

FINALIDADE

Sistema colorimétrico para determinação das fosfatases no soro, plasma e outros líquidos biológicos.

Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCÍPIO

O soro é incubado com **p-Nitrofenilfosfato, sal ciclohexilamina (substrato)**. Sob ação das fosfatases, dá-se a hidrólise do sal com a liberação de **p-Nitrofenol**. Com adição de soda à reação e alcalinização do meio, o p-Nitrofenol liberado torna-se amarelo. A atividade de fosfatase é proporcional à quantidade de p-Nitrofenol neo-formado.

PARTICULARIDADES DO SISTEMA

Em 1930, Kay demonstrou a presença de fosfatase alcalina no soro usando como substrato β -Glicerofosfato de Sódio. Na técnica desenvolvida por King e Armstrong utilizando fenilfosfato, o fenol liberado na reação era quantificado e expresso em unidades King-Armstrong. A necessidade de técnica mais rápida, com menos interferências, levou Bessey e Lowry a pesquisarem novos substratos. O p-Nitrofenilfosfato mostrou-se ideal, sendo utilizado tanto na quantificação da fosfatase alcalina como na da fosfatase ácida total e prostática. A metodologia é simples e toda reação se processa em um tubo num tempo de 10 minutos para fosfatase alcalina e 30 minutos para fosfatase ácida.

Doles Reagentes inclui, em um único kit, reagentes necessários para quantificação de ambas fosfatases. Os tampões, concentrados, são gotejados no substrato. Após adição do soro, decorrido o tempo de incubação, bloqueia-se a atividade enzimática com adição de soda.

Modificações na fórmula da solução tampão pH 10,3, permitem que o tempo de incubação seja de apenas 10 minutos. Trata-se de um teste ágil, simples e que atende às necessidades do laboratório. A presença de tampões ácidos permite a dosagem das frações da fosfatase ácida. Para cada indicação de fosfatase ácida são realizados, aproximadamente, 250 testes para fosfatase alcalina não se justificando o investimento em kit específico nos pequenos e médios laboratórios.

METODOLOGIA

Bessey - Lowry modificado.

REAGENTES

Substrato p-Nitrofenilfosfato: cada frasco contém 35mg de p-Nitrofenilfosfato, sal ciclohexilamina, liofilizado.

Tampão pH 10,3: solução 3M de 2-Amino, 2-Metil, 1-Propanol e 0,85M de Dietanolamina tamponada a pH 10,3, 25°C.

Tampão pH 4,8: solução tampão 0,25M de Citrato Trissódico, pH 4,8.

Tampão pH 4,8/Ácido Tartárico: solução tampão 0,25M de Citrato Trissódico/Ácido Tartárico 0,4M, pH 4,8.

Solução padrão: cada 20 μ L da mesma corresponde a 150U.I./L de fosfatase alcalina ou 28U.I./L de fosfatase ácida.

Solução estabilizadora: solução 3,4M de Ácido Acético.

Hidróxido de Sódio (concentrado): solução de Hidróxido de Sódio 10M.

APRESENTAÇÃO

Substrato	3 x	35mg
Tampão pH 10,3	1 x	10mL
Tampão pH 4,8	1 x	6mL
Tampão pH 4,8, Ácido Tartárico	1 x	4mL
Solução padrão	1 x	3mL
Solução estabilizadora	1 x	3mL
Hidróxido de Sódio (concentrado)	1 x	5mL

NÚMERO DE TESTES

37 - 74 testes

EQUIPAMENTOS E MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS

- Espectrofotômetro ou fotocolorímetro capaz de medir a absorvância em 410nm ou filtro azul.
- Tubos de ensaio.
- Pipetas graduadas.
- Pipetas semiautomáticas 50 μ L e 200 μ L.
- Ponteiras descartáveis.
- Água destilada ou deionizada.
- Banho maria (37°C).
- Cronômetro.
- Balão volumétrico de 500mL.
- Frasco plástico com capacidade volumétrica de 500mL.

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

Substrato p-Nitrofenilfosfato: armazenar à temperatura de 2-8°C. Em sua forma original, permanece estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco. Após sua reconstituição estável por 2 meses se armazenado à temperatura de 2-8°C. Aliquotado e congelado (10°C negativos), a estabilidade se estende para 5 meses.

