

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**Adriana Scotti da Silva**

**AVALIAÇÃO DA INTERFERÊNCIA ANALÍTICA DE  
FÁRMACOS NA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS E  
CETONAS NO EXAME QUÍMICO DE URINA – ESTUDOS *IN*  
*VITRO* E *IN VIVO***

Florianópolis  
2012



Adriana Scotti da Silva

**AVALIAÇÃO DA INTERFERÊNCIA ANALÍTICA DE  
FÁRMACOS NA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS E  
CETONAS NO EXAME QUÍMICO DE URINA – ESTUDOS *IN*  
*VITRO* E *IN VIVO***

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC – como requisito final para a obtenção do Grau de Doutor em Farmácia.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Miriam de Barcellos Falkenberg.

Florianópolis  
2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silva, Adriana Scotti da  
Avaliação da interferência analítica de fármacos na  
determinação de proteínas e cetonas no exame químico de urina  
- estudos in vitro e in vivo [tese] / Adriana Scotti da  
Silva ; orientadora, Miriam de Barcellos Falkenberg -  
Florianópolis, SC, 2012.  
116 p. ; 21cm

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-  
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Interferência analítica. 3. fármacos. 4.  
exame químico de urina. 5. urinálise. I. Falkenberg, Miriam  
de Barcellos. II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela minha vida e pelas maravilhosas experiências que Ele me permitiu vivenciar em todos esses anos de doutorado.

Aos meus pais, Danúbio e Ana Lúcia, muito obrigada por tudo. Tudo que sou hoje devo a vocês!

Aos meus irmãos, Aline e Daniel, por todo o apoio, sempre!

Ao meu namorado, Kael, pelo apoio e por todas as palavras de incentivo. Em muitos momentos elas foram essenciais... obrigada!

Aos meus padrinhos, e a todos os familiares, por todo apoio e também por entenderem os momentos de ausência.

A todos os meus amigos, por estarem sempre perto e fazerem cada momento valer a pena!

A minha orientadora, professora Miriam, por todos esses anos de parceria, e por todos os ensinamentos repassados, muito obrigada!

A todos os colegas e amigos do HU, que acompanharam de perto essa conquista.

Aos amigos e funcionários do setor de hematologia, Jéssica, Marlene, Jean, Wisnard, Angela, Vera, Sara, Marilei... muito obrigada, pois sem vocês a conclusão desse trabalho não seria possível.

A chefe do laboratório, professora Maria Luiza, pelo apoio que sempre me deu.

A professora Maria Cláudia, que sempre me acompanhou de perto, obrigada pelo apoio.

Aos professores, servidores, e alunos do Laboratório de Química Farmacêutica, que viraram grandes amigos. Obrigada por tudo!

A professora Angela Campos, do Laboratório de Farmacotécnica, por ceder o equipamento de CLAE, para realizar a etapa final desse trabalho, obrigada!

Ao amigo Cristian Kleemann, pela grande ajuda e pelas horas que ficamos realizando testes e mais testes em frente ao equipamento de CLAE, muito obrigada! E a todos os demais alunos do Laboratório de Farmacotécnica que sempre me receberam super bem!

A minha psicóloga e amiga, Sandra, pelas palavras sempre sábias.

Ao Dr. Roberto Heinisch, médico do HU, e à farmacêutica do centro de saúde da Trindade, Patricia Pozzatti Wanzeller, pela enorme ajuda em conseguir pacientes para essa pesquisa.

A todos os voluntários e pacientes que aceitaram fazer parte dessa pesquisa.

A Farmácia Biofórmula, pela doação de alguns dos fármacos testados.

E a todos que, de uma maneira ou outra, ajudaram na concretização desse trabalho...

Muito obrigada!

“Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocarmos nela, corre por nossa conta.”

Chico Xavier





## RESUMO

Interferências de fármacos em análises laboratoriais podem levar a resultados incorretos, diagnósticos equivocados e procedimentos desnecessários. O exame de urina permite a detecção de processos patológicos intrínsecos e extrínsecos ao sistema urinário, e é importante, sobretudo para diabéticos e pacientes com problemas renais. A partir de interferências em proteínas e cetonas urinárias detectadas em estudo anterior, o objetivo deste trabalho foi aprofundar os estudos de interferência analítica nestes parâmetros utilizando as tiras reagentes Multistix® 10 SG e Combur® 10 Test M, por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo*. No estudo *in vitro* tornou-se evidente o potencial interferente de fármacos quinolínicos (derivados de quinina, cloroquina e hidroxicloroquina) e quinolônicos (cloridrato de ciprofloxacino, ofloxacino e levofloxacino) para proteína na tira Multistix® 10SG e no teste confirmatório com vermelho de pirogalol-molibdato. Fármacos quinolínicos apresentaram interferência em concentrações subterapêuticas. No estudo *in vivo*, pacientes usuários de captopril apresentaram interferências estatisticamente significativas na detecção de cetonúria, em doses  $\geq 50$  mg/dia, mas as interferências não foram necessariamente proporcionais à dose. Para um mesmo paciente, amostras com interferência falso-positiva na tira Multistix® 10SG apresentaram maiores concentrações de captopril na urina (determinadas por método de cromatografia líquida de alta eficiência, adaptado e validado) que amostras sem interferência. Pacientes em uso de ciprofloxacino apresentaram interferências clinicamente significantes na quantificação de proteína urinária com vermelho de pirogalol-molibdato. No estudo transversal, a comparação da frequência de uso de fármacos entre amostras verdadeiro-positivas e falso-positivas para cetona e proteína urinárias não permitiu identificar inequivocamente outros fármacos com potencial de interferência, porém observaram-se associações estatisticamente significativas entre resultados falso-positivos para proteína e uso de cloridrato de metoclopramida, diazepam, dipirona + butilbrometo de escopolamina, heparina ou sulbactam sódico pelo teste de qui-quadrado.

**Palavras-chave:** Interferência analítica, fármacos, urina, cetonúria, proteinúria



## ABSTRACT

Urinalysis allows detection of pathological processes of urinary system (intrinsic and extrinsic), being especially important for diabetics and patients with renal diseases. Drugs interferences in clinical analysis can lead to incorrect results, false diagnostics and unnecessary procedures. The objective of this study was to extend a previous in vitro interference study on urinary protein and ketone interferences, to include analytical reagent strips Test 10 M, Combur® besides Multistix® 10 SG and to perform also in vivo studies. Potential interferences for urinary protein were observed in vitro with quinolinic drugs (quinine sulfate, chloroquine diphosphate, hydroxychloroquine sulfate) and quinolone antibiotics (ciprofloxacin hydrochloride, ofloxacin and levofloxacin) in tests with Multistix® 10SG reagent strip and the pyrogallol red-molybdate assay; quinolinic drugs interfered in subtherapeutical concentrations. By the in vivo study, statistically significant interferences were observed in patients using captopril ( $\geq 50$  mg/day). Interference magnitudes were not always proportional to the dosage, but considering intrapersonal variations, urinary concentrations of captopril were higher in samples that showed false-positive interference by Multistix® 10SG reagent strip in comparison to samples that did not show these interferences. Samples from patients taking ciprofloxacin presented clinically significant interference for proteinuria in the quantitative analysis performed with pyrogallol red-molybdate. In the transversal study, comparison of reports for used drugs among patients with true-positive and false-positive tests for urinary protein and ketones, did not allow the identification of other potentially interfering drugs, but statistically significant associations were observed between therapy with metoclopramide hydrochloride, diazepam, dipyrone + scopolamine butylbromide, heparin or sodium sulbactam and false-positive results for proteinuria with chi-square test.

**Key-words:** analytical interference, drugs, urine, ketonuria, proteinuria.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Reação de derivatização do captopril com tetrafluoroborato de 2-cloro-1-metilquinolina .....	42
<b>Figura 2</b> - Estruturas químicas da hidroxicloroquina e cloroquina .....	52
<b>Figura 3</b> - Estrutura química das quinolonas testadas no estudo.....	53
<b>Figura 4</b> - Frequência de reações falso-positivas para cetonas na tira reagente Multistix® 10 SG, nos 15 pacientes avaliados no estudo, de acordo com a dose diária de captopril utilizada.....	62
<b>Figura 5</b> - Distribuição, segundo a faixa etária, dos pacientes com resultados falso- e verdadeiro-positivos para cetonas com a tira reagente Multistix® 10 SG (Bayer) .....	82
<b>Figura 6</b> - Distribuição, segundo a faixa etária, dos pacientes com resultados falso- e verdadeiro-positivos para proteínas com a tira reagente Multistix® 10 SG (Bayer) .....	84



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Diferenças entre as tiras Multistix® 10 SG e Combur® 10 Test M em relação aos reagentes utilizados, limite de detecção e intervalos de leitura nos parâmetros cetona e proteína urinárias, segundo dados das bulas.....	32
<b>Tabela 2</b> - Fármacos selecionados e respectivas concentrações de teste para avaliação do potencial de interferência na determinação de proteína urinária.....	37
<b>Tabela 3</b> - Diferenças entre a metodologia original de determinação de captopril na urina por cromatografia líquida de alta eficiência (KUSMIEREK e BALD, 2007) e a metodologia adaptada neste estudo.....	41
<b>Tabela 4</b> - Proteína urinária determinada por meio de tiras reagentes para urinálise .....	50
<b>Tabela 5</b> - Proteína urinária determinada com o ensaio de vermelho de pirogalol-molibdato (VPM). .....	55
<b>Tabela 6</b> - Menores concentrações interferentes dos fármacos avaliados para proteína urinária, determinadas por meio da tira reagente Multistix® 10 SG e pela metodologia com vermelho de pirogalol-molibdato (VPM), comparadas com as respectivas concentrações terapêuticas estimadas (todos os valores em mg/dL) .....	58
<b>Tabela 7</b> - Associações medicamentosas utilizadas por pacientes fazendo uso do fármaco captopril que participaram do estudo.....	61
<b>Tabela 8</b> - Pacientes em uso de captopril que não apresentaram reações falso-positivas na avaliação semi-quantitativa de cetona: dose diária de captopril, concentração urinária e outros fármacos utilizados .....	63

<b>Tabela 9</b> - Pacientes em uso de captopril, que apresentaram reações falso-positivas sem significância estatística, na avaliação semi-quantitativa de cetona: dose diária de captopril, concentração urinária e outros fármacos utilizados .....	64
<b>Tabela 10</b> - Pacientes em uso de captopril, que apresentaram reações falso-positivas estatisticamente significativas, na avaliação semi-quantitativa de cetona: dose diária de captopril, concentração urinária e outros fármacos utilizados.....	65
<b>Tabela 11</b> - Variáveis observadas nas quatro coletas de urina realizadas no paciente C10 .....	67
<b>Tabela 12</b> - Variáveis observadas nas três coletas de urina realizadas no paciente C11 .....	68
<b>Tabela 13</b> - Variáveis observadas nas três coletas de urina realizadas no paciente C12 .....	69
<b>Tabela 14</b> - Variáveis observadas nas três coletas de urina realizadas no paciente C13 .....	70
<b>Tabela 15</b> - Variáveis observadas nas três coletas de urina realizadas no paciente C14 .....	71
<b>Tabela 16</b> - Variáveis observadas nas três coletas de urina realizadas no paciente C15 .....	72
<b>Tabela 17</b> - Associações medicamentosas relatadas por pacientes em uso de ciprofloxacino, dose utilizada do fármaco e gênero dos pacientes .....	76
<b>Tabela 18</b> - Pacientes que utilizaram ciprofloxacino: resultados de proteína urinária com a tira reagente Multistix® 10 SG (Bayer) e pelo método do vermelho de pirogalol-molibdato (VPM) em amostras coletadas durante o tratamento (a) e no mínimo 4 dias após o término do tratamento (b), e outros dados em relação à coleta. Valores de referência com VPM: 0-11,9 mg/dL .....	77



<b>Tabela 19</b> - Número de amostras analisadas no parâmetro cetona e dados sobre os prontuários analisados .....	81
<b>Tabela 20</b> - Número de amostras analisadas no parâmetro proteína e dados sobre os prontuários analisados .....	84
<b>Tabela 21</b> - Relação dos fármacos encontrados com maior frequência nos prontuários de pacientes com resultados verdadeiro-positivos para proteína, com o uso da tira reagente Multistix® 10 SG (Bayer) .....	85
<b>Tabela 22</b> - Relação dos fármacos encontrados com maior frequência nos prontuários de pacientes com resultados falso-positivos para proteína, com o uso da tira reagente Multistix® 10 SG (Bayer) .....	87
<b>Tabela 23</b> - Fármacos selecionados e respectivas concentrações de teste, para avaliar potencial interferência em tiras reagentes para urinálise .....	89



