

1 Introdução

Os setores ligados à prestação de serviços na área de saúde têm históricos recentes de desenvolvimento metrológico, particularmente a sua aplicação no laboratório clínico.

A nossa intenção ao desenvolver esta dissertação é a aplicação da metrologia na prática do laboratório clínico, pelo desenvolvimento de um método para determinação de vanádio em soro humano e sua validação, visando estabelecer a confiabilidade metrológica da medida como semente para estudos posteriores.

As boas práticas nos laboratórios se apóiam em fatores que determinam a correção e confiabilidade dos ensaios realizados. São eles:

- Fatores humanos;
- Acomodações e condições ambientais;
- Métodos de ensaio, calibração e validação de métodos;
- Equipamentos;
- Rastreabilidade da medição;
- Amostragem;
- Manuseio de itens de ensaio e calibração; ¹

No laboratório clínico são utilizadas as mais variadas metodologias para determinação de analitos de importância no apoio ao diagnóstico. O desenvolvimento e a validação de métodos nesta área envolvem várias dificuldades, entre elas, a falta de materiais de referência certificados para gerar a rastreabilidade do método. As metodologias que envolvem o uso de anticorpos ou antígenos são as que apresentam diferenças mais significativas entre os resultados para o mesmo analito produzidos em kits de fabricantes diferentes. Isto acontece porque cada fabricante produz seu próprio padrão e seus anticorpos e / ou antígenos, que podem ser mais ou menos específicos para dosagem. Como não há um material de referência certificado, podem ser obtidos resultados diferentes sem que os mesmos estejam incorretos se considerarmos as limitações da técnica. O

National Institute of Standards and Technology (NIST) hoje fornece menos de 30 materiais certificados para análises clínicas, contra pelo menos 1000 analitos dosados atualmente².

Uns dos mecanismos utilizados para conhecermos estas diferenças de resultados são os ensaios de proficiência ou programas de comparação interlaboratoriais. Nestes programas, é possível ter noção de como estão os resultados e metodologias em relação a outros laboratórios. Nos Estados Unidos, o Colégio Americano de Patologistas (CAP), fundado em 1946, mantém desde 1947, um programa de proficiência, que hoje é mundial, com milhares de participantes fora dos EUA, inclusive no Brasil³. No Brasil, há dois grandes provedores de programas de proficiência: um mantido pela Sociedade Brasileira de Patologia Clínica (SBPC), em parceria com a empresa ControlLab: é o programa de Proficiência em Ensaio Laboratoriais (PELM), iniciado em 1977⁴; e o outro é mantido pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC): o Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ), iniciado em 1976⁵. O programa do Colégio Americano de Patologistas é um programa que tem uma grande variedade de analitos, porém com um custo mais alto. Os programas nacionais têm uma abrangência menor em diversidade de analitos, porém, em termos de custo, estão mais de acordo com a realidade da grande maioria dos laboratórios brasileiros. Os analitos não cobertos pelos programas de proficiência contam, exclusivamente, com o controle interno dos laboratórios, mas não com a comparabilidade com outros laboratórios. Os laboratórios podem buscar uma comparação interlaboratorial, mas informalmente.

Em busca de desenvolver ferramentas para melhoria da qualidade, os laboratórios clínicos brasileiros, em meados dos anos 90, começaram a buscar a certificação pelas normas ISO 9000. Em 1997, o Laboratório Albert Einstein, em São Paulo, foi o primeiro a ser certificado; seguido em 1998 pelo Laboratório Sérgio Franco, no Rio de Janeiro. Na seqüência, outros se juntaram nesta busca.

