

DIRETRIZES PARA AVALIAÇÃO DE INTERFERÊNCIA ANALÍTICA *

JOÃO CIRIBELLI GUIMARÃES
(UFRJ)

1. Introdução

A ação ou efeito de medicamentos sobre os testes laboratoriais pode ser feito por um destes dois mecanismos:

- Analítico (*In Vitro*)
- Biológico (*In Vivo*)

O conhecimento prévio da interferência analítica deve anteceder os estudos dos efeitos biológicos. A interferência devido as concentrações inusualmente altas de produtos naturais, tal como a bilirrubina, não será aqui considerada, muito embora a metodologia que aqui se descreve possa ser aplicada a este tipo de interferência.

As substâncias adicionadas aos espécimes (anticoagulantes, antiglicolíticos) apresentam os mesmos problemas e suas interferências *in vitro* podem ser testadas com o mesmo protocolo.

Quando um medicamento é introduzido em um organismo, ele é usualmente transformado em metabólitos. Contudo, a interferência analítica de cada metabólito raramente pode ser estudada. O estudo geralmente é limitado ao medicamento e/ou seus principais metabólitos, embora o protocolo possa ser usado para cada metabólito.

O estudo da interferência analítica de um medicamento pode ser considerado:

- quando se estuda um medicamento;

- quando se estuda um analítico (constituente).

2. Estudo de um Medicamento

O estudo *in vitro* da interferência analítica de um medicamento deve ser obrigatório realizá-lo antes das investigações em animais ou no homem, a fim de assegurar a validade dos resultados *in vivo*, permitir o estudo das ações tóxicas ou farmacológicas com confiança e evitar atribuir ao medicamento em questão um falso efeito biológico.

2.1.1 Substância(s) a ser estudada(s)

Esta é usualmente a matéria-prima fornecida pelo fabricante ou constante do Codex se a substância está listada em uma Farmacopéia. Em certos casos pode ser o metabólito principal.

2.1.2 Formulações farmacêuticas

As formulações farmacêuticas podem apresentar adjuvantes que podem interferir analiticamente:

- lactose, amido, celulose etc...;
- corantes, flavorizantes;
- compostos metálicos (óxido de zinco, óxido de titânio, etc.);
- preservativos: agentes antioxidantes ou redutores (ácido ascórbico, sulfito de sódio, ácido nordihidroguaiarético, etc.);
- bactericidas ou fungicidas (fenol, parabenos, etc.).

Tais substâncias devem ser avaliadas separadamente para as interferências analíticas.

2.1.3 Informações sobre o produto: características físico-químicas e farmacocinéticas

É necessário ter o arquivo analítico do produtor e conhecer a fórmula e as principais propriedades físico-químicas do produto:

- propriedades físicas: forma (cristalina, amorfa, micronizada), solubilidade, pH da solução, etc.;
- propriedades químicas: o conhecimento dos grupamentos químicos e suas reatividades na molécula pode ter valor predizível.

É importante a estabilidade do produto no estado sólido e, especialmente, em solução (possível presença de produtos de degradação).

O conhecimento da farmacocinética e metabolização é necessário quando se adotam diferentes vias de administração. Os metabólitos podem apresentar atividade química modificada e, por isso o tipo e/ou intensidade da possível interferência pode mudar.

É necessário, portanto, conhecer:

- as vias de administração do medicamento;
- os metabólitos formados;
- os níveis sangüíneos que o produto e/ou principal metabólito podem atingir em caso de dose exagerada (*overdose*);
- a percentagem das proteínas séricas-ligadas e a natureza das proteínas ligadas;
- as vias de eliminação e as taxas de depuração (*clearance*) do medicamento e seus metabólitos.

* Retirado de: GALTEAU, M.M.; SEST, G. *Drugs Effects in Clinical Chemistry*. Part 2, Guidelines for Evaluation of Analytical Interference. IFCC Document Stage 1, draft 4.