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>A</b>	Absorção
<b>AAS</b>	Ácido acetilsalicílico
<b>CLAE</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>CMQT</b>	Tetrafluoroborato de 2-cloro-1-metilquinolina
<b>C<sub>ut</sub></b>	Concentração urinária “terapêutica”
<b>dp</b>	Desvio padrão
<b>ECA</b>	Enzima conversora da angiotensina
<b>EU</b>	Excreção urinária na forma inalterada
<b>HCTZ</b>	Hidroclorotiazida
<b>IC</b>	Inclinação da curva de calibração
<b>IRA</b>	Insuficiência renal aguda
<b>IRC</b>	Insuficiência renal crônica
<b>LES</b>	Lupus eritematoso sistêmico
<b>ND</b>	Não detectado
<b>NT</b>	Não testada por problemas de solubilidade
<b>SPP</b>	Serviço de Prontuário do Paciente
<b>ST</b>	Concentração supratrapêutica
<b>STc</b>	Concentração supratrapêutica correspondente ao ciprofloxacino
<b>sT</b>	Concentração subtrapêutica
<b>sTc</b>	Concentração subtrapêutica correspondente ao ciprofloxacino
<b>T</b>	Concentração terapêutica
<b>Tc</b>	Concentração terapêutica correspondente ao ciprofloxacino
<b>TCEP</b>	Cloridrato de tris (carboxietil) fosfina
<b>VPM</b>	Vermelho de pirogalol-molibdato



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>23</b>
1.1 O laboratório clínico e o risco de interferências .....	23
1.2 Urinálise .....	25
1.2.1 Proteinúria .....	28
1.2.2 Cetonúria .....	30
1.2.3 Tiras reagentes em urinálise .....	31
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>
2.1 Geral .....	33
2.2 Específicos .....	33
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
3.1 Avaliação analítica <i>in vitro</i> .....	35
3.1.1 Avaliação da interferência analítica de fármacos no parâmetro proteína urinária em tiras reagentes de urinálise.....	35
3.1.1.1 Seleção de fármacos para teste .....	35
3.1.1.2 Obtenção de amostras de urina para o <i>pool</i> de urina controle .....	35
3.1.1.3 Estabelecimento das concentrações de teste e preparação das soluções de fármacos a serem avaliados.....	35
3.1.1.4 Avaliação do potencial de interferência .....	37
3.1.2 Avaliação da interferência analítica dos fármacos interferentes em tiras reagentes para proteína urinária na quantificação de proteína, por meio do método com vermelho de pirogalol-molibdato (VPM) .....	38
3.1.3 Estabelecimento das menores concentrações interferentes .....	38
3.1.4 Análise estatística .....	39
3.2 Avaliação analítica <i>in vivo</i> .....	40
3.2.1 Avaliação do potencial de interferência do captopril.....	40
3.2.1.1 Obtenção de amostras de urina .....	40
3.2.1.2 Teste confirmatório para cetonas.....	40
3.2.1.3 Quantificação do captopril nas amostras de urina de pacientes .....	41
3.2.1.3.1 Preparação da amostra para a análise .....	42
3.2.1.3.2 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	43
3.2.1.3.3 Validação da metodologia adaptada .....	43

3.2.2 Avaliação do potencial de interferência do ciprofloxacino .....	45
3.2.2.1 Obtenção das amostras de urina .....	45
3.2.2.2 Testes confirmatórios para proteína .....	46
3.2.3 Análise dos resultados dos testes <i>in vivo</i> em pacientes usuários de captopril e ciprofloxacino .....	46
3.2.4 Estudo transversal da interferência de fármacos nos parâmetros proteína ou cetonas .....	47
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
4.1 Avaliação analítica <i>in vitro</i> .....	49
4.1.1 Avaliação da interferência analítica de fármacos no parâmetro proteína urinária por meio de tiras reagentes.....	49
4.1.2 Avaliação da interferência analítica dos fármacos interferentes em tiras reagentes para proteína urinária na quantificação de proteína por meio do método com vermelho de pirogalol-molibdato (VPM) .....	54
4.1.2.1 Interferência de fármacos quinolônicos na metodologia com VPM .....	56
4.1.2.2 Interferência de fármacos derivados da quinina (quinolônicos) na metodologia com VPM .....	56
4.1.3 Estabelecimento das menores concentrações interferentes .....	57
4.2 Avaliação analítica <i>in vivo</i> .....	60
4.2.1 Avaliação da interferência do captopril .....	60
4.2.1.1 Alterações estatisticamente significativas observadas no parâmetro cetona utilizando a tira Multistix® 10 SG (Bayer) .....	66
4.2.2 Avaliação da interferência do ciprofloxacino .....	75
4.2.3 Estudo transversal da interferência de fármacos nos parâmetros proteína ou cetonas .....	80
4.2.3.1 Interferência em cetonas.....	80
4.2.3.2 Interferências em proteínas.....	83
4.2.3.2.1 Reação positiva verdadeira .....	85
4.2.3.2.2 Reação falso-positiva .....	86
4.3 Testes complementares .....	88
4.4 Considerações finais .....	89
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>91</b>
5.1 Dos estudos <i>in vitro</i> .....	91
5.2 Dos estudos <i>in vivo</i> .....	91
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>95</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>107</b>

## 1) INTRODUÇÃO

Resultados de exames laboratoriais têm uma grande influência na prática clínica, fundamentando 60-70% das importantes decisões em internações, altas hospitalares e medicações, de modo que a qualidade dos testes laboratoriais, da padronização dos métodos à liberação dos resultados, é de grande importância para o sistema de saúde (PLEBANI, 2007; RIN, 2009; SONNTAG, 2009).

Boa parte dos estudos de interferência relaciona-se com a pesquisa de drogas de abuso (BRAHM et al., 2010; JAFFEE et al., 2007; KAPUR, 2012; LINDER e VALDES, 1994; ROLLINS et al., 1990) ou hormônios (BELL et al., 2012; MARZINKE et al., 2012), havendo relativamente poucos estudos de interferência em urinálise.

Nesta seção, será abordado o risco de interferências em análises clínicas, com ênfase naquelas relacionadas à urinálise e, em particular, à proteinúria e cetonúria.

### 1.1) O laboratório clínico e o risco de interferências

Analitos laboratoriais estão sujeitos a diversas fontes de variação, incluindo variação biológica, variação pré-analítica (coleta de amostras), variação analítica (viés e imprecisão) e variação pós-analítica (liberação dos resultados). A variação biológica consiste na variação natural, de ocorrência fisiológica, própria do indivíduo, independente das variáveis pré-analíticas. Em termos matemáticos, são expressos como coeficientes de variação em percentual, intra e interpessoal (RICÓS et al., 1999; LACHER et al., 2005). A exata determinação da concentração de analitos por testes laboratoriais é dependente de uma ampla variedade de fatores (SHER, 1982). Apesar da abundante literatura científica sobre a melhoria da qualidade nos laboratórios (principalmente a analítica), é relativamente escassa a literatura sobre erros em laboratório clínico. Uma das razões para isso, além da insuficiente atenção dedicada ao problema, é a dificuldade prática de relatar e registrar o número de erros, sejam eles nas fases pré, intra e pós-analíticas (BONINI et al., 2002).

O fator pré-analítico mais comum que afeta a aceitabilidade das amostras para análise é a presença de substâncias interferentes na amostra. A presença de interferentes pode alterar o valor do resultado e pode levar a intervenções clínicas inapropriadas, comprometendo a evolução do paciente (KAZMIERCZAK e CATROU, 2000).

Kroll e Elin (1994) definem interferência como “o efeito da substância presente na amostra que altera o valor correto do resultado, usualmente expresso como concentração ou atividade para um analito”. Segundo Sonntag (2009), uma interferência analítica é qualquer interferência de uma substância que não o analito a ser determinado. A ação ou efeito dos fármacos sobre os testes laboratoriais pode ocorrer por meio de dois mecanismos: analíticos (*in vitro*), quando o fármaco e/ou seus metabólitos poderiam influenciar na análise de um componente em algum estágio do processo analítico; ou biológicos (*in vivo*), quando o fármaco e/ou seus metabólitos poderiam ser responsáveis pela modificação de um componente biológico, por meio de um mecanismo fisiológico, farmacológico ou toxicológico (GALTEAU e SIEST, 1984; KALLNER e TRYDING, 1989). Tais efeitos interferentes, entretanto, podem passar despercebidos (SIEST et al., 1983; SONNTAG, 2009). Relatos de interferência de metabólitos, resultantes da biotransformação do fármaco são extremamente raros e estudos dos efeitos de diversos fármacos e seus metabólitos em pacientes recebendo dois, três ou mais fármacos ao mesmo tempo são também escassos (SONNTAG, 2009).

Estudos de interferência de fármacos são parte integral na avaliação de metodologias e instrumentos. Milhares de fármacos são usados clinicamente e suas concentrações séricas e urinárias variam de acordo com o uso clínico e condições fisiológicas e patológicas, representando um grande problema para a indústria de diagnóstico fornecer uma lista dos fármacos que interferem com testes laboratoriais (SONNTAG e SCHOLER, 2001).

Uma interferência relevante em determinações laboratoriais, que tem sido estudada há bastante tempo, é a que envolve a vitamina C ou ácido ascórbico (BRIGDEN et al., 1992; DIMESKI et al., 2010; MARTINELLO e SILVA, 2006a; MARTINELLO e SILVA, 2006b; McAULIFFE et al., 1998; SHER, 1982; SILVA et al., 2000; VANAVANAN et al., 2010; YOUNG et al., 1972; ZWEIG e JACKSON, 1986). Devido à importância desta interferência, fabricantes de tiras reagentes passaram a acrescentar uma nova área de reação nas tiras, a qual detecta a presença do ácido ascórbico na urina, com o objetivo de alertar para a provável ocorrência de alterações também nos outros parâmetros em análise pela tira, devido à presença deste interferente.

Young, um dos pesquisadores pioneiros com atuação destacada na área de interferência de fármacos, desde a década de 1970, teve preocupação de compilar informações sobre o tema, publicando



periodicamente relatos de avaliações de interferência analítica ou fisiológica de fármacos nos diversos exames laboratoriais (YOUNG et al., 1972; YOUNG, 1995; YOUNG, 1997; YOUNG, 2000; AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY, 2010). Entretanto, apesar do grande volume de relatos sobre interferências desde então, inúmeros fármacos novos vêm sendo lançados no mercado a cada ano, cujo risco de interferência ainda não é conhecido. Grande parte dos fármacos é excretada do organismo por meio da urina, na forma inalterada ou como metabólitos, e ambas as formas podem vir a interferir na determinação de parâmetros do exame químico de urina.

## **1.2) Urinálise**

O exame de urina pode fornecer uma quantidade significativa de informações. O exame cuidadoso permite a detecção de processos patológicos intrínsecos e extrínsecos ao sistema urinário, sejam eles funcionais ou anatômicos. A progressão ou a regressão de várias lesões também pode ser monitorada com um mínimo de estresse ao paciente. Além disso, processos patológicos sistêmicos, como anomalias endócrinas ou metabólicas, podem ser detectados por meio do reconhecimento de quantidades anormais de metabólitos específicos para a doença, excretados na urina. Pela sua simplicidade, baixo custo e pela facilidade na obtenção da amostra para análise, é exame de rotina (HENRY, 2008; LIMA et al., 2001).

Princípios analíticos que favorecem a simplicidade do método têm sido rotineiramente utilizados em laboratórios por muitos anos. Um exemplo clássico de tais princípios é o uso de tiras reagentes, amplamente utilizadas em laboratórios (BERG et al., 1989). Elas constituem um meio simples e rápido de realizar dez ou mais análises bioquímicas clinicamente importantes, como pH, proteínas, glicose, cetonas, hemoglobina, bilirrubina, urobilinogênio, nitrito, densidade e esterase de leucócitos (STRASINGER, 1996). A disponibilidade e aparente facilidade no uso de técnicas de química seca fizeram com que a análise química se tornasse um procedimento de triagem. A utilização de instrumentos que executam a leitura das fitas reagentes e a padronização do tempo de reação foram fatores essenciais para a melhoria da confiabilidade (DELANGHE, 2007).

A triagem de urina em crianças é um assunto que tem sido bastante debatido. A Academia Americana de Pediatria havia recomendado anteriormente (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2000) realizá-la na pré-escola e, anualmente, em

adolescentes sexualmente ativos, para avaliar a esterase leucocitária. Mas a recomendação mais recente (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2007) não exige mais a análise de urina como triagem nessa faixa etária. No entanto, muitos pediatras a solicitam com frequência para seus pacientes, sendo comum encontrar anormalidades. Porém, em muitos casos, elas são transitórias ou devido a reações falso-positivas (PATEL, 2006). O principal objetivo de programas de triagem de urina em crianças em idade escolar é detectar a doença renal em suas fases iniciais, permitindo o tratamento de forma a retardar ou mesmo impedir a evolução para insuficiência renal. Shajari e colaboradores (2009), em um estudo para avaliar o custo de programas de triagem por urinálise em escolas de Shiraz, no Irã, propõem uma única triagem, no início da idade escolar, entre 6 e 7 anos. Outro estudo, também realizado no Irã, com quatrocentos neonatos, aparentemente saudáveis, mostrou que o teste com tiras reagentes durante o período neonatal poderia ser útil para o diagnóstico precoce de doenças renais (FALAKAFLAKI et al., 2011).

Yamagata e colaboradores (2008) relatam que a triagem universal de proteinúria com tiras reagentes tem sido usada no Japão e enumeram várias razões para dar continuidade a esse programa de triagem. A taxa de proteinúria positiva na população geral, bem como a prevalência e incidência de glomerulonefrite, são altas no Japão. A urinálise é o único método para a detecção precoce de glomerulonefrites crônicas, e, finalmente, a redução da incidência de falência renal crônica por glomerulonefrite é um dos melhores meios para reduzir a prevalência de falência renal crônica.

