

FOTOMETRIA E PADRONIZAÇÃO

JOSÉ CARLOS BASQUES

Edição: 20/04/2010 • Revisão: 23/11/2016

Labtest 

INDICE

Fotometria	03
Componentes Básicos da Fotometria	04
Fonte de energia Elétrica	04
Fonte de Energia radiante	04
Monocromador	04
Filtros de Vidro	04
Filtros de Interferência	05
Prismas	05
Grades de Difração	06
Cubetas	06
Detectores	06
Circuito Medidor	06
Microprocessador	07
Leis da Fotometria	07
Lei de Beer	09
Problemas de Fotometria - Energia Parasita	10
Resolução e Faixa de Emissão	10
Seleção da Área Espectral	11
Faixa Útil de Trabalho	12
Uso de Brancos	12
Padronização	
Material Volumétrico	13
Produtos Químicos	14
Preparo de Soluções	15
Expressões de Concentração	15
Problemas de Diluição	16
Preparo de Padrões – Cálculo de Concentração	17
Calibração	19
Validação de Métodos	22
Comparação de Métodos	23
Bibliografia	24

FOTOMETRIA

Muitas determinações realizadas no laboratório clínico são baseadas em medições de energia radiante transmitida, absorvida, dispersa ou refletida sob condições controladas. Mostraremos aqui sucintamente os princípios envolvidos nestas medições.

A fotometria clássica é, sem dúvida, um dos maiores trunfos de que dispõe o laboratório na atualidade. Esta técnica, continuamente aperfeiçoada, ainda permanecerá durante longo período sendo um dos mais úteis instrumentos de medida.

Quando usamos a espectrofotometria como processo de medida, basicamente estamos empregando as propriedades dos átomos e moléculas de absorver e emitir energia eletromagnética em uma das muitas áreas do espectro eletromagnético (Tabela 1).

	Raios Gama	Raios X	Ultra Violeta	Visível	Infra Vermelho	Micro Ondas	Ondas de Rádio
Angstroms (Å)	1	10	1800	3800	7000	-	-
Nanômetros (nm)	-	-	180	380	700	-	-
Micra (μ)	-	-	-	-	0,7	400	-
Centímetro (cm)	-	-	-	-	-	0,04	25

Tabela 1 – Características do espectro eletromagnético radiante (EMR). Os números identificam o limite inferior dos comprimentos de onda de cada radiação.

Ao falarmos em fotometria pensamos instintivamente em luz. Na realidade a porção visível do espectro eletromagnético (EMR) é uma pequena porção e aquela que excita a retina produzindo nosso mais importante sentido, a visão. Esta relação fotometria-luz é desvantajosa porque encaramos o EMR em termos de luz e cor, quando deveria ser considerado em termos de energia, o que é a realidade.

Esta energia é propagada sob forma de ondas que poderiam ser esquematicamente consideradas como uma união de vales e elevações que partem do ponto de emissão da energia. A distância entre dois pontos mais altos de duas elevações contínuas é denominada comprimento de onda (Figura 1). Os comprimentos de onda variam de menores que 1 angstrom ou 0,1 nm (raios gama) a maiores que 25 cm (ondas de rádio).

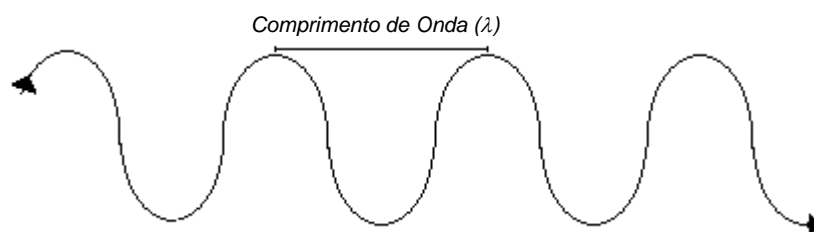


Figura 1 – Representação esquemática da propagação da energia radiante.

Um nanômetro (nm) é igual a 10^{-9} metros, sendo a unidade empregada para medida do comprimento de onda. A quantidade de energia é inversamente proporcional ao comprimento de onda e, portanto os menores comprimentos de onda fornecem os maiores níveis de energia.

Instrumentos modernos isolam uma faixa estreita do comprimento de onda do espectro. Aqueles que utilizam filtros são denominados fotômetros e aqueles que utilizam prismas ou grades de difração são denominados espectrofotômetros.

Componentes Básicos da Fotometria

A Figura 2 esquematiza os componentes básicos da fotometria.

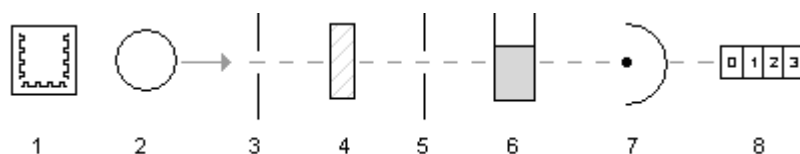


Figura 2 - Representação esquemática de um instrumento fotométrico.

- 1 – Fonte de energia elétrica – fornecedora de energia regulada, constante e apropriada para a operação do instrumento.
- 2 – Fonte de energia radiante – capaz de medir uma mistura de comprimentos de onda.
- 3 – Fenda de entrada da luz.
- 4 – Monocromador – utilizado para isolamento da porção desejada do espectro.
- 5 – Fenda de saída da luz.
- 6 – Cubeta - recipiente que recebe o líquido da reação a ser medido.
- 7 – Detector – utilizado para receber a energia radiante transmitida através da solução e transformá-la em energia elétrica.
- 8 – Circuito medidor – recebe a energia elétrica emitida pelo detector apresentando-a ao operador sob uma forma útil de medida: absorbância ou concentração.

Fonte de Energia Elétrica

Para que um instrumento fotométrico opere corretamente é necessário que receba energia elétrica adequadamente regulada. Esta energia, em muitos casos, necessita ser estabilizada com uso de equipamentos eletrônicos responsáveis por corrigir a tensão da rede elétrica fornecendo uma alimentação estável e segura. São os estabilizadores, que protegem os equipamentos contra sobretensão, subtensão e transientes.

Fonte de Energia Radiante

Tipos de fontes de luz usadas em espectrofotometria incluem lâmpadas incandescentes e lasers.

A lâmpada de Tungstênio é a mais utilizada fonte de energia radiante para o ultravioleta próximo e para o visível.

Monocromador

Um sistema para isolamento da energia radiante de um requerido comprimento de onda, excluindo a dos outros comprimentos de onda é chamado de monocromador. Os monocromadores podem ser filtros, prismas ou grades de difração.

Filtros de Vidro:

Podemos considerar dois tipos de filtro de acordo com seu desempenho.

O **filtro de corte** produz um nítido corte no espectro com transmitância quase nula de um lado e grande transmitância do outro. Este tipo de filtro é usado para eliminar energia estranha, espectros de segunda ordem etc. (Figura 3).

O **filtro composto** é construído pela associação de dois ou mais filtros de corte e transmite uma faixa definida do espectro. É o tipo mais comumente empregado nos fotocolorímetros. Na realidade o filtro composto não é um monocromador porque transmite uma faixa muito ampla de comprimentos de onda. A capacidade de monocromatização de um filtro composto é dependente de sua faixa de emissão, que é definida como o intervalo de comprimento de onda entre os dois lados da curva de transmitância do filtro a uma transmitância igual à metade do pico de transmitância.

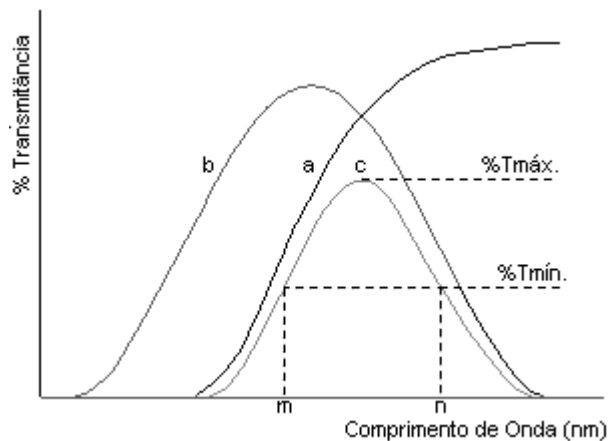


Figura 3 - Representação esquemática da característica de transmitância do filtro de corte (a) e um filtro composto com ampla faixa de emissão (b). O filtro com faixa de emissão estreito (c) é composto pela associação de dois filtros de corte com características opostas de Transmitância (a e b). A faixa de emissão do filtro c (distância n-m) é definida como a largura em nanômetros da curva de transmitância espectral, no ponto igual à metade da transmitância máxima.

Filtros de Interferência

São filtros de pequena faixa de emissão, transmitindo uma faixa muito estreita de comprimentos de onda. São constituídos por duas lâminas de vidro com os lados internos recobertos parcialmente por uma camada prateada semitransparente. As duas lâminas são separadas por um dielétrico (fluoreto de magnésio) de espessura controlada (Figura 4).