As normas ISO desenvolvidas para certificação de gestão não atendiam completamente as necessidades da área e, em 1996, o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO)

iniciou o desenvolvimento de uma norma para acreditação de laboratórios clínicos, com a criação do Comitê Técnico 04. A comissão, formada por representantes de vários laboratórios, universidades e entidades de classe gerou um documento inicial, apresentado em 1998, e que deu origem à norma NIT DICLA 083, de 2001, uma norma com enfoque técnico. As sociedades de classe criaram suas próprias formas de acreditação: a SBAC criou o Departamento de Inspeção e Credenciamento da Qualidade (DICQ), em 1997⁶ e a SBPC criou o Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos (PALC), em 1998⁷. Os laboratórios clínicos, em sua grande maioria, estão aderindo à certificação das sociedades de classe, principalmente porque a acreditação do INMETRO tem um custo mais alto, tornando difícil a adesão de laboratórios de pequeno porte. Até julho de 2009, havia 04 laboratórios acreditados pelo INMETRO⁸. As normas do PALC e do DICQ são mais claras na interpretação, sendo que o DICQ tem uma norma com requisitos progressivos, o que facilita a adesão de laboratórios menores. Até julho de 2009, o PALC tinha 92 laboratórios acreditados⁹ e o DICQ tinha 50 laboratórios acreditados¹⁰.

No panorama internacional, verifica-se que a área relacionada à Metrologia Química no Bureau International des Poids et Mesures (BIPM), o Consultative Committee for Amount of Substance (CCQM) foi criada apenas em 1993 no International Committee for Weights and Measures (CIPM)¹¹. No Brasil, o INMETRO implementou a área de Metrologia Química em 2000.

Na metrologia legal, no âmbito da International Organization of Legal Metrology (OIML), verifica-se a existência de um comitê técnico para instrumentos médicos de medição (TC18) e um sub-comitê para instrumentos de medição para laboratórios médicos (SC5), dedicados à regulamentação técnica metrológica destes instrumentos. Neste sub-comitê, encontram-se contemplados os seguintes instrumentos: tubos de Westergreen para medição da velocidade de hemossedimentação, espectrofotômetros, câmaras eletrônicas para contagem de células sanguíneas e seringas médicas. Todos os instrumentos relacionados são de muita relevância para o laboratório clínico, mas a abrangência dos

instrumentos ainda é pequena¹². No Brasil, a metrologia legal é representada pelo INMETRO, que tem um grupo de trabalho dedicado a regulamentação técnica metrológica de instrumentos de medição na área de saúde, mas até o momento não há nenhum instrumento relacionado ao laboratório clínico em estudo.

Este breve panorama da metrologia em relação ao laboratório clínico tem por objetivo apontar alguns dos desafios a serem superados como, por exemplo:

- O desenvolvimento de materiais certificados, a serem utilizados por fabricantes de kits, assim como por laboratórios, para validação de metodologias.
- A necessidade do conhecimento dos parâmetros metrológicos para as dosagens realizadas no laboratório clínico, a fim de estabelecer os limites de confiança das análises. Mesmo que no momento não possamos incluir no laudo a incerteza da medição, em função da falta de familiaridade da classe médica com o termo, devemos ser capazes de estabelecê-la, segundo as normas, sempre que possível.

1.1

O Vanádio

O vanádio (V), número atômico 23 e massa atômica 50,942, é um metal que ocorre na forma de dois isótopos, ^{50}V e ^{51}V , sendo o último de ocorrência mais abundante. O vanádio pode ser encontrado nos seguintes estados de oxidação: -1, 0, 2+, 3+, 4+ e 5+, sendo as duas últimas, as mais estáveis em pH fisiológico. O vanádio (IV) em pH fisiológico tem como forma predominante (VO^{2+}) e forma espécies poliméricas; porém, a complexação previne a formação de sólidos. O vanádio (V), em pH fisiológico, tem como forma predominante $[\text{H}_2\text{VO}_4]^-$.

O vanádio é considerado um elemento traço essencial para o organismo humano. A necessidade de ingestão diária é atendida sem

esforço pela alimentação, devido à onipresença do vanádio nos alimentos, sendo assim nenhuma síndrome relacionada à deficiência de vanádio é conhecida¹³.

