mg/dL a 200 mg/dL.

O intervalo de linearidade espectrofotométrica deste estudo foi de 0,41 mg/dL a 60,75 mg/dL (0,00041 g/dL a 0,06075 g/dL). De acordo com a faixa de linearidade e a absorbância lida a 415 nm, amostras que apresentem concentração de hemoglobina livre superior a 60,75 mg/dL e/ou absorbância em 415 nm superior a 4,30 deverão ser mais diluídas e retestadas. Da

mesma forma, amostras com concentração de hemoglobina livre inferior a 0,41 mg/dL deverão ser menos diluídas e retestadas para a garantia de resultados precisos.

8.5 Ensaio comparativo entre laboratórios para verificação da exatidão

O coeficiente de correlação intraclasse (ICC), devido à BARTKO (1974), foi utilizado para avaliar o grau de concordância entre os laboratórios ou a concordância entre os tecnólogos para medições paramétricas. As análises foram realizadas com o uso do pacote estatístico on-line da Universidade de Hong Kong, disponível em: <http://department.obg.cuhk.edu.hk/researchsupport/IntraClass_correlation.asp>

O índice de concordância entre os laboratórios A, B e C foi ICC=0,9888 e ICC=0,9931, respectivamente para os métodos de Harboe e 5 CO. Por outro lado, entre os laboratórios A, B e D, o índice de concordância foi ICC=0,0440 e ICC=0,0614, respectivamente para os métodos de Harboe e 5 CO, mencionado na **Tabela 26**.

De acordo com os critérios de CICCHETTI e SPARROW (1981), os coeficientes de correlação intraclasse podem ser classificados em níveis de significado clínico da seguinte forma: *Ruim* – inferior a 0,40; *Razoável* – entre 0,40 e 0,59; *Bom* – entre 0,60 e 0,74, e *Excelente* – de 0,75 a 1,00. Concluindo, a concordância entre os laboratórios A, B e C está excelente e a concordância entre os laboratórios A, B e D foi ruim.

A diferença marcante dos resultados encontrados no ensaio entre os laboratórios A, B, C e D poderia estar relacionada com a largura da banda espectral dos espectrofotômetros utilizados. A largura de banda estreita aumenta a sensibilidade de medidas de absorbância e fornece seletividade para o método de absorção, sendo pré-requisito para a obtenção de relação linear entre o sinal óptico e a concentração. O alargamento da banda pode comprometer os números de bandas identificados no espectro, uma vez que esse alargamento tem influência nas bandas individuais e dificulta a localização de picos, influenciando os resultados de medição (INMETRO, 2006). A influência da largura da banda espectral nos resultados pode ser verificada em nosso trabalho (Tabela 25), na qual se constata a largura da banda espectral de 10 nm no espectrofotômetro do laboratório D, com resultados insatisfatórios.

COOKSON *et al.* (2004) utilizaram em seu estudo espectrofotômetro com largura de banda entre 1 e 5 nm. DONALDSON *et al.* (1951) enfatizaram que as medições da hemoglobina devam ser realizadas em espectrofotômetro com ajuste correto da largura da banda espectral e, da mesma forma, KAHN *et al.* (1981) destacaram que a dosagem da

hemoglobina pelo método de varredura espectrofotométrica é simples e rápido, porém, para a obtenção de resultados satisfatórios, o espectrofotômetro deve possuir largura da banda de 1,0 nm. MALINAUSKAS (1997) utilizou em suas análises um espectrofotômetro Beckman® DU640 com largura de banda de 1,8 nm.

8.6 Guia visual de hemólise em concentrado de hemácias

O guia visual com escala de cores para a avaliação da hemólise foi desenvolvido, exclusivamente, para nortear os profissionais do serviço de hemoterapia na decisão pela utilização ou rejeição de concentrado de hemácias com aparência hemolisada. Para a análise, o examinador deverá observar a tonalidade do líquido sobrenadante na interface deste com as hemácias no interior da bolsa e comparar com a tonalidade observada na escala de cores do guia visual de hemólise. Este instrumento não pretende fornecer o valor do percentual de hemólise com exatidão, pois a análise visual da coloração é subjetiva, varia de observador para observador, bem como da fonte luminosa e da tonalidade da imagem impressa que pode variar da tonalidade verdadeira. A confirmação do percentual de hemólise deverá ser feita por método analítico utilizado no laboratório (CANADIAN BLOOD SERVICES, 2009).

Além da finalidade mencionada, o guia visual de hemólise auxiliará na diferenciação do valor elevado da HbL, em virtude da interferência de triglicerídeos no plasma lipêmico, tendo em vista a inabilidade dos métodos espectrofotométricos em subtrair totalmente a absorção devida à lipemia do plasma, resultando em valores falsamente elevados da hemoglobina livre (HARBOE, 1959; NOE, 1984; SOLONI, 1986; COPELAND, 1989).

COOKSON *et al.* (2004) utilizaram um guia visual de hemólise da Baxter® para estimar a quantidade de HbL em concentrados de plaquetas (CP), paralelamente aos métodos de Harboe e da Tetrametilbenzidina. A subjetividade da avaliação visual foi evidenciada pela rejeição de CP com HbL = 0,15 g/L e pela aceitação de CP com HbL = 0,11 g/L.

HAN *et al.* (2009) mencionam que a inspeção visual da intensidade de cor avermelhada do líquido sobrenadante nos concentrados de hemácias é a forma mais comum de avaliação da hemólise antes da transfusão, mas normalmente superestima-se o grau de hemólise com descarte desnecessário de produto tão valioso.

No mesmo contexto, JANATPOUR *et al.* (2004) compararam um método visual para a avaliação da hemólise na bolsa de CH com os métodos analíticos da Tetrametilbenzidina e o método automatizado HemoCue Plasma low-Hb. A Análise visual baseou-se na observação e comparação da cor do líquido sobrenadante da bolsa com as cores do guia Haemonetics®.

Pelos resultados dos testes analíticos, nenhum concentrado de hemácias apresentou concentração de HbL superior a 0,6 g/dL ou 1% de hemólise. No entanto, com base na análise visual cerca de 50% dos CH CPDA-1 e 10% dos CH Sad seriam rejeitados inadvertidamente.

9. CONCLUSÕES

Nesse trabalho foi padronizado o método de Harboe como método espectrofotométrico de determinação da concentração de hemoglobina livre para o controle de qualidade de concentrados de hemácias produzidos em Serviços de Hemoterapia. O método tem embasamento científico, é de fácil execução, tem custo baixo, proporciona resultados fidedignos e reproduzíveis, além de dispensar o uso de substâncias químicas nocivas.

Adicionalmente, foram elaboradas duas ferramentas para auxiliar os profissionais da área de controle de qualidade na rotina laboratorial. Uma delas trata-se de Procedimento Operacional Padrão, que apresenta o método espectrofotométrico de Harboe proposto num formato direto e claro. A segunda ferramenta constitui-se de um Guia Comparativo de Cores para a avaliação do grau de hemólise em concentrados de hemácias.

REFERÊNCIAS

AMERICAN ASSOCIATION OF BLOOD BANKS (AABB). **Technical Manual**. 17th ed. Bethesda, MD, 2011.

ADAMZIK, M.; HAMBURGER T.; PETRAT K.; PETERS, P.; GROOT, H.; HARTMANN, M. **Free hemoglobin concentration in severe sepsis: methods of measurement and prediction of outcome**. *Critical Care* 2012,16:R125.

<Disponível em <http://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/cc11425>> Acesso em 03 de setembro de 2016.

BARTKO, J. J. **The intraclass correlation coefficient as a measure of reliability**. *Psychol Rep.* 1966;19(1):3-11.

BARTKO, J. J. **Corrective note to: "The intraclass correlation as a measure of reliability."** *Psychological Reports*, 1974; 34:418.

BESSIS, M. **Red cell shapes: an illustrated classification and its rationale**. *Nouvelle revue française d'hématologie*, Paris, v.12, p. 721 – 745, 1972.

BOEHM, D.; BELL, A. **Simply red: A novel spectrophotometric erythroid proliferation assay as a tool for erythropoiesis and erythrototoxicity studies**. *Dublin 2, Ireland, Biotechnology Reports* 4 (2014) 34–41. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2215017X14000289>> Acesso em 03 de setembro de 2016.

BLAKNEY G. B.; DINWOODIE, A. J. **A spectrophotometric scanning technique for the rapid determination of plasma hemoglobin**. *Clin. Biochem* 8, 96-102 (1975).

BOISSEL, J. P. **Planning of clinical trials**. *Journal of Internal Medicine* 2004; 255: 427–438.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria Nº 158, de 4 de fevereiro de 2016**. Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos. Publicada no Diário Oficial da União nº 25, de 5 de fevereiro de 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. **Guia para o uso de hemocomponentes** / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Especializada. Brasília, Editora do Ministério da Saúde, 2010, 140 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Hospitalar e de Urgência. **Caderno de informação: sangue e hemoderivados** / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Hospitalar e de Urgência. 7ª Ed., Brasília: Ministério da Saúde, 2014, 158 p.

CANADIAN BLOOD SERVICES. **Visual assessment guide**. 2009. Disponível em <http://www.health.gov.nl.ca/health/bloodservices/pdf/visual_inspection.pdf>. Acesso em 20 de agosto de 2016.

CARDIGAN R., SMITH K. **Evaluation of the HemoCue plasma haemoglobin analyser for assessing haemolysis in red cell concentrates during storage.** Vox Sanguinis 2002; 82: 76–79.

CHALMERS, A. H., SNELL, L. E., **Estimation of Plasma and Urinary Hemoglobin by a Rate Spectrophotometric Method.** Clinical Chemistry, Vol.39, No.8, 1993 1679-1682.

CHIN-YEE, I.; ARYA N.; D'ALMEIDA, M.S. **The red cell storage lesion and its implication for transfusion.** Transfusion Science, 1997, 18(3):447–458.

CICCHETTI, D. V.; SPARROW, S. A. **Developing criteria for establishing inter rater reliability of specific items: applications to assessment of adaptive behavior.** Am J Ment Defic. 1981;86(2):127-37.