Tampão pH 10,3: armazenar à temperatura de 2-8°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo. Agitar antes de usar.

Tampão pH 4,8: armazenar à temperatura de 2-8°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo. Agitar antes de usar.

Tampão pH 4,8/Ácido Tartárico 0,4M: armazenar à temperatura de 2-8°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco. Agitar antes de usar.

Solução padrão: armazenar à temperatura de 2-8°C e ao abrigo da luz. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco.

Solução estabilizadora: armazenar à temperatura de 2-30°C. Estável até a data do vencimento indicada no rótulo do frasco.

Hidróxido de Sódio (concentrado): armazenar à temperatura de 2-30°C. Estável até a data do vencimento indicada no rótulo do frasco.

Hidróxido de Sódio 0,1M: armazenar à temperatura ambiente (20-30°C) em frasco plástico. Estável por 3 anos após a reconstituição, obedecidas as condições de armazenagem e preparo.

CUIDADOS E PRECAUÇÕES COM O USO DOS REAGENTES

Todos os reagentes são somente para **uso diagnóstico *in vitro***. Seu manuseio deve ser cuidadoso evitando-se contato com pele e mucosas. Os reagentes são corrosivos. Em caso de contaminação acidental, lavar a parte afetada em água corrente. O descarte do material utilizado deverá ser feito obedecendo-se aos critérios de biossegurança estabelecidos pelo laboratório, de acordo com as normas locais, estaduais ou federais.

Observar ainda a simbologia constante nos rótulos do produto:



Corrosivo

Irritante

AMOSTRA

Fosfatase alcalina: soro ou plasma colhido com heparina. A fosfatase alcalina permanece estável por 1 dia a 25°C, 7 dias sob refrigeração e 30 dias a 20°C negativos.

Fosfatase ácida: a atividade enzimática é sensível à temperatura e ao pH básico. O sangue deve ser colhido sem anticoagulante e o tubo colocado em vasilhame com gelo. Centrifugar dentro de 30 minutos após a coleta. Separar o soro e adicionar uma gota de **solução estabilizadora** a cada 1,5-2mL do soro. As hemácias contêm fosfatase ácida. Evitar soro hemolisado.

Vários autores reportam que a massagem prostática pode liberar enzima na corrente circulatória. Colher o sangue com intervalo de 24-48h em relação à massagem. Após acidificação, a fosfatase ácida permanece estável por 3 dias sob refrigeração (2-8°C) e 15 dias a -20°C. Os anticoagulantes usuais (citrato, fluoreto, edta) são inibidores das fosfatases.

Todas as amostras biológicas devem ser consideradas como sendo potencialmente infectantes.



PROCEDIMENTO TÉCNICO

Preparo do Hidróxido de Sódio 0,1M (solução de uso):

Adicionar o conteúdo de um frasco de Hidróxido de Sódio concentrado a um balão volumétrico de 500mL. Ajustar o volume com água destilada ou deionizada e armazenar em frasco plástico. Estável por 3 anos, à temperatura ambiente (20-30°C). Etiquetar com o rótulo anexo.

Preparo do substrato (uso):

Adicionar 10mL de água destilada ou deionizada a cada frasco de substrato. Estável por 2 meses, armazenado à temperatura de 2-8°C. Aliquotado e congelado a 10°C negativos, a estabilidade prolonga-se por 5 meses.

DETERMINAÇÃO DA FOSFATASE ALCALINA

Identificar dois tubos de ensaio com **B (branco)** e **T (teste)**.

Proceder como segue:

	B	T
Substrato (uso)	0,4mL	0,4mL
Tampão pH 10,3	2 gotas	2 gotas

Colocar em banho maria, a 37°C durante 2 minutos.

Amostra	-	50µL
----------------	---	------

Incubar a 37°C, durante 10 minutos. Usar o cronômetro.

Hidróxido de Sódio 0,1M (sol. de uso)	5mL	5mL
Amostra	50µL	-

Homogeneizar e ler as absorvâncias do **T (teste)** em espectrofotômetro ou fotocolorímetro, em **410nm** ou **filtro azul** ajustando o zero com o tubo **B**. A cor permanece estável por 30 minutos, à temperatura ambiente (20-30°C).