O primeiro passo da análise de urina é baseado em diferentes reações químicas, as quais estão incluídas na metodologia de tiras reagentes. Para completar o estudo, são necessárias a identificação e contagem de diferentes células e outras partículas presentes em amostras de urina. A análise complementar necessita mais tempo e requer certo grau de treinamento das pessoas envolvidas (MAYO, 2008). Em virtude disso, diretrizes preparadas por *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) dos EUA, *European Confederation of Laboratory Medicine* (ECLM) e Comitê Brasileiro de Análises Clínicas e Diagnóstico *In Vitro*, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) foram publicadas, com o objetivo de melhorar a padronização por meio do uso de sistemas automatizados ou procedimentos padronizados para contagem de células em câmara com um volume pré-definido (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS,

2005; EUROPEAN URINALYSIS GUIDELINES, 2000; NCCLS, 1995).

Instrumentos automatizados capazes de examinar partículas e células presentes na urina têm reduzido a necessidade da microscopia manual (WAH et al., 2005). Desde o final da década de 1990, está disponível no mercado um equipamento baseado no princípio de citometria de fluxo (Sysmex, modelo UF-100), que faz a análise quantitativa de células e partículas presentes na urina e muitos estudos estão sendo feitos para avaliar sua eficácia (BEN-EZRA et al., 1998; CHIEN et al., 2007; DIMECH e RONEY, 2002; LANGLOIS, 1999). Outro aparelho automatizado atualmente disponível para análise de sedimentos urinários é o modelo Iris iQ200, da marca Iris Diagnostics, que utiliza imagem digital e um *software* de reconhecimento de partículas para classificar partículas urinárias. Alguns estudos têm sido realizados para avaliar seu desempenho (ALTEKIN et al., 2010; LAMCHIAGDHASE et al., 2005; LINKO et al., 2006; SHAYANFAR et al., 2007; WAH et al., 2005).

Com esses avanços no exame de urina, bem como devido ao fato da urinálise permanecer como um dos três maiores testes diagnósticos de triagem (juntamente com os perfis bioquímicos no soro e o hemograma completo), cria-se a necessidade de um olhar crítico para o fluxo de trabalho (*workflow*) na realização de exames de urina, ressaltando a importância na redução da variabilidade pré-analítica (STANKOVIC e DiLAURI, 2008).

Em simpósio realizado em 1997, em Firenze (*International Menarini Symposium on Urinalysis*) foi aplicado um questionário entre 23 lideranças de mercado. Somente 9 delas declararam-se satisfeitas com a atual tira reagente, enquanto 14 sugeriram novos itens, dentre os quais, testes para proteínas específicas, proteína total, creatinina como marcador de diurese e um marcador para câncer de bexiga. Há concordância geral quanto ao limite de 10 parâmetros em uma única tira, uma vez que um maior número deles não somente aumentaria o perigo de confusão, como também a dificuldade para a adequada imersão da tira reagente na amostra de urina.

Kutter (2000) sugere uma tira com as seguintes áreas: avaliação semi-quantitativa para leucócitos, otimizada pela introdução de uma substância assegurando a lise celular; avaliação semi-quantitativa para proteína total, com faixa de concentração entre 50 e 1000 mg/L; teste semi-quantitativo para detecção de níveis baixos de albumina, por mecanismos de erro protéico de última geração ou imunológicos; teste semi-quantitativo para hemoglobina, permitindo a diferenciação entre

eritrócitos intactos e hemoglobina livre, otimizada pela eliminação da inibição do ácido ascórbico; teste qualitativo para nitrito; teste semi-quantitativo para glicose, também otimizado pela eliminação da inibição do ácido ascórbico; teste semi-quantitativo para acetoacetato; teste semi-quantitativo para urobilinogênio; teste semi-quantitativo para creatinina, com vistas a avaliar a diurese e a função renal; avaliação do pH. O autor sugere ainda a substituição da área de densidade pelo parâmetro creatinina, bem como a eliminação da área para determinação de bilirrubina, pela baixa sensibilidade e especificidade.

### **1.2.1) Proteinúria**

Resultados alterados de proteinúria em tiras reagentes podem ser devido a causas patológicas ou não patológicas. Albuminúria e proteinúria são achados importantes, especialmente em pacientes com hipertensão e/ou diabetes (PUGIA et al., 2001). Proteinúria é definida como a excreção de proteína urinária maior que 150 mg/dia (10 a 20 mg/dL de urina) e é uma característica de dano renal. Microalbuminúria é definida como a excreção de 30 a 150 mg de proteína por dia, e é um sinal de dano renal, particularmente em pacientes diabéticos.

As tiras detectam a presença de proteína por meio de um indicador seco, que muda de cor devido à presença de proteínas, em um meio pH-dependente. Os métodos de precipitação ácida detectam todas as proteínas e, portanto, indicam a presença de globulinas, bem como de albumina (HENRY, 2008). O resultado de 1+ corresponde a aproximadamente 30 mg de proteína/dL de urina. Os reagentes presentes na maioria das tiras são sensíveis para albumina, mas não detectam baixas concentrações de globulinas, proteína de Bence-Jones, mucoproteínas ou proteínas de baixo peso molecular (BARRATT, 2007; LAMB et al., 2009; MILFORD, 2008; SIMERVILLE et al., 2005). O limite mínimo de detecção pode variar, bem como o indicador utilizado. As tiras analisadas neste estudo, Combur® 10 Test M (Roche) e Multistix® 10 SG (Bayer - atualmente pertencente ao grupo Siemens), apresentam limites de 6 mg/dL e 15-30 mg/dL e utilizam os indicadores tetraclorofenoltetrabromossulftaleína e azul de tetrabromofenol, respectivamente (SILVA-COLOMBELI e FALKENBERG, 2006).

A proteinúria pode ser classificada como transitória ou de causa não patológica (febre, exercícios, proteinúria ortostática ou postural) e persistente ou patológica (desordens glomerulares, desordens tubulares) (CHRISTIAN e WATSON, 2004; PATEL, 2006; SIMERVILLE et al., 2005). Tendo em vista que um resultado positivo para proteína é

cl clinicamente significativa, o resultado deve ser confirmado por um segundo método e em amostras repetidas (HENRY, 2008). Uma vez confirmada a proteinúria, esta deve ser quantificada em urina de 24h (o que é considerado padrão-ouro), ou por meio da razão proteína/creatinina em amostra isolada (ALVES, 2004; PRICE et al., 2005; RALSTON et al., 1988). Existe inclusive uma tira no mercado (Multistix PRO® - Siemens) que contém uma área para detecção de albumina  $\geq 80$  mg/L, usando o reagente bis-(3',3''-diiodo-4',4''-dihidroxi-5',5''-dinitrofenil)-3,4,5,6-tetrabromo sulfoftaleína, uma área de reação com azul de tetrabromofenol para proteína  $\geq 300$  mg/L e uma área para creatinina baseada no complexo cobre-creatinina. Estudos têm mostrado uma boa correlação entre a tira e os métodos quantitativos convencionais (KANEKO et al., 2005; PUGIA et al., 2001; WATANABE et al., 2005).

A concentração de proteína na urina é mais comumente determinada por métodos colorimétricos, com o auxílio de corantes, como o azul de Coomassie brilhante (IWATA e NISHIKAZE, 1979; LOTT et al., 1983; MARSHALL e WILLIAMS, 1987) e o vermelho de pirogalol (ORSONNEAU et al., 1989; PHILLIPOU et al., 1989; WATANABE et al., 1986). Novos métodos quantitativos têm sido propostos recentemente, utilizando desde novos corantes, como a Eritrosina B, com melhor sensibilidade, detectando concentrações de 2,4 mg/L (HORIKOSHI et al., 2012), até espectrometria de massas (SHIEA et al., 2008).

Resultados falso-positivos para proteína em tiras convencionais de urinálise são encontrados em amostras de urina alcalinas ou concentradas, contendo fenazopiridina ou compostos de amônio quaternário. Por outro lado, resultados falso-negativos foram relatados em amostras diluídas ou contendo proteínas de baixo peso-molecular (PATEL, 2006; SIMERVILLE et al., 2005). Interferências falso-positivas já foram relatadas para cefalotina e cefaloridina, utilizando a tira Albustix® e, para clorexidina e gabapentina, com a tira Ames Multistix® (YOUNG, 2000). Em nosso estudo anterior, interferências analíticas falso-positivas foram encontradas no parâmetro proteína, por meio da tira reagente Multistix® 10 SG, com os fármacos cloridrato de ciprofloxacino e sulfato de quinina, na concentração supratrapêutica testada (350 mg/dL e 138 mg/dL, respectivamente), e difosfato de cloroquina, nas concentrações supratrapêutica e terapêutica, de 277 e 27,7 mg/dL, respectivamente (SILVA-COLOMBELI e FALKENBERG, 2007).

A maior divulgação do conhecimento sobre interferências em tiras reagentes de urina poderia contribuir para reduzir gastos para o sistema de saúde, com a realização de procedimentos e exames desnecessários, bem como evitar riscos ao paciente.

### 1.2.2) Cetonúria

O termo “corpos cetônicos” engloba três produtos intermediários do metabolismo das gorduras: acetona, ácido acetoacético e ácido beta-hidroxibutírico. Corpos cetônicos normalmente não são encontrados na urina. A excessiva formação desses compostos por distúrbios no metabolismo ou absorção dos carboidratos ou quantidade inadequada de carboidratos na dieta provoca a metabolização de quantidades crescentes de ácidos graxos. Quando isso ocorre, há um aumento na concentração sanguínea de corpos cetônicos (cetonemia), com o conseqüente aumento de excreção urinária (cetonúria) (HENRY, 2008; MOTTA, 2003). Tiras reagentes detectam ácido acetoacético por meio do reagente nitroprusseto de sódio. Resultados positivos são geralmente causados por baixa ingestão de carboidratos, em dietas de restrição calórica para redução de peso, pacientes diabéticos não-controlados e eventualmente podem chamar a atenção para casos de anorexia não diagnosticada (KUTTER, 2000; SIMERVILLE et al., 2005).

O teste das tiras reagentes não é específico para corpos cetônicos, e algumas substâncias endógenas (fenilcetonas) e fármacos são conhecidos por causar interferências. Fármacos que contenham um ou mais grupos sulfidríla (-SH ou tiol) livres, como, por exemplo, captopril, mesna, N-acetilcisteína, dimercaprol e penicilamina, podem reagir diretamente com o nitroprusseto (CSAKO e ELIN, 1996). A interferência do fármaco captopril já foi relatada por outros autores com diferentes tiras: N-Multistix® SG, Acetest®, Chemstrip® 9, Multistix® 10 SG, entre outras (CSAKO, 1987; LACY et al., 2000-2001; WARREN, 1980; YOUNG, 2000). Em estudo anterior encontramos interferência falso-positiva para o fármaco captopril nas concentrações supratrapêutica e terapêutica testadas (123 e 12,3 mg/dL) (SILVA-COLOMBELI, 2006).

Resultados falsamente elevados de cetonas implicam o risco de uma interpretação errônea do exame do paciente, ainda mais por ter sido detectada tal interferência em concentrações terapêuticas. O captopril é um inibidor da enzima conversora da angiotensina (ECA), utilizado no manejo da hipertensão. Pode diminuir ou interromper a progressão da

doença renal em pacientes diabéticos com nefropatia estabelecida, sendo que *American Diabetes Association* propõe seu uso para estes pacientes (LEWIS et al., 1993). Isso fez com que o uso do captopril em pacientes com nefropatia diabética aumentasse significativamente desde então, aumentando também a frequência da interferência pelo captopril em exames de urina (CSAKO e ELIN, 1996). Uma vez que um aumento na concentração de corpos cetônicos pode significar tanto uma acidose diabética, quanto falta de controle da dosagem de insulina por pacientes diabéticos (HENRY, 2008), tal interferência analítica, se passar despercebida, poderia conduzir a uma tomada de decisão equivocada.

### **1.2.3) Tiras reagentes em urinálise**

Atualmente existem no mercado inúmeras marcas de tiras reagentes em urinálise, com algumas diferenças quanto aos princípios utilizados nas determinações dos parâmetros analisados, quanto ao limite mínimo de detecção, intervalos de leitura e possíveis interferências (SILVA-COLOMBELI e FALKENBERG, 2006). A seguir (Tabela 1), são listadas as principais diferenças entre as tiras utilizadas neste estudo (Multistix® 10 SG e Combur® 10 Test M) em relação aos parâmetros analisados.

A partir das interferências falso-positivas detectadas (SILVA-COLOMBELI, 2006) e, ainda, considerando a relativa escassez de dados existentes na literatura sobre interferências no exame químico de urina, propusemo-nos a aprofundar os estudos de interferência analítica nos parâmetros cetona e proteína urinária (para os quais é possível caracterizar reações falso-positivas por testes complementares), nestas tiras reagentes de urinálise. Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Universidade Federal de Santa Catarina, sob número 158/07.

