ELIANE MARGARETH PIMENTA CARNEIRO

**Produção de materiais de referência candidatos à certificação em
bioquímica laboratorial: soro equino para controle de qualidade nos
laboratórios de saúde pública**

Versão Corrigida

(Versão original encontra-se disponível na Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo-FMUSP)

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Luis Fernandez Lopez

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Carneiro, Eliane Margareth Pimenta

Produção de materiais de referência candidatos à
certificação em bioquímica laboratorial : soro equino
para controle de qualidade nos laboratórios de saúde
pública / Eliane Margareth Pimenta Carneiro. -- São
Paulo, 2017.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientador: Luis Fernandez Lopez.

Descritores: 1.Biomarcadores 2.Material de
referência 3.Controle de qualidade 4.Homogeneidade
5.Estabilidade 6.Saúde pública

USP/FM/DBD-440/17

Carneiro EMP. Produção de materiais de referência candidatos à certificação em bioquímica laboratorial: soro equino para controle de qualidade nos laboratórios de saúde pública [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.	_____
Instituição	_____
Julgamento	_____

Prof. Dr.	_____
Instituição	_____
Julgamento	_____

Prof. Dr.	_____
Instituição	_____
Julgamento	_____

Dedico esta conquista à minha mãe Araides, ao meu pai José (*in memorian*)

Aprendi com vocês, o que sei sobre a vida.
Tudo ao seu tempo, sempre me ensinaram, mas eu tinha pressa!
Cada escolha que fiz, foi na firme base de seus ensinamentos: nunca minta, faça as opções certas, assumo seus erros e aprenda com eles, agradeça e recomece, trabalhe sempre, ajude quando for possível.

Obrigada pelos sacros ensinamentos, procuro honrá-los sempre.

Aos meus irmãos

Paulo pela parceria nas “artes”, que deixavam nossos pais de cabelos em pé, brincadeiras de boca de forno, cinema, matinê, carrinhos de rolimã, férias na fazenda, baillinhos de carnaval, e o nosso pé de cajá, lembra? O maior do mundo!

Marco (*in memorian*) companheiro de infância e traquinagens.
Adolescentes, varávamos noites ouvindo estrelas, cantos de corujas e grilos.
Adultos, nossas conversas corriam noite adentro, que saudade!
A esse tempo não sabia que pessoas viram estrelas, agora sei...

Rosana, os pilares da casa foram herdados por você, forte, íntegra, e de coração compassivo, seus 36 filhos gatos e quatro filhos cães são retratos fiéis da sua nobreza.

Obrigada por vocês serem parte das minhas sagradas memórias de infância.

Às minhas filhas

Moira, qual delas escolherá ser?
Não se esqueça da sua missão, trabalhe pela paz sempre.
Honra toda a humanidade, tem marcado na alma a sua missão,
ao tempo certo faça. Avante!

Licia, ainda na infância espiritual, plante a serenidade por onde passar e siga adiante.
Cada vez que sonhamos abrimos as portas do infinito, não tenha medo de ser feliz!

Ao Ronaldo (*in memorian*)

Nossas filhas são o nosso relicário.

Obrigada por serem os pilares da minha história.

À minha neta

Lívia, quando estava tudo incerto e triste, veio você.
Nasceu em meus braços, seu primeiro olhar foi meu!
Virou minha vida e casa do avesso, e trouxe luz para os meus dias.
Meu pequeno querubim!

À minha sogra Josette, mãe substituta e rocha de todos nós!

Obrigada Criador, porque tudo é Luz e Divindade!

AGRADECIMENTOS

À todos que me acompanharam o tempo necessário para que essa dissertação fosse desenvolvida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luis Fernandez Lopez, que se dispôs a dividir seu precioso tempo e me conduzir nessa empreitada, um agradecimento especial.

À Jerenice Esdras Ferreira, pelas longas trocas de idéias, debates, aprendizado e a parceria constante nesses tantos anos de convivência.

Ao Dr. Paulo Cesar Costa dos Santos, pela paciência e apoio ao longo desse projeto.

Ao Igor Tolgyesi e Gisele Souza, pela disposição de ajudar sempre.

À Dra. *Elia* Tamaso Espin G. Caldini obrigada por tornar suas as minhas dificuldades.

Ao Instituto Adolfo Lutz, pela oportunidade de realização do mestrado.

Ao REDESANG – Rede de serviços tecnológicos para sangue e hemoderivados por financiar parte do projeto.

Ao SIBRATEC - Sistema Brasileiro de Tecnologia por financiar parte do projeto.

Ao Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC) por financiar parte do projeto.

Aos equinos, minha gratidão e dívida, sem os quais esse trabalho não teria sido possível.

“Nenhum homem é uma ilha; cada homem é uma partícula do continente, uma parte da terra; se um torrão é arrastado para o mar, a Europa fica diminuída, como se fosse um promontório, como se fosse o solar de teus amigos ou o teu próprio; a morte de qualquer homem me diminui, porque sou parte do gênero humano. E por isso não perguntes por quem os sinos dobram; eles dobram por ti” (Donne, 1624, p. 31)

RESUMO

Carneiro EMP. *Produção de materiais de referência candidatos à certificação em bioquímica laboratorial: soro equino para controle de qualidade nos laboratórios de saúde pública* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

A participação de laboratórios nacionais em ensaios de proficiência internacionais expõe a fragilidade técnica na produção de Materiais de Referência (MR) no Brasil, devido à insuficiência desse tipo de material, tanto para ensaio de proficiência quanto para a rotina laboratorial. A capacitação de um Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN) como produtor de MR, em bioquímica laboratorial, permitirá a disponibilização para toda rede de laboratórios públicos do estado de São Paulo, contribuindo na melhoria da qualidade das análises laboratoriais em bioquímica. A Secretaria de Estado da Saúde (SES) poderá padronizar a qualidade desses exames em toda rede pública estadual, detendo a tecnologia necessária para o controle de qualidade. O objetivo desse estudo foi mostrar a viabilidade de produção de MR candidatos à certificação para os perfis: lipídico, renal, hepático, glicêmico, cardíaco e ósseo e a utilização como controle de qualidade em laboratórios clínicos de bioquímica. A produção foi feita a partir de soro de origem animal, estabilizado e liofilizado, com caráter específico para dosagens bioquímicas, seja em metodologia manual, semi-automatizada ou automatizada. Para a análise quantitativa dos dados foi utilizado o aplicativo Action Act versão 8.2.1. O modelo possibilitará o uso para desenvolvimento de outros programas de ensaio de proficiência. A implementação resultará em um ganho de qualidade a baixo custo e incentivo para a implantação de sistemas de qualidade que garantam a confiabilidade dos exames laboratoriais da rede de laboratórios públicos estadual.

Descritores: biomarcadores; material de referência; controle de qualidade; homogeneidade; estabilidade; saúde pública.

ABSTRACT

Carneiro EMP. *Production of reference materials candidates for certification in laboratory biochemistry: equine serum for quality control in public health laboratories* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

The participation of national laboratories in International Proficiency Testing demonstrates the technical weakness in the production of Reference Materials (RM) in Brazil, due to the failure of this type of material for use both as proficiency testing for the routine laboratory. It is vital to encourage training providers to produce reference materials control serum, high quality and low cost in clinical biochemistry and encourage the implementation of quality systems to ensure the reliability of clinical laboratory. Accreditation biochemical testing and qualification of a Central Public Health Laboratory (LACEN) as a producer of Reference Materials for proficiency testing in clinical biochemistry allow it to be available for the entire network of public laboratories in the State of São Paulo, contributing to improving the quality of laboratory analyzes biochemical processes for measurands and accredited. The State may standardize the quality of clinical examinations in all public schools, holding the technology needed to quality control. The aim of this study is to show the viability of producing candidates for certification for the profiles: renal, hepatic, lipid, glucose, cardiac and bone and the use in biochemistry laboratories. The reference material in biochemistry will be produced from biological material of animal origin, stabilized and lyophilized serum with specific character to be used in biochemical, whether in methodology manual, semi-automated or automated. For the quantitative analysis of the data the Action Act version 8.2.1 application was used. The implementation will result in a gain of quality at low cost and incentive for the implementation of quality systems to ensure the reliability of laboratory tests of state public health laboratories network.

Descriptors: biomarkers; reference material; quality control; homogeneity; stability; public health.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	OBJETIVO GERAL	19
2.1	Objetivos Específicos.....	19
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1	Escolha do Material.....	21
3.2	Marcadores Bioquímicos.....	24
3.3	Estabilidade e Homogeneidade	24
3.4	Estudo da Estabilidade.....	28
3.5	Estabilidade em Longo Prazo.....	30
3.6	Armazenamento e Medição.....	31
3.7	Testes Estatísticos.....	31
4	RESULTADOS	33
5	DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	77
	REFERÊNCIAS.....	85
	ANEXOS	89

1 INTRODUÇÃO

Os Laboratórios Centrais de Saúde Pública do Brasil (LACENs) têm como missão estratégica a realização de diagnósticos laboratoriais para os Centros de Vigilância Sanitária e Epidemiológica o que têm exigido, cada vez mais, respostas rápidas e maior eficiência no controle de qualidade. Dados laboratoriais são de extrema relevância para nortear ações em políticas públicas de saúde e devem ser utilizados para o desenvolvimento de tecnologias confiáveis, que se espelhem na veracidade dos resultados das análises laboratoriais, e como uma das ferramentas de apoio para a correta conduta clínica. Assim sendo é de grande importância incentivar a implantação de sistemas de qualidade para garantir a confiabilidade dos exames laboratoriais e buscar a autonomia na produção dessas tecnologias.

A participação de laboratórios nacionais em ensaios de proficiência internacionais expõe a fragilidade técnica do país na produção de materiais de referência e facilita, para os provedores do exterior, a divulgação dos resultados obtidos pelos laboratórios nacionais. Dessa forma, é de fundamental importância o incentivo à capacitação de provedores de ensaios de proficiência nacionais, na produção de materiais de referência (MR) com qualidade elevada e de baixo custo. Tal prática poderá contribuir na padronização dos laboratórios brasileiros, públicos e privados, na avaliação da qualidade técnica, aprimorando sua capacidade analítica (Rosas, 2009a).

Mesmo com o aumento da demanda para participar em ensaios de proficiência (EP) a disponibilidade destes ainda é escassa no Brasil. A maioria das ofertas é feita por provedores internacionais, com elevado custo para os participantes e, ainda, com agravantes como as exigências burocráticas feitas pelos países exportadores na liberação das amostras, principalmente as que apresentam conteúdo biológico e a burocracia para a liberação desses insumos na alfândega do Brasil, incorrendo algumas vezes na perda de prazo de validade, e a entrada, dos mesmos, nos laboratórios de análises fora das especificações de temperatura, o que inviabiliza o seu uso (INCQS, 2008).

É função do Estado a proteção da população, por meio de políticas públicas de saúde, e as práticas de vigilância sanitária têm adquirido uma crescente relevância na sua área de atuação (Silveira, 2006a). O atual modelo de vigilância sanitária brasileiro é regido pela Lei 8.080 (Brasil, 1990). Silveira (2006b p.35) escreve:

Para o cumprimento de suas ações, o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) utiliza diferentes práticas e instrumentos de intervenção que é integrado pelos seguintes órgãos: a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que coordena o Sistema; o Conselho Nacional de Secretários Estaduais de Saúde (CONASS); o Conselho Nacional de Secretarias Municipais de Saúde (CONASEMS); os Conselhos Estaduais, Distrital e Municipais de Saúde, os Centros de Vigilância Sanitária Estaduais, Municipais e do Distrito Federal (VISAS); os Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACENS) e o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

Figura 1: Hierarquia do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária no Brasil.

Segundo Lucchese (2001, p.320), para a avaliação analítica de produtos, a vigilância sanitária conta com o suporte técnico dos LACENs, distribuídos em todos os estados do território nacional e do INCQS ao nível federal. Esses laboratórios compõem a Rede Nacional de Laboratórios Oficiais de Controle de Qualidade ligados ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária e realizam entre outras atividades, análises laboratoriais em produtos sob apreensão fiscal, verificando o cumprimento das leis e auxiliando os laboratórios oficiais de controle de qualidade no desempenho do seu papel frente à Vigilância Sanitária e tem como principal desafio à atualização de novas tecnologias de produção.

O presente trabalho se propôs a produzir materiais de referência para controle de qualidade laboratorial e torná-los candidatos à certificação para os perfis lipídico, renal, hepático, glicêmico, cardíaco e ósseo e analisar a viabilidade de distribuição para a rede pública de laboratórios. Para produção foi utilizada matriz de soro equino fortificado, provenientes do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo.

O soro equino foi escolhido por ser um soro com os intervalos de medição próximos aos valores do soro humano e por mimetizar as propriedades dos perfis pesquisados. O volume necessário para produção de amostras também inviabilizaria o uso de soro humano, além disso, as bolsas de sangue devem ter um grande volume de glicose para conservação, o que provoca alteração no perfil glicêmico, comprometendo a linearidade da metodologia. Para bolsas de sangue humano, também, seria necessário transformar plasma em soro, por meio de trombinização, método que causa menos interferências nas reações bioquímicas.

Como resultado do desenvolvimento da tecnologia para materiais de referência (MR) a SES poderá garantir a autonomia de produção e utilizá-los para o monitoramento do controle de qualidade interno e externo dos ensaios bioquímicos na rede pública estadual e municipal, garantindo ganhos efetivos no controle de qualidade que refletirão na melhoria da confiabilidade dos

resultados laboratoriais e em ações coadjuvantes na prevenção, diagnóstico e controle de doenças.

1.1 Importância da Implantação de Sistemas da Qualidade em Laboratórios Analíticos

Nos laboratórios analíticos, que têm como objetivo o controle da qualidade de produtos e serviços destinados ao consumo humano a obtenção de resultados precisos e confiáveis são essenciais para a credibilidade e para a garantia da qualidade das suas funções. A utilização de sistemas da qualidade em laboratórios de ensaio promove melhorias no planejamento, na organização, no registro dos dados e na documentação dos procedimentos empregados, desde a entrada no laboratório até a liberação dos resultados (Cardoso, 2008; Hayes, 1996; Roberts, 1999).

Para Petersen et al. (1996), os fatores envolvidos na qualidade analítica relacionam-se com a definição de qualidade, criação de qualidade e controle de qualidade, e erros de fontes externas e internas, bem como de fatores permanentes e variáveis. Thienpont, Van Uytendaele e De Leenheer (2002) relatam possíveis perspectivas para o desenvolvimento de um sistema de medição de referência baseado em sistema internacional, que resolveria alguns problemas como mensurandos com identidade desconhecida ou que não possui um reconhecimento inequívoco, conversão de substratos enzimáticos. Ressaltam que para que essa padronização seja implementada globalmente e seja bem sucedida é necessário o consenso de todos os principais atores desse cenário.

Segundo Infusino et al. (2010) o objetivo da padronização para a medição da concentração é a obtenção de resultados comparáveis em amostras humanas, independentemente dos kits de reagentes, instrumentos e do laboratório onde se realiza o ensaio e contemplou no sistema requisitos como métodos de referência, bem descritos e avaliados extensivamente,

materiais de referência adequados e laboratórios de referência. Se esses sistemas são usados adequadamente é possível atribuir valores rastreáveis aos calibradores comerciais.

Os laboratórios clínicos que usam calibradores validados podem, a partir desse sistema, obter valores rastreáveis para procedimentos de referência, este último constitui a estrutura da cadeia de rastreabilidade, e os métodos de rotina podem ser ligados por meios de um processo de calibração apropriado. O reconhecimento formal da competência técnica de um laboratório de ensaio, ao utilizar sistemas da qualidade, pode ser obtido por meio da acreditação por um órgão competente para esta função (Rosas, 2009b).