2.2. Seleção dos métodos de laboratório

Estes são selecionados de acordo com diferentes critérios:

- os testes laboratoriais mais freqüentemente executados (incluindo as diferentes técnicas);
- os testes que pretendem mostrar possível toxicidade;
- os testes usados para monitorar a ação farmacológica específica do medicamento;
- os testes utilizados durante as experiências tóxico-farmacológicas;
- os testes cujos mecanismos de reação podem *a priori* ser modificados por causa da estrutura e/ou propriedades físico-químicas do medicamento e/ou seus metabólitos principais.

A interferência deve ser estudada para as concentrações dos componentes correspondentemente aos valores fisiológicos.

Para os componentes com concentrações fisiológicas baixas (ferro, bilirrubina, hormônios, etc.), ou aqueles com variações grandes (glicose urinária) o estudo deve ser repetido a níveis correspondentes aos limites de decisão.

3. Estudo de um Método Analítico

Este procedimento e o inverso do visto anteriormente para o estudo de um medicamento. O estudo *in vitro* de uma interferência de uma série de medicamento deve ser feito para cada novo método analítico.

3.1. Medicamentos a serem estudados

A escolha dos medicamentos a serem testados é baseada nas seguintes considerações:

- os medicamentos mais freqüentemente usados;
- os medicamentos mais freqüentemente prescritos para as doenças investigadas por este teste laboratorial;
- os medicamentos que, por sua natureza química,

podem, por similaridade, interferir com os testes em estudo.

3.2. Métodos a serem testados para um dado componente biológico

A escolha dos métodos a serem testados deve ser feita a partir de:

- métodos de referência, selecionados ou recomendados;
- métodos usados em estudos clínico ou tóxico-farmacológicos;
- métodos mais largamente usados;
- e, finalmente, se houver métodos baseados em princípios diferentes, usar pelo menos um de cada categoria.

4. Protocolos para Estudo da Interferência Analítica

Os estudos são feitos em duas etapas usando protocolos complementares. A primeira etapa é a detecção de possível interferência analítica; a segunda etapa é para medir e avaliar esta interferência. Os dois protocolos têm certos pontos em comum.

4.1. Metodologias comuns a ambos protocolos

4.1.1. Solubilização da droga e/ou dos seus metabólitos principais

Se o medicamento (e/ou seus metabólitos principais) é solúvel em água, usar uma solução de NaCl na concentração de 0,158 mol/l (9,2 g/l) em água destilada. Em alguns casos, é necessário usar uma solução protéica (albumina bovina ou humana).

Se o produto é insolúvel em água, mas solúvel em um solvente miscível com água (etanol, acetona, dimetil-sulfóxido), uma solução aquosa com um mínimo do solvente orgânico será usado. Um controle do solvente deve ser testado a fim de garantir que o solvente não cause desnaturação protéica ou perturbação analítica.

Se o produto é insolúvel em água ou em solvente orgânico miscível com água, o estudo será dificultado e soluções modificadas devem ser estudadas (Ex: ajuste de pH, adição de um tensão-ativo).

4.1.2. Espécimes biológicos empregados

Os espécimes devem ser obtidos de animais ou indivíduos sadios, que não estão sob medicação.

4.1.2.1. Soro ou plasma animal ou humano

É preparada uma solução de medicamento dez vezes mais concentrada. Adiciona-se 1 ml desta solução a 9 ml de um *pool* de plasma ou soro. É também preparada uma amostra controle: 1 ml do solvente mais 9 ml do mesmo *pool* de plasma ou soro.

Nota: O volume de 0,1 ml não deve ser excedido, a fim de que o ensaio não se torne invalidado pela baixa concentração dos componentes endógenos.

4.1.2.2. Soro ou plasma animal ou humano liofilizado

O procedimento é o mesmo anterior (4.1.2.1), usando um *pool* de plasma ou soro reconstituído de acordo com as instruções do fabricante do medicamento.

Uma outra possibilidade, é dissolver o medicamento e/ou seus metabólitos principais no solvente usado para reconstituir as amostras liofilizadas: Neste caso, a solução é feita no solvente recomendado pelo fabricante, de modo a atingir a concentração desejada do medicamento e/ou do metabólito principal. O teste em branco do soro é reconstituído em solvente puro.