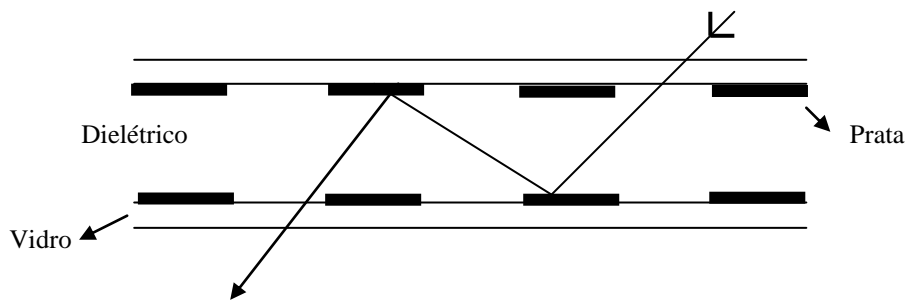


Figura 4 - Esquema de construção do filtro de interferência.

A energia radiante penetrando no filtro, perpendicular à superfície prateada, atravessa o dielétrico, é refletida pela camada prateada do lado oposto, retornando à primeira camada onde se reflete outra vez. Finalmente a energia radiante é transmitida através da camada prateada saindo do filtro com comprimento de onda selecionado. Ocorre neste processo interferência construtiva e destrutiva. A primeira ocorre quando o comprimento de onda é igual ou um múltiplo da espessura do dielétrico. Variações da espessura do dielétrico permitem a obtenção de filtros com diferentes faixas de emissão espectral. Estes filtros transmitem 40 a 60% de energia no seu pico de transmitância.

Podem ser produzidos filtros de muitas camadas através da superposição de várias camadas do dielétrico, cada uma correspondendo a uma fração do comprimento de onda desejado. Os filtros multicamada têm pequena faixa de emissão (5 a 10 nm).

Prismas

Produzem refração de energia radiante separando os vários componentes da energia composta. Os pequenos comprimentos de onda são refratados em grau maior, o que produz um espectro não linear com pequena definição nos grandes comprimentos de onda. Estes problemas requerem sistemas mecânicos e óticos relativamente complexos para permitirem a seleção de porções espectrais de pequena faixa de emissão e grande pureza espectral.

O prisma necessita receber energia radiante através de uma fenda de entrada e o isolamento espectral é feito por uma fenda de saída. Por razões óticas as fendas devem ser curvas e teoricamente devem ser infinitamente estreitas, mas praticamente devem ser suficientemente largas para permitirem passagem de energia radiante suficiente para medições exatas. Este é um dos fatores de limitação porque quanto mais larga a fenda maior é a faixa de emissão.

A largura da fenda será tanto menor quanto maior for o comprimento de onda desejado. Os instrumentos equipados com prismas têm fendas de entrada e saída que podem ser ajustadas em uma operação concomitante com o ajuste do comprimento de onda. Os prismas permitem o isolamento de faixas do espectro com diminuta faixa de emissão (0,5 a 1,5 nm).

Grades de Difração

São produzidas pela evaporação de uma película de um “alloy” (alumínio-cobre) na superfície ópticamente lisa de um vidro. São feitos sulcos bastante precisos na superfície do “alloy” com um número que pode variar de algumas a várias centenas por centímetro quadrado. Quanto maior o número de sulcos, maior é a capacidade de difração da grade e menor a faixa de emissão. Grades com boa capacidade de difração podem ter de 1000 a 2000 sulcos/mm.

A grade de difração utiliza o princípio de que os raios de energia radiante sofrem refração ao encontrar um ângulo agudo e o comprimento de onda fornecido varia com o grau de difração. Os sulcos da grade funcionam como pequenos prismas. A energia é refletida ou transmitida de maneira a fracionar a energia radiante composta em seus vários comprimentos de onda.

A grade de difração concorre para fornecer acentuada energia parasita ao sistema, o que aumenta bastante o erro fotométrico. Uma maneira de eliminação desta energia parasita consiste na associação de duas grades ou a introdução de um filtro de corte após a emissão da grade.

Cubetas

As cubetas são provavelmente a porção mais negligenciada do sistema fotométrico, apesar de serem de grande importância. Quando não são bem cuidadas contribuem decisivamente para aumentar o erro fotométrico.

A cubeta é um recipiente pequeno usado para conter o material a ser analisado. Podem ser quadradas, retangulares ou redondas e são construídas de vidro, de sílica (quartzo) ou plásticas.

Cubeta Redonda – Esta cubeta não é polida, podendo apresentar irregularidades de superfície. Está sujeita aos erros de refração e possui efeito de lente.

Cubeta Quadrada ou Retangular – Têm faces planas e paralelas. É polida ópticamente. Geralmente têm 1,0 cm de espessura de solução. Cubetas de vidro (boro silicato) são usadas nas medições da porção visível do espectro. Para uso em comprimentos de onda abaixo de 340 nm são usadas cubetas de quartzo.

Em analisadores automáticos, são usadas cubetas de plástico, com bom desempenho para uso tanto no visível quanto no ultravioleta, requerendo cuidados com manuseio, uso de determinados produtos de limpeza e temperatura. Estas cubetas geralmente são descartáveis, devendo ser usadas uma única vez.

Detectores

Fotodetectores são dispositivos que variam sua resposta em função da intensidade de luz incidida na superfície fotossensível (Ex: foto transistor, fotodiodo, etc.).

O tubo fotomultiplicador é o fotodetector mais comum usado para medir a intensidade de luz nas regiões ultravioleta e visível do espectro. A luz é detectada em uma janela óptica, excitando os elétrons no cátodo, sendo os mesmos direcionados para o vácuo e acelerados. Após atingir o ânodo do fotomultiplicador, o sinal é condicionado por um circuito eletrônico externo.

Fotodiodos são componentes semicondutores com junção P-N (diodos) sensíveis à intensidade luminosa, variando sua resistência proporcionalmente à intensidade luminosa incidente na sua “janela” fotodetectora.

Circuito Medidor

A energia elétrica do detector é mostrada em algum tipo de medidor ou sistema de leitura. No passado dispositivos analógicos foram amplamente utilizados como dispositivos de leitura em espectrofotômetros. Foram substituídos por dispositivos de leitura digital que mostra display numérico de absorvância ou valores convertidos em concentração. O sinal de saída do detector (em tensão) é condicionado, processado e enviado a um dispositivo de saída para apresentação do resultado. O valor de absorvância ou concentração normalmente é mostrado através de um display ou terminal conectado a computador externo com software de gerenciamento.

Microprocessador

Com microprocessadores e software residente, dados do calibrador são armazenados e sinais digitais do branco são subtraídos do calibrador, a concentração de controles e amostras é automaticamente calculada. Também dados de vários calibradores são armazenados para traçar uma curva de calibração, mostrar as absorbâncias obtidas ou traçar a curva para inspeção visual e calcular os resultados das amostras baseados na curva ou em algum cálculo matemático. O microprocessador e software residente são usados também para converter dados de uma reação cinética em concentração ou atividade enzimática.

Leis da Fotometria

Quando um raio de energia radiante atravessa uma solução, a energia incidente (I_0) será sempre mais intensa que a energia emergente (I). Esta atenuação da intensidade de energia pode ser atribuída a: (1) Reflexões nas interfaces entre o ar e a parede da cubeta e entre a solução e a parede da cubeta, (2) dispersão por partículas presentes na solução e (3) absorção da energia pela solução (Figura 5).

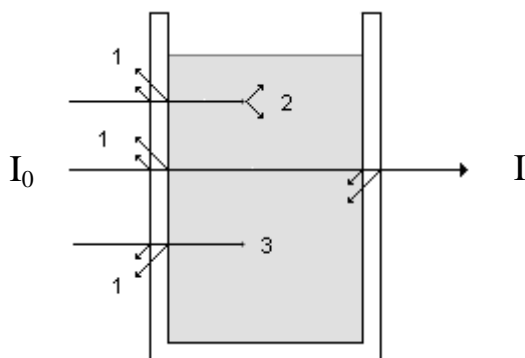


Figura 5 - Absorção da energia radiante que atravessa uma solução. 1 – reflexão nas interfaces, 2 – dispersão por partículas presentes na solução, 3 – absorção própria da solução.

Nas aplicações da fotometria, a absorção da energia é o fator primário na redução da energia incidente. Quando se usa energia monocromática (comprimento de onda simples), a fração da radiação absorvida pela solução, ignorando perdas por reflexão e dispersão, será função da concentração da solução e da espessura da solução. Matematicamente esta função pode ser definida como:

$$\frac{I}{I_0} = e^{-abc}$$

I = Intensidade de energia emergente

I_0 = Intensidade de energia incidente

e = base dos logaritmos neperianos: 2,303

a = absorvidade constante que depende do comprimento de onda

b = espessura da solução atravessada pela radiação

c = concentração da solução

Esta fórmula estabelece que quando a energia radiante monocromática atravessa uma solução, a quantidade de energia transmitida diminui exponencialmente com: (1): aumento da espessura da solução e (2): aumento da concentração ou intensidade de cor da solução. O primeiro conceito deriva da Lei de Lambert e o segundo da Lei de Beer, Estes dois conceitos são denominados algumas vezes de Lei de Lambert-Beer. Entretanto como as medidas fotométricas são realizadas com espessura constante da solução e somente a concentração é variável, é usual mencionar só a Lei de Beer.