Atualmente a norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 é o sistema de qualidade mais reconhecido e utilizado em laboratórios de ensaios analítico. Essa norma dispõe os requisitos que os laboratórios de ensaio e de calibração devem atender para demonstrar sua competência técnica e capacidade de produzir resultados tecnicamente precisos, confiáveis e rastreáveis.

Dentre os requisitos apontados para o controle da qualidade dos resultados das análises estão: o uso de métodos validados, a utilização de MR, para o controle laboratorial interno e participações periódicas do laboratório em programas de ensaios de proficiência (PEP) e/ou em comparações interlaboratoriais. A norma ABNT NBR NM ISO 15189 cobre os elementos essenciais para os laboratórios clínicos demonstrarem a qualidade e competência de seus serviços, transmitirem com confiabilidade os resultados de ensaios tecnicamente válidos assim como são conhecidos na norma.

Berlitz (2010) faz alguns questionamentos relacionados ao nível da qualidade dos serviços de saúde e propõem alternativas para avaliação efetiva do desempenho do método e da estabilidade de desempenho ao longo do tempo, segundo o autor “várias hipóteses têm sido formuladas para explicar essa questão. Algumas dizem respeito às ferramentas e metodologias utilizadas nas iniciativas de melhoria dos processos da área médica”.

Os autores Leguizamón, González e Bernal (2014), escrevem que os resultados gerados pelos laboratórios de análises clínicas são elementos chaves para o diagnóstico e tratamento das doenças, e também para o seguimento dos pacientes, sendo necessário um controle metrológico sobre todo o processo de medição, que é o mecanismo de aferição da comparação e confiança dos resultados. Gonzaga e Dias (2015) fizeram estudos para estabilidade de materiais de uso primário, para diferentes níveis de pH e demonstraram que os materiais de referência das soluções tampão ácidas e neutras podem ser facilmente fornecidos, apresentam pequenos valores de incerteza e vidas de prateleiras longas, enquanto as soluções tampão alcalino devem ter vidas de prateleiras mais limitadas e maiores valores de incerteza.

Para os autores Pessoa e Ferreira Jr. (2016), a produção dos kits diagnósticos não é de domínio da comunidade laboratorial, havendo pouca discussão sobre validações de métodos e produção de resultados exatos e comparáveis, e todos são produtos nacionais, de pouco uso para controle, já que existem fabricantes que não atestam a qualidade do produto por desconhecer de maneira mais aprofundada os mecanismos de rastreabilidade. No entanto, estudos de Castejon et al. (2014), atestam a existência de estudos mais aprofundados, em homogeneidade e estabilidade, quando se trata de controle de doenças com notificação compulsória e que requerem longo seguimento.

1.2 Materiais de Referência

A NBR ISO/GUIA 30 (2016, p.1), em seu item 2.1.1, define material de referência (MR), como:

“Material suficientemente homogêneo e estável com respeito a uma ou mais propriedades especificadas, que foi estabelecido como sendo adequado para o seu uso pretendido em um processo de medição e o uso pode incluir a calibração de um sistema de medição, a atribuição de valores a outros materiais e o controle de qualidade”.

A mesma norma define ainda, no mesmo item, também material de referência certificado (MRC) como:

“Material de referência (MR) caracterizado por um procedimento metrologicamente válido para uma ou mais propriedades especificadas, acompanhada de um certificado que fornece o valor de propriedade de uma incerteza associada e uma declaração de rastreabilidade metrológica.”

Destaca a importância crescente destes materiais em atividades nacionais e internacionais de normalização, em ensaios de proficiência e no credenciamento de laboratórios.

Nos testes quantitativos é avaliado o desempenho do laboratório na obtenção de resultados numéricos próximos a um valor esperado, assim como a concordância de resultados ao analisar a mesma matriz de ensaio por duas vezes consecutivas (Augustin; Carlier, 2006). Thompson, Ellison e Wood (2006) citam que os materiais de referência, disponibilizados para ensaios de proficiência, devem apresentar similaridade aos materiais biológicos analisados na rotina do laboratório e devem ser avaliados sem ter um tratamento diferenciado. Portanto, os materiais de referência mais apropriados para laboratórios de análises clínicas são os que apresentam fluídos biológicos (sangue, soro, urina, dentre outros) como matriz ou outro fluído que os mimetizam. A utilização desses materiais durante um ensaio propicia uma avaliação da totalidade dos procedimentos técnicos empregados na análise de um parâmetro químico.

O material de referência, certificado ou não, desempenha um papel fundamental, pois tem como objetivo tornar verdadeiro o sistema de referência quando comparados aos das medições de rotina. Os materiais, operativamente usados como calibradores ou como controles, pertencem a várias categorias podendo ser primário, secundário, referência, e assim por diante, principalmente com base na sua composição ou matriz e da confiabilidade do valor de quantidade que lhes foi atribuído (Franzini; Ceriotti, 1998).

As amostras biológicas, muitas vezes usam soro ou sangue como material, tornando-se a matriz de referência ao qual é atribuído o valor preciso para exames bioquímicos laboratoriais que são relevantes para a compreensão, prevenção, diagnóstico ou tratamento de doenças. A medição da concentração biológica nos componentes de uma amostra biológica é feita em química analítica, e esses procedimentos garantem a transferência de resultados e a rastreabilidade por meio dos materiais de referência (Kuwa K; Yasuda K, 2001). Rosas et al. (2010c) relembra que os provedores que comercializam materiais de referência para ensaio de proficiência normalmente não divulgam o método de preparo dos materiais por eles produzidos.

1.3 Ensaios de Proficiência

Ensaios de proficiência (EP) são ferramentas de controle de qualidade externa, que ajudam na avaliação da habilidade de um laboratório para obtenção de resultados precisos. A participação em EP permite a um laboratório a comparação do desempenho obtido com o de outros laboratórios ao analisarem marcadores idênticos, específicos para um parâmetro de ensaio (Rosengren; Heneryd, 1998; Roberts, 1999). Atualmente a Norma ABNT NBR ISO/IEC 17043 Avaliação de Conformidade – Requisitos Gerais para Ensaios de Proficiência fornece os requisitos para o desenvolvimento, a organização e condução desses programas.

A logística de um ensaio de proficiência consiste no envio simultâneo de matriz com conteúdo desconhecido e específico para um tipo de ensaio. Os marcadores, contidos na matriz, são provenientes de um mesmo lote de preparo e são selecionados aleatoriamente para serem enviados a um grupo de laboratórios participantes, junto com os materiais a serem analisados é enviada uma bula contendo: orientações sobre os cuidados para a manutenção da amostra até a data de análise; procedimentos adequados durante o manuseio inicial do material; método a ser utilizado na análise; prazos limite para o início da análise e de envio dos resultados (ABNT NBR ISO/IEC 17043).

A avaliação do desempenho do laboratório e da equipe técnica se dá através da comparação dos resultados obtidos com os de outros laboratórios, conferindo a possibilidade do acompanhamento da evolução analítica do laboratório em diferentes momentos (Augustin; Carlier, 2006). Os resultados podem apontar quedas de desempenho, alertando para a necessidade da utilização de ações corretivas na rotina de trabalho (Dveyrin; Bem-Dav; Mates, 2001). A regularidade de participações em EP mostra o comprometimento do laboratório na melhoria e manutenção do desempenho técnico. Resultados satisfatórios obtidos constituem provas valiosas da competência desses laboratórios (Roberts, 1999).

Resultados dos estudos de estabilidade de Cardoso et al. (2010), para produção de um material de referência certificado em controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros, demonstram em seu estudo de estabilidade, que foi possível garantir, também, a homogeneidade das amostras para a certificação. Brandão et al. (2014), em estudos para produção de MR quantitativo, *Bacillus cereus* em leite em pó, mostra a importância da participação em ensaios de proficiência, para que um laboratório possa ter seu desempenho avaliado por meio de uma comparação interlaboratorial, e a importância de estudos preliminares para testes de homogeneidade e estabilidade em diferentes temperaturas, em suas amostras testadas para uso em curto prazo.

2 OBJETIVO GERAL

O objetivo desse estudo foi produzir material de referência candidatos à certificação (MRC) para os perfis: lipídico, renal, hepático, glicêmico, cardíaco e ósseo, para utilização em bioquímica clínica.

2.1 Objetivos Específicos

- Elaborar materiais de referência para ensaio de proficiência e futura caracterização para MRC;
- Analisar a homogeneidade dos materiais de referência;
- Demonstrar a estabilidade por estudo isócrono (logística, repetitividade e armazenamento);
- Estudar a viabilidade de o estado subsidiar a produção de materiais de referência certificados para os perfis: lipídico, renal, hepático, glicêmico, cardíaco e ósseo;
- Estudar a viabilidade de disponibilizar MRC para avaliação dos serviços laboratoriais da rede pública de saúde.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os seis perfis (lipídico, renal, hepático, glicêmico, cardíaco e ósseo) para MR em bioquímica foram produzidos a partir de material biológico de origem animal, com caráter específico para utilização em dosagens bioquímicas, em metodologia manual, semi-automatizada ou automatizada. A matriz de soro liofilizado foi obtida de sangue de um equino sadio, com idade de seis anos. O animal recebeu alimentação balanceada (ração), não foi inoculado, não foi vacinado e nem utilizado para colheita de sangue nos 130 dias anteriores a colheita. Foi realizada uma colheita única de 800 mL de sangue, sem anticoagulante, para obtenção do volume total de 350 mL de soro.

O sangue foi acondicionado em frascos de vidro estéreis, centrifugado e, após a completa retirada de sangue residual, o soro resultante foi fortificado e foram adicionados estabilizantes e conservantes. Nessa etapa foram realizados os testes de esterilidade, com padrões microbiológicos: Agar sangue, Agar sabouraud, Agar chocolate e caldo BHI, para controle de contaminação e garantia das condições estéreis do material biológico. Após esse procedimento o soro obtido foi filtrado em unidade filtrante de 0,45 μ , alíquotado em 1mL, acondicionados em frascos de penicilina previamente pesados e etiquetados, congelados por 48 horas em freezer -40°C , posteriormente transferido para freezer -80°C por mais 48 horas, fechados com tampas de borrachas, previamente pesadas e identificadas. As amostras foram liofilizadas em um único lote e lacradas com lacres de alumínio previamente identificados e pesados, e novamente acondicionados no freezer -20°C , para posterior distribuição nas diversas temperaturas e análises ao longo do tempo.

O estudo foi aprovado, de acordo a Diretriz Brasileira, para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos, Lei Federal 11.794 de 08 de outubro de 2008, e pelo Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz sob o número CTC 68E/2013, Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA-IAL, parecer do projeto 02/2014 - CEUA-IAL e Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Protocolo

de Pesquisa nº 136/14, ambos no ano de 2014 (Anexos G e H).

Para condução dos testes e o desenvolvimento do estudo foi feita coleta de sangue total na fazenda Butantã, foram utilizados os equipamentos e a infraestrutura do Núcleo de Hematologia e Bioquímica do Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz Central e infraestrutura computacional do Laboratório de Informática Médica (LIM01) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FM-USP.

3.1 Escolha do Material

Os requisitos para a produção de um material de referência são homogeneidade, a estabilidade, rastreabilidade, comutabilidade, e também:

- a) a concentração de proteínas e enzimas, no material final, deve ser suficientemente elevado de modo a que diluições do material possa cobrir a parte relevante do intervalo de medição de os ensaios;
- b) o material deve ser opticamente claro. Esta propriedade é importante, a maioria dos equipamentos de bioquímica clínica para imunoensaios utilizam métodos de detecção ópticos;
- c) deve haver continuidade dos resultados das medições de ensaios calibrados contra materiais de referência consecutivos, é uma questão importante na química clínica, a utilização de valores de referência e limites de decisão requer que os resultados da medição sejam comparáveis em escalas de tempo mais longos;
- d) o material deve ser suficientemente comutáveis para reduzir consideravelmente as variações inter-ensaio;
- e) depois de processados constituirão um lote único e, se necessário, corrigido o pH para mimetizar o valor normal humano.

Segue ainda a ISO GUIDE 35, na fase de planejamento do procedimento de amostragem, planejamento do procedimento de preparação para materiais fortificados. Devido às dificuldades para se atingir um adequado grau de homogeneidade e de estabilidade no material candidato a referência, o procedimento de preparo e fortificação é criterioso, primeiro faz-se um estudo de viabilidade. As características físico-químicas da matriz, dos seus componentes, e do solvente utilizado no processo de fortificação foram cuidadosamente avaliadas. A pureza do solvente, tipo do material, e a equivalência do material fortificado com o material natural foram feitas de maneira que o MR fosse representativo de amostras reais.

3.1.1 Especificações para Apresentação das Amostras

Sob condições de sala limpa, 1 mL do soro foi pipetado em cada frasco, envasados em frascos de penicilina de 8mL transparentes, tampa em rolha de borracha cinza, com denteado, em dois tamanhos diferentes, para permitir a saída de água no processo a vácuo, e lacrados com lacres invioláveis de alumínio metálico e rotulados seguindo as especificações da ABNT ISO GUIA 30.

3.1.2 Umidade Residual e Massa Seca

No preparo dos MRs candidato à certificação foi utilizado a metodologia de liofilização por ser um dos métodos de dessecação mais utilizados e mais eficientes na preservação das propriedades a serem reconstituídas (Costa; Ferreira, 1991; Morgan et al., 2006). A massa seca do conteúdo dos frascos e a umidade residual foram determinadas em paralelo. Para determinação da massa seca, a massa de todos os tubos de penicilina foi determinada antes e após a remoção do conteúdo dos frascos.

3.1.2.1 Solução Técnica para Massa

Em balança calibrada (Sartorius®, Goettingen, Alemanha) foi feita a pesagem, de todos os frascos, antes e depois da liofilização e o mesmo procedimento foi repetido para todas as rolhas e lacres de alumínio. A umidade remanescente no material liofilizado foi feita por titulação de Karl Fischer, com cada frasco analisado a partir do início, meio e final do processo de enchimento.

Os resultados finais das medições e do desvio padrão (DP) e o desvio-padrão relativo (RSD) foram comparados para média de massa seca (gr) umidade residual (gr/L), entre o MR produzido. Para comparação foram calculados, entre os valores encontrados e tabelados, os resultados de medição entre esperados e observados após exclusão dos lacres e rolhas, aplicando o cálculo:

Erro

Peso da amostra antes = erro da balança/ $P_1 \pm e_b$

Peso da amostra depois = erro da balança/ $P_2 \pm e_b$

Erro: $1 - P_2 \pm e_b / P_1 \pm e_b = (1 - P_2 / P_1) \pm (P_1 + P_2) \cdot e_b$

Onde P = peso da amostra e e_b = erro da balança

3.1.2.2 Cálculo de Erro Associado a Amostra

Para calcular a incerteza do tipo B, todas as incertezas associadas ao sistema de medição devem constar em documentos de rastreabilidade, obrigatoriamente para MRC. A RDC 166 dispõe sobre a validação de métodos analíticos, na Seção V, para o cálculo de precisão utilizado para medição dos marcadores bioquímicos.

3.2 Marcadores Bioquímicos

Marcadores são substâncias intracelulares liberadas na circulação sanguínea que indicam a presença ou risco aumentado para um tipo de doença. São moléculas estranhas ou que aparecem em quantidade anormal, com alta especificidade e sensibilidade e podem ser detectadas e suas conexões associadas às doenças, como por exemplo, marcadores de injúria do miocárdio, e ainda, podem ser marcadores de formação ou reabsorção como nos exemplos de marcadores ósseos.