Nota: Os soros animais, em certos casos, não podem ser usados. Ex.: ensaios de proteínas específicas, medidas das atividades enzimáticas, radioimunoensaios, etc.

4.1.2.3. Sangue

Usa-se o mesmo procedimento anterior (4.1.2.1). Entretanto, a fim de minimizar a hemólise, as soluções adicionadas devem ser isotônicas.

4.1.2.4. Urina

Uma solução concentrada do medicamento é preparada e adicionada a um *pool* de urina, em um volume máximo de 0,1 ml.

Alternativamente, o medicamento e/ou metabólito principal podem ser diretamente dissolvidos na urina.

Nota: Em cada caso, os pH das soluções devem ser controlados e ajustados entre 4,5 e 8,0, a fim de evitar desnaturação protéica.

4.1.3. Métodos

Os métodos analíticos usados devem ser cuidadosamente descritos. A citação dos nomes dos autores não é o suficiente. É necessário descrever o protocolo completo inclusive a preparação dos reagentes, o procedimento de calibração, instrumento usado, etc. A fim de permitir a comparação de resultados de outros laboratórios válida, devem ser indicadas a repetibilidade, a reprodutibilidade, a precisão e a exatidão.

O quanto possível, o método deve ser descrito de acordo com as recomendações internacionais.

4.2. Metodologia para detecção de uma interferência analítica

4.2.1. Concentração do medicamento

Uma simples concentração do medicamento e/ou dos seus principais metabólitos é usada como se segue.

Soro, plasma ou sangue, uma concentração do medicamento dez vezes maior do que a dose terapêutica é usada (nível máximo ou seguro).

Urina: uma concentração do medicamento dez vezes maior

do que o máximo encontrado nas coletas fracionadas. Se a eliminação urinária é desconhecida, é usada dez vezes a dose terapêutica máxima diluída em 2 litros.

4.2.2. Ensaios e interpretação dos resultados

As amostras contendo o medicamento e/ou seus metabólitos principais e os controles correspondentes, são ensaiados em séries de quinze análises. As médias, os desvios padrões, as variações e os coeficientes de variação são calculados para os dois grupos.

Para comparar as variações, usar o teste F de Fisher e Snedecor. Se o valor de F não é significativo, o teste t de Student para pequenas séries não pareadas pode ser usado para comparar as médias. Se o valor de F é significativo, o teste U não paramétrico de Mann — Whitney é usado para avaliar a significância das diferenças entre as séries de dados:

— se os valores de p obtidos pelo teste t, de Student ou pelo teste U de Mann — Whitney não são significantes ($\alpha > 0,05$), o medicamento é considerado como não perturbador e o estudo está terminado;

— se as séries de dados diferem significativamente, o estudo continua seguindo o protocolo, que leva à quantificação da magnitude da interferência.

4.3. Protocolo para medir a magnitude da interferência analítica

Este protocolo é usado somente quando uma interferência analítica tenha sido detectada durante a primeira parte do estudo (4.2).

4.3.1. Seleção da concentração

A mais alta concentração é escolhida em conformidade com o protocolo previamente descrito (4.2.1.).

Séries de soluções com concentrações decrescentes são preparadas misturando-se o *pool* concentrado e o *pool* con-

trole em diferentes proporções. Pelo menos cinco diferentes concentrações são usadas, com duas delas na faixa terapêutica.

4.3.2. Ensaios e interpretação de resultados

Os ensaios são feitos nas amostras controle e amostras concentradas, cinco vezes consecutivas, de tal modo a minimizar o transporte. Idealmente, estas séries de ensaios devem ser feitas pelo menos em duplicata, preparando-se, para cada ensaio diferente, amostras das soluções dos medicamentos e das amostras biológicas.

Em certos casos, será necessário repetir o estudo usando-se um *pool* de amostras com valores mais altos e mais baixos dos componentes biológicos. Os mesmos testes estatísticos descritos anteriormente são aplicados.