A relação energia emergente/energia incidente indica a transmitância da solução.

$$T = \frac{I}{I_0}$$

Se uma determinada solução não absorve energia, I e I_0 têm o mesmo valor e I/I_0 será igual a 1. Podemos então concluir que qualquer solução que absorva energia terá transmitância menor que 1. Para evitar operações com decimais usou-se o artifício da multiplicação por 100. Assim quando I e I_0 são iguais, $T = 1 = 100\%$.

A absorção de energia radiante é função logarítmica e isto pode ser provado através do seguinte exemplo: Consideremos 7 filtros com capacidades iguais de absorção, colocados um após o outro, sendo que cada filtro absorve 20% de energia incidente. A energia incidente (I_0) no primeiro filtro é igual a 100 e logo a emergente (I) será igual a 80. Esta passará a ser a energia incidente (I_0) no segundo filtro e a energia transmitida (I) será igual a 64. Na continuação do processo obteremos a seguinte progressão: 100 – 84 – 64 – 51,2 – 42 – 33,6 – 27 e 21,5.

Se plotarmos estes valores em papel linear obteremos uma curva logarítmica, mas em papel mono logarítmico obteremos uma curva reta (Figura 6).

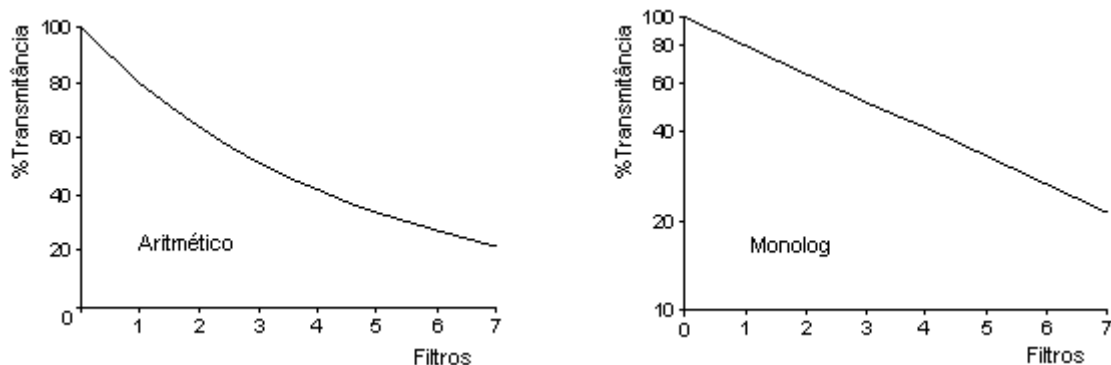


Figura 6 - Curvas de Absorção de energia radiante traçadas em papel aritmético e papel mono logarítmico.

Voltando às Leis de Lambert-Beer podemos matematicamente deduzir que:

$$\frac{I}{I_0} = e^{-abc}$$

$abc = B$ (absorbância neperiana), portanto:

$$\frac{I}{I_0} = e^{-B} \quad \text{ou} \quad \log \frac{I_0}{I} = B$$

Esta equação pode ser convertida a logaritmos de base 10, assim teremos:

$$\log \frac{I_0}{I} = A \quad \text{ou} \quad A = \log I_0 - \log I$$

Como $I_0 = 100$ teremos:

$$A = \log 100 - \log T \quad \text{ou} \quad \text{Absorbância} = 2 - \log T$$

Lei de Beer – Relação entre Transmittância, Absorbância e Concentração

A Lei de Beer estabelece que a concentração de uma substância seja diretamente proporcional à intensidade de luz absorvida ou inversamente proporcional ao logaritmo da luz transmitida (Figura 7).

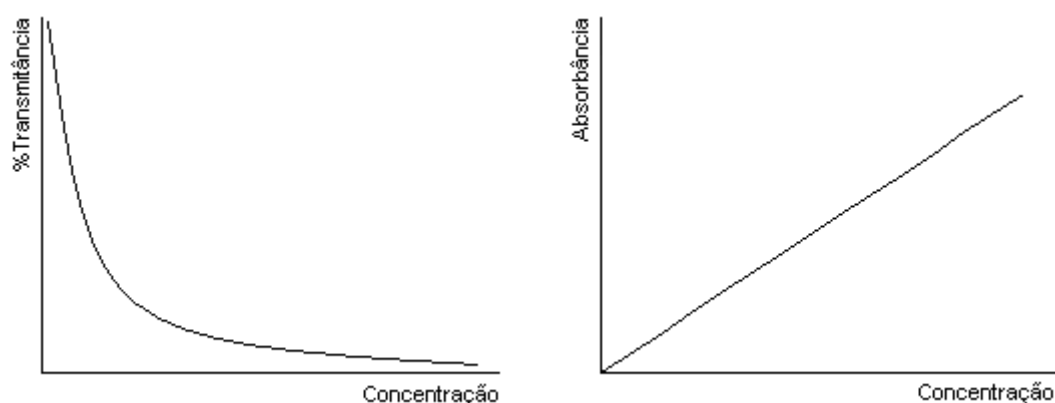


Figura 7 - Relação Absorbância e % Transmittância

Matematicamente a Lei de Beer é expressa como:

$$A = abc \quad (1)$$

A = Absorbância

a = absorvidade constante que depende do comprimento de onda

b = espessura da solução atravessada pela radiação

c = concentração da solução

Esta equação Forma a base da análise quantitativa da absorção fotométrica.

Aplicação da Lei de Beer

Na prática a proporção direta entre absorbância e concentração é estabelecida experimentalmente para dado instrumento em condições específicas. Frequentemente existe uma relação linear até uma determinada concentração ou absorbância. Quando esta relação ocorre, é dito que a reação obedece a Lei de Beer até este ponto. Sendo assim, um fator de calibração pode ser usado para calcular a concentração de uma amostra desconhecida pela comparação com um calibrador.

Rearranjando a equação (1) teremos:

$$a = \frac{A}{bc} \Rightarrow \frac{A_1}{b_1c_1} = \frac{A_2}{b_2c_2}$$

Como a espessura da solução (b) é constante no instrumento ($b_1 = b_2$), teremos:

$$\frac{A_1}{c_1} = \frac{A_2}{c_2} \Rightarrow \frac{A_c}{c_c} = \frac{A_u}{c_u}$$

Onde A_c e c_c são absorbância e concentração do calibrador e A_u e c_u são absorbância e concentração do desconhecido.

Demonstrando a equação para a concentração do desconhecido:

$$c_u = \frac{A_u}{A_c} \times c_c \quad \text{ou} \quad c_u = A_u \times \frac{c_c}{A_c} \quad \text{como} \quad \frac{c_c}{A_c} = k \rightarrow c_u = A_u \times k$$

O valor de k é determinado pela medição da absorbância do calibrador (A_c) de valor conhecido (c_c).

Denominamos k como sendo o Fator de Calibração (FC).

O FC somente deve ser utilizado quando a reação obedece à Lei de Beer no intervalo proposto.

Problemas de Fotometria

Energia Parasita

É um tipo de energia indesejável, também chamada luz adversa ou espúria, sendo constituída por qualquer tipo de energia dentro do instrumento, que chega até a cubeta com comprimento de onda diferente do indicado na escala do monocromador e promove a obtenção de resultados incorretos. A energia parasita pode ser causada por imperfeições na grade de difração ou prisma, defeitos no sistema ótico, deposições no vidro da lâmpada, orifícios permitindo entrada de luz externa, etc.

Podemos trabalhar com um instrumento fornecendo altos níveis de energia parasita se estes níveis forem mantidos constantes e se trabalharmos com curva de calibração, pois a energia parasita é responsável por desvios de linearidade. (Figura 8)

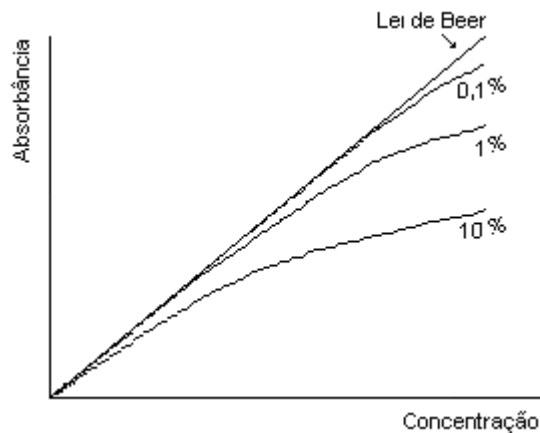


Figura 8 - Efeito de várias porcentagens de energia parasita no seguimento da Lei de Beer.

Os problemas de energia parasita são mais graves nos limites de comprimento de onda.

Resolução e Faixa de Emissão

Resolução é a capacidade de um instrumento fotométrico em detectar alterações na absorbância ocorrendo em uma estreita faixa de comprimento de onda (Figura 9). Esta capacidade depende da faixa de emissão e da porcentagem de energia parasita.