OBSERVAÇÕES

1. Sendo o período de incubação apenas 10 minutos, o tempo é crítico. Usar um cronômetro.
2. Quando o resultado encontrado superar a 267 U.I./L, procede-se à nova dosagem com soro diluído. Multiplicar o valor encontrado pelo fator de diluição.

DETERMINAÇÃO DAS FOSFATASES ÁCIDA TOTAL E PROSTÁTICA

A técnica baseia-se no princípio de que a fosfatase ácida prostática é inibida pelo ácido tartárico. Nessas condições, utilizam-se 3 tubos: **B (branco)**, **C (fosfatase ácida total)** e **D (onde se determina a fosfatase ácida não inibida pelo Ácido Tartárico)**. A fosfatase ácida prostática representa a diferença em unidades entre os tubos **C** e **D**. Na determinação da fosfatase ácida total basta a utilização de dois tubos **B (branco)** e **C (fosfatase ácida total)**. Identificar 3 tubos com **B (branco)**, **C (fosfatase ácida total)** e **D (fosfatase ácida não prostática)**.

Proceder como segue:

	B	C	D
Substrato (uso)	0,8mL	0,8mL	0,8mL
Tampão pH 4,8	4 gotas	4 gotas	-
Tampão pH 4,8 Ácido Tartárico	-	-	4 gotas

Colocar em banho maria, a 37°C durante 2 minutos.

Amostra	-	200µL	200µL
----------------	---	-------	-------

Incubar a 37°C, durante 30 minutos. Usar o cronômetro.

Hidróxido de Sódio 0,1M (solução de uso)	5mL	5mL	5mL
Amostra	200µL	-	-

Homogeneizar e ler as absorvâncias dos tubos **C (fosfatase ácida total)** e **D (fosfatase ácida não prostática)** em espectrofotômetro ou fotocolorímetro, em **410nm** ou **filtro azul**, ajustando o zero com o tubo **B**. A cor final permanece estável por 30 minutos, à temperatura ambiente (20-30°C).

OBSERVAÇÕES

1. Soros hemolisados não devem ser utilizados para dosagem de fosfatase ácida.
2. Quando o resultado encontrado for superior a 50U.I./L o soro deve ser diluído e a dosagem repetida.

CURVAS DE CALIBRAÇÃO

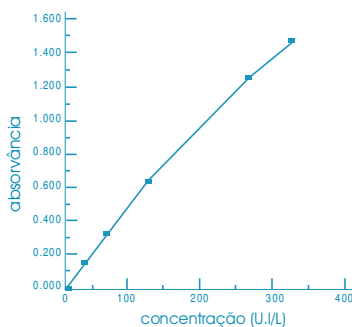


Figura 1 - fosfatase alcalina

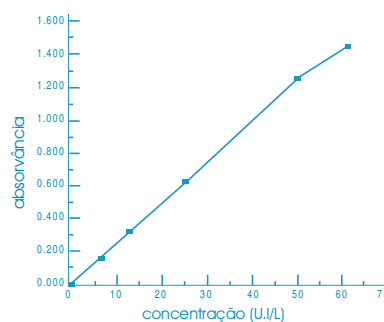


Figura 2 - fosfatase ácida

Obs.: Não utilizar estas curvas para determinar o resultado de seu ensaio.

- A curva de calibração é a representação gráfica da relação entre os valores das absorvâncias com os valores das concentrações de um conjunto de soluções padrão. São necessários três passos para confeccioná-la: (1) preparo das soluções padrão; (2) medição dos valores de absorvância das soluções padrão, de acordo com o especificado no procedimento técnico da presente instrução de uso, e (3) montagem de um gráfico em papel especial, linear, onde são relacionados os valores de absorvância com os de concentração, conforme demonstrado nas figuras acima. As dosagens para montagem das curvas foram feitas em um espectrofotômetro "Ultrospec III", Pharmacia Biotec, comprimento de onda de 410nm e cubetas com passagem de luz de 10mm.
- A curva de calibração demonstra a linearidade da reação até uma determinada concentração, na qual pode ser determinado um fator de calibração (F), de acordo com a Lei de Beer.
- **A reação é linear até 50 U.I./L para fosfatase ácida e 267 U.I./L para fosfatase alcalina (ver curvas acima). Obtendo-se valores mais elevados, dilui-se a amostra com solução fisiológica e procede-se à nova dosagem. Multiplicar o valor encontrado pelo fator de diluição.**
- **O kit de Fosfatases Doles possui padrão no intervalo de linearidade da metodologia adotada de Bessy-Lowry modificado. O laboratório deve realizar o ensaio com o padrão que acompanha o kit e calcular seu fator de calibração (F), a exemplo do demonstrado nos cálculos abaixo.**
- **O fator deve ser refeito periodicamente e a cada lote do produto.**