COPELAND, B. E.; DYER, P. J.; PESCE, A. J. **Hemoglobin Determination in Plasma or Serum by First-Derivative Recording Spectrophotometry - Evaluation of the Procedure of Soloni, Cunningham, and Amazon.** A.J.C.P., Novembro de 1989, 619 – 624
Disponível em: <http://ajcp.oxfordjournals.org> Acesso em 31 de maio de 2016.

COUNCIL OF EUROPE, **Guide to the Preparation, Use and Quality Assurance of Blood Components**, 16^a Ed, International Copyright Convention, France, 2011.

COVAS, D. T., LANGUI, J. D. M., BORDIN, J. O. **Hemoterapia – Fundamentos e Prática**, São Paulo, Editora Atheneu, 2007, 632 p.

COOKSON P, SUTHERLAND J, CARDIGAN R. **A simple spectrophotometric method for the quantification of residual haemoglobin in platelet concentrates.** Vox Sang 2004; 87:264–271.

DIEPENHORSRT, P.; ROKHOLT, S.; PRINS, H. K. **Removal of Leukocytes from Whole Blood and Erythrocyte Suspensions by Filtration through Cotton Wool - Influence of Filtration on Biochemical Parameters of Erythrocytes during Storage.** Vox Sang. 23: 321-330 (1972).

DONALDSON, R., SISSON, R. B., KING, E. J., WOOTTON, I. D. P. **Determination of haemoglobin - standardized optical data for absolute estimations.** The Lancet, abril-21, 875-881 (1951).

ESPECTROFOTÔMETRO 600 S, **Manual de Instalação e Operação**, Femto Indústria e Comércio de Instrumentos Ltda. São Paulo, 2002.

FAIRBANKS, V. F., ZIESMER, S. C., BRIEN, P. C. O. **Methods for Measuring Plasma Hemoglobin in Micromolar Concentration Compared.** Clin. Chem.38/1, 132-140 (1992).

FERNANDES, E. S. F. **Caracterização molecular de hemoglobinopatias raras associadas ao agrupamento gênico da beta-globina**, 2010. Dissertação de mestrado em biologia molecular e genética da Universidade de Lisboa, 48 p. Disponível em: <http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/2592/1/ulfc090564_tm_E_Fernandes.pdf>. Acesso em 17 de setembro de 2016.

GENETET, B.; MANNONI, P. **La transfusion**. Tradução A. Gelabert Blanes; F. Casals Sole. Havana: Edición Revolucionaria, 1984.

GOMES, JFS; GUEDES MB; COUCEIRO, IB. **Desempenho de espectrofotômetros UV/VIS/IVP: emprego dos materiais de referência**. ENQUALAB-2008, Congresso de Qualidade em Metrologia, São Paulo, 2008.
Disponível em <http://www.vertent.net/remesp/enqualab2008/cdrom/pdf/TT013.pdf>. Acesso em 24 de maio de 2016.

GREER, J. P. et al. **Wintrobe's Clinical Hematology**, 11ª Ed. Lippincott Williams & Wilkins Publishers; 2003.

GRIFFITHS et al . **Hemoglobin -Quaternary Structure Quaternary structure: assembly of multiple polypeptide subunits**. Department Of Biology - Memorial University. 2000. Disponível em: <<http://www.mun.ca/biology/scarr/Gr09-07d.htm>>. Acesso em 21 de setembro de 2016.

HAHN B.; VIASTELICA D. L., SNYDER L. R. et al. **Polychromatic analysis: New applications of an old technique**. Clin Chem 1979, 25,951-959.

HAN, V.; SERRANO, K.; DEVINE, D. V. **A comparative study of common techniques used to measure haemolysis in stored red cell concentrates**, Canadian Blood Services, Research and Development and the Centre for Blood Research, University of British Columbia, Vancouver, Canada, Vox Sanguinis (2009).

HARBOE M., **A method for determination of hemoglobin in plasma by near-ultraviolet spectrophotometry**. Scand J Clin Lab Invest 11, 66-70 (1959).

HARMENING, D. M., **Técnicas Modernas em Banco de Sangue e Transfusão**, Rio de Janeiro, Editora Revinter, 1992, 445 p.

HEMOCUE – **Plasma/Low Photometer Operating Manual**, Hemocue AB Ängelholm, Sweden.

HEMOGLOBIN (fHb) free **Hemoglobine acc. to Harboe**. Umkirch: Bioanalytisc GmbH, 2016.

HESS, J. R; SPARROW R. L.; VAN DER MEER, P. F.; ACKER, J. P.; CARDIGAN, R. A.; DEVINE, D. V. **Red blood cell hemolysis during blood bank storage: using national quality management data to answer basic scientific questions**. Transfusion, 2009. Volume 49, 2599-2603

HESS, J. R., **Measures of stored red blood cell quality – Review**, Vox Sanguinis 2014, 107, 1–9.

HÖGMAN, C. F.; HEDLUND, K.; SAHLESTRÖM, Y. **Red Cell Preservation in Protein-Poor Media III. Protection Against in vitro Hemolysis**. Vox Sang.1981, 41: 274-281.

HÖGMAN C. F. **Preparation and Preservation of Red Cells**. Vox Sanguinis 1998; 74 (Supl. 2): 177-187

HÖGMAN C. F.; MERYMAN, H. T. **Red blood cells intended for transfusion: quality criteria revisited.** Transfusion. 2006; 46:137-142.

HULKO, M. et al. **Cell-free plasma hemoglobin removal by dialyzers with various permeability profiles.** Scientific Reports 5:16367, 2015. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4639840/pdf/srep16367.pdf>>. Acesso em 04 de setembro de 2016.

INMETRO. **Ensaio de proficiência em espectrofotometria – 1ª rodada: transmitância espectral regular e comprimento de onda.** Rio de Janeiro, 2008. Disponível em <http://www.inmetro.gov.br/metcientifica/pdf/RelEspectro_1.pdf>. Acesso em 21 de julho de 2013.

INSTRUCTION **Manual operation guide UV-1601 Shimadzu** Recording Spectrophotometer. Tóquio: Shimadzu Corporation, 1994.

INSTRUCTION **Manual operation guide UVmini-1240.** Shimadzu Corporation, Kioto, 2004.

JANATPOUR, K. A. et al. **Visual assessment of hemolysis in red blood cell units and segments can be deceptive,** Transfusion, volume 44, Jul-2004.

KAHN, Stephen E.; WATKINS, Bruce F.; BERMES, Edward W. **An evaluation of a spectrophotometric scanning technique for measurement of plasma hemoglobin.** Annals of Clinical and Laboratory Science, Filadélfia, v. 11, n.2, p. 126-131, 1981.

KLEIN, H. G., ANSTEE, D. J. **Mollison's blood transfusion in clinical medicine**, 11th ed. Blackwell Publishing, Massachusetts, 2005, 920 p.

LEONART, M. S. S. et al. **Correlation of discocyte frequency and ATP concentration in preserved blood. A morphological indicator of red cell viability.** Brazilian Journal Medical Biological Research, Ribeirão Preto, v. 30, n. 6, p.745 – 747, 1997.

MALINAUSKAS, R. A. **Plasma hemoglobin measurement techniques for the in vitro evaluation of blood damage caused by medical devices.** Artificial Organs 21(12):1255-1267 (1997).

MICRONAL spectrophotometres **AJX-3000 PC. User's Manual.** São Paulo: Micronal S/A. 2013.

NOE, D.A.; WEEDN W.; BELL, W. R.; **Direct Spectrophotometry of Serum Hemoglobin: An Allen Correction Compared with a Three-Wavelength Polychromatic Analysis.** Clinical Chemistry, Vol. 30, No. 5, 1984 627.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introdução à espectroscopia** (tradução da 4ª edição norte-americana), 2010, Cengage Learning Edições Ltda.

PELISSARI, C. B.; STIGHEN, S.T; NASCIMENTO, A.J.; LEONART, M.S.S. **Padronização para a dosagem de hemoglobina extracelular pelo método da cianometahemoglobina.** Revista Brasileira de Análises Clínicas. v. 25, p. 14 -16, 1993.

PERUTZ, M. F. **The stereochemical mechanism of the cooperative effects in hemoglobin revisited.** Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 1998. 27:1–34

PRÓ- SANGUE, **Manual de Procedimentos do Laboratório de Garantia da Qualidade da Fundação Pró-Sangue - Hemocentro de São Paulo**, 1995, São Paulo.

REDSANG-SIBRATEC, **Manual para Controle de Qualidade de Sangue Total e Hemoderivados**, Rede de Serviços Tecnológicos para Sangue e Hemoderivados, São Paulo, 2011, p. 38.

RIMINGTON, C.; SVEINSSON, S. I.; **The spectrophotometric determination of uroporphyrin**, 1950

ROUS P., TURNER J. W., **The preservation of living red blood cells in vitro.** J Exp Med 1916;23:219-48.

SCHAER D. J. et al. **Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and heme scavengers as a novel class of therapeutic proteins.** Blood, 21 february 2013, V 121: 1276-1284. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23264591>>. Acesso em 18 de setembro de 2016.

SOWEMIMO-COKER SO: **Red blood cell hemolysis during processing.** Transfusion Medicine Reviews 2002; 16:46–60.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C.; **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 5ª ed., LTC: Rio de Janeiro, 1994, 387 p.

SIMON T. L.; MARCUS C. S.; MYHRE B. A.; NELSON E. J. **Effects of AS-3 nutrient-additive solution on 42 and 49 days of storage of red cells.** Transfusion 1987;27:178-82.

SOLONI, F. G.; CUNNINGHAM, M. T.; AMAZON, K. **Plasma hemoglobin determination by recording derivative spectrophotometry.** AJCP, vol. 85, nº 3, mar 1986, 342-347.

SWEENEY, J. D.; RIZK Y. **Clinical Transfusion Medicine**, Texas, Landes Bioscience, 1999, 180 p.