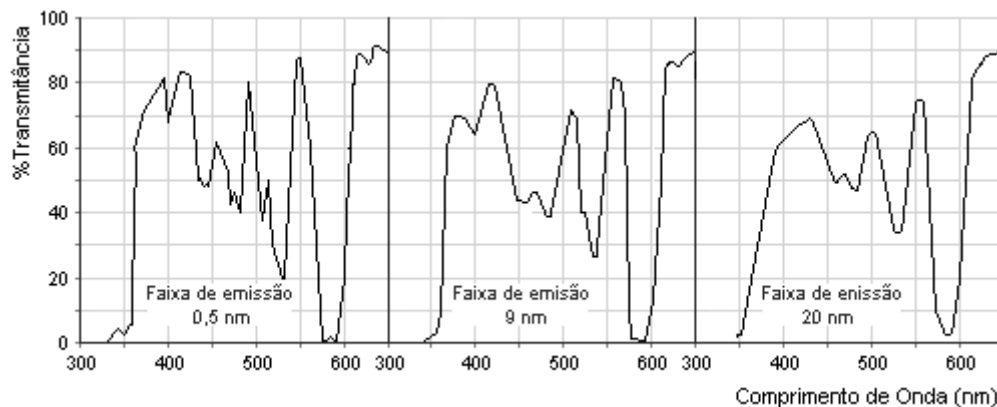


Figura 9 - Curvas de Transmissão de um filtro de didímio realizada em três espectrofotômetros com faixas de emissão de 0,5; 9 e 20 nm.

A faixa de emissão é também responsável pela linearidade da resposta em espectrofotômetros ou colorímetros.

Seleção da Área Espectral

Quando se realiza uma medida fotométrica deve-se utilizar uma faixa do espectro na qual a energia radiante seja absorvida ao máximo ou aproximadamente ao máximo a fim de se obter o mais alto grau de sensibilidade. Uma solução azul absorve o vermelho com maior intensidade e, portanto deve ser escolhida a porção vermelha para medida de solução azul. Na maioria das determinações colorimétricas utiliza-se sempre uma faixa espectral cuja cor é complementar à da solução a ser medida (Tabela 2).

Comprimento de Onda	Cor	Cor Complementar (Cor da solução analisada)
380 – 420	Violeta	Verde – Amarela
420 – 440	Violeta – Azul	Amarela
440 – 470	Azul	Laranja
470 – 500	Azul – Verde	Vermelha
500 – 520	Verde	Púrpura
520 – 550	Amarela – Verde	Violeta
550 – 580	Amarela	Violeta – Azul
580 – 620	Laranja	Azul
620 – 680	Vermelha	Azul – Verde
680 – 780	Púrpura	Verde

Tabela 2 - Espectro visível e cores complementares

Ocasionalmente uma medida fotométrica é feita em um comprimento de onda diferente daquele em que há o máximo de absorção. Isto promove uma redução da sensibilidade, mas é um artifício usado para obter linearização, aumento da faixa de trabalho ou eliminação de interferência como bilirrubina, hemoglobina, etc.

O melhor processo para avaliar a correta região espectral para uma medida fotométrica consiste no preparo da curva de absorção espectral, relacionando as absorbâncias e os respectivos comprimentos de onda (Figura 10).

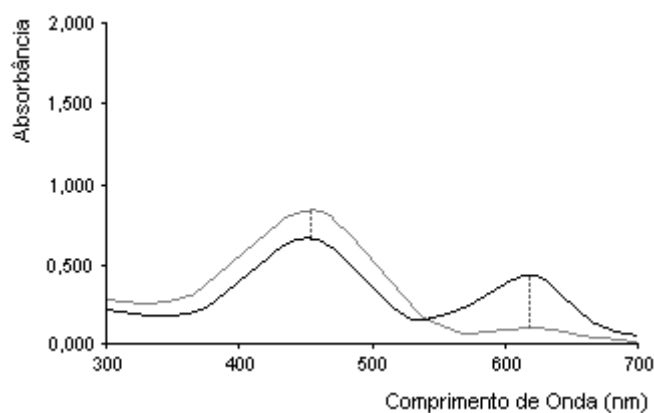


Figura 10 - Curva de absorção espectral da determinação de albumina pelo método VBC. Observar um pico de absorbância em 450 nm e outro em 620 nm (linha escura). A linha mais clara representa a curva do branco.

Na curva acima podemos observar que foram obtidos dois picos e será um destes o escolhido para as medidas fotométricas. O primeiro pico com grande absorbância em torno de 450 nm foi desprezado porque nesta região o branco do reagente tem absorbância maior que a absorbância da reação. O segundo pico em torno de 620 nm tem absorbância elevada, logo com maior sensibilidade e onde são mínimas as interferências de bilirrubina e hemoglobina.

Normas para escolha da região espectral:

- Escolher o comprimento de onda onde se obtêm a maior absorbância, se possível evitando as interferências fotométricas de hemoglobina, bilirrubina, turvação etc.;
- Caso as porções ascendentes e descendentes da curva não sejam linhas retas, provavelmente o sistema colorimétrico não segue a Lei de Beer;
- Devem-se usar os picos para a leitura colorimétrica porque pequenas variações no comprimento de onda produzem também pequenas variações na absorbância, enquanto que nas porções ascendentes e descendentes da curva, às pequenas variações do comprimento de onda correspondem grandes variações de absorbância.

Faixa Útil de Trabalho

Para obter uma exatidão máxima nas leituras fotométricas é necessário conhecer a faixa útil do colorímetro ou espectrofotômetro.

O manual do instrumento orienta quanto à faixa útil, geralmente acima de 2,000 de absorbância.

Uso de Brancos

O uso do Branco em fotometria é necessário para estabelecer a absorbância zero do reagente utilizado.

É necessário utilizar o Branco de reagentes como referência sempre que a absorbância da mistura de reagentes no comprimento de onda utilizado for diferente da absorbância da água.

Exemplo: Reação das Proteínas Totais onde o Reagente de Biureto apresenta uma absorbância em 545 nm em torno de 0,120. Ao utilizarmos o Reagente como Branco, para zerar o equipamento, estamos eliminando a contribuição desta absorbância nos resultados.

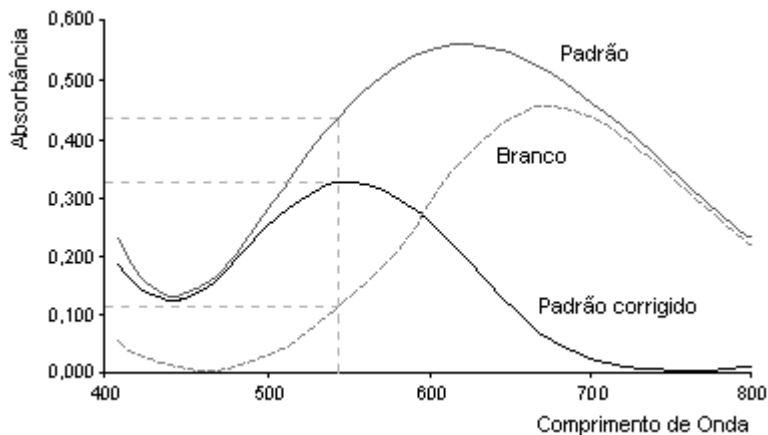


Figura 11 - Branco = Absorbância do Reagente (Branco da Reação) lida contra branco de água; Padrão - Absorbância do Padrão lida contra branco de água; Padrão corrigido = Absorbância da Reação do Padrão (usando o Reagente como Branco).

Modo de Leitura

Leitura Monocromática: A absorbância utilizada para cálculo é o resultado da medida realizada em um único comprimento de onda.

Leitura Bicromática: A absorbância utilizada para cálculo é o resultado da diferença entre as medidas realizadas no comprimento de onda primário e no comprimento de onda secundário.

Com a leitura Bicromática, podemos minimizar um erro sistemático constante no Teste, ou seja, minimizar interferências fotométricas da amostra, principalmente lipemia (Figura 12).

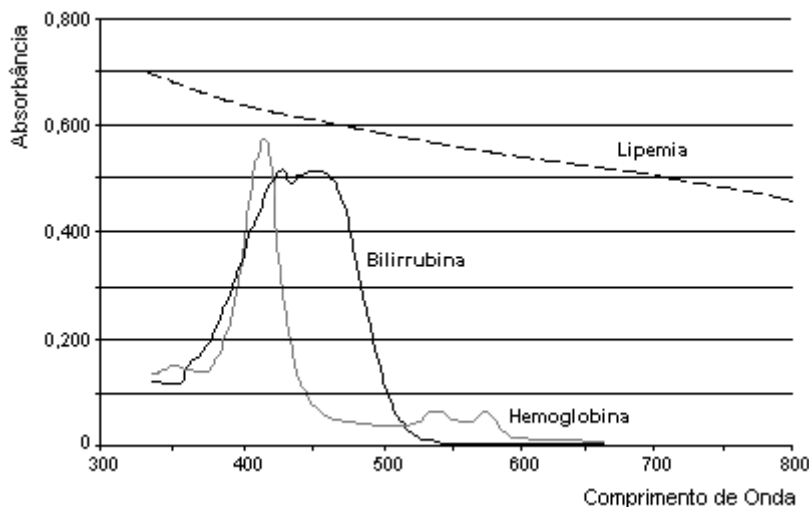


Figura 12 – Representação da interferência de Lipemia, Bilirrubina e Hemoglobina em diferentes comprimentos de onda.