- As concentrações dos padrões utilizados na montagem da curva de calibração foram ajustadas como descrito em "Alkaline and Acid Phosphatase", Louis Berger e Guilford G. Rudolph in "Standards Methods of Clinical Chemistry", vol. 5, 1968, pág. 211-221.

CÁLCULOS

DETERMINAÇÃO DO FATOR (F)

A determinação do fator F para fosfatase alcalina e ácida é feita com uma única solução e com apenas um tubo. Proceder como segue: a um tubo de ensaio, adicionar 5,5mL da solução de Hidróxido de Sódio 0,1M (solução de uso). Pipetar nesse tubo 20µL da solução padrão. Homogeneizar. Ler a absorvância da solução padrão zerando o aparelho com água destilada em 410nm ou filtro azul.

Fosfatase alcalina

$$\text{Fator (F)} = \frac{150}{\text{absorvância P}}$$

Fosfatase ácida

$$\text{Fator (F)} = \frac{28}{\text{absorvância P}}$$

$$\begin{aligned} \text{Fosfatase alcalina (U.I./L)} &= \text{absorvância T} \times \text{fator (F)} \\ \text{Fosfatase ácida total (U.I./L)} &= \text{absorvância tubo C} \times \text{fator (F)} \\ \text{Fosfatase ácida não prostática (U.I./L)} &= \text{absorvância tubo D} \times \text{fator (F)} \end{aligned}$$

A leitura do tubo C representa un. de fosfatase ácida total. A leitura do tubo D representa un. de fosfatase ácida não inibida por tartarato. A fosfatase ácida prostática corresponde à diferença de unidades entre os tubos C e D.

$$\text{Fosfatase ácida prostática (U.I./L)} = \text{Fosfatase ácida total (U.I./L)} - \text{Fosfatase ácida não inibida (U.I./L)}$$

Exemplos:

Leituras:

$$P = 0,485$$

$$T = 0,106 \text{ (fosfatase alcalina)}$$

$$C = 0,179 \text{ (fosfatase ácida total)}$$

$$D = 0,156 \text{ (fosfatase ácida não inibida por tartarato)}$$

Cálculo do Fator (F)

FOSFATASE ALCALINA (F)

$$\text{Fator (F)} = \frac{150}{0,485} = 309,28$$

FOSFATASE ÁCIDA (F)

$$\text{Fator (F)} = \frac{28}{0,485} = 57,73$$

$$\begin{aligned} \text{Fosfatase alcalina (U.I./L)} &= 0,106 \times 309,28 = 32,78 \\ \text{Fosfatase ácida total (U.I./L)} &= 0,179 \times 57,73 = 10,33 \\ \text{Fosfatase ácida não prostática (U.I./L)} &= 0,156 \times 57,73 = 9,01 \\ \text{Fosfatase ácida prostática (U.I./L)} &= 10,33 - 9,01 = 1,32 \end{aligned}$$

Uma U.I. de fosfatases (alcalina ou ácida) é a quantidade de enzima que cataliza o desdobramento de 1µmol de substrato/ minuto/ litro de soro.

O resultado pode ser expresso em unidade Bessey-Lowry dividindo-se o resultado de U.I./L por 16,7.

LIMITAÇÕES DO SISTEMA

Para se obter ótimo desempenho do sistema, é necessário que o procedimento técnico seja rigorosamente seguido conforme instruções de uso.