A faixa de vanádio normalmente encontrada no organismo de pessoas, expostas ou não ao metal, não tem, de forma geral, um consenso na literatura, variando muito com a metodologia utilizada para determinação do vanádio. Foram encontrados na literatura, valores até $11,3 \mu\text{g L}^{-1}$ em indivíduos não expostos e de 9 a $31 \mu\text{g L}^{-1}$ em indivíduos expostos¹⁴.

No sangue humano, 90% do vanádio está ligado à transferrina, uma glicoproteína com dois sítios de ligação para metais. Pode-se ter, no soro, vanádio com estados de oxidação 3+, 4+ e 5+, sendo $V(\text{III}) > V(\text{IV}) > V(\text{V})$ ^{15,16}, a ordem de afinidade com a transferrina em presença de bicarbonato. O vanadil (VO^{+2}) é a forma encontrada no espaço intracelular, enquanto a extracelular é o metavanadato (VO_3^-)¹⁷.

Embora o papel do vanádio no organismo ainda não tenha sido bem definido, sabe-se que inibe a atividade das ATPases em eritrócitos e células tubulares renais, afetando a função diurética dos rins, o metabolismo de leucócitos e macrófagos, a função do músculo cardíaco e causando efeitos como insulina em doses farmacológicas¹⁸.

Vários trabalhos na literatura demonstram o seu uso como hipoglicemiante em diabéticos do tipo 2. Em um estudo, 16 pacientes foram tratados com doses de sulfato de vanádio (75 a 300mg/dia) por 6 semanas e observou-se a queda significativa níveis de glicose no grupo que fez uso da dose de 300mg¹⁹. Em outro estudo, 11 pacientes diabéticos do tipo 2 foram tratados com doses de 150mg/dia por 6 semanas e, ao final, tanto a glicose plasmática como a hemoglobina glicada apresentaram quedas significativas²⁰. Estudos buscam avaliar a eficácia de novos compostos organometálicos com vanádio que possuem maior efeito e menor toxicidade no tratamento do diabetes^{19, 20}.

A avaliação de um composto organometálico, o bi (2-etil-3-hidroxi-4pyronato) oxavanadio (IV) (BEOV), já em fase IIa de estudo clínico em humanos, mostrou resultados positivos com redução da glicose de jejum,

melhora no teste de tolerância à glicose e redução nos níveis de hemoglobina glicada²¹.

Estudos também demonstraram que, por seu efeito estimulador do transporte e oxidação da glicose, o vanádio melhora a performance cardíaca, auxiliando na recuperação de isquemias cardíacas. Por causa do mesmo efeito, o vanádio tem a capacidade de modular as contrações do músculo liso, ajudando a normalizar as respostas vasculares exageradas no diabetes²². Em estudo conduzido em ratos, o vanádio demonstrou efeito anti-neoplásico protetor, e sua suplementação antes e após a iniciação do teste (injeção intraperitoneal de dietilnitrosamina), produziu significativa redução nas alterações hematológicas, em comparação com os animais controles²³. No esporte, o vanádio tem sido usado como um doping legal em doses de até 0,060g de sulfato de vanádio por dia, com o objetivo de melhorar a performance e estrutura muscular¹³.

O vanádio é o décimo sétimo elemento na lista de elementos químicos mais comuns do planeta. Anualmente, cerca de 280.000 toneladas de vanádio são extraídas de fontes naturais, e desta quantidade, aproximadamente 118.800 toneladas são dissipadas para o meio ambiente, em constante redistribuição na natureza. Em torno de dois bilhões de toneladas deste metal se encontram acumulados nos oceanos²⁴. A tendência é que a humanidade tenha cada vez mais contato com altas doses de vanádio²⁵.

O vanádio é de grande importância para a indústria. Cerca de 90% da produção são direcionados para produção de aço. É também utilizado como catalisador e na produção de vidros. Está presente em altas concentrações no petróleo e em óleos pesados procedentes principalmente do Kuwait, Iran, Iraque, Venezuela e México. O carvão também possui altos níveis de vanádio, e a queima destes combustíveis leva à formação de óxidos de vanádio, que ficam em suspensão na atmosfera¹⁷.