3.3 Estabilidade e Homogeneidade

A estabilidade e a homogeneidade do material foram avaliados para 20 mensurandos, distribuídos nos seguintes marcadores de perfis:

- a) Cardíaco: creatina quinase (CK/CPK), lactato desidrogenase (LDH);
- b) Glicêmico: amilase (AMIL), glicose (GLIC);
- c) Hepático: aspartato aminotransferase (AST/TGP), alanina aminotransferase (ALT/TGO), bilirrubina total (BILT), bilirrubina direta (BILD), fosfatase alcalina (FAL), gama glutamiltransferase (GGT/(γ GT)), proteína total (PT);
- d) Lipídico: colesterol (COL), lipoproteína de alta densidade (HDL), triglicérides (TRIG);
- e) Ósseo: cálcio (CA), fósforo (PHOS), magnésio (MG);
- f) Renal: ácido úrico (ACUR), creatinina (CREJ), uréia (UREA).

3.3.1 Análise de Dados

As análises foram realizadas para tendências dos resultados, estudos da homogeneidade, testes da homogeneidade e avaliação estatística da homogeneidade.

3.3.1.1 Análise de Tendência dos Resultados

Antes de se determinar a magnitude da incerteza da homogeneidade entre frascos, os dados experimentais obtidos, foram examinados quanto a tendências. O tipo de tratamento estatístico adotado dependeu da presença ou não da tendência. Foi verificada a existência de tendências nos resultados devido ao processo de medição, e devido ao processo de envasamento por meio de análise de regressão linear simples.

Para detectar uma tendência, devido a um desvio nas medições, efetuou-se uma análise de tendência dos resultados obtidos na ordem exata em que as medições foram realizadas. Na existência de alguma tendência nos resultados da medição, foram tomadas as seguintes ações: rejeição das medições e repetição do ensaio após eliminação das causas da tendência ou aplicação de uma correção nos resultados da medição ou inclusão da tendência na análise dos dados. Para detectar uma tendência devido à preparação da amostra efetuou-se uma análise de tendência dos resultados, obtidos de acordo com o número de sequência dos frascos. Se uma tendência significativa estiver presente, então, normalmente, o lote produzido é inadequado para uso como MR.

3.3.1.2 Estudo da Homogeneidade

Materiais preparados para EP e outros estudos interlaboratoriais são geralmente heterogêneos com relação a uma característica, apesar dos esforços aplicados para garantir a homogeneidade durante a produção (Thompson; Ellison; Wood, 2006b).

Para a etapa inicial do teste de homogeneidade a Norma ABNT ISO GUIA 35 indica a seleção aleatória das unidades a serem avaliadas e a quantidade que deve ser proporcional ao tamanho do lote, no entanto estabelece um número mínimo de dez unidades por lote.

A Norma recomenda a utilização de métodos de análise adequados, que permitam a obtenção de resultados precisos. Cada unidade selecionada deve ser analisada duas vezes, sob condições de repetitividade.

Para o teste da homogeneidade, a Norma NBR ISO/IEC GUIA 43 recomenda a utilização dos procedimentos estatísticos descritos por Thompson, Ellison e Wood (2006c) no “International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories”.

3.3.1.3 Teste da Homogeneidade

Doze frascos, selecionados aleatoriamente, foram utilizados para o teste da homogeneidade, ocorridos em um período máximo de 15 dias e após o processo de liofilização. A análise de cada um dos frascos foi realizada em 3 replicatas. Os frascos foram retirados do freezer e mantidos a temperatura ambiente por 30 minutos. Os líofilos foram reconstituídos com 1 mL água deionizada a temperatura ambiente e mantidos em repouso por 30 minutos. Foram preparadas diluições pontuais de acordo com a concentração final de cada lote.

Figura 2: Modelo para o estudo de homogeneidade entre frascos (recipientes). Adaptada do modelo apresentado por Van der Veen; Lisinger; Pauwles. (2001)

Fonte: EMP, Carneiro

O número da sequência das amostras de um lote foi logicamente relacionado com o processo de preparação da amostra e, em particular, com o processo de subdivisão; cada frasco e suas respectivas replicatas/medições foram identificados.

3.3.1.4 Avaliação Estatística da Homogeneidade

O teste de homogeneidade entre frascos foi feito após o MR ter sido embalado na sua forma final. A homogeneidade foi verificada medindo os perfis em 3 replicatas, em 12 frascos para cada perfil, e tomados aleatoriamente ao longo de todo o lote, utilizando o programa da Redsang/Sibratec para sorteio das amostras.

Para o teste da homogeneidade, as Normas NBR ISO/IEC GUIA 43, recomenda a utilização dos procedimentos estatísticos descritos por Thompson, Ellison e Wood (2006d) e a ISO GUIDE 35, para ensaio de homogeneidade.

Foi realizada a análise de dados por meio da análise da variância (ANOVA), de acordo com estudo de Thompson, Ellison e Wood (2006e) que determinam que os materiais só sejam considerados homogêneos, com 95% de confiança. Para representações gráficas foi utilizado o programa Action Act versão 8.2.1.

A incerteza da homogeneidade é função dos valores da média quadrática (MQ) entre as ampolas (MQ_{entre}) e dentro das ampolas (MQ_{dentro}), a qual também é fornecida pelo teste de análise de variância (Tabela 1). Quando o valor de MQ entre as ampolas (MQ_{entre}) for maior que dentro das mesmas (MQ_{dentro}), a incerteza padrão devido à não homogeneidade (u_{homogeneidade} ou u_{bb}) é equivalente ao desvio padrão (S_{bb}) entre as ampolas, podendo ser estimada através da Equação:

$$u_{bb} = S_{bb} = \sqrt{\frac{MQ_{entre} - MQ_{dentro}}{n}}$$

Onde n = número de replicatas das ampolas, segundo a medição do International Organization For Standardization (2006), van der Veen; Lisinger; Pauwles (2001) e considerando o grau de confiança de 95%.

3.4 Estudo da Estabilidade

Tendo em vista as variações que os MR podem sofrer antes de serem analisados, dois tipos de teste de estabilidade foram realizados separadamente: o teste de estabilidade em longo prazo, que verifica a estabilidade do material a uma temperatura escolhida que se tenha praticamente certeza da estabilidade do MR e o teste de estabilidade em curto prazo, que avalia a estabilidade do material sob condições ambientais extremas, simulando o processo de distribuição do material. O teste em curto prazo foi realizado com a exposição do material a diferentes temperaturas em diferentes intervalos de tempo. É geralmente realizado no período de 1 a 2 meses, entretanto pode ser estendido e determinado simultaneamente com a estabilidade em longo prazo (ISO GUIDE 35).

Para a condução do teste de estabilidade a norma ABNT ISO GUIA 35, recomenda a análise dos mensurandos sob condições de repetitividade utilizando o teste desenvolvido por Lamberty; Schimmel e Pauwels (1998a), denominado “*isochronous design*”. A metodologia se baseia no estoque de amostras em diferentes temperaturas por diferentes períodos de tempo, com a realização das análises das diferentes amostras em um mesmo momento. O “*isochronous design*” requer somente condições de repetitividade.

O método “*classic design*”, necessita de repetitividade e reprodutividade e os mensurandos são analisados em momentos diferentes, podendo assim aumentar as chances de variações nos resultados. O método é recomendado tanto para o teste de estabilidade em curto prazo, como para a estabilidade em longo prazo. Para a avaliação estatística da estabilidade utiliza-se um dos procedimentos de um dos documentos de Thompson, Ellison e Wood (2006f), a

Norma ISO 13528, ou a ISO GUIDE 35, para qual se estabelece a utilização da análise de regressão linear que verifica a relação entre duas variáveis.

3.4.1 Estabilidade de Transporte

Um estudo de estabilidade de curto prazo foi realizado para avaliar o efeito de transporte a temperaturas sobre a estabilidade do material. A temperatura de referência para armazenamento é de -20 °C com variações ± 5 . Para transporte, 2 amostras de cada perfil, foi utilizada caixa isolante e gelo, as amostras foram testadas nos tempos inicial (1), 15, 30, 60, 90 dias e comparadas ao tempo inicial. Para cada combinação de tempo e temperatura uma amostra N foi analisada em 3 replicas. As amostras foram analisadas para todos os mensurandos no equipamento de análises bioquímicas Cobas Integra 400 Plus e reagentes da marca Roche, por ser equipamento fechado, e os resultados foram tabelados e analisados.

O teste de estabilidade isócrona foi realizado nos tempos t_0 , t_1 , t_2 , t_3 , t_4 mensalmente durante 3 meses consecutivos. A cada análise, seis frascos de cada perfil, estocados 2 a 2, em temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$), geladeira (6-8 °C) e freezer (-20°C) foram retirados do estoque e submetidos a análise. Os ensaios para a avaliação da estabilidade em curto prazo foram realizados após o teste de estabilidade de estoque do t_5 que corresponde ao 6º mês.

Para o teste da estabilidade em curto prazo foram utilizados dezesseis frascos de cada lote, dividido em quatro grupos de quatro frascos. Para a simulação do transporte em diferentes temperaturas, foi utilizada a metodologia do “isochronous design” Lamberty; Schimmel e Pauwels (1998b).

As amostras de teste foram mantidas a -20 °C. Cada mensurando em cada frasco selecionado aleatoriamente foi medida em 3 replicatas e os resultados mostrados em tabelas. Os frascos foram identificados pelo número de dias de incubação, iniciando-se com a incubação de 1 dia e seguindo

seqüência 15, 30, 60, 90. O primeiro grupo, assim como os subseqüentes, foi incubado a 37°C, 25°C, 4°C e -20°C. As condições de tempo e temperatura foram mantidas para todos os frascos de cada grupo.

As avaliações da estabilidade em longo e em curto prazo foram realizadas por meio da construção de gráficos, onde os valores podem convertidos em Log_{10} e plotados no eixo y, foram então correlacionados com a variável: tempo de estudo decorrido, posicionada no eixo x. Foram traçadas linhas de tendência, a fim de facilitar a visualização da dispersão dos dados. Na análise estatística dos resultados foi aplicada a metodologia de regressão linear simples.

A partir do coeficiente angular da inclinação foram obtidos os limites de confiança inferiores e superiores com 95% de confiabilidade. Os materiais analisados são considerados estáveis quando os valores dos limites de confiança apresentam sinais opostos, indicando assim a inexistência de relação linear entre as variáveis.

3.5 Estabilidade em Longo Prazo

Estudos de estabilidade de curto e de longo prazo foram realizados utilizando um conjunto isócrono que consistiu na análise simultânea das amostras de referência e de teste. Para cada estudo um conjunto definido de amostras foi exposto por diferentes períodos de tempo a temperaturas elevadas e, em seguida, voltaram para a temperatura de referência de -20°C. No final do estudo, todas as amostras foram analisadas para as concentrações das proteínas dentro de uma mesma corrida analítica em condições de repetibilidade.

Um estudo de estabilidade de três e seis meses foi realizado com a finalidade de confirmar a estabilidade do material sob armazenamento a -20°C. As amostras de teste foram mantidas durante os tempos: 0, 15, 30, 60 e 90

dias a -20°C.

Cada mensurando, em cada frasco selecionado aleatoriamente, foi medido em três replicatas e os resultados mostrados em tabelas. Em paralelo um estudo de estabilidade de 180 dias foi realizado para futuros lotes para testar possível recertificação dos materiais candidato a MR. Foi esperado que os resultados indicassem que é seguro armazenar o material a -20°C durante esse tempo.

3.6 Armazenamento e Medição

Recomenda-se que frascos lacrados sejam armazenados entre - 20 °C em variações de ± 2 graus.

As medidas foram feitas em acordo com a norma ISO/IEC 17043 ou no âmbito da Norma ISO 13528, ou a ISO GUIDE 35. As provas documentais de competência técnica e aplicadas a autenticidade de informações são conferidas pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - Inmetro (2016) para Provedor de Ensaio de Proficiência (PEP).

3.7 Testes Estatísticos

A realização dos testes estatísticos visou definir as populações existentes, por meio de distribuição de frequências de um conjunto de dados quantitativos contínuos. A análise estatística dos testes de homogeneidade e estabilidade dos ensaios bioquímicos foi realizada de acordo com a ISO 13528. Para as médias de resultados foi usada a análise de variância de fator único – ANOVA (variâncias homogêneas) ou teste de Welch ou Levène (variâncias não homogêneas) e Regressão. Para reduzir o impacto de resultados discrepantes, os mesmos foram submetidos a métodos de detecção e tratamento para retirada de valores aberrantes pelo método de Box plot.

Os testes de homogeneidade das variâncias e da comparação das médias dos resultados obtidos com a utilização das diferentes técnicas analíticas foram repetidos para cada amostra, quando necessário.

A incerteza de medição que se obtém por análise estatística de uma série de observações chama-se incerteza do tipo A para os mensurandos e do tipo B as relacionadas aos equipamentos, e podem ser interpretadas como desvios padrão. O cálculo de incerteza realizado foi tipo A, para todos os MR candidatos à certificação.

As análises estatísticas foram realizadas no programa Action Act, versão 2.8.1. (Eastcamp, São Carlos, São Paulo, Brasil).

4 RESULTADOS

Os resultados dos testes de esterilidade foram satisfatórios, evidenciando ausência de contaminação dos materiais de referência com fungos, leveduras e bactérias, durante todo o processo de produção, garantindo a qualidade e viabilidade do material de referência.

O teste de homogeneidade deve ser feito mesmo quando há a expectativa de que um material seja homogêneo. Convém realizar os ensaios tomando-se uma quantidade de amostra ótima para o método escolhido a fim de minimizar a variação analítica. Esta quantidade deve ser maior ou igual do que a quantidade mínima de amostra para o qual a incerteza estabelecida ainda é válida.

O parâmetro de homogeneidade é de fundamental importância na produção de materiais de referência, os resultados fornecem as informações relativas à qualidade da matriz escolhida, e também, garante que a fortificação e estabilização da matriz foram suficientes para atingir o resultado almejado.

Para intervalo de medição (range) dos mensurandos analisados foi utilizado para comparação de resultados os valores do Department of Health and Human Services. Medicare, Medicaid and CLIA Programs: laboratory requirements relating to quality systems and certain personnel qualifications. Final Rule (2003), dados da Tabela 22, comparados com as médias da Tabela 1 das medições dos mensurandos. Os termos seguem o Vocabulário Internacional de Metrologia: conceitos fundamentais e gerais e termos associados (2012).

As técnicas utilizadas para medir as concentrações foram: espectrofotometria (fotometria de absorbância) com a metodologia correspondente a cada marcador de perfil (Anexos A a F).