**Tabela 1.** Diferenças entre as tiras Multistix® 10 SG e Combur® 10 Test M em relação aos reagentes utilizados, limite de detecção e intervalos de leitura nos parâmetros cetona e proteína urinárias, segundo dados das bulas.

Parâmetro /tira	Cetona		Proteína	
	Multistix® 10 SG	Combur® 10 Test M	Multistix® 10 SG	Combur® 10 Test M
<b>Reagentes utilizados</b>	Nitroprusseto de sódio (7,1% p/p); solução tampão (92,9% p/p)	Nitroprusseto de sódio glicina (157,2µg); (4,2 mg)	Azul de tetrabromofenol (0,3% p/p); solução tampão (97,3% p/p); componentes não-reativos (2,4% p/p)	Tetraclorofenol-tetrabromo-sulfoftaleína (13,9 µg)
<b>Limite de detecção</b>	5-10 mg/dL	5 mg/dL	15-30 mg/dL	6 mg/dL
<b>Intervalos de leitura</b>	Negativo Traços- 5 mg/dL Baixo - 15 mg/dl Moderado - 40 mg/dL Alto - 80-160 mg/dL	Negativo Positivo (+) Positivo (++) Positivo (+++)	Negativo Traços Positivo (+) - 30 mg/dL Positivo (++) - 100 mg/dL Positivo (+++) - 300 mg/dL Positivo (++++) ≥ 2.000 mg/dL	Negativo Positivo (+) - 30 mg/dL Positivo (++) - 100 mg/dL Positivo (+++) - 500 mg/dL

Adaptada de SILVA-COLOMBELI e FALKENBERG, 2006.



## 2) OBJETIVOS

### 2.1) Geral

- Ampliar e aprofundar o estudo realizado no trabalho de mestrado, em relação a interferências analíticas falso-positivas de fármacos nos parâmetros cetona e proteína urinárias.

### 2.2) Específicos

- *In vitro*:

Testar a potencial interferência para proteinúria, com as tiras Multistix® 10 SG (Bayer) e Combur® 10 Test M (Roche), de novos fármacos selecionados com base: a) na frequência com que seu uso era descrito em pacientes do Hospital Universitário/UFSC, que apresentaram resultados falso-positivos para proteína e/ou cetona urinárias; b) em aspectos estruturais semelhantes aos de fármacos para os quais o potencial de interferência já tenha sido confirmado; ou c) em elevada excreção urinária na forma inalterada, estabelecendo as menores concentrações em que a interferência é detectada.

- *In vivo*:

- Avaliar o potencial de interferência de captopril e ciprofloxacino nos parâmetros cetona e proteína urinária, respectivamente, com as tiras reagentes Multistix® 10 SG (Bayer) e Combur® 10 Test M (Roche), em pacientes fazendo uso destes fármacos, e avaliar possíveis correlações de dose e ingestão hídrica com as interferências observadas;

- Quantificar o captopril nas amostras de urina coletadas dos pacientes, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência;

- Realizar um estudo transversal de potenciais interferências falso-positivas nos parâmetros cetona e proteína urinária em amostras de pacientes atendidos no ambulatório ou

internados no Hospital Universitário da UFSC e, a partir deste levantamento, avaliar *in vitro*, o potencial de interferência dos fármacos mais frequentemente utilizados pelos pacientes cujos resultados de exame apresentaram falsas reações positivas.

### 3) MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1) Avaliação analítica *in vitro*

##### 3.1.1) Avaliação da interferência analítica de fármacos no parâmetro proteína urinária em tiras reagentes de urinálise

###### 3.1.1.1) Seleção de fármacos para teste

Os fármacos incluídos neste estudo foram selecionados com base: a) na ausência de relatos de interferência na literatura, b) em alguma similaridade estrutural aos fármacos já caracterizados como potencialmente interferentes no parâmetro proteína; ou c) em dados relativos à dose terapêutica, biodisponibilidade, metabolismo e preferencialmente alta porcentagem de excreção urinária na forma inalterada.

Foram utilizadas amostras com grau de pureza farmacêutica (atendendo aos requisitos de qualidade para uso na produção de medicamentos), disponíveis no laboratório de Química Farmacêutica ou cedidos por farmácias magistrais.

###### 3.1.1.2) Obtenção de amostras de urina para o *pool* de urina controle

As amostras de urina foram obtidas de voluntários que não faziam uso de qualquer tipo de medicamento, com resultados normais para os parâmetros avaliados nas tiras reagentes, de ambos os gêneros, com idade variando de 18 a 50 anos, que concordaram em assinar o termo de compromisso livre e esclarecido (apêndice A). O *pool* obtido foi utilizado como controle negativo e também para preparação das amostras de urina suplementadas com os fármacos.

###### 3.1.1.3) Estabelecimento das concentrações de teste e preparação das soluções de fármacos a serem avaliados

Com base na dose e nos parâmetros farmacocinéticos (AKTORIES et al., 2005; KLASCO, 2011; LACY et al., 2000-2001), foram estimadas as concentrações esperadas na urina, a partir da ingestão da maior dose terapêutica preconizada (“concentração

terapêutica”). Calculou-se, com base nos percentuais de absorção (A) e excreção urinária na forma inalterada (Eu), a concentração do fármaco (mg/dL de urina) que seria obtida em um adulto sadio de 70 kg que utilizasse a máxima dose terapêutica (mg) em 24 h, considerando-se o volume urinário médio de 1.300 mL/24 h. Embora outros parâmetros farmacocinéticos (volume de distribuição, meia-vida, etc.) pudessem ser considerados, a indisponibilidade de alguns destes dados, para diversos fármacos selecionados, implicaria diferenças na forma de estimativa das concentrações. Assim, para padronizar a fórmula, optou-se por utilizar apenas dose terapêutica máxima, percentuais de absorção e excreção urinária na forma inalterada. A concentração urinária “terapêutica” ( $C_{ut}$ ) estimada correspondeu ao resultado da equação abaixo:

$$C_{ut} = \frac{A \times Eu \times Dose \times 100}{1.300 \text{ mL}}$$

Foram testadas inicialmente concentrações ditas supraterapêuticas (ST) (cerca de dez vezes superior àquela que seria obtida na urina, após a administração de doses terapêuticas), conforme o Protocolo Internacional para Avaliação de Interferências Analíticas (GALTEAU e SIEST, 1984; KALLNER e TRYDING, 1989). Para tanto, amostras de fármacos selecionados foram pesadas em balança analítica, solubilizadas na própria urina, em volume necessário à obtenção da urina suplementada com o fármaco em concentração supraterapêutica. A partir desta, por diluição 1:10 com o *pool* de urina, foi obtida a amostra de urina com fármaco em “concentração terapêutica” (T). Por nova diluição 1:10 desta última, foi obtida a concentração subterapêutica (sT). Os fármacos selecionados, bem como as concentrações testadas, estão listados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Fármacos selecionados e respectivas concentrações de teste para avaliação do potencial de interferência na determinação de proteína urinária.

Fármacos	ST* (mg/dL)	T* (mg/dL)	sT* (mg/dL)
<b>Amilorida</b>	7,0	0,7	0,07
<b>Azitromicina</b>	NT**	2,0	0,2
<b>Clortalidona</b>	NT**	2,0	0,2
<b>Enalapril (Maleato)</b>	10,0	1,0	0,1
<b>Fluconazol</b>	250,0	25,0	2,5
<b>Hidroxicloroquina (Sulfato)</b>	80,0	8,0	0,8
<b>Levofloxacino</b>	NT**	45	4,5
	350***	35,0***	3,5***
<b>Neomicina</b>	30,0	3,0	0,3
<b>Norfloxacino</b>	60,0	6,0	0,6
	350***	35,0***	3,5***
<b>Ofloxacino</b>	350***	35,0***	3,5***
<b>Pantoprazol</b>	110,0	11,0	1,1

\*ST= Concentração Supraterapêutica, T= Concentração Terapêutica, sT= Concentração subterapêutica.

\*\*NT= Não testada por problemas de solubilidade.

\*\*\*Mesmas concentrações testadas com o cloridrato de ciprofloxacino em trabalho anterior (STc, Tc e sTc).

#### 3.1.1.4) Avaliação do potencial de interferência

Amostras do *pool* de urina suplementadas com fármacos em concentrações supraterapêuticas foram testadas em 5 replicatas. Para os fármacos potencialmente interferentes em concentrações supraterapêuticas, foram testadas 5 replicatas em concentração terapêutica e subterapêutica; para aqueles fármacos que não apresentaram interferência na maior concentração, foram testadas 3 replicatas nas demais concentrações (T e sT). As quinolonas foram testadas também nas concentrações supraterapêutica, terapêutica e

subterapêutica correspondentes ao ciprofloxacino (STc, Tc e sTc, respectivamente).

A avaliação foi feita comparando-se os resultados da amostra de urina controle (sem qualquer tratamento prévio) e da amostra de urina suplementada com cada fármaco. Utilizaram-se tiras reagentes de duas diferentes marcas, Multistix® 10 SG (Bayer) e Combur® 10 Test M (Roche). A realização das leituras foi feita através dos equipamentos CLINITEK 500 (Bayer) e Urisys 1100 (Roche), respectivamente.

### **3.1.2) Avaliação da interferência analítica dos fármacos interferentes em tiras reagentes para proteína urinária na quantificação de proteína, por meio do método com vermelho de pirogalol-molibdato (VPM)**

Todos os fármacos que apresentaram interferência falso-positiva no parâmetro proteína urinária, por meio das tiras reagentes utilizadas no estudo, foram avaliados quanto à potencial interferência na quantificação de proteína pelo método com vermelho de pirogalol-molibdato.

Os fármacos foram solubilizados em um *pool* de amostras de urina obtidas de voluntários que não faziam uso de qualquer tipo de medicamento, com resultados normais para os parâmetros avaliados nas tiras reagentes, de ambos os gêneros, com idade variando de 18 a 50 anos, o qual foi utilizado também como controle negativo.

As dosagens foram realizadas com o *kit* Siemens Dimension® Clinical Chemistry System Flex® - Urinary/Cerebrospinal Fluid Protein Flex®, no equipamento DIMENSION RXL Max – Siemens.

### **3.1.3) Estabelecimento das menores concentrações interferentes**

Para a avaliação da menor concentração interferente dos fármacos estudados, partiu-se de um *pool* de amostras de urina de voluntários com resultados normais para os parâmetros avaliados nas tiras reagentes, que não faziam uso de qualquer tipo de medicamento. O fármaco foi adicionado em quantidade equivalente à menor concentração em que foram encontradas interferências no trabalho anterior (SILVA-COLOMBELI, 2006) ou no presente estudo. Foram testadas pelo menos três concentrações intermediárias entre valores interferentes e não interferentes. As análises foram realizadas em 5 replicatas.

A avaliação das menores concentrações no parâmetro cetona foi feita para o fármaco captopril, que havia apresentado, na tira Multistix® 10 SG (Bayer), interferência falso-positiva nas concentrações de 123 mg/dL e 12,3 mg/dL, supraterapêutica e terapêutica, respectivamente (SILVA-COLOMBELI, 2006). As novas concentrações testadas partiram da menor concentração interferente (terapêutica) em direção à concentração subterapêutica testada (1,23 mg/dL). Avaliaram-se inicialmente, uma concentração intermediária entre as duas e, a seguir, outras concentrações intermediárias entre uma “interferente” e outra “não interferente”. Foi realizada também a avaliação de interferência deste fármaco com a tira Combur® 10 Test M (Roche), que não havia sido testada em trabalho anterior, e as menores concentrações interferentes foram analisadas como descrito acima.

Para os fármacos cloridrato de ciprofloxacino e sulfato de quinina, que apresentaram interferência no estudo anterior somente na concentração supraterapêutica (350 e 138 mg/dL, respectivamente), foram avaliadas concentrações no intervalo entre as concentrações supraterapêutica e terapêutica. Para o difosfato de cloroquina, que apresentou interferência também na concentração terapêutica (27,7 mg/dL), foram avaliados valores entre as concentrações terapêutica e subterapêutica.

Para aqueles novos fármacos avaliados em que houve interferência analítica para o parâmetro proteína em tira reagente, bem como para os fármacos que apresentaram interferência no método do vermelho de pirogalol-molibdato, realizou-se a avaliação da menor concentração interferente, da mesma maneira descrita acima.

#### **3.1.4) Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas com o programa Statistica 8.0, sendo considerados estatisticamente significativos valores de  $P \leq 0,05$ .

As determinações foram realizadas com cinco repetições, salvo exceções citadas no item 3.1.1.4. Para análise estatística das avaliações analíticas *in vitro* com tiras reagentes, foi utilizado o teste U não paramétrico de Mann-Whitney.

Para análise dos resultados obtidos no método do vermelho de pirogalol-molibdato, foi utilizado o teste *t* de Student para amostras não pareadas.

### **3.2) Avaliação analítica *in vivo***

O processamento das amostras de urina foi realizado da mesma maneira, independentemente do medicamento em uso pelo paciente. O exame químico de urina foi realizado em todas as amostras coletadas. A análise foi feita no mesmo dia da coleta, por meio das tiras reagentes Multistix® 10 SG (Bayer) e Combur® 10 Test M (Roche). A realização das leituras foi feita em equipamentos CLINITEK 500 (Bayer) e Urisys 1100 (Roche), respectivamente. Foram realizadas cinco repetições para cada tira reagente analisada, em cada uma das amostras coletadas.