CONTROLE DA QUALIDADE DO SISTEMA

1. A limpeza e a secagem adequada do material a ser utilizado são de fundamental importância para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.
2. A água utilizada na limpeza do material, no preparo dos reagentes e na dosagem, deve ser de boa qualidade.
3. Colunas deionizadoras saturadas liberam íons diversos, aminas e agentes oxidantes, que deterioram os reagentes.
4. As pipetagens devem ser precisas.
5. O nível da água do banho maria deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio. A temperatura (37°C) deve ser rigorosamente observada.
6. O uso de soro controle de referência deve ser uma prática rotineira do laboratório. Recomenda-se utilizar um soro controle com valor na faixa de normalidade (**soro controle N - Doles**) e outro soro controle de valor elevado (**soro controle P - Doles**).

VALORES DE REFERÊNCIA

É recomendado que cada laboratório estabeleça sua própria faixa de valores de referência na população atendida.

Como orientação, sugerimos os seguintes valores:

Fosfatase alcalina

Adultos	13 - 45 U.I./L
Crianças	7 - 115 U.I./L

Fosfatase ácida total

2,20 - 11 U.I./L

Fosfatase ácida prostática

0,17 - 2,5 U.I./L

SIGNIFICADO CLÍNICO

Fosfatase ácida

A determinação da atividade da fosfatase ácida no soro tem como principal finalidade o diagnóstico e a monitorização do câncer prostático e particularmente o da forma metastática. A fosfatase ácida total e seu isoenzima fosfatase ácida prostática encontram-se aumentados nos casos de adenocarcinoma prostático. O aumento é mais evidente nas condições em que já há infiltração da pseudo cápsula com metástases por vias hematogênica e linfática. Os aumentos são mais acentuados com relação à fosfatase ácida prostática. Discretos aumentos de fosfatase ácida total são encontrados na enfermidade de Paget, anemia hemolítica e anemia megaloblástica.

A fosfatase ácida total é utilizada como marcador da doença de Gaucher.

O antígeno prostático específico (PSA), fração antigênica específica do tecido prostático, vem substituindo, progressivamente, através de sua dosagem a dosagem das fosfatases ácidas devido a sua maior especificidade e sensibilidade.

Fosfatase alcalina

Os níveis de fosfatase alcalina sérica são de grande significado na investigação das desordens hepatobiliares e ósseas. Nas enfermidades hepatobiliares, as elevações são encontradas, predominantemente, na obstrução extra-hepática (cálculo vesical, câncer de cabeça do pâncreas).

Na obstrução do trato biliar, a atividade da fosfatase alcalina pode estar elevada até dez vezes em relação aos mais altos valores de referência.

O aumento da fosfatase alcalina encontra-se presente em várias enfermidades ósseas, especialmente naquelas que evoluem com quadro de osteólise. A doença de Paget talvez seja, a doença óssea que apresenta as maiores atividades de fosfatase alcalina, com níveis 10 a 25 vezes acima dos limites superiores dos valores de referência.

Discretos aumentos se verificam na osteomalácia, raquitismo, hiperparatiroidismo, fraturas e durante o crescimento ósseo. Níveis elevados de fosfatase alcalina são encontrados no sarcoma osteogênico.

Pequenos a moderados aumentos podem ser observados durante a gravidez, sendo essa fosfatase de origem placentária.



CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Fosfatase ácida

Foram realizados 45 testes em amostras cujos teores de fosfatase ácida situavam-se no intervalo de 0,25 a 27 U.I./L. Esses ensaios foram realizados em paralelo com uma metodologia de referência. A comparação da Fosfatase Ácida Doles (Y) com a metodologia mencionada (X) deu origem à seguinte equação de regressão linear: $Y = 0,03 + 1,024X$, sendo o coeficiente de correlação 0,99.

Em oito amostras de soros com teor de fosfatase ácida total entre 5 - 38 U.I./L foram adicionados 15 U.I./L de fosfatase ácida (proveniente de líquido seminal) havendo uma recuperação entre 97 - 102%.

O erro da média foi de 1,82%.

Fosfatase Alcalina

Foram realizados 45 testes em amostras cujos teores de fosfatase alcalina situavam-se no intervalo de 14 a 220 U.I./L.. Esses ensaios foram realizados em paralelo com uma metodologia de referência. A comparação da Fosfatase Alcalina Doles (Y) com a metodologia mencionada (X) deu origem à seguinte equação de regressão linear: $Y = 0,68 + 1,005X$, sendo o coeficiente de correlação 0,99.