PADRONIZAÇÃO

“Adoção de uma medida, especificação, paradigma ou tipo para uniformizar a produção ou a avaliação de qualquer coisa” (Dicionário Houaiss).

Material Volumétrico

A maioria dos procedimentos em Química Clínica requer medidas de volume. Para um trabalho exato é necessário ter certeza que o volume contido ou medido por uma peça da vidraria é realmente aquele indicado pela graduação.

Pipetas

Pipeta Volumétrica ou transferidora: planejada para medir um volume fixo de líquido constituindo-se de um bulbo cilíndrico contendo um tubo estreito em cada extremidade (Figura 13).

A exatidão da calibração desta pipeta é diretamente proporcional à sua capacidade, para micro análises devem ser utilizadas pipetas automáticas. Estas pipetas são calibradas para utilização em medida de amostras não viscosas, filtrados e padrões.

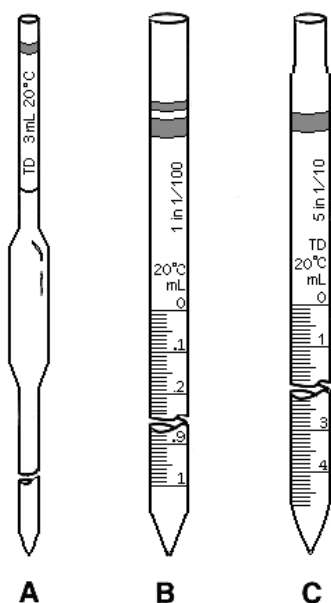


Figura 13: A - Pipeta Volumétrica; B: Pipeta Mohr (escoamento parcial); C: Pipeta sorológica (escoamento total)

Pipeta graduada ou medidora: Consiste em um tubo de vidro graduado uniformemente em seu comprimento. Existem 2 tipos;

- Pipeta graduada de escoamento parcial: calibrada entre duas marcas;
- Pipeta graduada de escoamento total (sorológica), graduada até a extremidade inferior.

Estas pipetas são planejadas para medidas de volumes pré determinados e não são consideradas exatas para medir amostras e padrões.

Cuidados necessários para uso correto das pipetas:

- Utilizar sempre um dispositivo para a pipetagem (não pipetar com a boca);
- Utilizar a pipeta sempre na posição vertical (tanto para aspirar como para desprezar o líquido);
- Utilizar pipetas íntegras;
- Utilizar pipetas limpas e secas;
- Utilizar pipetas com volume total o mais próximo possível do volume a ser medido;
- Para medidas de soluções viscosas, evitar que o líquido ultrapasse muito a marca de medida, deve-se limpar a parte externa da pipeta e lavar a mesma várias vezes na solução ou reagente que irá receber o material pipetado;
- Nas soluções incolores coloca-se o menisco inferior na marca de calibração enquanto que nas soluções coradas o acerto se faz na parte superior do menisco.

Pipeta Automática

Pipetas usadas quando há a necessidade de se transferir volumes muito reduzidos (micropipetas ou pipetas automáticas). Permite medir pequenos volumes, da ordem de microlitros, com precisão e exatidão. Este tipo de pipeta utiliza ponteiras plásticas descartáveis.

Vidrarias

Outros materiais volumétricos de uso em laboratórios, como balões volumétricos, provetas e buretas, sendo de boa procedência têm calibração aceitável para a rotina do laboratório clínico. Um fator importante é a correta manutenção e limpeza desta vidraria. Vidraria corretamente limpa mantém a integridade das soluções utilizadas, permite medidas corretas e não interfere com as reações químicas.

Para verificar a limpeza da vidraria deve-se enchê-la de água, esvaziar e verificar se a água forma pequenas gotas na parede. Isto indica presença de impurezas, principalmente gordura. Se ao contrário a água forma uma fina película nas paredes, significa limpeza correta. Este teste não identifica um enxágue mal feito, como por exemplo, presença de detergente na vidraria. Outro fator a ser considerado é a qualidade da água deionizada utilizada no enxágue final do material.

Produtos Químicos

Substâncias químicas utilizadas no laboratório são classificadas em diferentes graus de pureza.

Padrão Primário: Substância química de elevada pureza utilizado no preparo de soluções padrões. É fornecido com análise de lote e deve ser 99,95% puro. Estes produtos químicos devem ser estáveis e de composição química definida, permitindo secagem em estufa (100 – 110 °C) sem mudanças na composição. Não devem ser higroscópicos a fim de que não absorvam água durante o manuseio.

Padrão Secundário: São substâncias ou soluções em que a concentração não pode ser determinada por pesagem do soluto. A concentração é avaliada por análise de uma amostra de valor conhecido ou utilizando um método de referência ou um padrão primário.

Reagentes para Análise: Existem várias nomenclaturas como: ACS, AR, PA, etc. Neste grau de pureza se encontram os reagentes que preenchem as especificações para uso em análise qualitativa e quantitativa.

São obtidos em duas formas:

- Lote de reagente analisado: fornecidos em lotes analisados, tendo a quantidade de impurezas constante no rótulo (ex. Arsênico – 0,0005%).

- Limite máximo de impurezas: o rótulo contém uma relação dos limites máximos de impurezas (ex. metais pesados – máximo 0,001%). Neste caso as impurezas podem estar em limites bem inferiores aos rotulados, mas ao utilizar estes reagentes devemos considerá-los como contendo os limites máximos impressos nos rótulos.

Os reagentes que seguem as especificações da American Chemical Society (ACS) são de grande pureza e recomendados para análise de traços de metais e padronização de métodos de referência.

Reagente Quimicamente Puro: Esta designação não revela os limites tolerados de impurezas e as designações dos fabricantes não são uniformes. Reagentes desta categoria não devem ser usados na pesquisa e em várias técnicas em bioquímica clínica a menos que tenham sido testados para se assegurar de que as impurezas não causam problemas às reações químicas.

USP: São produtos que seguem as especificações da United States Pharmacopea e contém impurezas químicas que não produzem mal à saúde. Em muitos casos estes produtos são obtidos em graus de pureza que permitem seu uso em bioquímica clínica. Podem ser usados tanto para uso externo como para uso interno (podem ser ingeridos).

Cromatograficamente Puros: Destinados a processos analíticos altamente sensíveis, como a cromatografia. Indicam teores máximos de impurezas.

Espectrograficamente Puros: Destinados à análise espectroscópica. Possuem grau de pureza elevado.

Grau Técnico ou Comercial: Utilizado em indústrias e tem raras aplicações no laboratório clínico devido à quantidade de impurezas que apresentam.

Preparo de Soluções

Soluções são definidas como misturas homogêneas de duas ou mais substâncias. Elas são encontradas em qualquer um dos três estados da matéria: sólido, líquido e gasoso.

Todas as misturas gasosas são soluções porque qualquer mistura de gases é homogênea. Soluções sólidas, como certas ligas metálicas, são comuns. A grande maioria das soluções, entretanto, existe no estado líquido. Soluções líquidas são formadas pela dissolução de um gás, líquido ou sólido em um líquido.

Geralmente uma solução é constituída por um componente em maior quantidade, o solvente e, um ou mais componentes denominados solutos.

Solução diluída é aquela que contém uma quantidade relativamente pequena de soluto por volume de solução.

Solução concentrada contém grandes proporções de soluto. Soluções concentradas só são possíveis quando o soluto tem elevado grau de solubilidade.

Uma solução saturada existe quando moléculas do soluto estão em equilíbrio com excesso de moléculas não dissolvidas. Como a temperatura afeta a solubilidade deve-se especificar a temperatura exata para preparo da solução saturada.

Expressões de Concentração

A quantidade de soluto dissolvida em uma quantidade de solvente nos dá um valor que chamamos de concentração da solução. A concentração de uma solução é tanto maior quanto mais soluto estiver dissolvido em uma mesma quantidade de solvente.

A concentração das soluções pode ser expressa de diversas formas. O que se entende simplesmente por concentração é a quantidade de soluto existente em relação ao volume da solução. Matematicamente:

$$C = m/V \quad \text{onde } m \text{ é a massa de soluto e } V \text{ o volume da solução.}$$

A unidade usual para concentração é gramas por litro (g/L).

Há outros tipos de cálculo para a concentração em soluções:

Unidades Físicas:

- a) Peso do soluto por volume de solução (P/V). Ex. NaCl 20 g/L
- b) Porcentagem de peso na solução: gramas de soluto por 100 g de solução 2,0%
- c) Peso do soluto por peso de solvente (P/P).
- d) Volume de soluto por volume de solução (V/V). Estas soluções são as menos exatas e usadas quando o soluto é líquido.
- e) Partes por milhão: microgramas de soluto por grama de solução (PPM). Como 1 mL de água pesa 1 grama: PPM é igual a $\mu\text{g/mL}$ ou mg/L .