SYSMEX. **XS-1000i Automated Hematology Analyzer.** Mundelein, IL, 2012. Disponível em <<https://www.sysmex.com/la/pt/Products/Documents/English/XS-1000i-English.pdf>>. Acesso em 31 de outubro de 2016.

TOMCZAK, A.C.T.Q. **Estudos sobre o controle de qualidade de unidades transfusionais eritrocitárias.** 2008. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, 96 p. Disponível em: <<http://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/25278/Diss%20Ana%20C%20Tomczak%20FINAL.pdf?sequence=1>> Acesso em 24 de julho de 2016.

VOGELAAR, E. F. et al. **Contributions to the Optimal Use of Human Blood -. Analysis and Optimalization of the Production of Plasma Protein Fraction.** Vox Sang. 23: 481492 (1972).

APÊNDICES E ANEXOS

Apêndice A – Tabela com dados dos concentrados de hemácias CPDA1, resultados da hemoglobina livre e percentual de hemólise nas metodologias Harboe, 5 CO e Primeira derivada (n = 58).

Dados do CH						Harboe		5 CO		1ª Derivada	
	HbT (g/dL)	VG (%)	Tipo CH	Dia de armazen.	Aspecto visual	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)
1	22,2	66	CPDA1	02	Límpido	0,010	0,01	0,008	0,01	0,008	0,01
2	22,4	71	CPDA1	15	1+	0,076	0,10	0,068	0,09	0,047	0,06
3	26,0	80	CPDA1	24	4+	0,414	0,32	0,371	0,29	0,301	0,23
4	22,2	72	CPDA1	28	4+	0,562	0,71	0,499	0,63	0,614	0,77
5	22,0	67	CPDA1	01	1+	0,065	0,10	0,058	0,09	0,050	0,08
6	21,8	67	CPDA1	01	Límpido	0,042	0,06	0,040	0,06	0,031	0,05
7	22,0	68	CPDA1	01	Límpido	0,040	0,06	0,037	0,05	0,029	0,04
8	23,3	72	CPDA1	04	Límpido	0,035	0,04	0,032	0,04	0,026	0,03
9	24,6	77	CPDA1	06	1+	0,063	0,06	0,057	0,05	0,004	0,00
10	23,9	77	CPDA1	05	1+	0,050	0,05	0,046	0,04	0,030	0,03
11	23,0	64	CPDA1	09	1+	0,049	0,08	0,044	0,07	0,041	0,06
12	23,6	71	CPDA1	03	Límpido	0,033	0,04	0,030	0,04	0,028	0,03
13	23,8	72	CPDA1	08	Límpido	0,036	0,04	0,032	0,04	0,029	0,03
14	18,5	55	CPDA1	22	3+	0,134	0,33	0,121	0,30	0,096	0,23
15	20,2	66	CPDA1	22	4+	0,269	0,45	0,239	0,40	0,212	0,36
16	23,6	72	CPDA1	10	3+	0,227	0,27	0,204	0,24	0,172	0,20
17	23,6	71	CPDA1	05	1+	0,123	0,15	0,111	0,14	0,089	0,11
18	23,4	70	CPDA1	02	Límpido	0,045	0,06	0,043	0,06	0,034	0,04
19	21,2	66	CPDA1	02	1+	0,092	0,15	0,082	0,13	0,071	0,11
20	24,0	71	CPDA1	05	2+	0,166	0,20	0,148	0,18	0,104	0,13
21	23,4	70	CPDA1	10	3+	0,209	0,27	0,190	0,24	0,160	0,21
22	23,8	74	CPDA1	10	2+	0,143	0,16	0,130	0,14	0,100	0,11
23	23,6	68	CPDA1	04	Límpido	0,046	0,06	0,041	0,06	0,035	0,05
24	23,6	71	CPDA1	05	1+	0,083	0,10	0,075	0,09	0,067	0,08
25	24,8	76	CPDA1	05	1+	0,082	0,08	0,074	0,07	0,071	0,07
26	22,0	65	CPDA1	04	1+	0,081	0,13	0,073	0,12	0,061	0,10
27	21,6	66	CPDA1	03	Límpido	0,043	0,07	0,039	0,06	0,029	0,05
28	23,8	70	CPDA1	07	2+	0,190	0,24	0,172	0,22	0,138	0,17
29	22,8	68	CPDA1	04	1+	0,051	0,07	0,048	0,07	0,040	0,06
30	23,9	69	CPDA1	13	3+	0,127	0,16	0,116	0,15	0,099	0,13
31	24,6	74	CPDA1	13	3+	0,119	0,13	0,109	0,11	0,096	0,10
32	23,7	67	CPDA1	06	2+	0,054	0,08	0,049	0,07	0,046	0,06
33	24,8	70	CPDA1	04	2+	0,068	0,08	0,063	0,08	0,058	0,07
34	24,4	69	CPDA1	04	2+	0,047	0,06	0,044	0,06	0,043	0,05
35	20,9	66	CPDA1	35	3+	0,199	0,32	0,171	0,28	0,166	0,27
36	24,3	78	CPDA1	35	3+	0,175	0,16	0,158	0,14	0,121	0,11
37	24,2	87	CPDA1	35	3+	0,148	0,08	0,135	0,07	0,153	0,08
38	24,1	67	CPDA1	11	3+	0,223	0,31	0,200	0,27	0,185	0,25
39	25,2	76	CPDA1	18	3+	0,120	0,11	0,110	0,10	0,102	0,10
40	24,1	73	CPDA1	11	3+	0,446	0,50	0,396	0,44	0,345	0,39
41	24,9	72	CPDA1	06	2+	0,092	0,10	0,084	0,09	0,077	0,09
42	24,1	70	CPDA1	04	2+	0,068	0,08	0,064	0,08	0,074	0,09
43	24,9	80	CPDA1	28	3+	0,393	0,32	0,345	0,28	0,307	0,25
44	25,9	79	CPDA1	25	3+	0,406	0,33	0,366	0,30	0,288	0,23
45	25,4	80	CPDA1	31	3+	0,451	0,36	0,407	0,32	0,332	0,26
46	25,4	82	CPDA1	35	4+	0,655	0,46	0,574	0,41	0,479	0,34
47	24,7	82	CPDA1	35	4+	0,502	0,37	0,448	0,33	0,359	0,26

Continuação do Apêndice A – Tabela com dados dos concentrados de hemácias CPDA1, resultados da hemoglobina livre e percentual de hemólise nas metodologias Harboe, 5 CO e Primeira derivada (n = 58).

Dados do CH						Harboe		5 CO		1ª Derivada	
	HbT (g/dL)	VG (%)	Tipo CH	Dia de armazen.	Aspecto visual	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)
48	23,6	76	CPDA1	35	4+	0,259	0,26	0,235	0,24	0,179	0,18
49	22,8	70	CPDA1	35	3+	0,265	0,35	0,234	0,31	0,153	0,20
50	23,2	72	CPDA1	35	5+	0,399	0,48	0,368	0,44	0,412	0,50
51	22,2	71	CPDA1	35	3+	0,188	0,25	0,169	0,22	0,165	0,22
52	21,8	69	CPDA1	35	4+	0,340	0,48	0,309	0,44	0,233	0,33
53	19,6	63	CPDA1	35	3+	0,179	0,34	0,160	0,30	0,140	0,26
54	21,6	70	CPDA1	35	2+	0,080	0,11	0,073	0,10	0,061	0,08
55	22,6	70	CPDA1	35	3+	0,246	0,33	0,220	0,29	0,179	0,24
56	21,6	66	CPDA1	35	4+	0,336	0,53	0,306	0,48	0,280	0,44
57	21,8	67	CPDA1	35	4+	0,301	0,46	0,270	0,41	0,224	0,34
58	22,0	66	CPDA1	35	4+	0,393	0,61	0,348	0,54	0,375	0,58

Apêndice B – Tabela com dados dos concentrados de hemácias SAd, resultados da hemoglobina livre e percentual de hemólise nas metodologias Harboe, 5 CO e Primeira derivada (n = 129).