Fosfatase alcalina (origem intestinal) numa concentração de 80 U.I./L foi adicionada em 6 amostras de soros cujos valores iniciais de fosfatase alcalina situavam-se entre 35 e 120 U.I./L A recuperação nas diversas amostras situou-se entre 98 e 102%.

O erro da média foi de 1,60%.

Fosfatase Alcalina

Repetitividade: foram realizadas 20 dosagens sucessivas, com 3 amostras, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração (U.I./L)	9,08	40,31	161,10
Desvio padrão	0,36	0,66	2,36
Coefficiente de variação (%)	3,96	1,64	1,46

Reprodutibilidade: foram realizadas 20 dosagens, durante 20 dias consecutivos, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração (U.I./L)	8,02	35,18	148,40
Desvio padrão	0,35	0,97	2,41
Coefficiente de variação (%)	4,36	2,76	1,62

Fosfatase Ácida

Repetitividade: foram realizadas 20 dosagens sucessivas, com 3 amostras, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração (U.I./L)	2,39	8,54	38,10
Desvio padrão	0,06	0,16	0,45
Coefficiente de variação (%)	2,51	1,87	1,18

Reprodutibilidade: foram realizadas 20 dosagens, durante 20 dias consecutivos, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração (U.I./L)	2,24	9,92	41,93
Desvio padrão	0,07	0,33	0,89
Coefficiente de variação (%)	3,13	3,33	2,12

Especificidade: a presente metodologia é específica para determinação da fosfatase alcalina e da fosfatase ácida prostática. A especificidade da fosfatase ácida relaciona-se à presença de Ácido Tartárico na solução tampão, que inibe a fosfatase ácida proveniente de outros tecidos.

Sensibilidade: a absorvância encontrada, de 0,025, corresponde a 1 U.I./L de fosfatase ácida e a absorvância encontrada, de 0,0047, corresponde a 1 U.I./L de fosfatase alcalina, quando realizados os testes em espectrofotômetro, a 410nm. A sensibilidade do sistema está diretamente relacionada com a do aparelho utilizado no laboratório. A metodologia é sensível a outras fosfatases ácidas que não sejam de origem prostática.

Diluição da matriz: estudos sucessivos de diluição da matriz mostraram que não há interferência na sensibilidade diagnóstica da presente metodologia de Bessey - Lowry modificado.

Substâncias interferentes: não utilizar amostras hemolisadas e lipêmicas para determinação das fosfatases. O uso de tais amostras pode levar a resultados falsamente elevados. Podem-se obter resultados errôneos caso não se observem cuidados com a conservação da amostra e a temperatura da reação.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- Bessey, O.A., Lowry, O.H. e Brock, M.J. J.: *Biol. chem.*, 164: 321-9, 1946.
- Pesce, A.J.; Kaplan, L.A.: *Methods in clinical chemistry*; 683-690, 1074-1087, 1987
- Tibúrcio, H.M.: *Controle interno da qualidade analítica*, 1ªed. março/1995.
- Doles: dados de arquivo.

TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA DA QUALIDADE DO PRODUTO

As garantias do fabricante ao consumidor seguem estritamente as relacionadas na Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1.990 - **Código de Defesa do Consumidor**.

Todos os reagentes que compõem este sistema para diagnóstico são garantidos na sua performance, reprodutibilidade e qualidade até a data de vencimento dos mesmos, se obedecidas as condições abaixo:

- O usuário do sistema seguir, rigorosamente, o procedimento técnico.
- As condições de armazenamento deverão estar de acordo com o estabelecido nas instruções de uso.
- Os materiais necessários e não fornecidos deverão estar em boas condições técnicas.

Todos os produtos que apresentarem problemas técnicos comprovados serão substituídos, sem ônus para o consumidor.

Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratórios Ltda.

CNPJ: 01.085.513/0001-05

Rodovia BR 153, Km 1273, Lt.07, Chácara Retiro

CEP: 74001-970 Goiânia - GO - Brasil

Caixa Postal 1051

e-mail: doles@doles.com.br

M.S.: nº 10231810001

Revisão: 13 (07/2009)

NBR ISO 9001

Sistema da Qualidade certificado desde 1999