Unidades Químicas:

1- Solução molar (M): contém 1 mol em 1000 mL de solução.

2- Solução Normal (N): contém 1 equivalente grama de soluto em 1000mL de solução. 1 mol de HCl, 0,5 mol de H_2SO_4 e 0,333 mol de H_3PO_4 por 1000 mL de solução fornecem soluções 1 Normal.

3- Solução Molal (m): contém 1 mol de soluto em 1000 g de solvente. Comparada com a solução molar, que tem volume final de 1000 mL a solução molal é ligeiramente mais diluída.

4- Miligrama equivalente: É o equivalente grama (Eq. grama) de um soluto expresso em mg. O equivalente grama do ácido sulfúrico é 49,04 g e 1 miligrama equivalente é igual a 49,04 mg. O miligrama equivalente corresponde ao mEq (miliequivalente).

$$\text{mEq} = \frac{\text{Eq. grama}}{1000}$$

mg % podem ser convertidas a mEq/L usando a seguinte fórmula:

$$\text{mEq/L} = \frac{\text{mg\%} \times 10 \times \text{Valência}}{\text{peso atômico}}$$

As substâncias reagem em função de sua valência. Um mol de cálcio que é bivalente tem 2 vezes o poder de combinação de 1 mol de sódio. Portanto 1 mol de cálcio igual a 40 g tem o poder de combinação de 46 g de sódio (2 x 23).

Por este motivo as concentrações dos íons são expressas segundo seu poder de combinação (equivalente) usando-se então o miliequivalente por litro (mEq/L).

Problemas de Diluição

As soluções de uso em laboratório são soluções volumétricas que contêm uma quantidade definida de soluto em um determinado volume de solução. Em porcentagem, molar ou molal a massa do soluto em um dado volume da solução é igual ao produto da quantidade de volume vezes a concentração. Quando uma solução é diluída, seu volume é aumentado e sua concentração diminuída, mas a quantidade total de solutos permanece inalterada. Portanto soluções de diferentes concentrações, mas contendo as mesmas quantidades de soluto podem ser relacionadas:

$$\text{quantidade de soluto 1} = \text{volume 1} \times \text{concentração 1}$$

$$\text{quantidade de soluto 2} = \text{volume 2} \times \text{concentração 2}$$

$$\text{volume 1} \times \text{concentração 1} = \text{volume 2} \times \text{concentração 2}$$

Os volumes e concentrações nos 2 lados da equação devem ser expressos nas mesmas unidades:

$$\text{mL}_1 \times N_1 = \text{mL}_2 \times N_2$$

$$\text{litros}_1 \times M_1 = \text{litros}_2 \times M_2$$

$$\text{mL}_1 \times \text{g}\%_1 = \text{mL}_2 \times \text{g}\%_2$$

Preparar 500 mL de uma solução 0,16N de H₂SO₄ partindo de uma solução 1N:

$$\text{mL}_1 \times N_1 = \text{mL}_2 \times N_2$$

$$X \times 1,0 = 500 \times 0,16$$

$$X = (500 \times 0,16) / 1,0 \quad X = 80$$

Tomando 80 mL de H₂SO₄ 1N e diluindo a 500 mL obteremos a solução 1N.

Costuma-se expressar a diluição de uma solução por uma relação: 1/10. Isto quer dizer que 1 unidade de volume da solução original é diluída a um volume final de 10 unidades. Exemplificando tomamos 1 mL de solução a ser diluída e acrescentamos 9 mL de água (ou solução salina ou outro solvente apropriado), obtendo um volume final de 10 mL. Deduzimos então que o primeiro número da relação representa a quantidade em unidades de volume a ser tomada da solução original, enquanto que o segundo número significa o volume final da solução diluída. Os dois números da relação de diluição podem ser multiplicados ou divididos por um mesmo algarismo sem alterar a relação: 1/10 = 2/20 = 10/100 = 0,5/5 = 0,1/1.

Para preparar soluções a partir de líquidos deve-se considerar a densidade e a concentração da solução original.

Exemplo: Preparar 1000 mL de solução 1N do ácido "A". São fornecidos os seguintes dados:

Peso molecular = 100

Valência = 2

Densidade = 1,25 (1L = 1250 g)

Concentração = 80% (P/P)

Cálculos:

Solução 1N = 1 equivalente grama em 1000 mL

$$\text{Eq.grama} = \frac{\text{Peso molecular}}{\text{Valência}} \longrightarrow \frac{100}{2} = 50$$

Necessitamos de 50 gramas do ácido "A" para preparar uma solução 1N. Como a concentração é 80% teremos:

$$x = \frac{100 \times 50}{80} = 62,5$$

Se pesarmos 62,5 g do ácido "A" e diluirmos para 1000 mL com água deionizada teremos solução 1N.

Para evitar pesagem e utilizar medida de volume usamos o seguinte cálculo:

$$\begin{array}{l} 1250 \text{ g (densidade)} = 1000 \text{ mL} \\ 62,5 \text{ g} \qquad \qquad = y \text{ mL} \qquad \qquad \text{então } y = \frac{62,5 \times 1000}{1250} = 50 \end{array}$$

Logo se tomarmos 50 mL do ácido "A" e diluirmos para 1000 mL com água deionizada obteremos também solução 1N.

Para preparar a solução de normalidade desejada, dissolver a substância pesada ou medida, usando quantidade de solvente pouco menor que o volume requerido. Titular a solução usando um padrão primário. Para acertar a solução à normalidade desejada empregar a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Normalidade encontrada} - \text{Normalidade desejada}}{\text{Normalidade desejada}} \times \text{Volume requerido}$$

O valor encontrado é igual a mL de solvente a serem adicionados à solução.

Exemplo: deseja-se preparar 1000 mL de solução de HCl 1N. Adiciona-se 83 mL de HCl 37% a 900 mL de água. Feita a titulação foi encontrada uma normalidade de 1,01. Empregando a fórmula acima teremos:

$$\frac{1,01 - 1,00}{1,00 \times 1000} = 10 \text{ mL}$$

Deve-se acrescentar 10 mL de água deionizada à solução para obter a normalidade desejada.

Preparo de Padrões – Cálculo de Concentração

O padrão (material calibrador) é o elemento mais importante na dosagem bioquímica e sua correta manipulação, bem como estabelecimento de seu valor real na dosagem, é a peça fundamental para a exatidão dos resultados. Em muitas dosagens no laboratório podemos observar que o padrão é manipulado ou passa por etapas diferentes da amostra e nestes casos o valor a ser considerado para o padrão no momento de calcular o resultado final de uma amostra passa a ser diferente de sua concentração real. Podemos encontrar 4 situações:

1- O padrão passa pelas mesmas etapas da amostra. Neste caso o valor do padrão para efeito de cálculo é igual à sua concentração.

Exemplo: Na dosagem de Glicose PAP Labtest Ref. 84, o padrão passa pelas mesmas etapas da amostra. Se a concentração do padrão é de 100 mg/dL empregamos a seguinte fórmula:

$$\text{Conc. Teste (mg / dL)} = \frac{\text{Abs. Teste}}{\text{Abs. Padrão}} \times 100$$

2- A amostra é submetida a diluições ou desproteïnizações e o padrão só participa da colorimetria.

Empregamos a seguinte fórmula:

$$VP = \frac{V \times CP \times D}{A}$$

VP = valor do padrão a ser considerado para calcular a concentração da amostra;

V = volume do padrão utilizado na reação;

CP = Concentração do padrão utilizado na reação

D = diluição da amostra

A = Volume da amostra após diluição.

Exemplo 1: Na dosagem de Colesterol HDL Labtest Ref. 13 com precipitação a amostra é diluída **1:2**. Vamos utilizar **0,1** mL do padrão com concentração de **20 mg/dL** e **0,1** mL da amostra após diluição (precipitação).

$$VP(\text{mg / dL}) = \frac{0,01 \times 20 \times 2}{0,1} = 40$$

Exemplo 2: Na dosagem de Mucoproteínas Labtest Ref. 20 com precipitação a amostra é diluída **1:7,5**. Vamos utilizar **0,05** mL do padrão na concentração de **40 mg/dL** e **3,0** mL da amostra após diluição.

$$VP(\text{mg / dL}) = \frac{0,05 \times 40 \times 7,5}{3,0} = 5$$

3- A substância padrão em uma dosagem enzimática é a substância resultante da hidrólise enzimática.