Tabela 1 - Resultados das medições dos mensurandos e média das amostras

Mensurandos	ID Amostras												Média
	148	124	71	16	75	38	76	155	80	9	7	85	
CK	99,33	99,33	99,33	102,67	101,67	102,00	95,33	95,67	95,67	105,67	104,33	104,33	100,44
LDH	367,33	367,67	367,00	368,33	368,33	368,00	367,33	366,00	366,33	368,33	369,00	369,00	367,72
AMIL	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	4,67	5,00	5,00	5,00	4,97
GLIC	67,00	66,67	66,33	67,00	67,00	67,00	66,67	66,67	67,00	66,33	67,33	67,00	66,83
ALT	5,00	4,33	4,00	4,00	3,67	4,33	4,00	3,67	3,67	4,33	4,67	4,33	4,17
AST	248,00	254,67	246,33	245,67	233,33	250,67	248,33	242,67	245,67	244,67	246,00	247,00	246,08
BILT	0,41	0,45	0,42	0,41	0,45	0,41	0,46	0,42	0,47	0,44	0,41	0,44	0,43
BILD	0,26	0,29	0,27	0,30	0,29	0,28	0,29	0,27	0,32	0,28	0,26	0,28	0,28
FAL	122,00	114,67	99,67	105,00	99,00	106,67	97,33	101,67	97,67	103,00	100,67	103,33	104,22
GGT	12,00	13,00	11,67	11,00	11,33	12,00	11,67	11,67	12,00	11,67	11,00	12,00	11,75
PT	6,55	6,91	6,87	7,55	6,64	6,56	6,62	7,28	6,62	6,67	6,54	6,58	6,78
COL	59,00	59,00	59,00	59,00	59,67	59,67	59,67	59,33	59,00	59,67	59,67	59,67	59,36
HDL	47,00	47,67	47,33	47,67	48,00	48,00	46,67	46,33	46,33	46,67	46,67	47,00	47,11
TRIG	18,33	17,67	18,33	18,33	18,33	18,33	18,00	17,67	18,00	18,00	18,00	18,00	18,08
CA	11,27	11,23	11,17	11,27	11,13	11,23	11,20	11,23	11,17	11,23	11,17	11,27	11,21
PHOS	2,53	2,57	2,53	2,57	2,60	2,60	2,53	2,50	2,50	2,50	2,53	2,57	2,54
MG	1,68	1,68	1,68	1,70	1,67	1,68	1,64	1,64	1,67	1,69	1,65	1,67	1,67
ACUR	14,00	14,00	14,00	14,33	14,00	14,33	13,67	13,67	14,00	14,00	14,00	14,00	14,00
CREJ	1,31	1,29	1,29	1,32	1,31	1,31	1,30	1,29	1,28	1,30	1,30	1,29	1,30
UREA	33,67	33,67	33,67	34,00	34,33	34,33	33,00	33,33	33,00	34,00	33,67	34,33	33,75

Tabela 2 - Resultados para homogeneidade e estabilidade - creatina kinase

Homogeneidade						
ANOVA fator único para CK						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	173,3889	2	86,69444444	3,614550432	0,0380684	3,284918
Dentro dos grupos	791,5	33	23,98484848			
Total	964,8889	35				

Estabilidade						
ANOVA - regressão linear simples CK - freezer						
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	228,86	228,8599617	1,584796956	0,297118629	
Resíduo	3	433,2289	144,4096424			
Total	4	662,0889				

ANOVA - regressão linear simples CK - geladeira						
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	540,6897	540,6896552	71,63451777	0,003462432	
Resíduo	3	22,64368	7,54789272			
Total	4	563,3333				

ANOVA - regressão linear simples - bancada						
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	540,6897	540,6896552	71,63451777	0,003462432	
Resíduo	3	22,64368	7,54789272			
Total	4	563,3333				

ANOVA - regressão linear simples CK - estufa						
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	3675,172	3675,172414	3,366747394	0,163872714	
Resíduo	3	3274,828	1091,609195			
Total	4	6950				

Figura 3 – Distribuição normal de temperaturas para CK

Fonte do autor

Figura 4 – Resíduos para CK

Fonte do autor

Tabela 3 - Resultados para homogeneidade e estabilidade - lactato desidrogenase

Homogeneidade						
ANOVA fator único para lactato LDH						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	715,3889	2	357,6944444	7,300639109	0,002370134	3,284918
Dentro dos grupos	1616,833	33	48,99494949			
Total	2332,222	35				

Estabilidade					
ANOVA - regressão linear simples LDH - freezer					
	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	220,5611	220,5611111	1,672912424	0,286456542
Resíduo	3	395,5278	131,8425926		
Total	4	616,0889			

ANOVA - regressão linear simples LDH - geladeira					
	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	18,64828	18,64827586	2,480733945	0,213325192
Resíduo	3	22,55172	7,517241379		
Total	4	41,2			

ANOVA - regressão linear simples - bancada					
	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	6139,257	6139,256897	29,17339064	0,012440434
Resíduo	3	631,3209	210,4402937		
Total	4	6770,578			

ANOVA - regressão linear simples - estufa					
	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	56351,88	56351,87759	8,412295051	0,062482139
Resíduo	3	20096,26	6698,751916		
Total	4	76448,13			

Figura 5 – Distribuição normal de temperaturas para LDH

Fonte do autor

Figura 6 – Resíduos para LDH

Fonte do autor

Tabela 4 - Resultados para homogeneidade e estabilidade - amilase

Homogeneidade						
ANOVA fator único para AMIL						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,055556	2	0,027777778	1	0,378754042	3,284918
Dentro dos grupos	0,916667	33	0,027777778			
Total	0,972222	35				

Estabilidade						
ANOVA - regressão linear simples AMIL - freezer						
	gl	SQ	MQ	F	F de significação	
Regressão	1	0	0	#NÚM!	#NÚM!	
Resíduo	3	0	0			
Total	4	0				

ANOVA - regressão linear simples AMIL - geladeira						
	gl	SQ	MQ	F	F de significação	
Regressão	1	0,000192	0,000191571	0,004316547	0,951749539	
Resíduo	3	0,133142	0,044380587			
Total	4	0,133333				

ANOVA - regressão linear simples AMIL - bancada						
	gl	SQ	MQ	F	F de significação	
Regressão	1	0,009387	0,009386973	0,354216867	0,593641737	
Resíduo	3	0,079502	0,026500639			
Total	4	0,088889				

ANOVA - regressão linear simples AMIL - estufa						
	gl	SQ	MQ	F	F de significação	
Regressão	1	1,954215	1,954214559	5,489327354	0,10095218	
Resíduo	3	1,068008	0,356002554			
Total	4	3,022222				

Figura 7 – Distribuição normal de temperaturas para AMIL

Fonte do autor

Figura 8 – Resíduos para AMIL

Fonte do autor

Tabela 5 - Resultados para homogeneidade e estabilidade - glicose

Homogeneidade						
ANOVA fator único para GLIC						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,166667	2	0,083333333	0,402439024	0,671924295	3,284918
Dentro dos grupos	6,833333	33	0,207070707			
Total		7	35			

Estabilidade					
ANOVA - regressão linear simples GLIC - freezer					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	0,032375	0,032375479	0,025331002	0,88365637
Resíduo	3	3,834291	1,278097063		
Total	4	3,866667			

ANOVA - regressão linear simples GLIC - geladeira					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	0,032375	0,032375479	0,025331002	0,88365637
Resíduo	3	3,834291	1,278097063		
Total	4	3,866667			

ANOVA - regressão linear simples GLIC - bancada					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	0,538123	0,538122605	0,316150816	0,613205622
Resíduo	3	5,106322	1,70210728		
Total	4	5,644444			

ANOVA - regressão linear simples GLIC - estufa					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	1977,657	1977,656897	4,8782462	0,114242712
Resíduo	3	1216,21	405,4032567		
Total	4	3193,867			

Figura 9 – Distribuição normal de temperaturas para GLIC

Fonte do autor

Figura 10 – Resíduos para GLIC

Fonte do autor

Tabela 6 - Resultados para homogeneidade e estabilidade - alanina aminotransferase

Homogeneidade						
ANOVA fator único para ALT						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,166667	2	0,083333333	0,253846154	0,777312136	3,284918
Dentro dos grupos	10,83333	33	0,328282828			
Total		11	35			

Estabilidade					
ANOVA - regressão linear simples ALT - freezer					
	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	0,208621	0,20862069	0,631304348	0,484928521
Resíduo	3	0,991379	0,33045977		
Total	4	1,2			

ANOVA - regressão linear simples ALT - geladeira					
	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	0,42318	0,423180077	3,819596542	0,145649293
Resíduo	3	0,332375	0,110791826		
Total	4	0,755556			

ANOVA - regressão linear simples ALT - bancada					
	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	5,866858	5,866858238	17,22118088	0,025427215
Resíduo	3	1,022031	0,340676884		
Total	4	6,888889			

ANOVA - regressão linear simples ALT - estufa					
	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	3,754789	3,754789272	0,703012912	0,463319569
Resíduo	3	16,02299	5,340996169		
Total	4	19,77778			

Figura 11 – Distribuição normal de temperaturas para ALT

Fonte do autor

Figura 12 – Resíduos para ALT

Fonte do autor

Tabela 7 - Resultados para homogeneidade e estabilidade - aspartato aminotransferase

Homogeneidade						
ANOVA fator unico para AST						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	2	1,583333	0,059811123	0,942044299	3,284917651	3,284918
Dentro dos grupos	33	26,47222				
Total	35					

Estabilidade					
ANOVA - regressão linear simples AST - freezer					
	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	884,7128	884,7128352	3,941279651	0,141332243
Resíduo	3	673,4205	224,4734994		
Total	4	1558,133			

ANOVA - regressão linear simples AST -geladeira					
	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	1064,262	1064,262261	3,109709289	0,176025381
Resíduo	3	1026,716	342,2385057		
Total	4	2090,978			

ANOVA - regressão linear simples AST - bancada					
	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	22245,63	22245,62759	5,027111027	0,110743439
Resíduo	3	13275,39	4425,131545		
Total	4	35521,02			

ANOVA - regressão linear simples AST - estufa					
	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	19708,9	19708,89828	1,662010083	0,28773856
Resíduo	3	35575,41	11858,47095		
Total	4	55284,31			

Figura 13 – Distribuição normal de temperaturas para AST

Fonte do autor

Figura 14 – Resíduos para AST

Fonte do autor

Tabela 8 - Resultados para homogeneidade e estabilidade - bilirrubina direta

Homogeneidade						
ANOVA fator unico para BILD						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,000217	2	0,000108333	0,314055637	0,732637522	3,284918
Dentro dos grupos	0,011383	33	0,000344949			
Total	0,0116	35				

Estabilidade						
ANOVA - regressão linear simples BILD - freezer						
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	0,005669	0,005669272	6,459604191	0,084562971	
Resíduo	3	0,002633	0,00087765			
Total	4	0,008302				

ANOVA - regressão linear simples BILD - geladeira						
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	0,004944	0,004943755	5,61171354	0,098601558	
Resíduo	3	0,002643	0,000880971			
Total	4	0,007587				

ANOVA - regressão linear simples BILD - bancada						
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	0,005922	0,005922146	30,62774108	0,011627029	
Resíduo	3	0,00058	0,000193359			
Total	4	0,006502				

ANOVA - regressão linear simples BILD - estufa						
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	0,010519	0,010518793	4,461957066	0,12508934	
Resíduo	3	0,007072	0,002357439			
Total	4	0,017591				

Figura 15 – Distribuição normal de temperaturas para BILD

Fonte do autor

Figura 16 – Resíduos para BILD

Fonte do autor

Tabela 9 - Resultados para homogeneidade e estabilidade - bilirrubina total

Homogeneidade						
ANOVA fator unico para BILT						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,000117	2	5,83333E-05	0,108399812	0,897586946	3,284918
Dentro dos grupos	0,017758	33	0,000538131			
Total	0,017875	35				

Estabilidade						
ANOVA - regressão linear simples BILT - freezer						
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	0,007945	0,007945134	26,11687657	0,014495866	
Resíduo	3	0,000913	0,000304215			
Total	4	0,008858				

ANOVA - regressão linear simples BILT - geladeira						
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	0,007945	0,007945134	26,11687657	0,014495866	
Resíduo	3	0,000913	0,000304215			
Total	4	0,008858				

ANOVA - regressão linear simples BILT - bancada						
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	0,001246	0,00124569	3,660287081	0,151649699	
Resíduo	3	0,001021	0,000340326			
Total	4	0,002267				

ANOVA - regressão linear simples BILT - estufa						
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	0,072994	0,07299433	18,43100935	0,02323888	
Resíduo	3	0,011881	0,003960409			
Total	4	0,084876				

Figura 17 – Distribuição normal de temperaturas para BILT

Fonte do autor

Figura 18 – Resíduos para BILT

Fonte do autor

Tabela 10 - Resultados para homogeneidade e estabilidade - fosfatase alcalina

Homogeneidade						
ANOVA fator unico para FAL						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,388889	2	0,194444444	0,00360116	0,996405708	3,284918
Dentro dos grupos	1781,833	33	53,99494949			
Total	1782,222	35				

Estabilidade					
ANOVA - regressão linear simples FAL - freezer					
	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	435,0669	435,0668582	4,648153366	0,120031839
Resíduo	3	280,7998	93,59993614		
Total	4	715,8667			

ANOVA - regressão linear simples FAL - geladeira					
	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	818,4845	818,4844828	3,494235417	0,158365233
Resíduo	3	702,7155	234,2385057		
Total	4	1521,2			

ANOVA - regressão linear simples FAL - bancada					
	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	867,5065	867,5065134	1,382420007	0,324503168
Resíduo	3	1882,582	627,5274585		
Total	4	2750,089			

ANOVA - regressão linear simples FAL - estufa					
	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	3376,093	3376,09272	3,973264775	0,140233392
Resíduo	3	2549,107	849,7024266		
Total	4	5925,2			

Figura 19 – Distribuição normal de temperaturas para FAL

Fonte do autor

Figura 20 – Resíduos para FAL

Fonte do autor

Tabela 11 - Resultados para homogeneidade e estabilidade - gama glutamiltransferase

Homogeneidade						
ANOVA fator unico para GGT						
<i>Fonte da varição</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,666667	2	0,333333333	0,910344828	0,412252624	3,284918
Dentro dos grupos	12,08333	33	0,366161616			
Total	12,75	35				

Estabilidade						
ANOVA - regressão linear simples GGT - freezer						
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	0,387931	0,387931034	2,323135755	0,224858506	
Resíduo	3	0,500958	0,166985951			
Total	4	0,888889				

ANOVA - regressão linear simples GGT - geladeira						
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	0,478927	0,478927203	7,653061224	0,069776998	
Resíduo	3	0,187739	0,062579821			
Total	4	0,666667				

ANOVA - regressão linear simples GGT - bancada						
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	0,027586	0,027586207	0,163636364	0,712943924	
Resíduo	3	0,505747	0,168582375			
Total	4	0,533333				

ANOVA - regressão linear simples GGT - estufa						
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	8,609962	8,609961686	5,913684211	0,093179432	
Resíduo	3	4,367816	1,455938697			
Total	4	12,97778				

Figura 21 – Distribuição normal de temperaturas para GGT

Fonte do autor

Figura 22 – Resíduos para GGT

Fonte do autor

Tabela 12 - Resultados para homogeneidade e estabilidade - proteína total

Homogeneidade						
ANOVA fator unico para PT						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,010317	2	0,005158333	0,041371391	0,959522407	3,284918
Dentro dos grupos	4,114558	33	0,124683586			
Total	4,124875	35				

Estabilidade						
ANOVA - regressão linear simples PT - freezer						
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	0,062761	0,062760536	0,207848077	0,679436833	
Resíduo	3	0,905862	0,301953895			
Total	4	0,968622				

ANOVA - regressão linear simples PT - geladeira						
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	0,136262	0,136262241	0,490444683	0,53415453	
Resíduo	3	0,833502	0,277834068			
Total	4	0,969764				

ANOVA - regressão linear simples PT - bancada						
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	0,234004	0,23400431	0,770298976	0,44473739	
Resíduo	3	0,911351	0,303783748			
Total	4	1,145356				

ANOVA - regressão linear simples PT - estufa						
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	0,355699	0,35569887	1,049186968	0,381076523	
Resíduo	3	1,01707	0,33902334			
Total	4	1,372769				

Figura 23 – Distribuição normal de temperaturas para PT

Fonte do autor

Figura 24 – Resíduos para PT

Fonte do autor

Tabela 13 - Resultados para homogeneidade e estabilidade - colesterol total

Homogeneidade						
ANOVA fator unico para COL						
Fonte da variacão	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	1,722222	2	0,861111111	3,310679612	0,048937908	3,284918
Dentro dos grupos	8,583333	33	0,26010101			
Total	10,30556	35				

Estabilidade					
ANOVA - regressão linear simples COL- freezer					
	gl	SQ	MQ	F	F de significaco
Regressão	1	4,196169	4,196168582	1,742099682	0,278551712
Resíduo	3	7,226054	2,408684547		
Total	4	11,42222			

ANOVA - regressão linear simples COL - geladeira					
	gl	SQ	MQ	F	F de significaco
Regressão	1	6,556513	6,55651341	1,945523449	0,257404373
Resíduo	3	10,11015	3,370051086		
Total	4	16,66667			

ANOVA - regressão linear simples COL - bancada					
	gl	SQ	MQ	F	F de significaco
Regressão	1	31,26743	31,26743295	7,551634793	0,070859559
Resíduo	3	12,42146	4,140485313		
Total	4	43,68889			