Os trabalhadores em usinas de produção de aço e indústrias que utilizam combustíveis fósseis como fonte de energia são expostos a grandes quantidades de vanádio, sendo importante o monitoramento dos

seus níveis. Um dos fatores que limitam este monitoramento são as dificuldades analíticas que envolvem a determinação do vanádio em materiais biológicos, uma vez que o vanádio está presente em quantidades da ordem de partes por bilhão (ppb)²⁶.

Os resultados de um estudo, que avaliou o impacto da exposição ao vanádio em trabalhadores de uma fábrica de V_2O_5 , encontraram diferenças nos níveis de vanádio no plasma dos trabalhadores expostos da ordem de sete vezes o valor dos controles, oxidação das bases do DNA, alterações nos mecanismos de reparo do DNA e aumento nos danos ao DNA, sugerindo que os trabalhadores expostos a altas concentrações de V_2O_5 têm um risco aumentado para câncer e outras doenças relacionadas à instabilidade do DNA²⁷.

Em um estudo, 49 pacientes cronicamente expostos ao vanádio, com valores médios na urina de $14\mu\text{g L}^{-1}$, foram avaliados em relação a 49 pacientes controles, com valores médios de $0,8\mu\text{g L}^{-1}$. Os resultados da avaliação apresentaram significativas alterações do grupo exposto, com queda nas capacidades neurológicas, visuais e nível de atenção²⁸.

Em outro estudo com o objetivo de determinar a causa de tosse e falta de ar em trabalhadores de uma fábrica de processamento de vanádio, com diferentes tempos de exposição, foi realizado o acompanhamento de 40 pacientes de um total de 1440 trabalhadores com avaliação de vários fatores, entre eles os níveis de vanádio. Como resultado, os pesquisadores encontraram forte evidência de que a inalação do V_2O_5 induz a hiperatividade bronquiolar e asma em indivíduos previamente isentos de doença pulmonar. As alterações persistiram até 23 meses após o fim da exposição ao vanádio²⁹.

O controle da dose e exposição em todos os casos é muito importante, pois o vanádio, como qualquer metal, é tóxico, dependendo da dose. Em uma intoxicação aguda, o paciente apresenta: diarreia, vômitos, cólicas abdominais, língua esverdeada, bronco espasmo, sintomas neurológicos e dano irreversível na excreção renal. Na intoxicação crônica, temos: alterações do sistema nervoso (desordens motoras e cognitivas), danos no sistema gastrointestinal, renal, hepático, cardiovascular, imunológico e reprodutivo¹³.

A determinação de vanádio em soro tem ganhado importância, e os laboratórios clínicos vêm apresentando um crescimento constante de solicitações. No Brasil, não temos laboratórios comerciais que realizem esta determinação, uma vez que a maior parte envia para laboratórios internacionais e outros nem oferecem o serviço. Há muita dificuldade na obtenção desta informação, pois muitos laboratórios ocultam este fato mesmo para laboratórios parceiros. O custo desta terceirização é alto, quando comparado com outros parâmetros de mesma complexidade.

Nosso interesse é, pois, desenvolver um método para determinação de vanádio em soro por absorção atômica, com o objetivo de atender esta demanda, validar o método analítico e estabelecer a sua confiabilidade metrológica.

Os seguintes fatos e circunstâncias influenciaram positivamente:

- O laboratório tem como uma de suas metas eliminar a terceirização de exames.
- O desenvolvimento desta técnica levará a uma economia do laboratório.
- Possibilidade de permitir que o laboratório atenda a demanda nacional deste teste.

1.2

Objetivos gerais e específicos

Com base no exposto, o objetivo geral desta dissertação é desenvolver, validar analiticamente e estabelecer os parâmetros de confiabilidade metrológica de um método para determinação de vanádio em soro humano pela técnica de espectrometria de absorção atômica, para que o mesmo atenda às necessidades médicas e possa ser utilizado em larga escala no Brasil.