Uma curva dose - efeito é obtida e a inclinação calculada. Se a inclinação é zero, o medicamento não interfere nas concentrações testadas. Se a curva não for zero, um fator 2 da análise de variância pode diferenciar a variação analítica da interferência do medicamento.

O cálculo da regressão em conformidade com o método dos quadrados mínimos leva ao cálculo da interferência (a concentração do medicamento x corresponde a uma interferência y).

5. Conclusões

O estudo da interferência analítica de medicamentos é importante para as medidas precisas e exatas dos efeitos farmacológicos desejáveis e indesejáveis, bem como para os possíveis efeitos tóxicos de um medicamento.

Embora a literatura seja abundante, muitas vezes é difícil avaliar a contribuição da interferência analítica ao efeito total reportado.

Os estudos devem, no entanto, ser empreendidos de acordo com um protocolo bem definido para estudar as interferências analíticas dos medicamentos

largamente usados e a confiabilidade dos métodos correntes.

O conhecimento dos mecanismos de interferência dos medicamentos tem valor predizível. Se novos medicamentos e novos métodos são sistematicamente estudados deste modo, um conhecimento melhorado deste problema estará garantido para o futuro.

A preparação de novos métodos deve ter a sua especificidade aumentada. Entretanto, no interesse da economia, certos métodos mais específicos podem ser adequados, contanto que os analistas clínicos e os médicos clínicos estejam cientes da vulnerabilidade para a interferência dos medicamentos.

Como é totalmente impossível lembrar de todos os dados sobre interferência analítica de cada medicamento sobre cada método analítico, a necessidade de um banco de todos é evidente. Tais bancos estão sendo feitos em diferentes países.

6. Referências Bibliográficas

1. BASELT, R.C.; WRIGHT, J.A.; CRAVEY, R.H. Therapeutic and Toxic Concentrations of more than 100 Toxicologically Significant Drugs in Blood. Plasma or Serum: a Tabulation *Clin. Chem.*, v. 21, p. 44-62, 1975.
2. SIEST, G.; APPEL, W.; BLIJENBERG, G.B.; CAPOLAGHI, B.; GALTEAU, M.M.; HEUGHEM, C.; HJELM, M.; LAUER, K.L.; LE PERON, B.; LOPPINET, V.; LOVE, C.; ROYER, R.J.; TOGNONI, C.; WILDING, P., Drug Interference in Clinical Chemistry: Studies on Ascorbic Acid. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* v. 16, p. 103-110, 1978.
3. VINEK, Ch. L. Tabulation of Therapeutic, Toxic and Lethal Concentrations of Drugs and Chemicals in Blood. *Clin. Chem.*, v. 22, p. 832-836, 1976.
4. GALLI, A. Analytical Interferences of Drugs. IN: SIEST, G. (ed.) Drug Effects on Laboratory Test Results. *Developments in Clinical Biochemistry*. Nijhoff, 1980. p. 39-48.

mistry. Nijhoff, 1980. p. 39-48.

5. FRANÇA. Comité Scientifique de la Société Française de Biologie Clinique. Section de physiopathologie, Commission "Effets des médicaments sur les examens de laboratoire", lignes directrices pour l'étude et la définition d'une interférence analytique. Propo-

sition d'un protocole. *Inform. Sci. Biol.*, v. 3, p. 107-112, 1981.

6. HAECKEL, R.; SONNTAG, O. Detection of Drug Interferences in Method Evaluation Programs., IN: SIEST, G. (ed.) Drug Effects on Laboratory test Results. *Developments in Clinical Biochemistry*. Nijhoff 1980. p. 58-73.

6 de outubro

Dia Nacional de Mobilização e Luta pelo Decreto 793/93



Por uma

Política Nacional de Medicamentos

Conselhos Federal e Regionais de Farmácia
Federação e Sindicatos dos Farmacêuticos
Executiva Nacional dos Estudantes de Farmácia

Informações: (061)224-6849