ANOVA - regressão linear simples COL - estufa					
	gl	SQ	MQ	F	F de significaco
Regressão	1	379,7824	379,7823755	11,9128916	0,040891864
Resíduo	3	95,63985	31,87994891		
Total	4	475,4222			

Figura 25 – Distribuição normal de temperaturas para COL

Fonte do autor

Figura 26 – Resíduos para COL

Fonte do autor

Tabela 14 - Resultados para homogeneidade e estabilidade - HDL colesterol

Homogeneidade						
ANOVA fator unico para HDL COL						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	20,72222	2	10,36111111	11,08918919	0,000207154	3,284918
Dentro dos grupos	30,83333	33	0,934343434			
Total	51,55556	35				

Estabilidade						
ANOVA - regressão linear simples HDL COL- freezer						
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	2,193295	2,193295019	1,375255255	0,325555832	
Resíduo	3	4,784483	1,594827586			
Total	4	6,977778				

ANOVA - regressão linear simples HDL COL - geladeira						
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	3,439847	3,439846743	1,777821782	0,274620215	
Resíduo	3	5,804598	1,9348659			
Total	4	9,244444				

ANOVA - regressão linear simples HDL COL - bancada						
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	7,062069	7,062068966	4,623411371	0,120683813	
Resíduo	3	4,582375	1,527458493			
Total	4	11,64444				

ANOVA - regressão linear simples HDL COL - estufa						
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	258,6674	258,667433	17,25330948	0,02536471	
Resíduo	3	44,97701	14,99233716			
Total	4	303,6444				

Figura 27 – Distribuição normal de temperaturas para HDL Col

Fonte do autor

Figura 28 – Resíduos para HDL Col

Fonte do autor

Tabela 15 - Resultados para homogeneidade e estabilidade - triglicérides

Homogeneidade						
ANOVA fator unico para TRIG						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	2,166667	2	1,083333333	7,8	0,001682603	3,284918
Dentro dos grupos	4,583333	33	0,138888889			
Total	6,75	35				

Estabilidade						
ANOVA - regressão linear simples TRIG- freezer						
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	3,701341	3,701340996	52,93424658	0,00535909	
Resíduo	3	0,20977	0,069923372			
Total	4	3,911111				

ANOVA - regressão linear simples TRIG - geladeira						
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	7,739655	7,739655172	135,4223464	0,001363041	
Resíduo	3	0,171456	0,05715198			
Total	4	7,911111				

ANOVA - regressão linear simples TRIG - bancada						
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	16,78467	16,78467433	22,50410959	0,017767495	
Resíduo	3	2,237548	0,745849298			
Total	4	19,02222				

ANOVA - regressão linear simples TRIG - estufa						
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	161,0898	161,0898467	8,786871941	0,059340405	
Resíduo	3	54,99904	18,33301405			
Total	4	216,0889				

Figura 29 – Distribuição normal de temperaturas para TRIG

Fonte do autor

Figura 30 – Resíduos para TRIG

Fonte do autor

Tabela 16 - Resultados para homogeneidade e estabilidade - cálculo

Homogeneidade						
ANOVA fator unico para CA						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,037222	2	0,018611111	3,304932735	0,049172744	3,284918
Dentro dos grupos	0,185833	33	0,005631313			
Total	0,223056	35				

Estabilidade					
ANOVA - regressão linear simples CA- freezer					
	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	0,007364	0,007363985	0,211131454	0,677133094
Resíduo	3	0,104636	0,034878672		
Total	4	0,112			

ANOVA - regressão linear simples CA - geladeira					
	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	1,284983	1,284982759	40,95416709	0,007728705
Resíduo	3	0,094128	0,031376117		
Total	4	1,379111			

ANOVA - regressão linear simples CA - bancada					
	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	0,001962	0,001961686	0,170666667	0,707272774
Resíduo	3	0,034483	0,011494253		
Total	4	0,036444			

ANOVA - regressão linear simples CA - estufa					
	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	0,904155	0,904155172	13,0504355	0,036438372
Resíduo	3	0,207845	0,069281609		
Total	4	1,112			

Figura 31 – Distribuição normal de temperaturas para CA

Fonte do autor

Figura 32 – Resíduos para CA

Fonte do autor

Tabela 17 - Resultados para homogeneidade e estabilidade - fósforo

Homogeneidade						
ANOVA fator unico para PHOS						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,055556	2	0,027777778	8,088235294	0,001385108	3,284918
Dentro dos grupos	0,113333	33	0,003434343			
Total	0,168889	35				

Estabilidade						
ANOVA - regressão linear simples PHOS - freezer						
	gl	SQ	MQ	F	F de significação	
Regressão	1	3,701341	3,701340996	52,93424658	0,00535909	
Resíduo	3	0,20977	0,069923372			
Total	4	3,911111				
ANOVA - regressão linear simples PHOS - geladeira						
	gl	SQ	MQ	F	F de significação	
Regressão	1	7,739655	7,739655172	135,4223464	0,001363041	
Resíduo	3	0,171456	0,05715198			
Total	4	7,911111				
ANOVA - regressão linear simples PHOS - bancada						
	gl	SQ	MQ	F	F de significação	
Regressão	1	16,78467	16,78467433	22,50410959	0,017767495	
Resíduo	3	2,237548	0,745849298			
Total	4	19,02222				
ANOVA - regressão linear simples PHOS - estufa						
	gl	SQ	MQ	F	F de significação	
Regressão	1	161,0898	161,0898467	8,786871941	0,059340405	
Resíduo	3	54,99904	18,33301405			
Total	4	216,0889				

Figura 33 – Distribuição normal de temperaturas para PHOS

Fonte do autor

Figura 34 – Resíduos para PHOS

Fonte do autor

Tabela 18 - Resultados para homogeneidade e estabilidade - magnésio

Homogeneidade						
ANOVA fator unico para MG						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,021422	2	0,010711111	8,031812157	0,00143862	3,284918
Dentro dos grupos	0,044008	33	0,001333586			
Total	0,065431	35				
Estabilidade						
ANOVA - regressão linear simples MG - freezer						
	gl	SQ	MQ	F	F de significação	
Regressão	1	0,264391	0,264391284	29,1039213	0,01248165	
Resíduo	3	0,027253	0,009084387			
Total	4	0,291644				
ANOVA - regressão linear simples MG - geladeira						
	gl	SQ	MQ	F	F de significação	
Regressão	1	0,284399	0,28439864	16,48184407	0,026939848	
Resíduo	3	0,051766	0,017255268			
Total	4	0,336164				
ANOVA - regressão linear simples MG - bancada						
	gl	SQ	MQ	F	F de significação	
Regressão	1	0,101253	0,101252893	1,056738169	0,379594592	
Resíduo	3	0,287449	0,095816443			
Total	4	0,388702				
ANOVA - regressão linear simples MG - estufa						
	gl	SQ	MQ	F	F de significação	
Regressão	1	0,096983	0,096982759	0,405085338	0,569713189	
Resíduo	3	0,718239	0,239413155			
Total	4	0,815222				

Figura 35 – Distribuição normal de temperaturas para MG

Fonte do autor

Figura 36 – Resíduos para MG

Fonte do autor

Tabela 19 - Resultados para homogeneidade e estabilidade - ácido úrico

Homogeneidade						
ANOVA fator unico para ACUR						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,5	2	0,25	1,5	0,237951664	3,284918
Dentro dos grupos	5,5	33	0,166666667			
Total	6	35				

Estabilidade						
ANOVA - regressão linear simples ACUR - freezer						
	gl	SQ	MQ	F	F de significação	
Regressão	1	0,084483	0,084482759	0,354216867	0,593641737	
Resíduo	3	0,715517	0,238505747			
Total	4	0,8				

ANOVA - regressão linear simples ACUR - geladeira						
	gl	SQ	MQ	F	F de significação	
Regressão	1	0,172414	0,172413793	1,046511628	0,38160417	
Resíduo	3	0,494253	0,164750958			
Total	4	0,666667				

ANOVA - regressão linear simples ACUR - bancada						
	gl	SQ	MQ	F	F de significação	
Regressão	1	0,110345	0,110344828	0,36302521	0,589328259	
Resíduo	3	0,911877	0,303959132			
Total	4	1,022222				

ANOVA - regressão linear simples ACUR - estufa						
	gl	SQ	MQ	F	F de significação	
Regressão	1	3,491379	3,49137931	20,59322034	0,020032384	
Resíduo	3	0,508621	0,16954023			
Total	4	4				

Figura 37 – Distribuição normal de temperaturas para ACUR

Fonte do autor

Figura 38 – Resíduos para ACUR

Fonte do autor

Tabela 20 - Resultados para homogeneidade e estabilidade - creatinina

Homogeneidade						
ANOVA fator unico para CREJ						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,006117	2	0,003058333	2,35347843	0,110796367	3,284918
Dentro dos grupos	0,042883	33	0,001299495			
Total	0,049	35				

Estabilidade						
ANOVA - regressão linear simples CREJ - freezer						
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	0,264391	0,264391284	29,1039213	0,01248165	
Resíduo	3	0,027253	0,009084387			
Total	4	0,291644				

ANOVA - regressão linear simples CREJ - geladeira						
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	0,284399	0,28439864	16,48184407	0,026939848	
Resíduo	3	0,051766	0,017255268			
Total	4	0,336164				

ANOVA - regressão linear simples CREJ - bancada						
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	0,101253	0,101252893	1,056738169	0,379594592	
Resíduo	3	0,287449	0,095816443			
Total	4	0,388702				

ANOVA - regressão linear simples CREJ - estufa						
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	0,096983	0,096982759	0,405085338	0,569713189	
Resíduo	3	0,718239	0,239413155			
Total	4	0,815222				

Figura 39 – Distribuição normal de temperaturas para CREJ

Fonte do autor

Figura 40 – Resíduos para CREJ

Fonte do autor

Tabela 21 - Resultados para homogeneidade e estabilidade - ureia

Homogeneidade						
ANOVA fator unico para UREA						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,166667	2	0,083333333	0,089918256	0,914229053	3,284918
Dentro dos grupos	30,58333	33	0,926767677			
Total	30,75	35				

Estabilidade						
ANOVA - regressão linear simples UREA - freezer						
	gl	SQ	MQ	F	F de significação	
Regressão	1	0,264391	0,264391284	29,1039213	0,01248165	
Resíduo	3	0,027253	0,009084387			
Total	4	0,291644				

ANOVA - regressão linear simples UREA - geladeira						
	gl	SQ	MQ	F	F de significação	
Regressão	1	0,284399	0,28439864	16,48184407	0,026939848	
Resíduo	3	0,051766	0,017255268			
Total	4	0,336164				

ANOVA - regressão linear simples UREA - bancada						
	gl	SQ	MQ	F	F de significação	
Regressão	1	0,101253	0,101252893	1,056738169	0,379594592	
Resíduo	3	0,287449	0,095816443			
Total	4	0,388702				

ANOVA - regressão linear simples UREA - estufa						
	gl	SQ	MQ	F	F de significação	
Regressão	1	0,096983	0,096982759	0,405085338	0,569713189	
Resíduo	3	0,718239	0,239413155			
Total	4	0,815222				

Figura 41 – Distribuição normal de temperaturas para UREIA

Fonte do autor

Figura 42 – Resíduos para UREIA

Fonte do autor

Quadro 1- Resumo dos resultados de homogeneidade e estabilidade comparados a CLIA

Marcador	média	Var homog	u(A) est	u(A) homog	CLIA	ANOVA	u comparado a CLIA	Estabilidade temperatura
CK	100,44	7 U/L	± 0,88	± 9,20	± 30%	não homogênea	perda de homogeneidade	Estável em freezer e geladeira
LDH	367,72	2 U/L	± 0,83	± 0,79	± 20%	não homogênea	perda de homogeneidade	Estável em freezer e geladeira
AMIL	4,97	0 U/L	± 0,04	± 0,16	± 30%	homogênea	pequena variação na incerteza da homogeneidade	Estável em freezer, geladeira, ambiente e estufa
GLIC	63,83	< 1 mg/dL	± 0,23	± 4,3	± 10%	homogênea	pequena variação na incerteza da homogeneidade	Estável em freezer e geladeira
ALT	4,17	< 1 U/L	± 0,09	± 0,24	± 20%	homogênea	pequena variação na incerteza da homogeneidade	Estável em freezer e geladeira
AST	246,08	10,0 U/L	± 0,83	± 0,79	± 20%	homogênea	pequena variação na incerteza da homogeneidade	Estável em freezer e geladeira
BILD	0,28	< 1 mg/dL	± 0,01	± 0,01	± 20% (greater)	homogênea	pequena variação na incerteza da homogeneidade	Estável em freezer, geladeira e ambiente
BILT	0,43	< 1 mg/dL	± 0,01	± 0,01	Target value 1.0 mg/dL	homogênea	pequena variação na incerteza da homogeneidade	Estável em freezer, geladeira e ambiente
FAL	104,22	12,00 U/L	± 1,19	± 2,08	± 30%	homogênea	pequena variação na incerteza da homogeneidade	Estável em freezer, geladeira e ambiente
GGT	11,75	2,00 U/L	± 0,10	± 0,55	***	homogênea	variação na incerteza da homogeneidade	Estável em freezer, geladeira e ambiente
PT	6,78	1,00 g/dL	± 0,06	± 0,07	±10%	homogênea	pequena variação na incerteza da homogeneidade	Estável nas temperaturas de freezer, geladeira, ambiente e estufa
COL	59,36	0,67	± 0,24	± 4,58	± 10%	homogênea	pequena variação na incerteza da homogeneidade	Estável em freezer, geladeira e ambiente
HDL	47,11	1,67	± 0,21	±3,21	± 30%	não homogênea	pequena variação na incerteza da homogeneidade	Estável em freezer, geladeira e ambiente
TRIG	18,08	0,66	± 0,08	±1,04	± 25%	não homogênea	pequena variação na incerteza da homogeneidade	Estável em freezer e geladeira
CA	11,21	0,14 mg/dL	± 0,04	± 0,80	***	homogênea por aproximação	não comparado	Estável em freezer e geladeira
PHOS	2,54	0,10 mg/dL	± 0,02	± 0,17	***	não homogênea	não comparado	Estável em freezer, geladeira, ambiente e estufa
MG	1,67	0,06 mg/dL	± 0,01	± 0,10	± 25%	não homogênea	perda de homogeneidade	Estável em freezer, geladeira, ambiente e estufa

Var homog – variação da homogeneidade

u(A) – incerteza do tipo A

Fonte do autor

Tabela 22 - Resultados de homogeneidade e estabilidade das amostras e valores CLIA

Mensurandos	Estabilidade		Homogeneidade	**CLIA
	Média	* u (A)	* u (A)	
Ácido urico	14	± 0,07	± 0,49	Target value ± 17%
Alanina aminotransferase	4,17	± 0,09	± 0,24	Target value ± 20%
Amilase	4,94	± 0,04	± 0,16	Target value ± 30%
Aspartato aminotransferase	246,08	± 0,83	± 0,79	Target value ± 20%
Bilirrubina direta	0,28	± 0,01	± 0,01	Target value ± 0.4 mg/dL or ± 20% (greater)
Bilirrubina total	0,43	± 0,01	± 0,01	Target value ± 1.0 mg/dL
Calcio	11,23	± 0,04	± 0,80	***
Colesterol	59,97	± 0,24	± 4,58	Target value ± 10%
Creatina kinase	100,44	± 0,88	± 9,20	Target value ± 30%
Creatinina	1,3	± 0,01	± 0,05	Target value ± 0.3 mg/dL or ± 15% (greater)
Fosfatase alcalina	104,22	± 1,19	± 2,075	Target value ± 30%
Fósforo	2,54	± 0,02	± 0,17	***
Gama glutamiltransferase	11,75	± 0,10	± 0,55	***
Glicose	67,5	± 0,234	± 4,30	Target value ± 6 mg/dL or ± 10% (greater)
HDL Colesterol	47,11	± 0,21	± 3,21	Target value ± 30%
Lactato desidrogenase	365,22	± 1,36	± 18,80	Target value ± 20%
Magnésio	1,67	± 0,01	± 0,10	Target value ± 25%
Proteína total	6,78	± 0,06	± 0,07	Target value ± 10%
Triglicérides	18,08	± 0,08	± 1,04	Target value ± 25%
Ureia	33,75	± 0,16	± 0,08	Target value ± 2 mg/dL or ± 9% (greater)

* u (A) incerteza do tipo A

**The Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988 (CLIA) regulations.

*** Valores não comparados

5 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Comparando dados para Creatina kinase (CK) na Tabela 1, foi observada uma variação nas médias dos dados de homogeneidade em cada frasco, em média de 7,00 U/L. Na Tabela 2 e na ANOVA foi avaliada uma perda da homogeneidade. Como esse método é mais sensível, isso significa que houve variações expressivas em cada frasco, que estão associadas à complexidade da enzima. No estudo da incerteza da homogeneidade foi observado que há uma pequena variação, ou seja, menor ao que é estabelecido pela CLIA (Tabela 22). No estudo de estabilidade em diversas temperaturas (Figuras 3 e 4) foi observado que a CK é mais estável nas temperaturas de freezer e geladeira.