Em termos específicos, a dissertação busca:

- Desenvolver um método com características adequadas à necessidade médica.
- Validar o método segundo normas nacionais e internacionais.
- Estabelecer a confiabilidade metrológica do método desenvolvido.

1.3

Metodologia

Quanto aos fins, a pesquisa é metodológica e aplicada e, quanto aos meios de investigação é bibliográfica, laboratorial e experimental, conforme taxonomia proposta por Vergara (2003). Quanto à natureza é predominantemente quantitativa (ver figura 1).

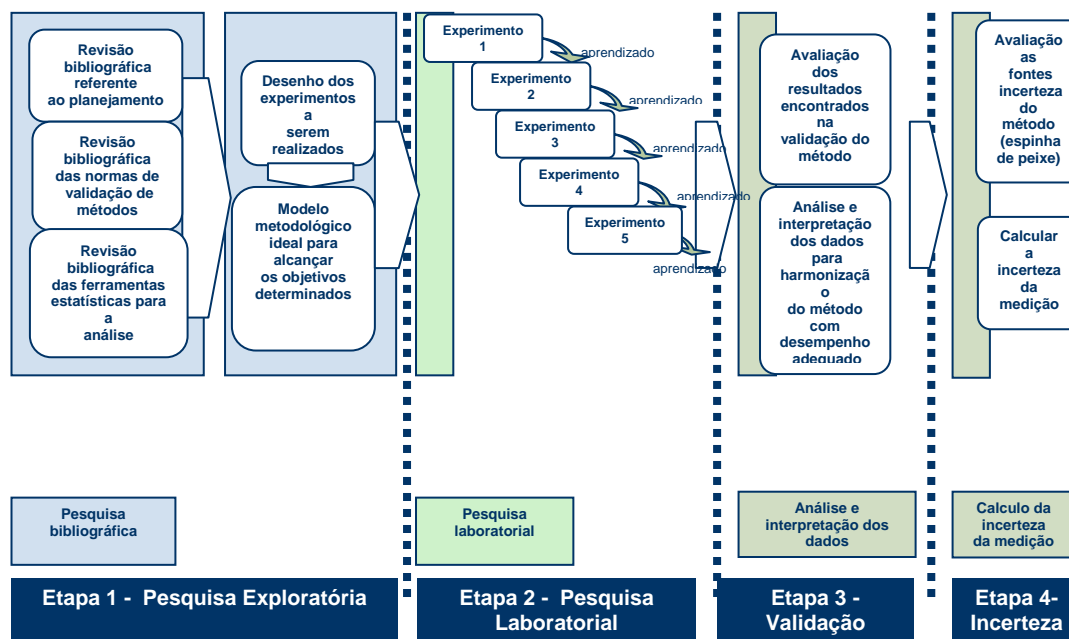


Figura 1 – Desenho da pesquisa, seus componentes e métodos.

1.4

Estrutura da dissertação

A dissertação está estruturada em sete capítulos:

- Capítulo 1 – Introdução: compreende esta introdução.
- Capítulo 2 – Referencial Teórico: contém a fundamentação teórica e normativa para o desenvolvimento da dissertação.
- Capítulo 3 – Parte Experimental: contém a descrição dos recursos e materiais utilizados para o desenvolvimento do estudo.
- Capítulo 4 – Desenvolvimento do método: contém a descrição dos procedimentos realizados para o desenvolvimento do método, resultados obtidos e conclusões parciais.
- Capítulo 5 – Validação analítica: corresponde à descrição dos procedimentos usados para validação do método, resultados obtidos e conclusões parciais.
- Capítulo 6 – Confiabilidade metrológica: contém os procedimentos usados para o cálculo da incerteza da medição, resultados obtidos e conclusões parciais.
- Capítulo 7 – Conclusão: apresenta as principais conclusões da dissertação.