Dados do CH						Harboe		5 CO		1ª Derivada	
	HbT (g/dL)	VG (%)	Tipo CH	Dia de armazen.	Aspecto visual	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)
1	17,0	52	SAd	16	2+	0,019	0,05	0,020	0,06	0,023	0,06
2	18,0	56	SAd	10	2+	0,036	0,09	0,032	0,08	0,015	0,04
3	18,5	57	SAd	10	2+	0,024	0,06	0,022	0,05	0,019	0,04
4	16,5	51	SAd	04	1+	0,017	0,05	0,016	0,05	0,014	0,04
5	17,2	50	SAd	02	Límpido	0,016	0,05	0,014	0,04	0,019	0,06
6	20,6	59	SAd	02	2+	0,026	0,05	0,026	0,05	0,031	0,06
7	17,0	51	SAd	03	2+	0,038	0,11	0,037	0,11	0,031	0,09
8	17,7	52	SAd	03	3+	0,055	0,15	0,051	0,14	0,045	0,12
9	20,2	59	SAd	04	2+	0,028	0,06	0,026	0,05	0,025	0,05
10	16,7	50	SAd	01	2+	0,024	0,07	0,023	0,07	0,016	0,05
11	16,7	50	SAd	01	1+	0,028	0,08	0,026	0,08	0,026	0,08
12	18,7	56	SAd	16	Límpido	0,034	0,08	0,032	0,07	0,028	0,07
13	18,2	56	SAd	24	1+	0,055	0,13	0,050	0,12	0,046	0,11
14	19,5	62	SAd	16	1+	0,092	0,18	0,082	0,16	0,064	0,12
15	18,1	52	SAd	20	1+	0,084	0,22	0,076	0,20	0,066	0,18
16	17,6	54	SAd	13	Límpido	0,027	0,07	0,026	0,07	0,023	0,06
17	18,7	57	SAd	06	1+	0,032	0,07	0,026	0,06	0,023	0,05
18	19,4	57	SAd	06	1+	0,045	0,10	0,041	0,09	0,035	0,08
19	19,6	55	SAd	06	1+	0,060	0,14	0,053	0,12	0,047	0,11
20	17,8	51	SAd	03	1+	0,030	0,08	0,027	0,07	0,025	0,07
21	19,2	53	SAd	03	1+	0,054	0,13	0,049	0,12	0,050	0,12
22	17,7	52	SAd	03	1+	0,044	0,12	0,040	0,11	0,036	0,10
23	19,6	53	SAd	03	1+	0,035	0,08	0,031	0,07	0,031	0,07
24	18,2	55	SAd	04	Límpido	0,023	0,06	0,022	0,05	0,020	0,05
25	17,8	57	SAd	23	Límpido	0,023	0,05	0,023	0,06	0,022	0,05
26	20,0	62	SAd	18	1+	0,099	0,19	0,088	0,17	0,082	0,15
27	18,5	56	SAd	16	2+	0,033	0,08	0,032	0,08	0,030	0,07
28	17,4	54	SAd	11	2+	0,069	0,18	0,061	0,16	0,056	0,15
29	17,0	52	SAd	04	1+	0,017	0,05	0,015	0,04	0,016	0,05
30	17,9	53	SAd	04	1+	0,015	0,04	0,014	0,04	0,012	0,03
31	19,4	63	SAd	42	4+	0,188	0,36	0,169	0,32	0,163	0,31
32	17,9	63	SAd	42	4+	0,112	0,23	0,101	0,21	0,077	0,16
33	17,6	56	SAd	15	2+	0,044	0,11	0,043	0,11	0,035	0,09
34	19,0	60	SAd	10	2+	0,051	0,11	0,038	0,08	0,045	0,09
35	19,3	59	SAd	12	2+	0,064	0,14	0,063	0,13	0,054	0,11
36	20,0	62	SAd	11	3+	0,125	0,24	0,113	0,21	0,094	0,18
37	19,4	59	SAd	29	3+	0,263	0,55	0,238	0,50	0,182	0,38
38	18,2	59	SAd	22	2+	0,089	0,20	0,080	0,18	0,066	0,15
39	18,8	61	SAd	14	3+	0,114	0,24	0,115	0,24	0,083	0,17
40	17,0	55	SAd	19	2+	0,055	0,15	0,049	0,13	0,045	0,12
41	18,9	59	SAd	19	2+	0,075	0,16	0,070	0,15	0,061	0,13
42	19,2	56	SAd	13	1+	0,181	0,42	0,148	0,34	0,163	0,37
43	19,8	63	SAd	19	2+	0,094	0,18	0,088	0,17	0,073	0,14
44	17,8	58	SAd	27	2+	0,092	0,22	0,084	0,20	0,062	0,15
45	18,9	59	SAd	30	3+	0,239	0,52	0,220	0,48	0,198	0,43
46	18,1	57	SAd	37	2+	0,099	0,24	0,085	0,20	0,077	0,18
47	17,1	58	SAd	40	3+	0,232	0,57	0,210	0,52	0,166	0,41

Continuação do Apêndice B – Tabela com dados dos concentrados de hemácias SAd, resultados da hemoglobina livre e percentual de hemólise nas metodologias Harboe, 5 CO e Primeira derivada (n = 129).

Dados do CH						Harboe		5 CO		1ª Derivada	
	HbT (g/dL)	VG (%)	Tipo CH	Dia de armazen.	Aspecto visual	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)
48	18,7	57	SAd	35	1+	0,050	0,12	0,045	0,10	0,042	0,10
49	21,6	66	SAd	25	2+	0,160	0,25	0,147	0,23	0,104	0,16
50	17,7	54	SAd	04	2+	0,090	0,23	0,087	0,23	0,062	0,16
51	19,8	60	SAd	06	1+	0,055	0,11	0,050	0,10	0,045	0,09
52	19,4	59	SAd	06	2+	0,113	0,24	0,101	0,21	0,089	0,19
53	19,5	58	SAd	39	2+	0,079	0,17	0,073	0,16	0,062	0,13
54	16,5	52	SAd	37	1+	0,056	0,16	0,050	0,14	0,041	0,12
55	18,1	58	SAd	20	Limpido	0,041	0,10	0,038	0,09	0,033	0,08
56	18,1	60	SAd	26	1+	0,055	0,12	0,050	0,11	0,042	0,09
57	18,1	58	SAd	25	1+	0,064	0,15	0,052	0,12	0,044	0,10
58	18,9	62	SAd	42	2+	0,145	0,29	0,129	0,26	0,101	0,20
59	19,1	63	SAd	42	3+	0,274	0,53	0,240	0,47	0,185	0,36
60	19,7	68	SAd	42	3+	0,190	0,31	0,169	0,27	0,144	0,23
61	18,2	61	SAd	42	2+	0,073	0,16	0,067	0,14	0,045	0,10
62	20,8	68	SAd	42	3+	0,196	0,30	0,172	0,26	0,153	0,24
63	19,1	61	SAd	42	2+	0,066	0,14	0,061	0,13	0,045	0,09
64	18,0	60	SAd	42	4+	0,306	0,68	0,259	0,58	0,220	0,49
65	18,5	56	SAd	05	3+	0,138	0,33	0,126	0,30	0,081	0,19
66	18,6	59	SAd	06	1+	0,056	0,12	0,050	0,11	0,041	0,09
67	18,0	56	SAd	07	1+	0,048	0,12	0,042	0,10	0,039	0,10
68	20,6	61	SAd	06	1+	0,074	0,14	0,066	0,13	0,055	0,10
69	20,7	61	SAd	05	1+	0,053	0,10	0,047	0,09	0,044	0,08
70	18,9	61	SAd	30	3+	0,354	0,73	0,314	0,65	0,211	0,44
71	18,4	59	SAd	19	2+	0,067	0,15	0,060	0,13	0,051	0,11
72	18,7	57	SAd	10	1+	0,054	0,12	0,048	0,11	0,060	0,14
73	16,9	53	SAd	09	1+	0,046	0,13	0,042	0,12	0,038	0,11
74	17,7	57	SAd	07	2+	0,088	0,21	0,078	0,19	0,067	0,16
75	18,6	55	SAd	06	1+	0,032	0,08	0,029	0,07	0,029	0,07
76	18,5	54	SAd	05	1+	0,036	0,09	0,033	0,08	0,031	0,08
77	17,7	55	SAd	12	1+	0,029	0,07	0,026	0,07	0,022	0,06
78	19,2	59	SAd	08	1+	0,031	0,07	0,029	0,06	0,028	0,06
79	19,3	60	SAd	11	1+	0,030	0,06	0,027	0,06	0,026	0,05
80	19,6	59	SAd	08	1+	0,030	0,06	0,027	0,06	0,026	0,05
81	17,7	54	SAd	09	1+	0,025	0,06	0,022	0,06	0,021	0,05
82	19,3	60	SAd	26	2+	0,070	0,15	0,062	0,13	0,053	0,11
83	19,8	62	SAd	25	1+	0,058	0,11	0,052	0,10	0,049	0,09
84	18,4	59	SAd	24	1+	0,054	0,12	0,048	0,11	0,043	0,10
85	19,9	59	SAd	20	1+	0,056	0,12	0,050	0,10	0,049	0,10
86	19,9	58	SAd	07	1+	0,041	0,09	0,037	0,08	0,033	0,07
87	18,7	62	SAd	42	3+	0,187	0,38	0,165	0,33	0,147	0,30
88	18,5	61	SAd	41	3+	0,168	0,36	0,153	0,32	0,125	0,26
89	18,8	65	SAd	39	3+	0,134	0,25	0,119	0,22	0,118	0,22
90	19,6	65	SAd	38	2+	0,105	0,19	0,093	0,17	0,071	0,13
91	18,6	60	SAd	42	1+	0,064	0,14	0,056	0,12	0,043	0,09
92	18,4	60	SAd	40	2+	0,126	0,27	0,113	0,25	0,109	0,24
93	18,5	61	SAd	40	3+	0,243	0,51	0,213	0,45	0,197	0,42
94	17,4	56	SAd	42	2+	0,076	0,19	0,068	0,17	0,053	0,13

Continuação do Apêndice B – Tabela com dados dos concentrados de hemácias SAd, resultados da hemoglobina livre e percentual de hemólise nas metodologias Harboe, 5 CO e Primeira derivada (n = 129).