#### **3.2.1) Avaliação do potencial de interferência do captopril**

##### **3.2.1.1) Obtenção de amostras de urina**

Os pacientes foram encaminhados ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário/UFSC pelo médico responsável, que explicou o motivo da pesquisa, e esclarecidos sobre os objetivos do trabalho pela própria pesquisadora, sendo então assinado o termo de consentimento livre e esclarecido (apêndice B). Como praticamente nenhum paciente encaminhado utilizava monoterapia com captopril, foram incluídos na amostra pacientes polimedicados que estivessem fazendo uso contínuo do fármaco. Foram coletadas três amostras em dias diferentes, logo após as consultas com o médico. As amostras foram identificadas por um código correspondente ao número do prontuário do paciente, seguido pelo algarismo 1, 2 ou 3, referentes à sequência de coleta das amostras. Por ocasião de cada coleta, foi solicitado aos pacientes que respondessem a um questionário, para obter diversas informações sobre o uso do fármaco, como dose e horário de tomada do medicamento, ingestão hídrica, etc. (apêndice C).

##### **3.2.1.2) Teste confirmatório para cetonas**

As amostras que apresentaram reação positiva para cetona foram testadas para a diferenciação entre a reação verdadeira e a possível interferência (falso-positivo). Para tanto, foi adicionada uma gota de ácido acético glacial na própria tira, observando se ocorreria uma mudança de coloração, após 15 a 60 segundos. Se a cor rapidamente desbotasse para um vermelho-cereja e eventualmente desaparecesse depois da acidificação, a reação para cetonas era considerada falso-positiva (CSAKO, 1987).



### 3.2.1.3) Quantificação do captopril nas amostras de urina de pacientes

O captopril nas amostras de urina foi quantificado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com base em um método desenvolvido por Kusmierek e Bald (2007), o qual sofreu pequenas alterações em relação ao gradiente de eluição, à coluna e pré-coluna cromatográficas e ao procedimento de centrifugação na preparação da amostra. Por conta disso, o método foi validado antes de ser utilizado. Os detalhes das diferenças entre a metodologia original e a adaptada são descritos na tabela 3.

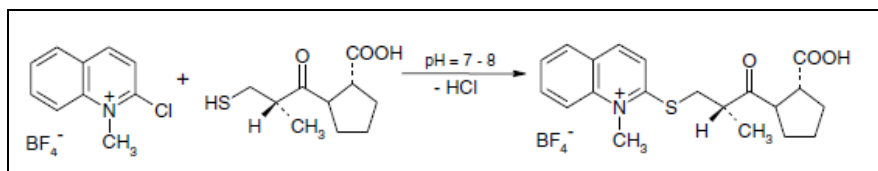
**Tabela 3.** Diferenças entre a metodologia original de determinação de captopril na urina por cromatografia líquida de alta eficiência (KUSMIEREK e BALD, 2007) e a metodologia adaptada neste estudo.

	<b>Metodologia original (Kusmierek e Bald, 2007)</b>	<b>Metodologia adaptada neste estudo</b>
<b>Equipamento</b>	Hewlett-Packard 1100	Perkin Elmer
	Series	
<b>Coluna</b>	Zorbax SB C-18 (5 µm, 150 x 4,6 mm)	Supelcosil™ LC-18 (5 µm, 150 x 4,6 mm)
<b>Pré-coluna</b>	Não utilizada	ODS (4,0 x 3,0 mm)
<b>Gradiente de Eluição (Acetonitrila)</b>	0-4 min 15% 4-8 min 15-40% 8-12 min 40-15%	0-4 min 9% 4-8 min 9-40% 8-12 min 40-9% 12-14 9%
<b>Centrifugação da amostra previamente à análise</b>	<i>Força de centrifugação (g)</i> 12.000	12.100
	<i>Tempo (min)</i> 5	10

### 3.2.1.3.1) Preparação da amostra para a análise

#### - Síntese do reagente de derivatização

A metodologia analítica utilizada incluía a derivatização do captopril na urina, previamente à análise propriamente dita (Figura 1). Para tanto, foi sintetizado o reagente de derivatização, tetrafluoroborato de 2-cloro-1-metilquinolina (CMQT), de acordo com Bald e Glowacki (2001), no laboratório de Química Farmacêutica, misturando-se 1,0 g (3112 mmol) de 2-cloroquinolina (Sigma-Aldrich), 1,2 mL de nitrometano (Sigma-Aldrich) e 1,0 g (6760 mmol) de tetrafluoroborato de trimetiloxônio (Sigma-Aldrich). Após a mistura, foram adicionados 4 mL de éter dietílico e ocorreu a formação dos cristais, que foram lavados com éter dietílico e secos em pentóxido de fósforo sob vácuo. O produto obtido foi analisado por espectroscopia no infra-vermelho (apêndice D), comparando-se aos reagentes iniciais e comprovando-se a mudança estrutural desejada. O rendimento do produto sintetizado foi de 86,48%.



**Figura 1.** Reação de derivatização do captopril com tetrafluoroborato de 2-cloro-1-metilquinolina.

Fonte: Kusmierek e Bald, 2007.

#### - Processamento das amostras de urina

As amostras foram descongeladas e processadas da seguinte forma: em um tubo de Eppendorf foram colocados 200  $\mu\text{L}$  da amostra de urina do paciente, acrescidos de 100  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato 0,2 M (pH 7,8) e 10  $\mu\text{L}$  de cloridrato de tris (carboxietil) fosfina (TCEP) (Sigma-Aldrich). Após 5 minutos, foram acrescentados 30  $\mu\text{L}$  de CMQT 0,1 M, com posterior agitação em vórtex, e a amostra foi incubada 2 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  de ácido perclórico à mistura que foi centrifugada por 10 minutos, a 12.100 g. No método original, a centrifugação era realizada por 5 minutos a

12.000 g. O sobrenadante foi filtrado e 20  $\mu$ L foram injetados no sistema cromatográfico.

### 3.2.1.3.2) Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A análise cromatográfica foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência Perkin Elmer, equipado com injetor automático Perkin Elmer Series 200, bomba binária Series 200, desgaseificador a vácuo Perkin Elmer Series 200, detector UV/Vis Series 200, interface 600 Series LINK. A separação foi feita em coluna Supelcosil<sup>TM</sup> LC-18 (5  $\mu$ m, 150 x 4,6 mm), usando pré-coluna ODS (4,0 x 3,0 mm). O fluxo foi de 1,0 mL/min, detecção em 355 nm, volume de injeção de 20  $\mu$ L, usando como fase móvel tampão ácido tricloroacético 0,1M pH 1,6 (componente A) e acetonitrila (componente B). Um gradiente de acetonitrila foi utilizado. O perfil de eluição utilizado foi: 0-4 min 9% B, 4-8 min 9-40% B, 8-12 min 40-9% B e 12-14 9% B.

### 3.2.1.3.3) Validação da metodologia adaptada

Os parâmetros de validação foram desenvolvidos conforme ICH (2005) e ANVISA (2003). Os parâmetros avaliados e validados do método foram: linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação e limite de detecção.

#### - *Linearidade*

Foi estabelecida por meio da construção da curva de calibração, obtida com soluções de captopril nas concentrações de: 5, 10, 50, 100, 150 e 200  $\mu$ M em urina, a partir de uma solução de captopril estoque de 10 mM em HCl 0,1 M. As áreas (uV.s) foram representadas frente às concentrações de captopril ( $\mu$ M) para a construção da curva. A equação da reta foi obtida por regressão linear e o coeficiente de correlação calculado. Para determinar a linearidade da curva em um método bioanalítico, espera-se que o coeficiente de correlação linear (r) seja igual ou superior a 0,98 (ANVISA, 2003).

- *Precisão e exatidão*

A precisão e a exatidão do método analítico foram avaliadas por análises inter e intra-dia. A precisão representa o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais.

A repetibilidade foi verificada utilizando-se 3 concentrações de captopril (50, 100 e 150  $\mu\text{M}$ ), realizando-se 5 determinações de cada concentração. Desta forma, foi possível calcular o desvio padrão relativo, não devendo este ser maior do que 15% (ANVISA, 2003).

A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (ANVISA, 2003). Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até  $\pm 20\%$ . Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até  $\pm 15\%$  (RIBANI et al., 2004).

- *Limite de quantificação (LQ)*

Representa a menor quantidade do analito na amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições experimentais estabelecidas. A equação utilizada para o cálculo é apresentado a seguir:

$$LQ = 10 \times dp/IC$$

onde: dp é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de várias curvas de calibração construídas, contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação; IC é a inclinação da curva de calibração; 10 é utilizado com base na relação de dez vezes o ruído da linha de base.

- *Limite de detecção (LD)*

Representa a menor quantidade do analito presente na amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. Normalmente é avaliada pela relação sinal/ruído, em uma proporção 3:1. A equação utilizada para o cálculo é apresentado a seguir:

$$LD = 3,3 \times dp/IC$$

onde:  $dp$  é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação;  $IC$  é a inclinação da curva de calibração; 3,3 é utilizado com base na relação de 3,3 vezes o ruído da linha de base.

### **3.2.2) Avaliação do potencial de interferência do ciprofloxacino**

#### **3.2.2.1) Obtenção de amostras de urina**

Pela dificuldade em encontrar pacientes em uso somente de ciprofloxacino, entre os pacientes atendidos no Hospital Universitário/UFSC, submetemos nosso projeto de pesquisa à Comissão de Acompanhamentos dos Projetos de Pesquisa em Saúde da Secretaria Municipal de Saúde, Prefeitura Municipal de Florianópolis, sendo o mesmo aprovado para execução em alguns Centros de Saúde de Florianópolis.

Uma declaração foi deixada no Centro de Saúde da Trindade, e com a ajuda das farmacêuticas que dispensavam a medicação, alguns pacientes que começariam o uso de ciprofloxacino aceitavam fornecer dados como nome e telefone, para que a própria pesquisadora esclarecesse quaisquer dúvidas sobre o trabalho e agendasse a coleta das amostras. As amostras foram obtidas, quase em sua totalidade, nas próprias casas ou locais de trabalho dos pacientes, por decisão do próprio paciente, requisito fundamental para participar da pesquisa, pois muitas vezes tornava-se inviável sua ida ao Laboratório de Análises Clínicas do HU/UFSC para realizar a coleta. No momento da coleta, foi explicado o motivo da pesquisa e esclarecidos os objetivos do trabalho, e então foi assinado o termo de consentimento livre e esclarecido (apêndice E).

Foi coletada uma amostra durante o uso do medicamento e outra depois de concluído o tratamento. As amostras foram identificadas por um código correspondente ao número do prontuário do paciente (ou número de registro, nos casos em que o paciente não possuía prontuário), seguido pelo algarismo 1 ou 2, referentes à primeira e à segunda coleta. Por ocasião de cada coleta, foi solicitado aos pacientes que respondessem a um questionário, para obter diversas informações sobre o uso do fármaco, como dose e horário de tomada do medicamento, ingestão hídrica, etc. (apêndice F).

### 3.2.2.2) Testes confirmatórios para proteína

Em todas as amostras analisadas, foi realizado o teste confirmatório para proteínas com ácido sulfossalicílico 20%. Em um tubo de vidro, adicionou-se uma gota de ácido para cada mililitro de urina e observou-se a intensidade de turbidez (ANVISA, 2003; STRASINGER, 1996).

Nas amostras com reação confirmatória positiva foi também realizada a quantificação das proteínas, por meio do método colorimétrico, utilizando vermelho de pirogalol-molibdato (VPM) (EUROPEAN URINALYSIS GUIDELINES, 2000; HENRY, 2008).

### **3.2.3) Análise dos resultados dos testes *in vivo* em pacientes usuários de captopril e ciprofloxacino**

A análise foi feita dividindo-se os resultados em três grupos para cada parâmetro analisado: reação negativa, reação falso-positiva e reação positiva verdadeira. Foram atribuídos escores para o teste do parâmetro em análise (cetona ou proteína). Quando a reação foi negativa ou positiva verdadeira, isto foi considerado como escore zero (não houve interferência). Caso no teste confirmatório tenha se constatado que a reação foi falso-positiva (interferência), foi atribuído escore 1 para cada amostra (ou replicata) em que for constatada interferência, independente da intensidade de reação positiva.

Foi realizada uma comparação entre os pacientes fazendo uso do fármaco captopril e o controle (*pool* de amostras de voluntários, que não estavam fazendo uso de medicamentos). Para esta análise, foi utilizado o teste U não paramétrico de Mann-Whitney.

No caso das amostras de urina coletadas de pacientes fazendo uso de ciprofloxacino durante e após o tratamento, foi utilizado o teste de Wilcoxon para comparar as amostras analisadas, por meio da leitura da tira reagente, e teste *t* de Student para amostras pareadas, para comparação das leituras realizadas com o vermelho de pirogalol-molibdato.