O resultado é expresso em unidades internacionais, isto é, micromoles/litro/minuto.

$$VP = \frac{P \times 1000}{A \times T}$$

P = quantidade de substância padrão em micromoles colocada no tubo "padrão"

1000 = conversão para 1 litro de soro

A = alíquota da amostra

T = tempo de incubação em minutos

Exemplo: na dosagem de fosfatase alcalina usando timolftaleína monofosfato como substrato, incubamos **0,05** mL de soro durante **10** minutos com o substrato. Usamos 0,05 mL de solução de timolftaleína contendo 450 micromoles/litro (0,05 mL contêm **0,0225** micromoles). O resultado é expresso em unidades internacionais.

$$VP(\text{UI/L}) = \frac{0,0225 \times 1000}{0,05 \times 10} = 45$$

Consideramos então 45 como sendo a concentração efetiva do padrão na dosagem de fosfatase alcalina e empregamos a seguinte fórmula:

$$\text{Conc. Teste (UI/L)} = \frac{\text{Abs. Teste}}{\text{Abs. Padrão}} \times 45$$

CALIBRAÇÃO

Definição: Conjunto de operações que estabelecem a relação quantitativa entre a resposta de um sistema analítico e os valores de concentração ou atividade de um analito.

O procedimento de calibração deve ser estabelecido considerando as características de desempenho inerentes a cada sistema de medição. A quantidade e a concentração dos calibradores devem ser definidas visando à obtenção da calibração com o menor custo sem comprometimento da exatidão do resultado.

Durante o desenvolvimento de um sistema analítico, a preocupação com a sensibilidade é de importância fundamental para se determinar com exatidão, concentrações do analito na região de maior interesse médico, os chamados níveis de decisão.

O estabelecimento de um intervalo operacional visando minimizar as repetições do teste em amostras com concentrações acima do limite superior do intervalo de referência, também deve ser priorizado.

Assim sendo, o sistema analítico deve ter a sensibilidade ajustada convenientemente para atender a necessidade da aplicação. De um modo geral, a imprecisão da medição ao longo do intervalo operacional varia de maneira inversa a intensidade da resposta do sistema.

Em relação à resposta frente à concentração do analito na amostra, os sistemas de medição quantitativos utilizados no laboratório clínico são caracterizados durante seu desenvolvimento como: **Lineares** e **Não Lineares** (Figura 14).

Sistemas analíticos **Não Lineares** são aqueles que, no intervalo operacional especificado, **não respondem** de modo **proporcional** à concentração do analito na amostra, ou seja, não seguem a Lei de Beer.

São caracterizados como **Lineares** os sistemas analíticos que, no intervalo operacional especificado, **respondem** de modo **proporcional** à concentração do analito na amostra.

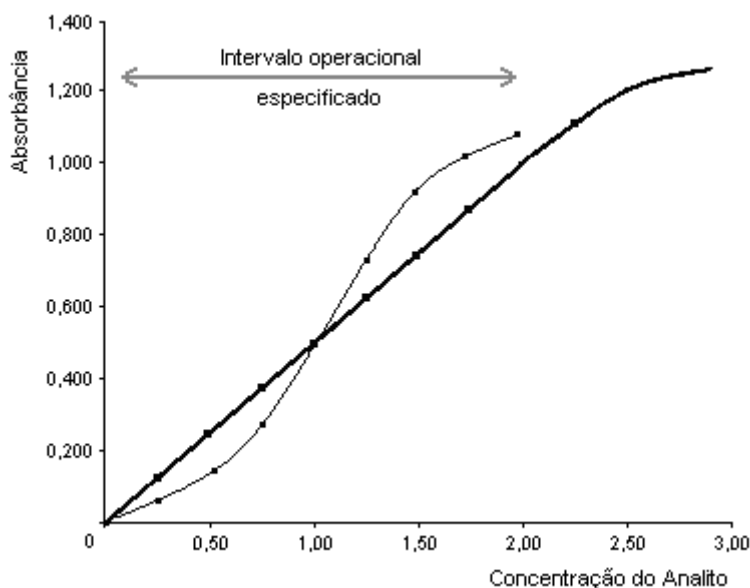


Figura 14 - Gráfico representativo de resposta linear dentro do intervalo operacional especificado (linha escura) e de resposta não linear (linha clara).

Características da calibração

Para se obter a calibração, determina-se a resposta do sistema para amostras com concentrações conhecidas do analito, denominadas padrões ou calibradores. O correto número de calibradores é definido em função da resposta do sistema. Em seguida, ao se estabelecer a relação entre as concentrações do analito nos calibradores e as respectivas respostas, obtém-se a calibração (Curva de calibração, Curva Padrão ou Fator de Calibração).

De maneira inversa, a concentração do analito em amostras de pacientes é determinada através da relação entre a resposta do sistema para estas amostras e a calibração.

Sistema Analítico Não Linear

A calibração em geral é obtida através da medição das respostas de quatro a seis níveis de calibradores.

É representada graficamente por uma curva e pode ser descrita por equações que representam as funções polinomial, logarítmica, exponencial, entre outras. A quantidade e concentração dos calibradores são definidas de modo a conferir maior exatidão dos resultados principalmente nas faixas de concentrações de maior utilidade médica. Os pontos de calibração devem necessariamente compreender todo o intervalo operacional sendo que de um modo geral, o limite superior do intervalo operacional do sistema é estabelecido pela maior concentração do analito utilizada na calibração.

Devido à característica da resposta frente a diferentes concentrações do analito, estes sistemas analíticos são obrigatoriamente calibrados através do ensaio de quatro a seis níveis de calibradores. Portanto, alterar a quantidade ou a concentração dos calibradores estabelecidos para o procedimento de calibração pode comprometer a exatidão do sistema.

Sistema Analítico Linear

A calibração deste sistema é frequentemente obtida através da medição das respostas de dois ou mais níveis de calibradores. A calibração é representada graficamente por uma reta descrita pela equação $y = ax + b$.

y = concentração do analito na amostra do paciente;

a = coeficiente angular da equação da regressão (fator de calibração);

x = absorvância obtida para a amostra do paciente;

b = coeficiente linear da equação da regressão. O valor de b é um valor absoluto expresso em unidades do analito que está sendo determinado;

Quando o coeficiente linear (b) da equação da regressão da calibração multiponto de um sistema analítico **não é significativamente** diferente de zero, o resultado do teste é obtido pelo produto ax (figura 15).

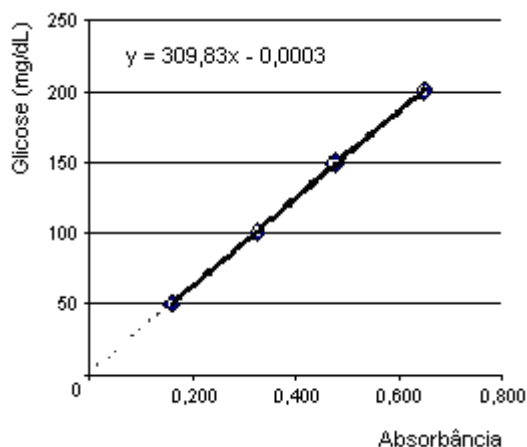


Figura 15 – Gráfico da curva de calibração obtida pela medição de quatro calibradores com diferentes concentrações. O coeficiente linear (b) da equação da regressão da calibração não é significativamente diferente de zero.

Se o coeficiente linear (**b**) da equação da regressão da calibração multiponto de um sistema analítico é **significativamente** diferente de zero, o resultado do teste é obtido pela adição do valor de **b** ao produto **ax** (Figura 16).

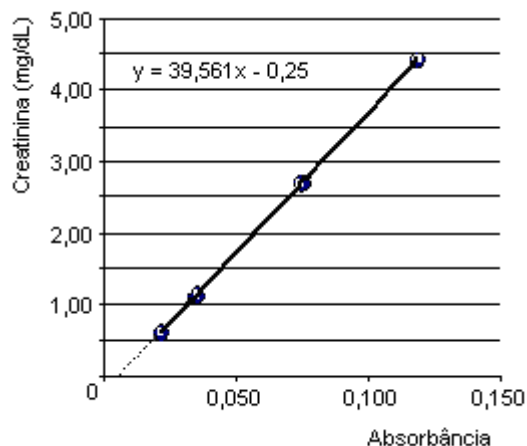


Figura 16 – Gráfico da curva de calibração obtida pela medição de quatro calibradores com diferentes concentrações. O coeficiente linear (*b*) da equação da regressão da calibração é significativamente diferente de zero.

Em ambos os casos, a calibração poderá ser obtida apenas pela associação das medições de um calibrador com concentração do analito igual a zero (água, NaCl 150 mmol/L ou o(s) reagente(s)) e de um calibrador com concentração do analito capaz de produzir uma resposta fotométrica situada na região de baixa imprecisão do sistema analítico.

Por responderem de modo proporcional à concentração do analito na amostra, as respostas do sistema para apenas duas diferentes concentrações do analito são suficientes para a obtenção da calibração. A utilização de dois calibradores com significativa diferença de concentração entre si melhora a exatidão e diminui a variabilidade entre calibrações.

Assim sendo, a calibração pode ser obtida através da medição da resposta do sistema para um calibrador com concentração do analito igual a zero (água, NaCl 150 mmol/L ou apenas o(s) reagente(s)) e outro calibrador com concentração do analito situada na região de menor imprecisão do sistema. Considerando que a imprecisão do sistema varia de modo inverso a sua resposta, a concentração do analito para o calibrador de valor diferente de zero deve se situar na região intermediária do sistema operacional.

VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

Um método de dosagem deve ter a capacidade de fornecer resultados de confiança. Um método que atenda este perfil deve preencher 2 requisitos:

a) **PRECISÃO**: capacidade do método de repetir os mesmos valores ou valores mais próximos nas dosagens em duplicata ou no dia a dia. A precisão é medida pelo Coeficiente de Variação (CV). Quanto menor o CV maior será a precisão (Figura 17).

b) **EXATIDÃO**: capacidade de fornecer resultados que mais se aproximam dos valores reais. Um método preciso não é necessariamente exato. (Figura 17)

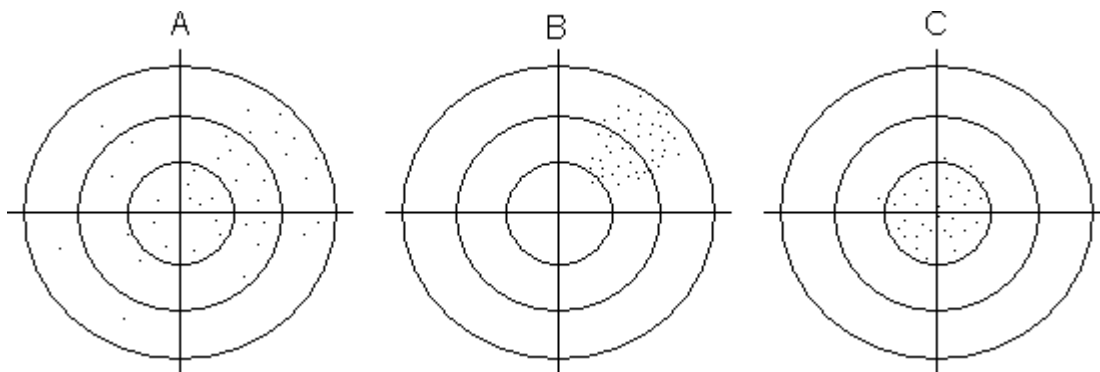


Figura 17- Demonstração esquemática da obtenção de valores e sua dispersão em relação à média.

Na Figura 17 acima observamos: O gráfico A descreve um método com **PRECISÃO** inaceitável, onde os resultados obtidos estão totalmente dispersos ao redor da média.

No gráfico B nota-se que existe uma pequena dispersão de valores, demonstrando boa **PRECISÃO**, mas devido a um ou mais erros sistemáticos, não se consegue obter **EXATIDÃO**, estando a média diferente do seu valor verdadeiro.

O gráfico C mostra claramente um método que reúne as propriedades de **PRECISÃO** e **EXATIDÃO**.

Avaliação da Imprecisão

Determina-se o coeficiente de variação (CV) em amostras com concentração do analito próximas dos níveis de decisão médica (concentração de um analito onde a interpretação médica é crítica para o paciente), analisar as amostras selecionadas, em duplicata, realizando duas corridas analíticas diárias durante 20 dias.

Para se obter o CV devemos calcular primeiramente o desvio padrão (DP) utilizando a fórmula:

$$DP = \sqrt{\frac{\sum (\bar{X} - X)^2}{N - 1}}$$

\bar{X} = média aritmética dos valores obtidos

X = valor de cada dosagem

N = número de dosagens

De posse do DP calculamos o CV:

$$CV = \frac{DP}{m\acute{e}dia} \times 100$$

A finalidade da avaliação da imprecisão é a verificação da reprodutibilidade no dia a dia porque podem variar as condições ambientais, os reagentes, o analista, etc.

Para que um método seja aceito como preciso e introduzido no laboratório, o CV não pode ser maior que o Erro Total do método.

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS

A Comparação de métodos tem o objetivo de estimar o erro sistemático (Bias) presente em um sistema ou método analítico quando comparado com outro sistema ou método, selecionado como sistema ou método comparativo.

No estudo de comparação de métodos, o objetivo é estimar a inexatidão do método teste ou verificar se os resultados entre os dois sistemas são concordantes ou equivalentes. O objetivo, descrito de outra forma, é identificar se os resultados do método Teste não se desviam dos resultados do método Comparativo em mais que a imprecisão inerente dos dois métodos ou que os resultados do método Teste não se desviam dos resultados do método Comparativo em mais que as diferenças definidas pelas especificações da qualidade analítica.

Portanto, na avaliação, a hipótese estatística é: **a média das diferenças entre os resultados dos dois métodos é igual a Zero ou o intervalo de confiança da média das diferenças inclui o valor zero**. Quando a hipótese estatística não é atendida, pode-se inferir que existe um erro sistemático entre o sistema teste e o sistema comparativo, erro este que deve ter sua causa identificada e removida.

O estudo não tem o objetivo de verificar se os sistemas têm boa correlação porque uma boa correlação é somente indicativa da associação linear, não sendo significativa da equivalência ou concordância dos resultados obtidos.

1. O método selecionado como Comparativo deve reunir as melhores características de desempenho e atender aos seguintes requisitos:

- Ter imprecisão menor que a imprecisão do sistema teste; a imprecisão deve atender as especificações da qualidade analítica;
- Ter baixa sensibilidade a interferências;
- Ter erro sistemático conhecido (rastreadibilidade);
- Ter mesmas unidades de medida;
- Ter metodologia comparável com a metodologia do método teste;
- Ter estabilidade em testes de proficiência, isto é, ter resultados adequados em relação ao grupo pareado em 2 ou mais rodadas;

A seleção do método comparativo é uma etapa crítica do processo e responsável pela qualidade final dos resultados. Portanto, deve-se selecionar o método comparativo com alto nível de exigência.

2. Devem-se definir os requisitos da qualidade a serem atendidos (imprecisão, erro sistemático e erro total máximo). Para definir os requisitos da qualidade, utilizar a base de dados do manual: Especificações da Qualidade Analítica - Anexo A.

3. O CIQ do método comparativo deve estar estável, com atendimento aos requisitos dos itens 1 e 2.

4. O método teste deve também ter CIQ estável e atender aos requisitos de imprecisão da mesma base de dados do item 2.

5. A reduzida imprecisão dos métodos Teste e Comparativo não é indicativa de correlação e/ou equivalência de resultados porque pode haver uma diferença significativa entre os resultados, decorrente da presença de erro sistemático.

O experimento de medição

O experimento de comparação compreende a medição de 20 amostras nativas de pacientes utilizando o método comparativo e o método teste. Devem-se selecionar amostras que não contenham os principais interferentes (hemólise, icterícia e lipemia) e que tenham as concentrações distribuídas no intervalo operacional ou linearidade dos métodos. Quanto maior for a diferença entre o menor valor e o maior valor ensaiado, maior será o poder estatístico da comparação de métodos.

Pode-se realizar o experimento de comparação medindo, com os dois métodos, 4 amostras por dia durante 5 dias ou 7 amostras por dia durante 3 dias. Não é desejável medir as 20 amostras em uma só corrida analítica. O Controle Interno da Qualidade (CIQ) deve ser executado simultaneamente para os dois sistemas analíticos para confirmar a estabilidade estatística dos procedimentos, principalmente da calibração.

Os resultados não são válidos para comparação se forem observadas mudanças significativas na imprecisão ou na calibração dos sistemas durante o período de avaliação.

Não se deve calcular resultados com número de pares menor que 12 (doze) porque ocorre diminuição da robustez estatística do procedimento de comparação.

BIBLIOGRAFIA

1. Tietz Textbook of Clinicals Chemistry, Burtis CA, Ashood ER, 4ª edição, Elsevier Saunders Inc., 2006.
2. Samples: From the patient to the Laboratory – The Impact of preanalytical variables on the quality of laboratory controls, Guder WG, Narayanan S, GIT VERLAG GMBH, 1996.
3. Systematic Comparison of Bias and Precision Data Obtained with Multiple-Point and one-Point Calibration in Six Validated Multianalyte Assays for Quantification of Drugs in Human Plasma. *Anal. Chem.* 2007, 79, 4967-4976.
4. Degeller, K e Sandifort, CRJ: Comments on the recommendations of the German Society of Clinical Chemistry Standardization of Methods for the Estimation of Enzyme Activity in Biological Fluids: *Clin. Chim. Acta*, 43: 13-22, 1973.
5. Henry, RJ: *Clinical Chemistry, Principles and Technics*, 2ª edição, Harper & Row Publishers, 1974.
6. Todd-Sanford, *Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*, WB Saunders Co. 14ª edição, 1968.
7. Tonks, DB: *Quality Control in Clinical Laboratories*, Diagnostics Reagents Division, Warner-Chilcott, Ontario, 1970.
8. Comparação e Validação de Métodos, Labtest Diagnóstica SA Laboratório Clínico nº 10, ano 15, 1992.

Labtest Diagnóstica S.A.

Av. Paulo Ferreira da Costa, 600, Vista Alegre
Lagoa Santa / MG - Brasil. CEP: 33400-000

Serviço de Assessoria Científica

DDG: 0800 031 3411
sac@labtest.com.br

Labtest 