Dados do CH						Harboe		5 CO		1ª Derivada	
	HbT (g/dL)	VG (%)	Tipo CH	Dia de armazen.	Aspecto visual	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)
95	18,1	59	SAd	42	4+	0,352	0,80	0,315	0,71	0,256	0,58
96	18,2	57	SAd	42	2+	0,056	0,13	0,047	0,11	0,042	0,10
97	18,5	60	SAd	42	3+	0,175	0,38	0,155	0,33	0,144	0,31
98	17,8	59	SAd	42	4+	0,278	0,64	0,248	0,57	0,214	0,49
99	19,0	62	SAd	42	2+	0,116	0,23	0,103	0,21	0,093	0,19
100	18,2	58	SAd	42	3+	0,225	0,52	0,199	0,46	0,166	0,38
101	16,3	58	SAd	42	4+	0,346	0,89	0,308	0,79	0,252	0,65
102	20,1	65	SAd	39	3+	0,129	0,22	0,113	0,20	0,099	0,17
103	18,7	60	SAd	42	2+	0,110	0,24	0,098	0,21	0,099	0,21
104	19,7	67	SAd	42	3+	0,331	0,55	0,293	0,49	0,230	0,39
105	17,5	57	SAd	41	2+	0,071	0,17	0,063	0,16	0,064	0,16
106	19,0	62	SAd	41	3+	0,113	0,23	0,100	0,20	0,083	0,17
107	16,6	53	SAd	40	3+	0,232	0,66	0,207	0,59	0,233	0,66
108	18,1	60	SAd	39	4+	0,327	0,72	0,289	0,64	0,313	0,69
109	18,2	60	SAd	39	2+	0,140	0,31	0,124	0,27	0,112	0,25
110	18,9	65	SAd	42	2+	0,211	0,39	0,187	0,35	0,169	0,31
111	18,4	61	SAd	42	2+	0,152	0,32	0,117	0,25	0,128	0,27
112	18,7	63	SAd	42	4+	0,278	0,55	0,246	0,49	0,236	0,47
113	19,1	63	SAd	41	2+	0,135	0,26	0,120	0,23	0,102	0,20
114	17,6	59	SAd	42	3+	0,152	0,35	0,121	0,28	0,121	0,28
115	17,8	60	SAd	42	3+	0,190	0,43	0,169	0,38	0,147	0,33
116	18,3	59	SAd	42	2+	0,108	0,24	0,096	0,22	0,083	0,19
117	16,4	58	SAd	42	4+	0,246	0,63	0,219	0,56	0,224	0,57
118	16,7	53	SAd	42	3+	0,247	0,70	0,221	0,62	0,230	0,65
119	18,3	61	SAd	42	2+	0,100	0,21	0,089	0,19	0,086	0,18
120	20,3	67	SAd	42	4+	0,310	0,50	0,276	0,45	0,239	0,39
121	17,9	60	SAd	42	2+	0,107	0,24	0,095	0,21	0,086	0,19
122	19,1	65	SAd	41	3+	0,214	0,39	0,191	0,35	0,188	0,34
123	19,5	63	SAd	41	3+	0,230	0,44	0,206	0,39	0,214	0,41
124	18,7	61	SAd	41	2+	0,129	0,27	0,114	0,24	0,093	0,19
125	18,5	56	SAd	41	1+	0,060	0,14	0,054	0,13	0,040	0,10
126	17,8	58	SAd	40	2+	0,096	0,23	0,086	0,20	0,083	0,20
127	18,6	62	SAd	39	2+	0,102	0,21	0,091	0,19	0,075	0,15
128	19,6	65	SAd	42	2+	0,123	0,22	0,109	0,20	0,102	0,18
129	19,1	65	SAd	42	2+	0,122	0,22	0,109	0,20	0,093	0,17

Apêndice C – Tabela dos concentrados de hemácias CPDA1, no período I do armazenamento (1º ao 10º dia).

Dados do CH						Harboe		5 CO		1ª Derivada	
	HbT (g/dL)	VG (%)	Tipo CH	Dia de armazen.	Aspecto visual	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)
1	22,2	66	CPDA1	02	Límpido	0,010	0,01	0,008	0,01	0,008	0,01
2	22,0	67	CPDA1	01	1+	0,065	0,10	0,058	0,09	0,050	0,08
3	21,8	67	CPDA1	01	Límpido	0,042	0,06	0,040	0,06	0,031	0,05
4	22,0	68	CPDA1	01	Límpido	0,040	0,06	0,037	0,05	0,029	0,04
5	23,3	72	CPDA1	04	Límpido	0,035	0,04	0,032	0,04	0,026	0,03
6	24,6	77	CPDA1	06	1+	0,063	0,06	0,057	0,05	0,004	0,00
7	23,9	77	CPDA1	05	1+	0,050	0,05	0,046	0,04	0,030	0,03
8	23,0	64	CPDA1	09	1+	0,049	0,08	0,044	0,07	0,041	0,06
9	23,6	71	CPDA1	03	Límpido	0,033	0,04	0,030	0,04	0,028	0,03
10	23,8	72	CPDA1	08	Límpido	0,036	0,04	0,032	0,04	0,029	0,03
11	23,6	72	CPDA1	10	3+	0,227	0,27	0,204	0,24	0,172	0,20
12	23,6	71	CPDA1	05	1+	0,123	0,15	0,111	0,14	0,089	0,11
13	23,4	70	CPDA1	02	Límpido	0,045	0,06	0,043	0,06	0,034	0,04
14	21,2	66	CPDA1	02	1+	0,092	0,15	0,082	0,13	0,071	0,11
15	24,0	71	CPDA1	05	2+	0,166	0,20	0,148	0,18	0,104	0,13
16	23,4	70	CPDA1	10	3+	0,209	0,27	0,190	0,24	0,160	0,21
17	23,8	74	CPDA1	10	2+	0,143	0,16	0,130	0,14	0,100	0,11
18	23,6	68	CPDA1	04	Límpido	0,046	0,06	0,041	0,06	0,035	0,05
19	23,6	71	CPDA1	05	1+	0,083	0,10	0,075	0,09	0,067	0,08
20	24,8	76	CPDA1	05	1+	0,082	0,08	0,074	0,07	0,071	0,07
21	22,0	65	CPDA1	04	1+	0,081	0,13	0,073	0,12	0,061	0,10
22	21,6	66	CPDA1	03	Límpido	0,043	0,07	0,039	0,06	0,029	0,05
23	23,8	70	CPDA1	07	2+	0,190	0,24	0,172	0,22	0,138	0,17
24	22,8	68	CPDA1	04	1+	0,051	0,07	0,048	0,07	0,040	0,06
25	23,7	67	CPDA1	06	2+	0,054	0,08	0,049	0,07	0,046	0,06
26	24,8	70	CPDA1	04	2+	0,068	0,08	0,063	0,08	0,058	0,07
27	24,4	69	CPDA1	04	2+	0,047	0,06	0,044	0,06	0,043	0,05
28	24,9	72	CPDA1	06	2+	0,092	0,10	0,084	0,09	0,077	0,09
29	24,1	70	CPDA1	04	2+	0,068	0,08	0,064	0,08	0,074	0,09

Apêndice D – Tabela dos concentrados de hemácias CPDA1, no período II do armazenamento (11º ao 20º dia).

Dados do CH						Harboe		5 CO		1ª Derivada	
	HbT (g/dL)	VG (%)	Tipo CH	Dia de armazen.	Aspecto visual	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)
1	22,4	71	CPDA1	15	1+	0,076	0,10	0,068	0,09	0,047	0,06
2	23,9	69	CPDA1	13	3+	0,127	0,16	0,116	0,15	0,099	0,13
3	24,6	74	CPDA1	13	3+	0,119	0,13	0,109	0,11	0,096	0,10
4	24,1	67	CPDA1	11	3+	0,223	0,31	0,200	0,27	0,185	0,25
5	25,2	76	CPDA1	18	3+	0,120	0,11	0,110	0,10	0,102	0,10
6	24,1	73	CPDA1	11	3+	0,446	0,50	0,396	0,44	0,345	0,39

Apêndice E – Tabela dos concentrados de hemácias CPDA1, no período III do armazenamento (21º ao 30º dia).

Dados do CH						Harboe		5 CO		1ª Derivada	
	HbT (g/dL)	VG (%)	Tipo CH	Dia de armazen.	Aspecto visual	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)
1	26,0	80	CPDA1	24	4+	0,414	0,32	0,371	0,29	0,301	0,23
2	22,2	72	CPDA1	28	4+	0,562	0,71	0,499	0,63	0,614	0,77
3	18,5	55	CPDA1	22	3+	0,134	0,33	0,121	0,30	0,096	0,23
4	20,2	66	CPDA1	22	4+	0,269	0,45	0,239	0,40	0,212	0,36
5	24,9	80	CPDA1	28	3+	0,393	0,32	0,345	0,28	0,307	0,25
6	25,9	79	CPDA1	25	3+	0,406	0,33	0,366	0,30	0,288	0,23

Apêndice F – Tabela dos concentrados de hemácias CPDA1, no período IV do armazenamento (31º ao 35º dia).

Dados do CH						Harboe		5 CO		1ª Derivada	
	HbT (g/dL)	VG (%)	Tipo CH	Dia de armazen.	Aspecto visual	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)
1	20,9	66	CPDA1	35	3+	0,199	0,32	0,171	0,28	0,166	0,27
2	24,3	78	CPDA1	35	3+	0,175	0,16	0,158	0,14	0,121	0,11
3	24,2	87	CPDA1	35	3+	0,148	0,08	0,135	0,07	0,153	0,08
4	25,4	80	CPDA1	31	3+	0,451	0,36	0,407	0,32	0,332	0,26
5	25,4	82	CPDA1	35	4+	0,655	0,46	0,574	0,41	0,479	0,34
6	24,7	82	CPDA1	35	4+	0,502	0,37	0,448	0,33	0,359	0,26
7	23,6	76	CPDA1	35	4+	0,259	0,26	0,235	0,24	0,179	0,18
8	22,8	70	CPDA1	35	3+	0,265	0,35	0,234	0,31	0,153	0,20
9	23,2	72	CPDA1	35	5+	0,399	0,48	0,368	0,44	0,412	0,50
10	22,2	71	CPDA1	35	3+	0,188	0,25	0,169	0,22	0,165	0,22
11	21,8	69	CPDA1	35	4+	0,340	0,48	0,309	0,44	0,233	0,33
12	19,6	63	CPDA1	35	3+	0,179	0,34	0,160	0,30	0,140	0,26
13	21,6	70	CPDA1	35	2+	0,080	0,11	0,073	0,10	0,061	0,08
14	22,6	70	CPDA1	35	3+	0,246	0,33	0,220	0,29	0,179	0,24
15	21,6	66	CPDA1	35	4+	0,336	0,53	0,306	0,48	0,280	0,44
16	21,8	67	CPDA1	35	4+	0,301	0,46	0,270	0,41	0,224	0,34
17	22,0	66	CPDA1	35	4+	0,393	0,61	0,348	0,54	0,375	0,58

Apêndice G – Tabela dos concentrados de hemácias SAd, no período I do armazenamento (1º ao 10º dia).