### **3.2.4) Estudo transversal da interferência de fármacos nos parâmetros proteína ou cetonas**

Foi realizada a análise de interferências no período de 15/09/2008 até 11/11/2008 (devido a problemas técnicos no aparelho leitor de tiras utilizado no laboratório), tendo sido reiniciado somente em 25/05/2009 prosseguindo até 24/07/2009. As amostras de urina analisadas na rotina do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário foram triadas diariamente nos períodos mencionados, separando-se aquelas que apresentaram reação positiva para proteínas ou cetonas, para a realização dos respectivos testes confirmatórios.

Para todos os pacientes que apresentaram resultados verdadeiro-positivos e falso-positivos, foi realizada a coleta de dados referentes aos medicamentos utilizados no período da coleta das amostras de urina, a partir da análise dos prontuários dos pacientes disponibilizados no Serviço de Prontuário do Paciente (SPP) do Hospital Universitário/UFSC. Foram tabulados os dados e realizado um levantamento da frequência dos fármacos, destacando-se aqueles envolvidos em maior número de casos, para avaliações específicas complementares. Adicionalmente, foi realizada uma análise das associações (qui-quadrado) para as amostras de proteínas e cetonas e regressão logística para o teste de proteínas, considerando um nível de significância de 5%.

Alguns fármacos mais frequentemente citados nos prontuários de pacientes com falsas reações positivas foram avaliados quanto ao potencial de interferência *in vitro*, conforme item 3.1.1.





## 4) RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1) Avaliação analítica *in vitro*

#### 4.1.1) Avaliação da interferência analítica de fármacos no parâmetro proteína urinária por meio de tiras reagentes

Os fármacos selecionados inicialmente para esta etapa e as respectivas concentrações de teste estão relacionados na Tabela 4. Os fármacos azitromicina e clortalidona foram avaliados somente nas concentrações terapêutica e subterapêutica por problemas de solubilidade. Por esse mesmo motivo, o fármaco ofloxacino não foi avaliado na concentração supraterapêutica durante o trabalho de mestrado (SILVA-COLOMBELI, 2006), em que ele não apresentou interferências nas suas concentrações terapêutica e subterapêutica (52,6 e 5,26 mg/dL, respectivamente). O fármaco levofloxacino, também por problemas de solubilidade, foi avaliado somente em concentração terapêutica e subterapêutica, enquanto o norfloxacino foi avaliado nas três concentrações. Para viabilizar a comparação do potencial interferente das quinolonas testadas neste trabalho, elas foram avaliadas também nas concentrações supraterapêutica, terapêutica e subterapêutica correspondentes ao ciprofloxacino (STc, Tc e sTc, respectivamente).

O sulfato de hidroxicloroquina apresentou interferência falso-positiva estatisticamente significativa quando comparado à urina controle na concentração supraterapêutica (80 mg/dL) e na concentração terapêutica (8 mg/dL) com a tira reagente Multistix® 10SG, porém não apresentou interferência com a tira da Roche, em nenhuma das concentrações testadas. Os fármacos levofloxacino e ofloxacino também apresentaram interferência somente com a tira Multistix® 10SG na maior concentração testada, correspondente à concentração supraterapêutica estimada para o ciprofloxacino (350 mg/dL), sem apresentar tais interferências com a outra tira estudada. Os demais fármacos avaliados não apresentaram quaisquer interferências significantes nas duas fitas avaliadas em nenhuma das concentrações estudadas. Na literatura pesquisada, não foi encontrado qualquer relato de interferência analítica na proteína urinária para os fármacos hidroxicloroquina, levofloxacino e ofloxacino.

**Tabela 4.** Proteína urinária determinada por meio de tiras reagentes para urinálise.

Fármacos	Concentração do fármaco na urina (mg/dL)	Proteína urinária	
		Multistix® 10 SG	Combur® 10 Test M
Amilorida	7,0 (ST)	(-)	(-)
	0,7 (T)	(-)	(-)
	0,07 (sT)	(-)	(-)
Azitromicina	20,0 (ST)	NT	NT
	2,0 (T)	(-)	(-)
	0,2 (sT)	(-)	(-)
Clortalidona	20,0 (ST)	NT	NT
	2,0 (T)	(-)	(-)
	0,2 (sT)	(-)	(-)
Enalapril (Maleato)	10,0 (ST)	(-)	(-)
	1,0 (T)	(-)	(-)
	0,1 (sT)	(-)	(-)
Fluconazol	250,0 (ST)	(-)	(-)
	25,0 (T)	(-)	(-)
	2,5 (sT)	(-)	(-)
Hidroxicloroquina (Sulfato)	80,0 (ST)	2+*	(-)
	8,0 (T)	1+*	(-)
	0,8 (sT)	(-)	(-)
Levofloxacino	450,0 (ST)	NT	NT
	45,0 (T)	(-)	(-)
	4,5 (sT)	(-)	(-)
	350 (STc)	1+*	(-)
	35,0 (Tc)	(-)	(-)
	3,5 (sTc)	(-)	(-)
Neomicina	30,0 (ST)	(-)	(-)
	3,0 (T)	(-)	(-)
	0,3 (sT)	(-)	(-)
Norfloxacino	60,0 (ST)	(-)	(-)
	6,0 (T)	(-)	(-)
	0,6 (sT)	(-)	(-)
	350 (STc)	(-)	(-)
	35,0 (Tc)	(-)	(-)
	3,5 (sTc)	(-)	(-)
Ofloxacino	350 (STc)	1+*	(-)
	35,0 (Tc)	(-)	(-)
	3,5 (sTc)	(-)	(-)
Pantoprazol	110,0 (ST)	(-)	(-)
	11,0 (T)	(-)	(-)
	1,1 (sT)	(-)	(-)

ST= Concentração Supraterapêutica, T= Concentração Terapêutica, sT= Concentração subterapêutica.

STc, Tc e sTc= Mesmas concentrações testadas com o cloridrato de ciprofloxacino em trabalho anterior.

NT= Não testada por problemas de solubilidade.

\* $P < 0,01$ , Mann Whitney. Todas as análises foram realizadas em 5 replicatas.

A mudança na tonalidade de cor do indicador de pH, chamada “erro protéico” tem sido amplamente utilizado na determinação de albumina no soro, utilizando corantes como o verde de bromocresol e púrpura de bromocresol (MURAMOTO et al., 1999; SUZUKI, 2005). O método de tiras reagentes para proteína também se baseia no mesmo princípio. Uma vez que as proteínas apresentam carga em pH fisiológico, sua presença induzirá alteração de pH. A tira reagente de urina é impregnada com azul de tetrabromofenol tamponado em pH ácido de 3, ou tetraclorofenoltetrabromossulfoftaleína. Na ausência de proteína, a tira fica amarela; 30 a 60 segundos após o contato com a urina aparecem tonalidades variáveis de verde dependendo do tipo e da concentração das proteínas presentes. Os resultados podem ser lidos em um “sistema de cruzes” como negativo, vestígios, e 1+ a 4+ (HENRY, 2008). Segundo Patel (2008) um resultado de proteína negativo ou vestígios nas tiras reagentes pode ser considerado normal, no entanto pacientes com valores de 1+ ou superiores deveriam ser pelo menos monitorados.

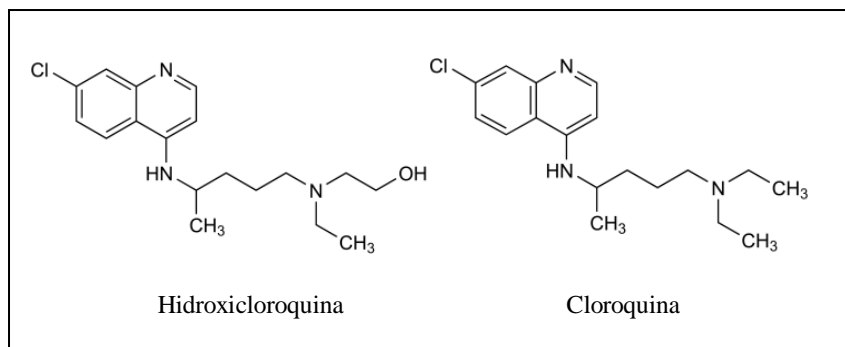
O azul de tetrabromofenol, além de ser utilizado como indicador, é também usado para detectar  $\text{SO}_2$  em gelatinas, bem como indicador ácido-básico para pesquisa de impurezas ácidas ou alcalinas e na identificação de cloreto de benzalcônio e cloreto de cetilpiridínio (HARTKE e MUTSCHLER, 1987). Sendo assim, pode-se dizer que este indicador é pouco específico, estando o teste de proteínas passível de sofrer interferências.

A principal fonte de erro no uso de tiras ocorre quando a urina é extremamente alcalina e supera a capacidade do sistema de tamponamento, produzindo elevação do pH e uma mudança de cor que não tem relação com a concentração de proteínas (CARAWAY e KAMMEYER, 1972; STRASINGER, 1996; VIZCAÍNO et al., 2000).

Segundo Suzuki (2005), características espectrais no ultravioleta de indicadores de pH com sulfoftaleína na presença de proteína podem ser explicadas pelo equilíbrio químico, baseado na reação entre as cadeias laterais de resíduos de aminoácidos carregadas positivamente na molécula de proteína e o ânion dissociado do corante.

Em estudo anterior, foram detectadas interferências analíticas com os fármacos ciprofloxacino, cloroquina e quinina no parâmetro proteína utilizando a tira Multistix® 10SG (SILVA-COLOMBELI, 2006). Desta classe, no presente trabalho, somente pôde ser avaliado o sulfato de hidroxicloroquina. A hidroxicloroquina difere da cloroquina pela presença de um grupamento hidroxila no final da cadeia lateral

(Figura 2) e, assim como a cloroquina, apresentou interferência inclusive na concentração terapêutica.



**Figura 2.** Estruturas químicas da hidroxicloroquina e cloroquina.

Fonte: Moffat et al., 2004.

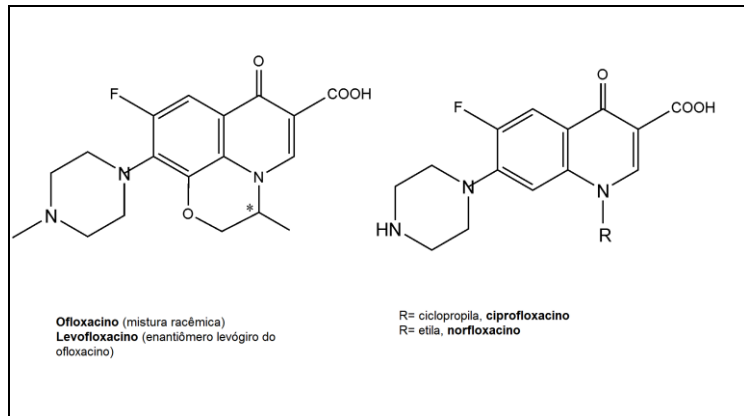
A hidroxicloroquina é usada no tratamento da malária, lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide (LACY et al., 2000-2001). Evidências têm demonstrado que a hidroxicloroquina tem efeito protetor contra trombose e proporciona aumento da sobrevida em pacientes com lúpus (RUIZ-IRASTORZA et al., 2006). Alguns antimaláricos (cloroquina, hidroxicloroquina e mepacrina) têm se mostrado eficazes em outras doenças diversas (KALIA e DUTZ, 2007). Estudos recentes sugerem o uso de hidroxicloroquina no tratamento de perniose, em dose inicial de 200 mg, administrada duas vezes ao dia, não excedendo a dosagem máxima de 6,5 mg/kg/dia (YANG et al., 2010). Lupus eritematoso pérmio foi descrito pela primeira vez por Hutchinson, no século XIX, como uma forma de lúpus com manifestações de perniose, que são lesões inflamatórias de pele decorrentes de uma reação anormal à diminuição da temperatura ambiental (SPELLING et al., 2001).

Em estudo anterior, realizado apenas com a tira Multistix® 10 SG (SILVA-COLOMBELI e FALKENBERG, 2007), o ofloxacino foi avaliado somente nas concentrações terapêutica e subterapêutica (52,6 mg/dL e 5,26 mg/dL), porém não apresentou interferência estatisticamente significativa para proteína. Quando avaliado em 350 mg/dL (STc, que também seria considerado um valor supraterapêutico para o ofloxacino) uma reação falso-positiva estatisticamente significativa foi observada. O levofloxacino, insolúvel em sua própria concentração supraterapêutica (450 mg/dL), também foi avaliado na

concentração supratrapêutica do ciprofloxacino (STc), sendo observada reação falso-positiva.

O fenômeno denominado “erro proteico dos indicadores” é mais ou menos pronunciado, segundo o número de grupos amínicos livres nas diversas frações protéicas. Tanto ciprofloxacino quanto ofloxacino apresentam nitrogênios protonáveis em suas estruturas, que poderiam estar envolvidos na reação falso-positiva. O levofloxacino é o enantiômero S (forma levógira) do ofloxacino, e uma vez que ambos apresentaram interferência, a estereoquímica do átomo de carbono assimétrico não parece ser tão relevante para a reação de interferência. Por outro lado, a única diferença estrutural entre o norfloxacino e o ciprofloxacino é o substituinte no nitrogênio do anel quinolônico (grupo etila e ciclopropila, respectivamente). Sendo assim, o substituinte no átomo de N parece extremamente relevante para o potencial de interferência (Figura 3).