Para Lactato desidrogenase (LDH) na Tabela 1, foi observada uma discreta variação nas médias dos dados de homogeneidade em cada frasco, ou seja, em média de 2,00 U/L. Na Tabela 3, ao se analisar pelo método ANOVA na avaliação dos dados entre e dentro os frascos, foi verificado uma perda da homogeneidade. Como esse método é mais sensível, isso significa que foi possível observar pequenas variações em cada frasco, que provavelmente são inerentes à própria enzima. No estudo da incerteza da homogeneidade foi observado que há variação, mas é menor do que o estabelecido pela CLIA (Tabela 22). No estudo de estabilidade em diversas temperaturas (Figuras 5 e 6) foi observado que a LDH é mais estável nas temperaturas de freezer e geladeira.

Para Amilase (AMIL) na Tabela 1, não houve variação nas médias dos dados de homogeneidade em cada frasco. Na Tabela 4, essa homogeneidade foi comprovada na análise pelo método ANOVA, no qual foram avaliados os dados entre e dentro os frascos, foi verificado que não houve perda da homogeneidade. No estudo da incerteza da homogeneidade não houve variação, o valor encontrado é bem menor do que os estabelecidos pela CLIA (Tabela 22). No estudo de estabilidade em diversas temperaturas (Figuras 7 e 8) foi observado que a AMIL é muito estável em todas as temperaturas.

Para Glicose (GLIC) Tabela 1, houve uma discreta variação nas médias dos dados de homogeneidade em cada frasco. Na Tabela 5, a homogeneidade foi comprovada na análise pelo método ANOVA, no qual foram avaliados os dados entre e dentro os frascos, foi verificado que não houve perda da homogeneidade. No estudo da incerteza da homogeneidade houve discreta variação, os valores encontrados são menores do que os estabelecidos pela CLIA (Tabela 22). No estudo de estabilidade em diversas temperaturas (Figuras 9 e 10) foi observado que a GLIC é mais estável nas temperaturas de freezer e geladeira.

Para Alanina Aminotransferase (ALT) Tabela 1, nas médias dos dados de homogeneidade em cada frasco foi observada uma discreta variação, ou seja, em média menor que 1,00 U/L. Na Tabela 6, na análise pelo método ANOVA, no qual foram avaliados os dados entre e dentro os frascos, o material apresentou homogeneidade. No estudo da incerteza da homogeneidade não houve variação significativa e foi menor do que é estabelecido pela CLIA (Tabela 22). No estudo de estabilidade em diversas temperaturas (Figuras 11 e 12) foi observado que a ALT é mais estável nas temperaturas de freezer e geladeira.

Para Aspartato aminotransferase (AST) Tabela 1, nas médias dos dados de homogeneidade em cada frasco foi observada uma discreta variação, ou seja, em média 10,00 U/L. Na Tabela 7, na análise pelo método ANOVA, no qual foram avaliados os dados entre e dentro os frascos, o material apresentou homogeneidade. No estudo da incerteza da homogeneidade não houve variação significativa, menor do que é estabelecido pela CLIA (Tabela 22). No estudo de estabilidade em diversas temperaturas (Figuras 13 e 14) foi observado que a AST é mais estável nas temperaturas de freezer e geladeira.

Para Bilirrubina direta (BILD) Tabela 1, houve uma discreta variação nas médias dos dados de homogeneidade em cada frasco. Na Tabela 8, na análise pelo método ANOVA, no qual foram avaliados os dados entre e dentro os frascos, o material apresentou homogeneidade. No estudo da incerteza da

homogeneidade não houve variação significativa, menor do que é estabelecido pela CLIA (Tabela 22). No estudo de estabilidade em diversas temperaturas (Figuras 15 e 16) foi observado que a BILD é mais estável nas temperaturas de freezer, geladeira e temperatura ambiente.

Para Bilirrubina total (BILT) Tabela 1, houve uma discreta variação nas médias dos dados de homogeneidade em cada frasco. Na Tabela 9, na análise pelo método ANOVA, no qual foram avaliados os dados entre e dentro os frascos, o material apresentou homogeneidade. No estudo da incerteza da homogeneidade não houve variação significativa, menor do que é estabelecido pela CLIA (Tabela 22). No estudo de estabilidade em diversas temperaturas (Figuras 17 e 18) foi observado que a BILT é mais estável nas temperaturas de freezer, geladeira e temperatura ambiente.

Para Fosfatase alcalina (FAL) Tabela 1, nas médias dos dados de homogeneidade em cada frasco foi observada uma variação, ou seja, em média 12,00 U/L. Na Tabela 10, na análise pelo método ANOVA, no qual foram avaliados os dados entre e dentro os frascos, o material apresentou homogeneidade. No estudo da incerteza da homogeneidade não houve variação significativa, menor do que é estabelecido pela CLIA (Tabela 22). No estudo de estabilidade em diversas temperaturas (Figuras 19 e 20) foi observado que a FAL é mais estável nas temperaturas de freezer, geladeira e temperatura ambiente.

Para Gamaglutamil transferase (GGT) Tabela 1, houve uma discreta variação nas médias dos dados de homogeneidade em cada frasco. Na Tabela 11, na análise pelo método ANOVA no qual foram avaliados os dados entre e dentro os frascos, o material apresentou homogeneidade. No estudo da incerteza da homogeneidade não houve variação significativa, para esse mensurando não foi encontrado valor para comparação na CLIA. No estudo de estabilidade em diversas temperaturas (Figuras 21 e 22) foi observado que a GGT é mais estável nas temperaturas de freezer, geladeira e temperatura ambiente.

Para Proteína total (PT) Tabela 1, houve uma discreta variação nas médias dos dados de homogeneidade em cada frasco. Na Tabela 12, na análise pelo método ANOVA, no qual foram avaliados os dados entre e dentro os frascos, o material apresentou homogeneidade. No estudo da incerteza da homogeneidade não houve variação significativa, menor do que é estabelecido pela CLIA (Tabela 22). No estudo de estabilidade (Figuras 23 e 24), a PT em apresentou estabilidade nas temperaturas de freezer, geladeira, temperatura ambiente e estufa.

Para Colesterol (COL) Tabela 1, houve uma discreta variação nas médias dos dados de homogeneidade em cada frasco. Na Tabela 13, na análise pelo método ANOVA, no qual foram avaliados os dados entre e dentro os frascos, o material apresentou homogeneidade. No estudo da incerteza da homogeneidade não houve variação significativa, menor do que é estabelecido pela CLIA (Tabela 22). No estudo de estabilidade em diversas temperaturas (Figuras 25 e 26) foi observado que o COL é mais estável nas temperaturas de freezer, geladeira e temperatura ambiente.

Para Colesterol-HDL (HDL Col) Tabela 1, houve uma discreta variação nas médias dos dados de homogeneidade em cada frasco. Na Tabela 14, na análise pelo método ANOVA, no qual foram avaliados os dados entre e dentro os frascos, o material não apresentou homogeneidade. No estudo da incerteza da homogeneidade não houve variação significativa, menor do que é estabelecido pela CLIA (Tabela 22). No estudo de estabilidade (Figuras 27 e 28), o HDL Col apresentou estabilidade nas temperaturas de freezer, geladeira e temperatura ambiente.

Para Triglicérides (TRIG) Tabela 1, houve uma discreta variação nas médias dos dados de homogeneidade em cada frasco. Na Tabela 15, na análise pelo método ANOVA, no qual foram avaliados os dados entre e dentro os frascos, o material não apresentou homogeneidade. No estudo da incerteza da homogeneidade não houve variação significativa, menor do que é estabelecido pela CLIA (Tabela 22). No estudo de estabilidade (Figuras 29 e

30), o mensurando TRIG apresentou estabilidade nas temperaturas de freezer e geladeira.

Para Cálcio (CA) Tabela 1, houve uma discreta variação nas médias dos dados de homogeneidade em cada frasco. Na Tabela 16, na análise pelo método ANOVA, no qual foram avaliados os dados entre e dentro os frascos, por critério de arredondamento, o material apresentou homogeneidade. No estudo da incerteza da homogeneidade não houve variação significativa, para esse mensurando não foi encontrado valor para comparação na CLIA. No estudo de estabilidade em diversas temperaturas (Figuras 31 e 32), foi observado que o CA é mais estável nas temperaturas de freezer e geladeira.

Para Fósforo (PHOS) Tabela 1, houve uma discreta variação nas médias dos dados de homogeneidade em cada frasco. Na Tabela 17, na análise pelo método ANOVA, no qual foram avaliados os dados entre e dentro os frascos, o material não apresentou homogeneidade para esse mensurando não foi encontrado valor para comparação na CLIA. No estudo de estabilidade (Figuras 33 e 34), o PHOS não apresentou em apresentou estabilidade nas temperaturas de freezer, geladeira, temperatura ambiente e estufa.

Para Magnésio (MG) Tabela 1, houve uma discreta variação nas médias dos dados de homogeneidade em cada frasco. Na Tabela 18, na análise pelo método ANOVA, no qual foram avaliados os dados entre e dentro os frascos, o material não apresentou homogeneidade entre os frascos. No estudo de estabilidade (Figuras 35 e 36), a variação pode ter refletido na estabilidade a partir do 30° dia. Do dia 1 ao 30° o MG apresentou estabilidade nas temperaturas de freezer, geladeira, temperatura ambiente e estufa.

Para Ácido úrico (ACUR) Tabela 1, houve uma discreta variação nas médias dos dados de homogeneidade em cada frasco. Na Tabela 19, a homogeneidade foi comprovada na análise pelo método ANOVA, no qual foram avaliados os dados entre e dentro os frascos, foi verificado que não houve perda da homogeneidade. No estudo da incerteza da homogeneidade houve

discreta variação, os valores encontrados são menores do que os estabelecidos pela CLIA (Tabela 22). No estudo de estabilidade em diversas temperaturas (Figuras 37 e 38) foi observado que o ACUR é mais estável nas temperaturas de freezer e geladeira e ambiente.

Para Creatinina (CREJ) Tabela 1, houve uma discreta variação nas médias dos dados de homogeneidade em cada frasco. Na Tabela 20, a homogeneidade foi comprovada na análise pelo método ANOVA, no qual foram avaliados os dados entre e dentro os frascos, foi verificado que não houve perda da homogeneidade. No estudo da incerteza da homogeneidade houve discreta variação, os valores encontrados são menores do que os estabelecidos pela CLIA (Tabela 22). No estudo de estabilidade em diversas temperaturas (Figuras 39 e 40), foi observado que a CREJ é mais estável nas temperaturas de freezer e geladeira.

Para Ureia (UREA) Tabela 1, houve uma discreta variação nas médias dos dados de homogeneidade em cada frasco. Na Tabela 21, a homogeneidade foi comprovada na análise pelo método ANOVA, no qual foram avaliados os dados entre e dentro os frascos, foi verificado que não houve perda da homogeneidade. No estudo da incerteza da homogeneidade houve discreta variação, os valores encontrados são menores do que os estabelecidos pela CLIA (Tabela 22). No estudo de estabilidade em diversas temperaturas (Figuras 41 e 42) foi observado que a UREA é mais estável nas temperaturas de freezer e geladeira.

Para todos os mensurandos analisados não foram encontradas tendências para resultados estatísticos dos resíduos.

Os mensurandos CK, LDH, HDL, TRIGL, PHOS, MG, não apresentaram homogeneidade, portanto são inviáveis para materiais candidatos a certificação. Os mensurandos AMIL, GLIC, ALT, AST, BILD, BILT, FAL, PT, COL, ACUR, CREJ, UREA, demonstraram serem viáveis para materiais candidatos a certificação. Os mensurandos GGT e CA se mostraram viáveis

para candidatos a certificação, entretanto, por não terem referências na CLIA, demandarão mais estudos a fim de qualificá-los como novos marcadores.

Para amostras biológicas, dadas as suas particularidades e variações que induzem a erros experimentais, estudos anteriores de Ferreira et al (2012a) e Carneiro et al (2012a), já demonstraram a viabilidade de substituição de soro humano por soro equino.

Testes para o soro equino já foram feitos por Carneiro et al (2012b) e a comutatividade entre sistemas analíticos já foram descritas por Ferreira, Carneiro e Santos (2012b). Resultados de Ferreira et al (2010) atestam a validade do uso para comparações interlaboratoriais. Araújo et al (2007) e Araújo et al (2008) fizeram estudos de alterações em perfil lipídico em soro humano, que foram comparados contra soro equino por Santos et al (2014), e fortificadas por Carneiro, Ferreira e Santos (2014) a partir do método utilizado por Carneiro, Ferreira e Santos (2014), e parte da metodologia para produção de amostras no Programa de Controle Interlaboratorial, acreditado pelo INMETRO em 2015.

Os cálculos de incerteza (u) para massa dos mensurandos não foram levados em consideração, pois deverão ser acrescentados aos calculo de incerteza (u) do tipo B, que não foram contemplados nessa fase dos estudos.

Os equipamentos, instrumentos e materiais foram identificados somente para especificar adequadamente o procedimento experimental. Em nenhum caso essa identificação implica recomendação ou endosso por parte do Instituto Adolfo Lutz.

O Instituto Adolfo Lutz é pioneiro na produção de material de referência laboratorial e há quinze anos desenvolve e aprimora novos materiais que mimetizam a matriz de soro humano, para aplicação em bioquímica laboratorial.

Como resultado final de mestrado pretendeu-se criar e deter o conhecimento da tecnologia necessária para futuro desenvolvimento de MRC e possível patente, dos seis perfis pesquisados, de domínio do estado de São Paulo, por meio da Secretaria da Estadual de Saúde de São Paulo.

O Brasil é um país de dimensões continentais, tem a quinta maior população mundial, o que gera uma grande demanda na área de saúde pública. Um investimento pontual, com aporte de equipamentos, treinamento e capacitação dos LACEN's, tornam viável a produção de MR e MRC nacionais.

Ações de ajustes para produção e caracterização desses materiais, em território nacional, serão interessantes do ponto de vista econômico, pois garantirá um diagnóstico mais confiável, diminuindo prescrição de remédios desnecessários, desonerando o Sistema Único de Saúde, liberando recursos que podem ser direcionados para outras áreas. Os resultados obtidos são um avanço para a caracterização dos mensurandos candidatos a Material de Referência Certificado.

REFERÊNCIAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Gerência Geral de Laboratórios de Saúde Pública. Relatório situacional dos Lacens-2005 (Ano-base 2004). Brasília; 2006 [citado 17 mai. 2013]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/reblas/lacens/relatorio_2005.pdf.