Dados do CH						Harboe		5 CO		1ª Derivada	
	HbT (g/dL)	VG (%)	Tipo CH	Dia de armazen.	Aspecto visual	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)
1	18,0	56	SAd	10	2+	0,036	0,09	0,032	0,08	0,015	0,04
2	18,5	57	SAd	10	2+	0,024	0,06	0,022	0,05	0,019	0,04
3	16,5	51	SAd	04	1+	0,017	0,05	0,016	0,05	0,014	0,04
4	17,2	50	SAd	02	Límpido	0,016	0,05	0,014	0,04	0,019	0,06
5	20,6	59	SAd	02	2+	0,026	0,05	0,026	0,05	0,031	0,06
6	17,0	51	SAd	03	2+	0,038	0,11	0,037	0,11	0,031	0,09
7	17,7	52	SAd	03	3+	0,055	0,15	0,051	0,14	0,045	0,12
8	20,2	59	SAd	04	2+	0,028	0,06	0,026	0,05	0,025	0,05
9	16,7	50	SAd	01	2+	0,024	0,07	0,023	0,07	0,016	0,05
10	16,7	50	SAd	01	1+	0,028	0,08	0,026	0,08	0,026	0,08
11	18,7	57	SAd	06	1+	0,032	0,07	0,026	0,06	0,023	0,05
12	19,4	57	SAd	06	1+	0,045	0,10	0,041	0,09	0,035	0,08
13	19,6	55	SAd	06	1+	0,060	0,14	0,053	0,12	0,047	0,11
14	17,8	51	SAd	03	1+	0,030	0,08	0,027	0,07	0,025	0,07
15	19,2	53	SAd	03	1+	0,054	0,13	0,049	0,12	0,050	0,12
16	17,7	52	SAd	03	1+	0,044	0,12	0,040	0,11	0,036	0,10
17	19,6	53	SAd	03	1+	0,035	0,08	0,031	0,07	0,031	0,07
18	18,2	55	SAd	04	Límpido	0,023	0,06	0,022	0,05	0,020	0,05
19	17,0	52	SAd	04	1+	0,017	0,05	0,015	0,04	0,016	0,05
20	17,9	53	SAd	04	1+	0,015	0,04	0,014	0,04	0,012	0,03
21	19,0	60	SAd	10	2+	0,051	0,11	0,038	0,08	0,045	0,09
22	17,7	54	SAd	04	2+	0,090	0,23	0,087	0,23	0,062	0,16
23	19,8	60	SAd	06	1+	0,055	0,11	0,050	0,10	0,045	0,09
24	19,4	59	SAd	06	2+	0,113	0,24	0,101	0,21	0,089	0,19
25	18,5	56	SAd	05	3+	0,138	0,33	0,126	0,30	0,081	0,19
26	18,6	59	SAd	06	1+	0,056	0,12	0,050	0,11	0,041	0,09
27	18,0	56	SAd	07	1+	0,048	0,12	0,042	0,10	0,039	0,10
28	20,6	61	SAd	06	1+	0,074	0,14	0,066	0,13	0,055	0,10
29	20,7	61	SAd	05	1+	0,053	0,10	0,047	0,09	0,044	0,08
30	18,7	57	SAd	10	1+	0,054	0,12	0,048	0,11	0,060	0,14
21	16,9	53	SAd	09	1+	0,046	0,13	0,042	0,12	0,038	0,11
32	17,7	57	SAd	07	2+	0,088	0,21	0,078	0,19	0,067	0,16
33	18,6	55	SAd	06	1+	0,032	0,08	0,029	0,07	0,029	0,07
34	18,5	54	SAd	05	1+	0,036	0,09	0,033	0,08	0,031	0,08
35	19,2	59	SAd	08	1+	0,031	0,07	0,029	0,06	0,028	0,06
36	19,6	59	SAd	08	1+	0,030	0,06	0,027	0,06	0,026	0,05
37	17,7	54	SAd	09	1+	0,025	0,06	0,022	0,06	0,021	0,05
38	19,9	58	SAd	07	1+	0,041	0,09	0,037	0,08	0,033	0,07

Apêndice H – Tabela dos concentrados de hemácias SAd, no período II do armazenamento (11º ao 20º dia).

Dados do CH						Harboe		5 CO		1ª Derivada	
	HbT (g/dL)	VG (%)	Tipo CH	Dia de armazen.	Aspecto visual	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)
1	17,0	52	SAd	16	2+	0,019	0,05	0,020	0,06	0,023	0,06
2	18,7	56	SAd	16	Limpido	0,034	0,08	0,032	0,07	0,028	0,07
3	19,5	62	SAd	16	1+	0,092	0,18	0,082	0,16	0,064	0,12
4	18,1	52	SAd	20	1+	0,084	0,22	0,076	0,20	0,066	0,18
5	17,6	54	SAd	13	Limpido	0,027	0,07	0,026	0,07	0,023	0,06
6	20,0	62	SAd	18	1+	0,099	0,19	0,088	0,17	0,082	0,15
7	18,5	56	SAd	16	2+	0,033	0,08	0,032	0,08	0,030	0,07
8	17,4	54	SAd	11	2+	0,069	0,18	0,061	0,16	0,056	0,15
9	17,6	56	SAd	15	2+	0,044	0,11	0,043	0,11	0,035	0,09
10	19,3	59	SAd	12	2+	0,064	0,14	0,063	0,13	0,054	0,11
11	20,0	62	SAd	11	3+	0,125	0,24	0,113	0,21	0,094	0,18
12	18,8	61	SAd	14	3+	0,114	0,24	0,115	0,24	0,083	0,17
13	17,0	55	SAd	19	2+	0,055	0,15	0,049	0,13	0,045	0,12
14	18,9	59	SAd	19	2+	0,075	0,16	0,070	0,15	0,061	0,13
15	19,2	56	SAd	13	1+	0,181	0,42	0,148	0,34	0,163	0,37
16	19,8	63	SAd	19	2+	0,094	0,18	0,088	0,17	0,073	0,14
17	18,1	58	SAd	20	Limpido	0,041	0,10	0,038	0,09	0,033	0,08
18	18,4	59	SAd	19	2+	0,067	0,15	0,060	0,13	0,051	0,11
19	17,7	55	SAd	12	1+	0,029	0,07	0,026	0,07	0,022	0,06
20	19,3	60	SAd	11	1+	0,030	0,06	0,027	0,06	0,026	0,05
21	19,9	59	SAd	20	1+	0,056	0,12	0,050	0,10	0,049	0,10

Apêndice I – Tabela dos concentrados de hemácias SAd, no período III do armazenamento (21º ao 30º dia).

Dados do CH						Harboe		5 CO		1ª Derivada	
	HbT (g/dL)	VG (%)	Tipo CH	Dia de armazen.	Aspecto visual	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)
1	18,2	56	SAd	24	1+	0,055	0,13	0,050	0,12	0,046	0,11
2	17,8	57	SAd	23	Límpido	0,023	0,05	0,023	0,06	0,022	0,05
3	19,4	59	SAd	29	3+	0,263	0,55	0,238	0,50	0,182	0,38
4	18,2	59	SAd	22	2+	0,089	0,20	0,080	0,18	0,066	0,15
5	17,8	58	SAd	27	2+	0,092	0,22	0,084	0,20	0,062	0,15
6	18,9	59	SAd	30	3+	0,239	0,52	0,220	0,48	0,198	0,43
7	21,6	66	SAd	25	2+	0,160	0,25	0,147	0,23	0,104	0,16
8	18,1	60	SAd	26	1+	0,055	0,12	0,050	0,11	0,042	0,09
9	18,1	58	SAd	25	1+	0,064	0,15	0,052	0,12	0,044	0,10
10	18,9	61	SAd	30	3+	0,354	0,73	0,314	0,65	0,211	0,44
11	19,3	60	SAd	26	2+	0,070	0,15	0,062	0,13	0,053	0,11
12	19,8	62	SAd	25	1+	0,058	0,11	0,052	0,10	0,049	0,09
13	18,4	59	SAd	24	1+	0,054	0,12	0,048	0,11	0,043	0,10

Apêndice J – Tabela dos concentrados de hemácias SAd, no período IV do armazenamento (31° ao 42° dia).

Dados do CH						Harboe		5 CO		1ª Derivada	
	HbT (g/dL)	VG (%)	Tipo CH	Dia de armazen.	Aspecto visual	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)
1	19,4	63	SAd	42	4+	0,188	0,36	0,169	0,32	0,163	0,31
2	17,9	63	SAd	42	4+	0,112	0,23	0,101	0,21	0,077	0,16
3	18,1	57	SAd	37	2+	0,099	0,24	0,085	0,20	0,077	0,18
4	17,1	58	SAd	40	3+	0,232	0,57	0,210	0,52	0,166	0,41
5	18,7	57	SAd	35	1+	0,050	0,12	0,045	0,10	0,042	0,10
6	19,5	58	SAd	39	2+	0,079	0,17	0,073	0,16	0,062	0,13
7	16,5	52	SAd	37	1+	0,056	0,16	0,050	0,14	0,041	0,12
8	18,9	62	SAd	42	2+	0,145	0,29	0,129	0,26	0,101	0,20
9	19,1	63	SAd	42	3+	0,274	0,53	0,240	0,47	0,185	0,36
10	19,7	68	SAd	42	3+	0,190	0,31	0,169	0,27	0,144	0,23
11	18,2	61	SAd	42	2+	0,073	0,16	0,067	0,14	0,045	0,10
12	20,8	68	SAd	42	3+	0,196	0,30	0,172	0,26	0,153	0,24
13	19,1	61	SAd	42	2+	0,066	0,14	0,061	0,13	0,045	0,09
14	18,0	60	SAd	42	4+	0,306	0,68	0,259	0,58	0,220	0,49
15	18,7	62	SAd	42	3+	0,187	0,38	0,165	0,33	0,147	0,30
16	18,5	61	SAd	41	3+	0,168	0,36	0,153	0,32	0,125	0,26
17	18,8	65	SAd	39	3+	0,134	0,25	0,119	0,22	0,118	0,22
18	19,6	65	SAd	38	2+	0,105	0,19	0,093	0,17	0,071	0,13
19	18,6	60	SAd	42	1+	0,064	0,14	0,056	0,12	0,043	0,09
20	18,4	60	SAd	40	2+	0,126	0,27	0,113	0,25	0,109	0,24
21	18,5	61	SAd	40	3+	0,243	0,51	0,213	0,45	0,197	0,42
22	17,4	56	SAd	42	2+	0,076	0,19	0,068	0,17	0,053	0,13
23	18,1	59	SAd	42	4+	0,352	0,80	0,315	0,71	0,256	0,58
24	18,2	57	SAd	42	2+	0,056	0,13	0,047	0,11	0,042	0,10
25	18,5	60	SAd	42	3+	0,175	0,38	0,155	0,33	0,144	0,31
26	17,8	59	SAd	42	4+	0,278	0,64	0,248	0,57	0,214	0,49
27	19,0	62	SAd	42	2+	0,116	0,23	0,103	0,21	0,093	0,19
28	18,2	58	SAd	42	3+	0,225	0,52	0,199	0,46	0,166	0,38
29	16,3	58	SAd	42	4+	0,346	0,89	0,308	0,79	0,252	0,65
30	20,1	65	SAd	39	3+	0,129	0,22	0,113	0,20	0,099	0,17
31	18,7	60	SAd	42	2+	0,110	0,24	0,098	0,21	0,099	0,21
32	19,7	67	SAd	42	3+	0,331	0,55	0,293	0,49	0,230	0,39
33	17,5	57	SAd	41	2+	0,071	0,17	0,063	0,16	0,064	0,16
34	19,0	62	SAd	41	3+	0,113	0,23	0,100	0,20	0,083	0,17
35	16,6	53	SAd	40	3+	0,232	0,66	0,207	0,59	0,233	0,66
36	18,1	60	SAd	39	4+	0,327	0,72	0,289	0,64	0,313	0,69
37	18,2	60	SAd	39	2+	0,140	0,31	0,124	0,27	0,112	0,25
38	18,9	65	SAd	42	2+	0,211	0,39	0,187	0,35	0,169	0,31
39	18,4	61	SAd	42	2+	0,152	0,32	0,117	0,25	0,128	0,27
40	18,7	63	SAd	42	4+	0,278	0,55	0,246	0,49	0,236	0,47
41	19,1	63	SAd	41	2+	0,135	0,26	0,120	0,23	0,102	0,20
42	17,6	59	SAd	42	3+	0,152	0,35	0,121	0,28	0,121	0,28
43	17,8	60	SAd	42	3+	0,190	0,43	0,169	0,38	0,147	0,33
44	18,3	59	SAd	42	2+	0,108	0,24	0,096	0,22	0,083	0,19
45	16,4	58	SAd	42	4+	0,246	0,63	0,219	0,56	0,224	0,57
46	16,7	53	SAd	42	3+	0,247	0,70	0,221	0,62	0,230	0,65
47	18,3	61	SAd	42	2+	0,100	0,21	0,089	0,19	0,086	0,18