Young (2000) relata um aumento fisiológico da excreção protéica urinária em 1% dos pacientes tratados com norfloxacino, porém não menciona qualquer tipo de interferência relacionada ao uso de ofloxacino.



**Figura 3.** Estrutura química das quinolonas testadas no estudo.

Em função dos resultados dos estudos *in vivo* e do estudo transversal, foi realizada a avaliação da interferência analítica *in vitro* no exame químico de urina com as duas tiras reagentes avaliadas neste estudo, de fármacos que apareceram com frequência no estudo transversal ou em associação com algum fármaco estudado no estudo *in vivo*. Foram avaliados os fármacos dipirona, omeprazol e

hidroclorotiazida nas concentrações supratrapêuticas (26 mg/dL, 10 mg/dL e 46 mg/dL, respectivamente), terapêuticas e subterapêuticas estabelecidas para os mesmos. Nenhuma interferência foi observada.

#### **4.1.2) Avaliação da interferência analítica dos fármacos interferentes em tiras reagentes para proteína urinária na quantificação de proteína por meio do método com vermelho de pirogalol-molibdato (VPM)**

Após a análise da amostra de urina de voluntário utilizando ciprofloxacino (ver discussão e resultados do estudo *in vivo*, item 4.2.2), foi observado resultado positivo para proteína na tira Multistix® 10 SG e negativo no teste confirmatório com ácido sulfossalicílico, caracterizando uma reação falso-positiva. Em virtude desse achado, resolveu-se realizar também o teste de quantificação da proteína com o vermelho de pirogalol-molibdato, para confirmar que se tratava somente de interferência do fármaco com o reagente contido na tira. Contrariamente à expectativa, valores acima dos valores de referência foram encontrados, sendo que a amostra, após o término do tratamento com ciprofloxacino, apresentou valores dentro do intervalo de referência. Devido a esses resultados, optamos por quantificar a proteína pelo método do vermelho de pirogalol-molibdato em todas as amostras coletadas, bem como avaliar a potencial interferência na metodologia com vermelho de pirogalol-molibdato dos fármacos por nós identificados como interferentes na metodologia da tira reagente.

Os resultados para os testes de interferência estão apresentados na Tabela 5. Todos os fármacos avaliados que tiveram interferência na tira reagente Multistix® 10 SG interferiram também na metodologia com vermelho de pirogalol-molibdato.

**Tabela 5.** Proteína urinária determinada com o ensaio de vermelho de pirogalol-molibdato (VPM).

Amostras de urina	Concentração do fármaco na urina (mg/dL)	Proteína urinária (mg/dL) determinada pelo ensaio com VPM (Valores de referência: 0-11.9)
Urina controle (sem fármaco)	---	5,34 ± 0,207
<i>Quinolonas</i>		
<b>Ciprofloxacino (cloridrato)</b>	350 (ST)	51,06 ± 0,594 <sup>b</sup>
	35 (T)	8,50 ± 0,187 <sup>b</sup>
	3,5 (sT)	5,32 ± 0,109
<b>Levofloxacino</b>	350 (STc)	22,28 ± 1,064 <sup>b</sup>
	35 (Tc)	6,20 ± 0,255 <sup>b</sup>
	3,5 (sTc)	5,56 ± 0,378
<b>Norfloxacino</b>	350 (STc)	9,08 ± 0,239 <sup>b</sup>
	35 (Tc)	5,82 ± 0,164 <sup>a</sup>
	3,5 (sTc)	5,52 ± 0,130
<b>Ofloxacino</b>	350 (STc)	20,56 ± 0,321 <sup>b</sup>
	35 (Tc)	6,80 ± 0,292 <sup>b</sup>
	3,5 (sTc)	5,44 ± 0,055
<i>Derivados da quinina</i>		
<b>Cloroquina (difosfato)</b>	280 (ST)	506,00 ± 4,699 <sup>b</sup>
	28 (T)	45,12 ± 1,069 <sup>b</sup>
	2,8 (sT)	8,26 ± 0,279 <sup>b</sup>
<b>Hidroxicloroquina (sulfato)</b>	80 (ST)	166,50 ± 1,142 <sup>b</sup>
	8 (T)	19,46 ± 0,297 <sup>b</sup>
	0,8 (sT)	6,46 ± 0,114 <sup>b</sup>
<b>Quinina (sulfato)</b>	140 (ST)	218,38 ± 1,522 <sup>b</sup>
	14 (T)	16,40 ± 0,674 <sup>b</sup>
	1,4 (sT)	7,42 ± 0,311 <sup>b</sup>

Os resultados do ensaio realizado com vermelho de pirogalol-molibdato são expressos como média ± DP de cinco ensaios em separado (CV<5%). <sup>a</sup> P<0,01; <sup>b</sup> P<0,001, teste *t* de Student para amostras não pareadas. Comparação da urina controle com amostras suplementadas com os fármacos.

#### 4.1.2.1) Interferência de fármacos quinolônicos na metodologia com VPM

As quinolonas apresentaram interferência nas concentrações STc e Tc, sendo observada para o ciprofloxacino a reação de interferência de maior magnitude, praticamente um aumento de 10 vezes na maior concentração testada.

Todos os valores obtidos para fármacos quinolônicos nas concentrações terapêuticas testadas apresentaram-se dentro dos valores de referência estabelecidos para a metodologia utilizada; porém, em casos de valores limítrofes, isso poderia tornar-se preocupante.

Os únicos relatos de interferência analítica por antibacterianos quinolônicos encontrados na literatura foram sobre reações falso-positivas na determinação de opiáceos na urina (BADEN et al., 2001; ZACHER e GIVONE, 2004). No presente estudo, o norfloxacin não apresentou qualquer interferência com as tiras reagentes testadas. Na metodologia com vermelho de pirogalol-molibdato, houve interferência estatisticamente significativa nas concentrações STc e Tc, porém sem muita significância clínica, uma vez que os valores obtidos estão dentro dos valores de referência, e também porque as suas próprias concentrações supratrapêutica e trapêutica estimadas (60 mg/dL e 6 mg/dL, respectivamente) são ainda menores que as do ciprofloxacino.

#### 4.1.2.2) Interferência de fármacos derivados da quinina (quinolônicos) na metodologia com VPM

Urinas contendo hidroxicloroquina apresentaram reações de intensidade intermediária nas concentrações supra e trapêuticas (2+ e 1+, respectivamente). Em nosso estudo anterior (SILVA-COLOMBELI e FALKENBERG, 2007), a cloroquina apresentou valores de 2+ a 3+ na concentração supratrapêutica e 1+ na concentração trapêutica, enquanto a quinina apresentou interferência somente na concentração supratrapêutica estimada (2+). Resultados dessa magnitude em pacientes poderiam levar os médicos a solicitar exames confirmatórios, possivelmente com o reagente vermelho de pirogalol-molibdato, o que torna o relato dessas interferências ainda mais relevantes, uma vez que se podem observar interferência falso-positiva dos derivados da quinina nessa metodologia, inclusive nas concentrações subtrapêuticas testadas.

Na concentração trapêutica estimada para a cloroquina, os resultados apresentaram-se quatro vezes maiores que o limite superior do intervalo de referência. A hidroxicloroquina e a quinina apresentaram



valores um pouco mais baixos, porém ainda superiores aos valores de referência preconizados pelo método, apresentando, portanto, interferências clinicamente relevantes.

A hidroxicloroquina é utilizada por um longo período, usualmente meses (LACY et al., 2000-2001), o que aumenta o risco potencial de interferência falso-positiva na análise de urina. Nenhum relato de interferência analítica do sulfato de hidroxicloroquina foi encontrado na literatura consultada até o momento, sendo possivelmente este o primeiro relato sobre potenciais interferências analíticas deste fármaco.

Interferências falso-positivas no ensaio com vermelho de pirogalol-molibdato foram relatadas para antibióticos aminoglicosídeos utilizando Dade Behring Dimension RxL e Sigma (KOERBIN et al., 2001; MARSHALL e WILLIAMS, 2003); porém, não foram encontradas interferências utilizando Cobas Fara e Roche Integra 700 (KOERBIN et al., 2001). A magnitude da interferência no primeiro caso parece depender da concentração de corante no reagente, bem como da presença de oxalato de sódio ou dodecilsulfato de sódio (MARSHALL e WILLIAMS, 2004). Na bula do reagente utilizado em nosso estudo, não há detalhes sobre a composição dos surfactantes.

Alguns antipsicóticos também interferem na metodologia com vermelho de pirogalol-molibdato (WILLIAMS et al., 2003). Estudo recente mostrou que a heparina também interfere no ensaio de proteína no líquido, medida por meio do complexo vermelho de pirogalol-molibdato (YANG et al., 2009).

#### **4.1.3) Estabelecimento das menores concentrações interferentes**

O fármaco captopril foi avaliado para o parâmetro cetonas, apresentando concentrações mínimas interferentes de 5 mg/dL para ambas as tiras (Multistix® 10SG e Combur® 10 Test M). A concentração terapêutica estimada para o captopril na urina foi de 12,3 mg/dL.

Os fármacos cloridrato de ciprofloxacino, levofloxacino, ofloxacino, difosfato de cloroquina, sulfato de quinina e sulfato de hidroxicloroquina foram avaliados somente com a tira reagente Multistix® 10SG, em que apresentaram interferências no parâmetro proteína. Foram também testadas as menores concentrações para todos os fármacos interferentes na metodologia com vermelho de pirogalol-molibdato. As menores concentrações interferentes encontradas no parâmetro proteína em ambas metodologias são apresentadas na Tabela 6.

**Tabela 6.** Menores concentrações interferentes dos fármacos avaliados para proteína urinária, determinadas por meio da tira reagente Multistix® 10 SG e pela metodologia com vermelho de pirogalol-molibdato (VPM), comparadas com as respectivas concentrações terapêuticas estimadas (todos os valores em mg/dL).

Fármacos	Concentração mínima interferente		Concentração terapêutica estimada
	Multistix® 10 SG	VPM	
<i>Derivados quinolônicos</i>			
<b>Ciprofloxacino (cloridrato)</b>	200,0	10,0	35,0
<b>Levofloxacino</b>	250,0	15,0	45,0
<b>Norfloxacino</b>	SI <sup>a</sup>	25,0	6,0
<b>Ofloxacino</b>	250,0	15,0	53,0
<i>Derivados quinolínicos</i>			
<b>Cloroquina (difosfato)</b>	20,0	1,0	28,0
<b>Hidroxicloroquina (sulfato)</b>	3,0	0,5	8,0
<b>Quinina (sulfato)</b>	35,0	0,5	14,0

<sup>a</sup>Sem interferência

Entre as quinolonas, o ciprofloxacino apresentou as menores concentrações mínimas interferentes em ambas as metodologias, interferindo inclusive no método do vermelho de pirogalol-molibdato (VPM) em uma concentração de 10 mg/dL, menor que a sua concentração terapêutica estimada (35 mg/dL). De todas as quinolonas testadas, o ciprofloxacino parece apresentar o maior potencial para interferências falso-positivas, enquanto norfloxacino teria baixo potencial de interferência, já que só interferiu no VPM em

concentrações quatro vezes maior que a concentração terapêutica estimada. Levofloxacino e ofloxacino, com base em suas concentrações terapêuticas estimadas (45 e 53 mg/dL, respectivamente), poderiam ser considerados como tendo um potencial intermediário para interferências.

A variabilidade farmacocinética tem sido apontada como a maior fonte de variação na resposta terapêutica. Um paradigma na farmacologia é que a concentração do fármaco no local efetor é responsável tanto pelos benefícios, quanto pelos efeitos adversos do fármaco. A dose aplicada é somente indiretamente relacionada com a concentração (STEIMER et al., 2001). Nenhum dado foi encontrado na literatura sobre as concentrações dos fármacos interferentes que seriam esperadas na urina de pacientes fazendo uso de doses terapêuticas. Assim, as concentrações testadas foram estimadas. Todos os fármacos avaliados são excretados na urina, em grande parte na forma inalterada, mas a taxa de excreção pode variar de paciente para paciente, devido a condições individuais (idade, função renal e hepática, interações entre fármacos e também alimentos, bem como ingestão hídrica e intervalo entre as micções).

Para os fármacos quinolônicos avaliados, a menor concentração interferente foi muito pequena, especialmente no ensaio com vermelho de pirogalol-molibdato, em que a menor concentração interferente foi muito menor que a concentração terapêutica estimada, o que sugere elevado potencial para interferências clinicamente significativas. Entretanto, o número de pacientes que fazia uso destes fármacos nos locais estudados era muito reduzido, de modo que a sua avaliação não foi viável neste trabalho (Tabela 6).

Ainda, como o tratamento com ciprofloxacino é de duração relativamente curta, e o fármaco tem um tempo de meia-vida de 3 a 6 horas (KLASCO, 2011; LACY et al., 2000-2001), a falsa proteinúria pode ser facilmente reconhecida como tal. Já no caso da hidroxicloroquina, que é utilizada por períodos mais longos e tem meia-vida de eliminação muito maior, de 32 a 50 dias (KLASCO, 2011; LACY et al., 2000-2001), a confirmação da falsa proteinúria (devido à interferência) seria mais difícil, uma vez que depois da suspensão do medicamento, altas concentrações do fármaco ainda poderiam ser encontradas na urina por um longo tempo. Como a cloroquina e a quinina têm um tempo de meia-vida mais curto (6 a 20 dias e até 26 horas, respectivamente) que a hidroxicloroquina, e considerando que o tratamento com ambos antimaláricos dura apenas alguns dias (KLASCO, 2011; LACY et al., 2000-2001), a suspeita de proteinúria/dano renal poderia ser mais facilmente descartada do que em pacientes utilizando hidroxicloroquina.