Araújo LT, Costa EAS, Tonissi AP, Ferreira JE, Carneiro EMP, Catarino RM, Santos RTM. Avaliação da LDL colesterol como potencial fator de risco cardiovascular em pacientes diabéticos [CD-ROM]. II Simpósio do Programa de Aprimoramento Profissional do Instituto Adolfo Lutz; 2008; São Paulo. São Paulo (Brasil): Anais; 2008. CD-ROM.

Araújo LT, Ferreira JE, Carneiro EMP, Catarino RM, Santos RTM. Prevalência de pacientes com doença de base que apresentam alterações no perfil lipídico [CD-ROM]. VII Encontro do Instituto Adolfo Lutz "O Laboratório no 3 milênio: Tradição e Inovação", 2007 Out; São Paulo. São Paulo (Brasil): Anais; 2007. CD-ROM.

Associação Brasileira de Normas Técnicas. ISO GUIA 30: Materiais de referência -Termos e definições selecionado. Rio de Janeiro: ABNT; 2016.

Associação Brasileira de Normas Técnicas. ISO Guia 34: Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência. Rio de Janeiro: ABNT; 2012.

Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR ISO/IEC 17025: Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro: ABNT; 2005.

Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR ISO/IEC 17043: Avaliação de conformidade – Requisitos gerais para Ensaio de proficiência. Rio de Janeiro: ABNT; 2011.

Augustin JC, Carlier V. Lessons from the organization of a proficiency testing program in food microbiology by interlaboratory comparison: analytical methods in use, impact of methods on bacterial counts and measurement uncertainty of bacterial counts. Food Microbiol. 2006 Feb;23(1):1-38. Review.

Berlitz FA de Almeida.. Controle da qualidade no laboratório clínico: alinhando melhoria de processos, confiabilidade e segurança do paciente. J. Bras. Patol. Med. Lab. 2010 Oct;46(5): 353-63.

Brandão MLL, Rosas CO, Bricio SML, Da Costa JCB, Medeiros VM, de La Cruz MHC; Da Nóbrega AW. Produção de material de referência para ensaio de proficiência de enumeração de *Bacillus cereus* em leite. Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade. 2014 Febr; 2(1):39-45.

BRASIL ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, 24/07/2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências., Brasília, Diário Oficial [da] União nº 141.25/07/2017. (2017 jul. 25). p. 62 Seção I.

BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria 3204, de 20 de outubro de 2010. Norma Técnica de Biossegurança para Laboratórios de Saúde Pública. Brasília, Diário Oficial [da] União de 21/10/2010. p. 50 – Seção I.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Diretrizes gerais para o trabalho em contenção com agentes biológicos. Departamento de Ciência e Tecnologia – 3. ed. – Brasília: Editora [do] Ministério da Saúde, 2010. 52 p. – [Série A. Normas e Manuais Técnicos].

Brasil. Lei nº 8.080 de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. Diário Oficial, Brasília (1990 set. 19); Seq.1

Cardoso MHW, da Nóbrega AW, Vital HC, Abrantes SMP. Preparation of a certified reference material for pesticide control in the cultivation fruits and vegetables: a stability study. Food Science and Technology. 2010 June;30(2):439-46.

Cardoso MHW. Preparação de um Material de Referência Certificado para Controle de Agrotóxicos em Hortifrutigranjeiros [tese]. Rio de Janeiro: INCQS/Fiocruz; 2008.

Carneiro EMP, Ferreira JE, Miguita K, Tonissi AP, Cação V M, Oshiro M, Salzone CM, Olympio A L, Ribeiro Y, Maretti RC, Trincado JB, Araujo LT, Catarino RM, Santos RTM. Quality control interlaboratory: Performance of parameters hematological and biochemical. Rev Instituto Adolfo Lutz. 2012 Nov;71(suppl.):M-070-22.

Carneiro EMP, Ferreira JE, Santos PCC. Fortificação de amostras de soro para produção de materiais de referência em bioquímica clínica [Internet]. Anais do X Encontro do Instituto Adolfo Lutz: Desafios do Laboratório de Saúde Pública: Redes de saúde, Inovação tecnológica e eventos de massa;28-31 out. 2014; São Paulo. São Paulo: 2014 [citado 16 ago. 2017]. Disponível em: <http://200.144.1.139/~eial/anais2014/trabalhos.htm>.

Carneiro EMP, Ferreira JE, Santos RTM, Ferreira R A, Silva MF. Interfering factors in equine blood collection for biochemical analysis on representative sample. Rev Instituto Adolfo Lutz. 2012 Nov;71(suppl.):M-069-22.

Castejon MJ, Yamashiro R, Oliveira CC, Olivieri JC, Oliveira CAF, Ueda M. Homogeneity study of the internal quality control sera for immunodiagnosis of HIV/AIDS. J. Bras. Patol. Med. Lab. 2014 Feb;50(1):46-52.

Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA – Resolução CONAMA nº 358 de 2005, dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos resíduos dos serviços de saúde e dá outras providências. [citado em 30 de out. 2015]. Disponível em: [\[http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35805.pdf\]](http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35805.pdf)

Costa CP, Ferreira MC. Preservação de microrganismos [revisão]. Rev Microbiol. 1991 Jul-Set;22(3): 263-8.

Department of Health and Human Services. Medicare, Medicaid and CLIA Programs: laboratory requirements relating to quality systems and certain personnel qualifications. Final Rule. Fed. Regist 2003;68:3639-714. [citado 2016 jan. 23]. Disponível em: <http://www.westregard.com/clia.htm>

Donne J. Devotions Upon Emergent Occasions. 2017 [citado 6 mar]. Disponível em: <http://triggs.djvu.org/djvu-editions.com/DONNE/DEVOTIONS/Download.pdf>

Dveyrin Z, Ben-Dav H, Mates A. Proficiency testing as tool for ISO 17025 implementation in national public health laboratory: a mean for improving efficiency. Accreditation and Quality Assurance. 2001 Apr; 6:190-4.

Escopo da Acreditação – ABNT NBR ISO/IEC 17043 - Provedor de Ensaios de Proficiência (Pep) [citado 26 de nov. 2015]. Disponível em: [\[http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/pdf/PEP0007.pdf\]](http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/pdf/PEP0007.pdf)

Ferreira JE, Carneiro EMP, Miguita K, Cação V M, Catarino RM, CM Salzone, Maretti RC, Santos RTM. Indicadores de qualidade para avaliar a atuação do desempenho analítico em ensaio de proficiência [Internet]. Anais do X Encontro do Instituto Adolfo Lutz: Desafios do Laboratório de Saúde Pública: Redes de saúde, Inovação tecnológica e eventos de massa;28-31 out. 2014; São Paulo. São Paulo: 2014 [citado 16 ago. 2017]. Disponível em: <http://200.144.1.139/~eial/anais2014/trabalhos.htm>.

Ferreira JE, Carneiro EMP, Santos RTM. Avaliação da comutatividade em diferentes sistemas analíticos. Rev Instituto Adolfo Lutz. 2012 Nov;71(suppl.):M-103-22.

Ferreira JE, Miguita K, Oshiro M, Carneiro EMP, Tonissi AP, Cação V M, Catarino RM, CM Salzone, Ribeiro Y, Maretti RC, Trincado JB, Santos RTM. Indicadores de qualidade para avaliar o desempenho do Programa de Comparação Interlaboratorial em Hematologia e Bioquímica. Rev Instituto Adolfo Lutz. 2012 Nov;71(suppl.):M-015-23.

Ferreira JE, Tonissi AP, Carneiro EMP, Catarino RM, Santos RTM. Desempenho analítico de programa de comparação interlaboratorial: Avaliação de tendência pelo Método de Youden. J

Bras Patol Med Lab, 2010 Oct;46.

Franzini C, Ceriotti F. Impact of reference materials on accuracy in clinical chemistry. Clin Biochem. 1998 Aug;31 (6):449-457.

Gonzaga F, Dias J. Long-term stability monitoring of pH reference materials using primary pH method. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2015 Abr;407(11):3249-52 .

Hayes D. Quality assurance in the microbiology laboratory. Accreditation and Quality Assurance. 1996 Jan;1:18-23.

Infusino I, Schumann G, Ceriotti F, Panteghini M. Standardization in clinical enzymology: a challenge for the theory of metrological traceability. Clin Chem Lab Med 2010 Feb;48(3):301-7.

International Organization For Standardization – ISO 13528. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons. 2005.

International Organization For Standardization – ISO GUIDE 35. Reference Materials – Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability. 2017

Kuwa K, Yasuda K. Practical Use of Matrix Reference Materials in Clinical Chemistry Analysis. Analytical Sciences. 2001 Set;17(Suppl);495-9.

Lamberty A, Schimmel H, Pauwels J. The study of the stability of reference materials by isochronous measurements. Fresenius J Anal Chem. 1998 Aug; (360): 359-61

Leguizamón JE, González IA, Bernal LJ. Necesidades metrológicas en los laboratorios clínicos. Revista Colombiana de Química. 2014 Jan;43(1):30-35.

Lucchese G. Globalização e Regulação Sanitária: os Rumos da Vigilância Sanitária no Brasil [tese]. Rio de Janeiro: ENSP/FIOCRUZ; 2001.

Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G. Preservation of micro-organisms by drying; a review. J Microbiol Methods. 2006 Aug;66(2):183-93.

Motta, VT. Bioquímica Clínica para o Laboratório - Princípios e Interpretações - 5ª Ed. Rio de Janeiro: [Medbook]; 2009. V.10:120-141.

Oficina Sobre Ensaio de Proficiência e Produção de Materiais de Referência no Brasil, II. Relatório. INCQS/FIOCRUZ; 2008 Abr 15-16; Rio de Janeiro. Rio de Janeiro (Brasil)..

Pessoa MCF, Ferreira Jr OC. Rastreabilidade metrológica em medicina laboratorial. Estudo de kits de bioquímica utilizados em laboratórios de análises clínicas. Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade. 2016 Nov; 3(4):68-73.

Petersen PH, Ricós C, Stöckl D, Libeer JC, Baadenhuijsen H, Fraser C, Thienpont L. Proposed guidelines for the internal quality control of analytical results in the medical laboratory. Eur J Clin Chem Clin Biochem. 1996 Dec;34(12):983-99.

Redsang/Sibratec. São Paulo; 2016 [citado 6 mar]. Disponível em: <<http://www.redsang.ial.sp.gov.br>>.

Roberts D. Proficiency testing in the food microbiology laboratory. *Arh Hig Rada Toksikol*. 1999 Mar;50(1):55-65.

Rosas CO, Brandão MLL, Bricio SML, Medeiros VM, Bernardo SPC, De La Cruz MHC, Cardanelli-Leite P. Desenvolvimento de material de referencia para ensaio de proficiência em microbiologia de alimentos. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010 Mar;69(1):15-22.

Rosengren A, Heneryd AC. Proficiency testing schemes – their role in quality assurance. *International Journal of Food Microbiology*. 1998 Dec;45(2):55.

Santos PCC, Carneiro EMP, Ferreira JE, Santos RTM. Comparação de Estabilidade entre Amostras de Soro do Programa Interlaboratorial em Hematologia e Bioquímica do Instituto Adolfo Lutz [Internet]. *Anais do X Encontro do Instituto Adolfo Lutz: Desafios do Laboratório de*

Saúde Pública: Redes de saúde, Inovação tecnológica e eventos de massa;28-31 out. 2014; São Paulo. São Paulo: 2014 [citado 16 ago. 2017]. Disponível em: <http://200.144.1.139/~eial/anais2014/trabalhos.htm>.

Silveira LC. Ciência, Tecnologia, Inovação e Vigilância Sanitária [dissertação]. Brasília: UNB; 2006.

Thienpont LM, Van Uytvanghe K, De Leenheer AP. Reference measurement systems in clinical chemistry. *Clin Chim Acta*. 2002 Sep;323(1-2):73-87.

Thompson M, Ellison SLR, Wood R. International harmonized protocol for proficiency testing of (chemical) analytical chemistry laboratories. *Pure Appl. Chem*. 2006 Jan;78(1):5-196.

Van der Veen AMH, Lisinger T, Pauwles J. Uncertainty calculations in the certification of reference materials: homogeneity study. *Accreditation and Quality Assurance*, 2001 Jan;6: 26-30.

Vocabulário Internacional de Metrologia: conceitos fundamentais e gerais e termos associados (VIM 2012). [citado 1 jun. 2016]; Disponível em <http://www.inmetro.gov.br/metCientifica/vim/vim_completo.pdf>.

ANEXOS

ANEXO A - Marcadores de Perfil Glicêmico

Glicose (GLIC) - Características

A glicose é o principal hidrato de carbono presente no sangue periférico e sua oxidação constitui a principal fonte de energia celular do organismo. A glicose proveniente da dieta é convertida em glicogênio, para armazenamento no fígado, ou em ácidos gordos, para armazenamento no tecido adiposo. A concentração de glicose no sangue é mantida dentro de estreitos limites, graças a ação de hormonas, sendo as mais importantes produzidas pelo pâncreas. A causa mais frequente de hiperglicemia é a diabetes *melittus*, originada pelo déficit da secreção ou ação da insulina. Outros fatores também influenciam a elevação dos níveis de glicose no sangue, entre eles a pancreatite, disfunção da tireoide, insuficiência renal e hepatopatias.

Metodologia: Reação bioquímica de ponto final com hexoquinase.

Apresentação de resultados: Soro e Plasma: 70 a 99 mg/dL

Amilase (AMIL) - Características

Amilases são enzimas que são catalisadoras da hidrólise da amilopectina, da amilose e do glicogênio em maltose e dextrinas. Na saliva encontra-se uma forma de alfa-amilase denominada ptialina e no pâncreas, a amilase pancreática.

Metodologia : Reação bioquímica cinética enzimática UV (IFCC).

Apresentação de resultados: Adultos: 28 a 100 U/L.

ANEXO B - Marcadores de Perfil Hepático

Aspartato Aminotransferase - AST (TGO ou GOT) - Características

O aspartato aminotransferase (AST), também chamada de transaminase glutâmico oxalacética (TGO), é uma enzima transaminase amplamente distribuídas nos tecidos: hepático, cardíaco, muscular e renal. Encontram-se níveis séricos elevados em doenças em que exista o envolvimento desses tecidos. Nas doenças hepatobiliares, como cirrose, carcinoma metastático e a hepatite viral, provocam um aumento no nível sérico de AST. No caso de enfarte do miocárdio, a AST sérica aumenta e atinge um pico dois dias após o infarto.

Metodologia: Reação bioquímica cinética enzimática UV (IFCC).

Apresentação de resultados: Adultos: Homens: até 38 U/L- Mulheres: até 32 U/L

Alanina Aminotransferase - ALT (GTP) - Características

A alanina aminotransferase (ALT), ou alanina transaminase, também conhecida como transaminase glutâmico pirúvica (TGP), é uma enzima transaminase presente em maior quantidade no fígado sendo uma enzima muito eficiente para diagnóstico de doenças hepáticas. Apresenta aumento da ALT sérica na hepatite, cirrose, icterícia obstrutiva, carcinoma do fígado e no abuso crônico do álcool.

Metodologia: Reação bioquímica cinética enzimática UV (IFCC).

Apresentação de resultados: Adultos: Homens: até 41 U/L - Mulheres: até 31 U/L.

Bilirrubina Direta e Total - BILD e BILT - Características

A bilirrubina é formada no sistema reticuloendotelial, durante a degradação dos eritrócitos envelhecidos. A porção heme da hemoglobina é removida, metabolizada em bilirrubina e transportada para o fígado sob a forma do complexo com a albumina sérica. No fígado é conjugada com ácido glucoronico, transportada para o canal biliar e eliminada no aparelho digestivo. Doenças ou determinados processos hemolíticos, produzem mais bilirrubina que o fígado consegue processar, elevando o nível de bilirrubina não conjugada na circulação. A imaturidade hepática e outras doenças com mecanismo de conjugação da bilirrubina alterado provocam elevações semelhantes da bilirrubina não conjugada. A obstrução do canal biliar ou lesões da estrutura hepatocelular aumentam os níveis da bilirrubina conjugada (direta) e da não conjugada (indireta) na circulação.