Continuação Apêndice J – Tabela dos concentrados de hemácias SAd, no período IV do armazenamento (31º ao 42º dia).

Dados do CH						Harboe		5 CO		1ª Derivada	
	HbT (g/dL)	VG (%)	Tipo CH	Dia de armazen.	Aspecto visual	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)
48	20,3	67	SAd	42	4+	0,310	0,50	0,276	0,45	0,239	0,39
49	17,9	60	SAd	42	2+	0,107	0,24	0,095	0,21	0,086	0,19
50	19,1	65	SAd	41	3+	0,214	0,39	0,191	0,35	0,188	0,34
51	19,5	63	SAd	41	3+	0,230	0,44	0,206	0,39	0,214	0,41
52	18,7	61	SAd	41	2+	0,129	0,27	0,114	0,24	0,093	0,19
53	18,5	56	SAd	41	1+	0,060	0,14	0,054	0,13	0,040	0,10
54	17,8	58	SAd	40	2+	0,096	0,23	0,086	0,20	0,083	0,20
55	18,6	62	SAd	39	2+	0,102	0,21	0,091	0,19	0,075	0,15
56	19,6	65	SAd	42	2+	0,123	0,22	0,109	0,20	0,102	0,18
57	19,1	65	SAd	42	2+	0,122	0,22	0,109	0,20	0,093	0,17

Apêndice K – Tabela de concentrados de hemácias SAd com plasma sobrenadante de aspecto visual lipêmico (n = 5)

Dados do CH						Harboe		5 CO		1ª Derivada	
	HbT (g/dL)	VG (%)	Tipo CH	Dia de armazen.	Aspecto visual	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)	HbL (g/dL)	Hemólise (%)
1	17,4	52	SAd	03	Lipemia 3+ Hemólise 1+	0,143	0,39	0,118	0,32	0,109	0,30
2	21,1	65	SAd	12	Lipemia 2+ Hemólise 1+	0,208	0,34	0,182	0,30	0,188	0,31
3	17,9	55	SAd	01	Lipemia 1+ Hemólise 1+	0,062	0,16	0,055	0,14	0,051	0,13
4	20,8	67	SAd	14	Lipemia 4+ Hemólise 4+	1,560	2,47	1,375	2,18	1,176	1,87
5	18,0	57	SAd	07	Lipemia 1+ Hemólise 1+	0,109	0,26	0,097	0,23	0,099	0,24

Apêndice L – Amostras controle - hemoglobina esperada e hemoglobina encontrada (n = 52)

Nº	Hemoglobina esperada (g/dL)	Hemoglobina encontrada (g/dL)	Nº	Hemoglobina esperada (g/dL)	Hemoglobina encontrada (g/dL)
1	6,80	7,16	27	18,50	17,48
2	6,80	6,44	28	18,50	18,23
3	8,00	8,03	29	18,50	17,31
4	8,00	8,08	30	18,50	18,38
5	14,40	14,22	31	18,50	17,31
6	14,40	14,41	32	26,04	27,50
7	13,20	11,98	33	26,04	27,27
8	13,20	11,90	34	26,04	25,83
9	13,20	12,67	35	26,23	29,41
10	18,40	20,90	36	26,23	29,28
11	18,40	20,57	37	26,23	27,14
12	18,40	18,26	38	26,07	28,94
13	18,50	17,20	39	26,07	29,61
14	18,50	17,51	40	26,07	27,34
15	18,50	18,48	41	25,96	28,28
16	18,50	17,22	42	25,96	29,69
17	18,50	17,77	43	25,96	26,23
18	18,50	18,06	44	26,02	28,43
19	18,50	16,99	45	26,02	28,83
20	18,50	16,65	46	26,02	26,71
21	18,50	19,36	47	18,20	18,15
22	18,50	17,88	48	21,50	17,31
23	18,50	17,74	49	22,50	22,31
24	18,50	17,57	50	18,90	22,05
25	18,50	18,07	51	11,80	10,25
26	18,50	17,84	52	15,30	14,91

Apêndice M – Alterações bioquímicas durante o armazenamento de Concentrados de Hemácias (CH) e Sangue Total (ST) no início e no final do armazenamento, em soluções preservantes CPD, CPDA-1, AS-1, AS-3 e AS-5 (adaptado de AABB, 2011).

Nota: CPD = citrato-fosfato-dextrose, CPDA-1 = citrato-fosfato-dextrose-adenina, AS-1 = solução aditiva Adsol, AS-3 = solução aditiva Nutricel, AS-5 = solução aditiva Optisol, N/A = não analisado.

Variável	CPD			CPDA-1		AS-1		AS-3	AS-5
	ST	ST	ST	CH	ST	CH	CH	CH	CH
Dia de estocagem	0	21	0	0	35	35	42	42	42
% Células viáveis (24 horas após transfusão)	100	80	100	100	79	71	76	84	80
pH (medido a 37°C)	7,20	6,84	7,60	7,55	6,98	6,71	6,60	6,50	6,50
ATP (% do valor inicial)	100,00	86,00	100,00	100,00	56 (±16)	45(±12)	60,00	59,00	68,50
2,3-DPG (% do valor inicial)	100,00	44,00	100,00	100,00	< 10,00	< 10,00	< 5,00	< 10,00	< 5,00
Potássio plasmático (mmol/L)	3,90	21,00	4,20	5,10	27,30	78,50	50,00	46,00	45,60
Hemoglobina livre (mg/dL)	17,00	191,00	82,00	78,00	461,00	658,00	N/A	386,00	N/A
% de hemólise	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0,50	0,90	0,60

Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Estado da Saúde do Paraná – Hospital do Trabalhador (página1/3)

HOSPITAL DO TRABALHADOR/SES/PR
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP
<p>DADOS DO PROJETO DE PESQUISA</p> <p>Título da Pesquisa: DETERMINAÇÃO DA HEMOGLOBINA PLASMÁTICA PELA ESPECTROFOTOMETRIA DIRETA: METODOLOGIA DE HARBOE - UMA PROPOSTA DE PADRONIZAÇÃO.</p> <p>Pesquisador: KATIA TEIXEIRA DE MEIROZ GRILLO</p> <p>Área Temática:</p> <p>Versão: 1</p> <p>CAAE: 42609215.1.0000.5225</p> <p>Instituição Proponente: SECRETARIA DE ESTADO DA SAUDE</p> <p>Patrocinador Principal: Financiamento Próprio</p> <p>DADOS DO PARECER</p> <p>Número do Parecer: 999.816</p> <p>Data da Relatoria: 09/03/2015</p> <p>Apresentação do Projeto:</p> <p>A indicação básica para transfusão de hemácias visa manter ou restabelecer a capacidade de transporte de oxigênio aos tecidos. A determinação da hemoglobina plasmática (HbP) nos concentrados de hemácias primários ou modificados se constitui em um dos parâmetros do controle de qualidade obrigatórios para avaliar o grau de hemólise ao longo do tempo de armazenamento dos hemocomponentes com hemácias. Não existe um método totalmente aceito e padronizado para a determinação da concentração da hemoglobina plasmática e da hemólise. No Brasil a maioria dos serviços de hemoterapia e hemocentros adota a metodologia espectrofotométrica descrita em manuais de procedimentos para o controle de qualidade de hemocomponentes que, entretanto, não citam fonte bibliográfica do método. A transfusão de hemocomponentes eritrocitários com elevado teor de hemólise e hemoglobina livre apresenta efeitos adversos em relação ao sistema renal (nefrotoxicidade) e cardiovascular (efeito vasomotor). A avaliação visual da hemólise por meio da coloração do plasma sobrenadante dos concentrados de hemácias é imprecisa e normalmente tende a</p>
<p>Endereço: Avenida República Argentina nº 4406 Bairro: Novo Mundo CEP: 81.050-000 UF: PR Município: CURITIBA Telefone: (41)3212-5871 Fax: (41)3212-5828 E-mail: cepht@sesa.pr.gov.br</p>

Página 01 de 03

Anexo 2 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Estado da Saúde do Paraná – Hospital do Trabalhador (página2/3)

HOSPITAL DO TRABALHADOR/SES/PR
<p><small>Continuação do Parecer: 999.816</small></p> <p>superestimar o percentual de hemólise, com descarte desnecessário de bolsas de sangue. O objetivo do presente estudo é propor uma metodologia espectrofotométrica para a dosagem da hemoglobina plasmática que se constitua numa opção de teste padronizado, com embasamento científico, de simples execução e de baixo custo, além de produzir resultados fidedignos e reprodutíveis.</p> <p>Objetivo da Pesquisa:</p> <p>Propor uma metodologia espectrofotométrica para a dosagem da hemoglobina plasmática que se constitua numa opção de teste padronizado, embasado cientificamente, de simples execução e de baixo custo, além de produzir resultados fidedignos e reprodutíveis.</p> <p>Avaliação dos Riscos e Benefícios:</p> <p>Riscos:</p> <p>Não há riscos.</p> <p>Benefícios:</p> <p>Possibilitar um teste alternativo para a determinação da hemoglobina plasmática em concentrados de hemácias, testados no controle de qualidade de hemocomponentes, dos Serviços de Hemoterapia/Bancos de Sangue.</p> <p>Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:</p> <p>Estudo de boa qualidade, se a hipótese for verificada, trará um bom método de avaliação da qualidade do sangue transfundido.</p> <p>Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:</p> <p>todos preenchidos</p> <p>Recomendações:</p> <p>-</p> <p>Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:</p> <p>parecer positivo</p> <p>Situação do Parecer:</p> <p>Aprovado</p> <p>Necessita Apreciação da CONEP:</p> <p>Não</p>
<p>Endereço: Avenida República Argentina nº 4406 Bairro: Novo Mundo CEP: 81.050-000 UF: PR Município: CURITIBA Telefone: (41)3212-5871 Fax: (41)3212-5828 E-mail: cepht@sesa.pr.gov.br</p>

Página 02 de 03

Anexo 3 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Estado da Saúde do Paraná – Hospital do Trabalhador (página 3/3)

<p align="center">HOSPITAL DO TRABALHADOR/SES/PR</p> <p align="center"> </p> <p><small>Continuação do Parecer: 999.816</small></p> <p>Considerações Finais a critério do CEP:</p> <p align="center">CURITIBA, 26 de Março de 2015</p> <hr/> <p align="center">Assinado por: silvania klug pimentel (Coordenador)</p>
<p><small>Endereço: Avenida República Argentina nº 4406 Bairro: Novo Mundo CEP: 81.050-000 UF: PR Município: CURITIBA Telefone: (41)3212-5871 Fax: (41)3212-5828 E-mail: cepht@sesa.pr.gov.br</small></p>

Anexo 4 – Declaração de anuência da Instituição Proponente (Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná – HEMEPAR)

<p align="center"> PARANÁ GOVERNO DO ESTADO Secretaria da Saúde</p> <p align="center">DECLARAÇÃO DE ANUÊNCIA</p> <p>Declaramos termos ciência e concordamos com o desenvolvimento do projeto de pesquisa intitulado "Determinação da hemoglobina plasmática pela espectrofotometria direta: Metodologia de Harboe - Uma proposta de padronização", sob a responsabilidade da pesquisadora Katia Teixeira de Meiroz Grilo, nas dependências da Divisão de Produção (DVPRO), neste Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná – HEMEPAR.</p> <p>Autorizamos a sua execução, após o cumprimento de todas as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa para o desenvolvimento de pesquisa envolvendo seres humanos nas Unidades da Secretaria Estadual da Saúde (SESA/PR).</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;"> Anália M. Breckenfeld Machado Chefe Divisão de Produção DVPRO - HEMEPAR </div> <div style="text-align: center;"> Paulo Roberto Hirschbach Diretor da Hemorrede HEMEPAR </div> </div> <p align="center">Curitiba, 20 de fevereiro de 2015.</p> <p align="right"> <small>Superintendência de Gestão de Sistemas de Saúde - SGS Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná - HEMEPAR Travessa João Prodócimo, 145 - Alto da XV - Curitiba - PR - CEP: 80.945-143 Fone: (041) 3281-4080 - Fax: (041) 3344-7020</small> </p>
--

Anexo 5– Autorização de afastamento para a realização do Curso de Pós-graduação (Mestrado Profissional em Hemoterapia)

PARANÁ
GOVERNO DO ESTADO
Gabinete do Governador

DESPACHO DO GOVERNADOR

Protocolo nº 13.045.955-2

1. À vista dos elementos de instrução do protocolado e dada, ainda, a relevância da ação administrativa apresentada neste protocolado, **AUTORIZAMOS**, com fulcro no art. 4º do Decreto n.º 444/1995, aliados à Informação nº 263/2014, do NJA/SEAP, o afastamento da servidora Kátia Teixeira de Meiroz Grilo, portadora da Carteira de Identidade nº 2.097.057-0 – SIESP/PR, detentora do cargo de Agente Profissional, função farmacêutico, para realizar o Curso de Pós-Graduação, Mestrado Profissional em Hemoterapia, promovido pela Coordenação Geral do Sangue e Hemoderivados do Ministério da Saúde, em Ribeirão Preto – SP, no período de 09 a 14 de fevereiro de 2014; 09 a 14 de março; 06 a 11 de abril; 11 a 16 de maio; 01 a 06 de junho; 20 a 25 de julho; 10 a 15 de agosto; 07 a 12 de setembro; 05 a 10 de outubro; 09 a 14 de novembro e 07 a 12 de dezembro de 2014, com ônus para o Estado, arcando, ainda, a Secretaria de Estado da Saúde, se disponíveis recursos orçamentários para a despesa, com os valores das passagens aéreas, ante o interesse da Secretaria de Estado da Saúde na qualificação profissional de sua servidora.

2. Para o consentimento acima foram examinados apenas os aspectos da conveniência e da oportunidade. O exame da viabilidade técnica, financeira, orçamentária, fiscal e jurídica, é de responsabilidade do titular do órgão/entidade solicitante.

3. Publique-se e encaminhe-se à origem para as providências legais.

CURITIBA, 19, 05, 2014.

CARLOS ALBERTO RICHÁ
 GOVERNADOR DO ESTADO

Anexo 6– Declaração de anuência da Instituição Coparticipante (Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto)

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

Prezado Coordenador

DECLARAÇÃO DE ANUÊNCIA DE INSTITUIÇÃO COPARTICIPANTE.

Declaramos que nós, da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, estamos de acordo com a condução de parte do projeto de pesquisa "Determinação da Hemoglobina Plasmática pela Espectrofotometria Direta: Metodologia de Harboe- Uma Proposta de Padronização", sob a responsabilidade de Katia Teixeira de Meiroz Grilo, nas dependências do Laboratório de Controle de Qualidade de Hemocomponentes, tão logo o projeto seja aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição Proponente.

Declaramos, ainda, conhecermos e cumprimos as Resoluções Éticas Brasileiras, e em especial a Resolução do Conselho Nacional de Saúde CNS 466/2012, estando cientes de nossas corresponsabilidades como instituição coparticipante do projeto de pesquisa em tela, assim como do compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos de pesquisa nela recrutados, dispondo de infraestrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem estar.

Ribeirão Preto, 10 de fevereiro de 2015.

 Maria Angela Pignata Ottoboni
 Responsável pelo Controle de
 Qualidade de Hemocomponentes

 Dimas Tadeu Covas
 Diretor Presidente Fundação
 hemocentro de Ribeirão Preto

Anexo 7– Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP (página 1/2)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA USP -
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	
Elaborado pela Instituição Coparticipante	
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA	
Título da Pesquisa: DETERMINAÇÃO DA HEMOGLOBINA PLASMÁTICA PELA ESPECTROFOTOMETRIA DIRETA: METODOLOGIA DE HARBOE - UMA PROPOSTA DE PADRONIZAÇÃO.	
Pesquisador: KATIA TEIXEIRA DE MEIROZ GRILLO	
Área Temática:	
Versão: 1	
CAAE: 42609215.1.3001.5440	
Instituição Proponente: SECRETARIA DE ESTADO DA SAUDE	
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio	
DADOS DO PARECER	
Número do Parecer: 1.011.317	
Data da Relatoria: 27/03/2015	
Apresentação do Projeto:	
De acordo com o parecer da Instituição Proponente.	
Objetivo da Pesquisa:	
De acordo com o parecer da Instituição Proponente.	
Avaliação dos Riscos e Benefícios:	
De acordo com o parecer da Instituição Proponente.	
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:	
De acordo com o parecer da Instituição Proponente.	
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:	
Apresentou carta de anuência do responsável pelo local de coleta no HCFMRP-USP (Hemocentro).	
Recomendações:	
Não há.	
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:	
O CEP tomou ciência e concorda com o parecer da Instituição Proponente.	
Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900 UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO Telefone: (16)3632-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br	

Página 01 de 02

Anexo 8– Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP (página 2/2)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA USP -
<small>Continuação do Parecer: 1.011.317</small>	
Situação do Parecer:	
Aprovado	
Necessita Aprovação da CONEP:	
Não	
Considerações Finais a critério do CEP:	
"O CEP do HC e da FMRP-USP concorda com o parecer ético emitido pelo CEP da Instituição Proponente, que cumpre as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS 466/12. Diante disso, o HCFMRP-USP, como Instituição co-participante do referido projeto de pesquisa, está ciente de suas responsabilidades e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos desta pesquisa, dispondo de infra-estrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem-estar".	
RIBEIRÃO PRETO, 05 de Abril de 2015	
Assinado por: MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA (Coordenador)	
Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900 UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO Telefone: (16)3632-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br	

Página 02 de 02