Metodologia : Reação bioquímica colorimétrica de ponto final (Diazo).

Apresentação de resultados: Adultos: Bilirrubina Total: < 1,0 mg/dL

Bilirrubina Direta: < 0,34 mg/dL

Fosfatase Alcalina (FAL) - Características

A fosfatase alcalina é uma enzima presente nas membranas de revestimento dos canalículos biliares (canalicular), é produzida por vários órgãos e tecidos, como o fígado, ossos, intestinos. A maioria da FAL existente no soro normal provém do fígado ou das vias biliares e seus níveis são dependentes da idade, sendo mais elevados em crianças e adolescentes. Nos adultos os homens apresentam níveis mais elevados que as mulheres, ocorre aumento na gravidez devido a secreção placentária de FAL. As elevações estão associadas a doenças como hepatite, cirrose, doenças malignas, toxicidade química e doenças ósseas.

Metodologia: Reação bioquímica cinética enzimática a 409nm (método IFCC).

Apresentação de resultados: Adultos: Homens: 40 a 129 U/L - Mulheres: 35 a 104 U/L.

Gama Glutamil Transferase - GGT (γ GT) - Características

A gama-glutamyltransferase é utilizada no diagnóstico e monitoração das doenças hepatobiliares. A atividade enzimática da GGT é um parâmetro seguro para identificar alterações além de ser um teste sensível para reconhecimento de alcoolismo oculto.

Metodologia: Reação bioquímica cinética (Szasz modificado).

Apresentação de resultados: Adultos Soro/Plasma: Homens: 8 a 61 U/L
Mulheres: 5 a 36 U/L

Proteínas Totais (PT) - Características

As proteínas do plasma são sintetizadas principalmente no fígado, nos plasmócitos, gânglios linfáticos, baço e medula óssea. Em estados patológicos, tanto os níveis de proteínas plasmáticas totais como o rácio das frações individuais, pode estar alterado em relação aos valores normais. A hipoproteïnemia pode ser causada por condições síndrome nefrótica, grande perda de sangue e sprue (deficiência de absorção de proteínas), queimaduras graves e também em casos de desidratação grave.

Metodologia: Reação bioquímica colorimétrica de ponto final (Biureto).

Apresentação de resultados: Adultos: Soro/Plasma: 6,0 A 8 g/dL

ANEXO C - Marcadores de Perfil Lipídico

Colesterol Total (COL) COLT- Características

O colesterol é um esteroide, sintetizado em vários grupos de tecidos, sobretudo no fígado e parede intestinal, cerca de três quartos é formado por síntese e um quarto tem origem na dieta alimentar. As determinações do colesterol são usadas para avaliar risco aterogênico e diagnóstico e tratamento de doenças que envolvam o risco elevado de colesterol como hipotireoidismo, síndrome nefrótica, diabetes e em perturbações do metabolismo lipídico e lipoprotéico.

Metodologia: Reação bioquímica colorimétrica enzimática de ponto final (col oxidase).

Apresentação de resultados: Adultos: Colesterol Total: < 200 mg/dL

Os valores de LDL- colesterol se baseia na Fórmula de Friedewald:

$LDL = \text{colesterol} - (\text{colesterol} - HDL + VLDL)$. Onde: $VLDL = \text{Triglicérides}/5$

Triglicérides (TRIG) - Características

Os triglicerídeos são os principais lípidos presentes no plasma humano, formam-se na mucosa intestinal pela esterificação do glicerol e ácidos gordos livres, são liberados para os gânglios linfáticos mesentéricos, viajam pela corrente sanguínea acoplados a proteína VLDL e são distribuídos pela maioria dos tecidos, para armazenamento. Os triglicerídeos são os lipídios mais armazenados pelos seres humanos e são cerca de 95% dos lípidos do tecido adiposo. Níveis elevados estão associados a aterosclerose grave, e associados a hiperlipidemia podem ser um traço congênito ou consequências de doenças como diabetes mellitus, nefrose, obstrução biliar e doenças metabólicas com alterações endócrinas.

Metodologia: Reação bioquímica enzimática de ponto final (Lipase)

Apresentação de resultados: Adultos: Colesterol Total: < 200 mg/dL

Lipoproteínas de Alta Densidade - HDL Colesterol (HDL) - Características

As lipoproteínas de alta densidade (HDL) são responsáveis pelo transporte inverso do colesterol das células periféricas para o fígado, onde é transformado em ácidos biliares que são excretados para o intestino, através das vias biliares. O HDL em altas concentrações são protetores contra doenças coronárias, e em baixas concentrações, em conjunto com triglicérides elevados, aumentam o risco cardiovascular.

Metodologia :Reação bioquímica direta enzimática Trinder de ponto final (PEG-Colesterol Esterase e Oxidase).

Apresentação de resultados: Os valores de LDL- colesterol se baseia na Fórmula de Friedewald: $LDL = \text{colesterol} - (\text{colesterol} - HDL + VLDL)$; onde: $VLDL = \text{Triglicérides}/5$

ANEXO D - Marcadores de Perfil Renal

Acido Urico (ACUR) - Características

O ácido úrico é um composto orgânico de carbono, nitrogênio, oxigênio e hidrogênio ($C_5H_4N_4O_3$), é encontrado em pequenas quantidades na urina como resultado da quebra das moléculas de purina por ação da enzima xantina oxidase. Depois de utilizadas, as purinas são degradadas e transformadas em ácido úrico, parte permanece no sangue e o restante é eliminado pelos rins.

Metodologia: Reação bioquímica cinética enzimática uricase (método IFCC).

Apresentação de resultados: Adultos: homens: (≤ 65 anos) < 7,0 mg/dl / (>65 anos) < 8,4 mg/dL - Mulheres: < 5,7 mg/dL

Creatinina (CREA) Características

A creatinina é um produto da degradação da fosfocreatina (creatina fosforilada) no músculo, geralmente é produzida em uma taxa praticamente constante pelo corpo e a taxa é diretamente proporcional à massa muscular.

Metodologia: Reação bioquímica cinética de dois pontos (Picrato - Jaffé).

Apresentação de resultados: São expressos em mg/dL.

Adultos soro/plasma: homens: 0,70 a 1,20 mg/dl/

Mulheres: 0,50 a 0,90 mg/dL

Ureia (UREA) UR - Características

A uréia é um composto orgânico (CH_4N_2O) e o principal produto final do metabolismo de nitrogênio protéico. É sintetizada no ciclo da uréia no fígado a

partir da amônia produzida na desaminação dos aminoácidos. É excretada pelos rins, pelo suor em quantidades mínimas, sendo degradada nos intestinos por ação bacteriana.

Metodologia: Reação bioquímica enzimática UV cinética de dois pontos (Urease - GLDH).

Apresentação de resultados: Adultos: soro/plasma: ($\leq$ 65 anos): <50mg/dl
soro/plasma: (> 65 anos): <71mg/dl

ANEXO E - Marcadores de Perfil Cardíaco

Creatina Quinase (**CPK**) - **CK** - Características

A creatina-quinase (CK) é uma enzima dimérica que surge sob quatro formas diferentes: uma isoenzima mitocondrial e as isoenzimas citosólicas CK-MM (tipo músculo), CK-BB (tipo cérebro) e CK-MB (tipo miocárdio). A determinação das atividades da CK e respectiva iso-enzima é utilizada no diagnóstico e monitorização do enfarte do miocárdio e de miopatias como a distrofia muscular progressiva de Duchenne. Após lesão do miocárdio, como sucede no enfarte agudo do miocárdio, a CK é libertada das células danificadas do miocárdio. Em casos precoces, é possível observar-se um aumento da atividade da CK apenas 4 horas após um enfarte. A atividade da CK atinge um nível máximo ao fim de 12–24 horas, voltando a descer para o intervalo normal ao fim de 3–4 dias. É muito provável a ocorrência de lesões do miocárdio quando a atividade da CK total é superior a 190 U/l, a da CK-MB é superior a 24 U/l (37°C) e a fração de atividade da CK-MB ultrapassa 6% do total.

Metodologia: Reação bioquímica cinética enzimática método IFCC.

Apresentação de resultados: Adultos: homens: 39 a 308 U/L

Mulheres: 26 a 192 U/L

Lactato Dehidrogenase (LDH) – Características

A enzima lactato desidrogenase (LDH) encontra-se amplamente distribuída pelos tecidos, sobretudo no coração, fígado, músculos e rins. A LDH no soro pode ser separada em cinco isoenzimas diferentes com base na respectiva mobilidade electroforética. Cada isoenzima é um tetrâmero composto por duas subunidades diferentes. Estas duas subunidades foram denominadas coração e musculatura, com base nas respectivas cadeias polipeptídicas. Existem dois homotetrâmeros, LDH-1 (coração) e LDH-5

(musculatura) e três isoenzimas híbridas. Os níveis mais elevados são observados nos doentes com anemia megaloblástica, carcinoma disseminado e choque. Ocorrem aumentos moderados nas perturbações musculares, síndrome nefrótica e cirrose. Há ligeiros aumentos da atividade da LDH nos casos de enfarte do miocárdio ou pulmonar, leucemia, anemia hemolítica e hepatite não-viral.

Metodologia : Reação bioquímica cinética enzimática UV (método IFCC).

Apresentação de resultados : Adultos: homens: 135 a 214 U/L

Mulheres: 135 a 225 U/L

ANEXO F - Marcadores de Perfil Ósseo

Cálcio (CAL) CALC - Características

O teor de cálcio num adulto é cerca de 2% do peso corporal, sendo 99% sob a forma de hidroxapatite de cálcio nos ossos e menos de 1% no ECS (espaço extracelular) ou ICS (espaço intracelular) extra-ósseo. O nível de cálcio no soro no ECS está em equilíbrio dinâmico com a fração rapidamente permutável de cálcio ósseo. Os íons de cálcio afetam a contração do coração e da musculatura esquelética e são essenciais para o sistema nervoso, importante na coagulação sanguínea e na mineralização óssea. No plasma, está ligado às proteínas ($\pm 40\%$), com 10% na forma de complexos inorgânicos e 50% como cálcio livre (ionizado). A hipocalcemia é o tétano latente ou manifesto e osteomalacia, causada pela ausência ou deficiência do funcionamento da paratiróide ou deficiência da vitamina D. A hipercalcemia é um aumento da mobilização de cálcio no sistema esquelético (osteoporose) ou aumento da absorção intestinal. A maior parte dos casos são causados pelo hiper-paratireoidismo primário (pHPT) ou metástases ósseas do carcinoma da mama, próstata ou tireóide e carcinoma brônquico.

Metodologia: Reação bioquímica colorimétrica de ponto final (Cresolftaleína).

Apresentação de resultados: Adultos: Soro/Plasma: (≤ 50 Anos): 8,8 a 11,0 Mg/Dl. Soro/Plasma: (> 50 Anos): 8,4 a 9,7 Mg/Dl

Fósforo (PHOS) - Características

A maior quantidade de fósforo existente no organismo situa-se no osso ($\pm 88\%$), sob a forma de fosfato de cálcio, sob forma de hidroxapatite. A quantidade restante está envolvida no metabolismo intermédio dos hidratos de carbono e em substâncias importantes como fosfolípidos, ácidos nucleicos e ATP. O fósforo no sangue está sob a forma de fosfato inorgânico e de ácido

fosfórico organicamente ligado. A pequena quantidade de fósforo orgânico extracelular encontra-se quase exclusivamente sob a forma de fosfolípidos. O rácio fosfato/cálcio no sangue é de cerca de 6:10. Um aumento do nível de fósforo provoca uma redução do nível de cálcio. O mecanismo é influenciado por interações entre a paratormona e a vitamina D. O hipoparatiroidismo, a intoxicação por vitamina D e a insuficiência renal associada a uma redução da taxa de filtração glomerular do fosfato provocam hiperfosfatemia, que ocorre no raquitismo, hiperparatiroidismo e síndrome de Fanconi.

Metodologia: Reação bioquímica colorimétrica com Molibdato de amônia.

Apresentação de resultados: Adultos: 2,70 a 4,5 mg/dL

Magnésio (MAG) - Características

O magnésio é o quarto cátion mais abundante no organismo, cerca de 50 % está presente nos ossos, associado ao cálcio e ao fosfato, o restante é intracelular e uma pequena quantidade é encontrada no fluido extracelular e funciona como ativador de vários processos físico-químicos, como a fosforilação, síntese das proteínas. Também ajuda na condução neuromuscular e na excitabilidade do músculo esquelético e cardíaco. Os rins controlam a homeostase do magnésio e conserva o magnésio quando a ingestão é baixa e excreta o excesso quando é alta. Ocorrem aumentos das concentrações de magnésio sérico na insuficiência renal, na acidose diabética aguda, na desidratação ou na doença de Addison. A hipomagnesemia altera o mecanismo de condução do coração, causando parada cardíaca, também é observado no alcoolismo crônico, diarreia grave, pancreatite aguda, terapêutica diurética e com fluidos parentéricos prolongada, doenças renais como a glomerulonefrite e deficiências da reabsorção tubular. A diminuição das concentrações séricas de magnésio podem resultar em tetania, convulsões e arritmias cardíacas.

Metodologia: Reação bioquímica colorimétrica com Clorofosfonazo III

Apresentação de resultados: Adultos: 1,70 a 2,55 mg/dL

ANEXO G – Comitê de Ética do Instituto Adolfo Lutz

<p>GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS INSTITUTO ADOLFO LUTZ COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS CEUA-IAL</p>
<p>ANEXO E</p>		
<p>São Paulo, 23 de junho de 2014.</p>		
<p>Parecer Projeto 02/2014 – CEUA-IAL</p>		
<p>Venho pela presente informar que o projeto de pesquisa intitulado “Produção de Materiais de Referência Certificado em Bioquímica Laboratorial: Soro para Controle de Qualidade nos Laboratórios de Saúde Pública”, sob coordenação de Eliane Margareth Pimenta Carneiro, Núcleo de Hematologia e Bioquímica do Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz - Central, foi considerado APROVADO, e poderá ser realizado conforme procedimentos delineados apresentados a esta Comissão.</p>		
<p>O presente projeto utilizará no total 03 (três) equinos machos de 06 a 08 anos de idade com peso aproximado de 400 kg.</p>		
<p>Informamos que devem ser encaminhados relatórios ANUAIS à CEUA-IAL, no intuito de acompanharmos os procedimentos realizados segundo os aspectos éticos e sanitários e permitindo também a elaboração de relatórios anuais que são realizados por esta CEUA-IAL e que são encaminhados ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), conforme a Lei Federal 11.794 de 8 de outubro de 2008.</p>		
<p>Atenciosamente,</p> <p>Raquel dos Anjos Fazioli Coordenadora da CEUA-IAL</p>		
<p>RAF/raf</p>	<p>Endereço: Avenida Doutor Arnaldo, n° 355 11º Andar – Salas 1102 – Cerqueira César São Paulo – SP – CEP: 01246-902 Tel: (11) 3068-2887 – e-mail: ceua@ial.sp.gov.br</p>	

ANEXO H – Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 08/09/2014, **Aprovou** o Protocolo de Pesquisa nº 136/14, intitulado **“Produção de Materiais de Referência Certificado em Bioquímica Laboratorial: Soro para controle de Qualidade nos Laboratórios de Saúde Pública”** no programa de Pós Graduação da FMUSP, área de concentração de Fisiopatologia Experimental, da candidata **Eliane Margareth Pimenta Carneiro**, tendo como orientador o **Prof. Dr. Luis Fernandez Lopez**.

CEUA-FMUSP, 08 de Setembro de 2014

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua.fm@usp.br