## **4.2) Avaliação analítica *in vivo***

### **4.2.1) Avaliação da interferência do captopril**

A avaliação da interferência do fármaco captopril foi realizada com 15 pacientes que finalizaram a coleta das três amostras de urina. Devido à grande dificuldade em encontrar pacientes que fazem uso somente de captopril (dos 15, somente dois fizeram uso de monoterapia), optamos por incluir também pacientes polimedicados atendidos no Hospital Universitário. Dos 15 pacientes, quatro (C2, C6, C8 e C11) utilizavam medicamentos para diabetes. Na Tabela 7, podem-se visualizar as associações de medicamentos utilizadas, bem como o número de pacientes fazendo uso das mesmas.

Para cada amostra de urina, foram analisadas cinco replicatas com cada marca de tira reagente, sendo observada maior interferência utilizando a tira reagente Multistix® 10 SG (Bayer). Com esta tira, dos 15 pacientes estudados, cinco não apresentaram alteração no parâmetro cetona, em nenhuma das três amostras coletadas (Tabela 8), quatro deles apresentaram pelo menos uma falsa interferência, porém sem significância estatística (Tabela 9), e seis apresentaram interferências estatisticamente significativas em pelo menos umas das amostras coletadas com esta tira (Tabela 10). Com a tira reagente Combur® 10 Test M (Roche), dos 15 pacientes estudados, apenas três (C12, C14 e C15) apresentaram falsa reação no parâmetro cetona, em uma das amostras analisadas, porém não estatisticamente significante.

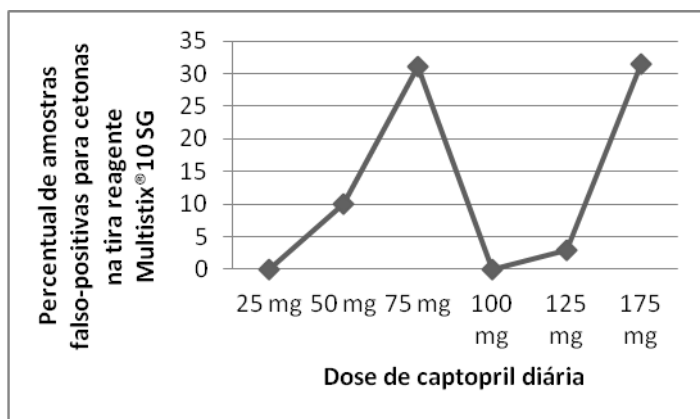
**Tabela 7.** Associações medicamentosas utilizadas por pacientes fazendo uso do fármaco captopril que participaram do estudo.

Fármacos em associação	Número de pacientes
<b>Captopril</b> (Monoterapia)	2
<b>Captopril</b> / AAS* / Glibenclamida / Metformina	1
<b>Captopril</b> / AAS* / Metformina	1
<b>Captopril</b> / AAS* / Atenolol / Furosemida / Insulina	1
<b>Captopril</b> / Ácido fólico / Sulfato ferroso / Omeprazol	1
<b>Captopril</b> / HCTZ**	4
<b>Captopril</b> / HCTZ** / Atenolol / AAS* / Sinvastatina / Omeprazol	1
<b>Captopril</b> / HCTZ** / Atenolol / AAS* / Cilostazol / Fumarato de formoterol + budesonida / Amitriptilina	1
<b>Captopril</b> / HCTZ** / Atenolol / AAS* / Metformina / Sinvastatina	1
<b>Captopril</b> / HCTZ** / Sinvastatina / Omeprazol	1
<b>Captopril</b> / Clonazepam	1

\* Ácido acetilsalicílico

\*\* Hidroclorotiazida

A análise dos resultados de interferência nas tiras não permitiu correlacionar inequivocamente a ocorrência de falso-positivo com os outros parâmetros em análise. *A priori*, observou-se que todas as interferências (estatisticamente significantes ou não) ocorreram com doses diárias de pelo menos 50 mg/dia, mas não foi observada correlação linear entre frequência de interferência e dose diária (Figura 4). Algumas tendências puderam ser observadas, como a maior ocorrência de interferência em pacientes com baixa ingestão hídrica e com intervalo mais longo entre as micções.



**Figura 4.** Frequência de reações falso-positivas para cetonas na tira reagente Multistix® 10 SG, nos 15 pacientes avaliados no estudo, de acordo com a dose diária de captopril utilizada.

**Tabela 8.** Pacientes em uso de captopril que não apresentaram reações falso-positivas na avaliação semi-quantitativa de cetona: dose diária de captopril, concentração urinária e outros fármacos utilizados.

Paciente	Dose captopril (mg/dia) na data de cada coleta	Falso (+) na determinação de cetonas em 5 tiras		Concentração total de captopril na urina (mg/dL)**	Fármacos utilizados (além do captopril)
		Multistix® 10 SG	Combur® 10 Test M		
C1	25	ND	ND	ND	-
	25	ND	ND	ND	
	25	ND	ND	ND	
C2	75	ND	ND	ND	Ácido acetilsalicílico, metformina
	75	ND	ND	0,18 ± 0,003	
	75	ND	ND	0,21 ± 0,003	
C3	25	ND	ND	0,25 ± 0,002	Hidroclorotiazida
	25	ND	ND	0,46 ± 0,018	
	25	ND	ND	0,36 ± 0,039	
C4	100	ND	ND	0,43 ± 0,003	Hidroclorotiazida
	100	ND	ND	0,25 ± 0,005	
	100	ND	ND	0,29 ± 0,017	
C5	75	ND	ND	0,55 ± 0,016	Hidroclorotiazida, sinvastatina, omeprazol
	50	ND	ND	0,34 ± 0,007	
	50	ND	ND	0,26 ± 0,007	

ND= Não detectado.

\* Os ensaios com as tiras foram realizados com 5 repetições.  $P < 0,05$ , Mann Whitney.

\*\* Resultados expressos como média ± DP de 3 replicatas determinadas em CLAE.

**Tabela 9.** Pacientes em uso de captopril, que apresentaram reações falso-positivas sem significância estatística, na avaliação semi-quantitativa de cetona: dose diária de captopril, concentração urinária e outros fármacos utilizados.

Paciente	Dose captopril (mg/dia) na data de cada coleta	Falso (+) na determinação de cetonas em 5 tiras		Concentração total de captopril na urina (mg/dL)**	Fármacos utilizados (além do captopril)
		Multistix® 10 SG	Combur® 10 Test M		
C6	50	1 de 5	ND	0,51 ± 0,004	Ácido acetilsalicílico, atenolol, furosemida, insulina
	50	ND	ND	0,23 ± 0,016	
	50	ND	ND	0,24 ± 0,002	
C7	75	ND	ND	0,18 ± 0,004	Hidroclorotiazida
	75	1 de 5	ND	0,17 ± 0,001	
	75	ND	ND	0,17 ± 0,003	
C8	150	2 de 5	ND	0,26 ± 0,014	Hidroclorotiazida, atenolol, ácido acetilsalicílico, metformina, sinvastatina
	150	ND	ND	0,20 ± 0,007	
	150	ND	ND	0,28 ± 0,014	
C9	75	1 de 5	ND	0,31 ± 0,010	Clonazepam
	75	ND	ND	0,32 ± 0,010	
	75	ND	ND	0,28 ± 0,013	

ND= Não detectado.

\* Os ensaios com as tiras foram realizados com 5 repetições.  $P < 0,05$ , Mann Whitney.

\*\* Resultados expressos como média ± DP de 3 replicatas determinadas em CLAE.



**Tabela 10.** Pacientes em uso de captopril, que apresentaram reações falso-positivas estatisticamente significativas, na avaliação semi-quantitativa de cetona: dose diária de captopril, concentração urinária e outros fármacos utilizados.

Paciente	Dose captopril (mg/dia) na data de cada coleta	Falso (+) na determinação de cetonas em 5 tiras		Concentração total de captopril na urina (mg/dL)**	Fármacos utilizados (além do captopril)
		Multistix® 10 SG	Combur® 10 Test M		
<b>C10</b>	50	ND	ND	0,15 ± 0,002	-
	75	5 de 5*	ND	1,02 ± 0,006	
	75	ND	ND	0,33 ± 0,033	
	75	ND	ND	0,18 ± 0,003	
<b>C11</b>	150	ND	ND	0,58 ± 0,061	Ácido acetilsalicílico, glibenclamida, metformina
	150	4 de 5*	ND	1,12 ± 0,159	
	150	ND	ND	0,40 ± 0,054	
<b>C12</b>	50	3 de 5*	ND	ND	Ácido fólico, sulfato ferroso, omeprazol
	75	5 de 5*	1 de 5	ND	
	75	5 de 5*	ND	ND	
<b>C13</b>	75	5 de 5*	ND	0,37 ± 0,011	Hidroclorotiazida
	75	1 de 5	ND	0,19 ± 0,003	
	50	ND	ND	0,23 ± 0,006	
<b>C14</b>	75	ND	ND	0,37 ± 0,008	Hidroclorotiazida, atenolol, ácido acetilsalicílico, sinvastatina, omeprazol
	75	3 de 5*	ND	0,68 ± 0,027	
	75	5 de 5*	1 de 5	0,75 ± 0,020	
<b>C15</b>	125	ND	ND	0,42 ± 0,032	Hidroclorotiazida, atenolol, ácido acetilsalicílico, cilostazol, amitriptilina, fumarato de formoterol + budesonida
	125	3 de 5*	ND	0,52 ± 0,041	
	150	5 de 5*	2 de 5	0,86 ± 0,063	

ND= Não detectado.

\* Os ensaios com as tiras foram realizados com 5 repetições.  $P < 0,05$ , Mann Whitney.

\*\* Resultados expressos como média ± DP de 3 replicatas determinadas em CLAE.

Na tentativa de melhor compreender as variáveis intra e interpacientes, decidiu-se realizar a quantificação do captopril nas amostras de pacientes, o que, em princípio, não estava previsto neste trabalho.

O método de Kusmierek e Bald (2007) precisou ser adaptado, já que, no tempo de retenção correspondente ao captopril, havia sobreposição com outros componentes, de modo que o pico do captopril não apresentava resolução adequada para permitir a quantificação com boa precisão e exatidão. Uma vez otimizado, o método adaptado foi validado e, durante esse período de tempo, as amostras de urina permaneceram congeladas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , algumas por até um ano. Os resultados da validação da metodologia adaptada estão no apêndice G.

De acordo com a literatura, em estudo realizado com a cisteína (KUSMIEREK et al., 2008), após 3 meses de congelamento, a concentração de tiol na forma livre diminui em mais de 90%, de modo que o método proposto na literatura para quantificação de captopril (KUSMIEREK e BALD, 2007) incluía uma etapa de redução das ligações S-S com TCEP, e posterior reação com CMQT, usado como agente de derivatização. Sem a etapa de redução, esse método poderia ser usado apenas para determinação do captopril reduzido, em que o grupamento sulfidril livre reage diretamente com o nitroprusseto de sódio, reagente utilizado na tira para determinação de cetonas (CSAKO e ELIN, 1996).

Assim, foi possível quantificar o que chamamos de “captopril total”, correspondente à soma de captopril que permaneceu na forma de tiol (R-SH) e do captopril que foi oxidado (R-S-S-R), antes ou depois do congelamento da amostra. Levando-se em conta que esta etapa não estava prevista no início do trabalho e que as amostras ficaram congeladas por mais do que três meses, estando praticamente todo o captopril na forma oxidada, foi necessário realizar a etapa de redução para garantir a determinação de todo captopril da amostra. Portanto, pode ser que o valor determinado tenha um percentual variável de captopril na forma livre, variando de acordo com o metabolismo de cada paciente.

#### **4.2.1.1) Alterações estatisticamente significativas observadas no parâmetro cetona utilizando a tira Multistix® 10 SG (Bayer)**

Detalhes dos pacientes em que as interferências observadas não foram estatisticamente significativas estão no apêndice H.

O **paciente C10** era um dos dois pacientes que fazia uso unicamente do fármaco captopril. Ele começou a coleta de amostras no

dia em que foi atendido no ambulatório do Hospital Universitário, fazendo uso de 50 mg diários do fármaco, mas, por prescrição médica, passou, a partir de então, a fazer uso de 75 mg/dia. Foi observada uma falsa reação no parâmetro cetona na segunda amostra coletada (Tabela 10), justamente após a mudança na dose diária de captopril. Por este motivo, foi solicitada mais uma amostra, totalizando quatro amostras, com o objetivo de verificar se a interferência persistiria, o que, no entanto não foi observado. Analisando a tabela 11, pode-se observar que houve aumento na ingesta hídrica nas coletas posteriores à da reação falso-positiva e diminuição no intervalo entre a tomada do captopril e a coleta. Postula-se que um aumento na dosagem do medicamento tenha ocasionado um pico de concentração sérica do fármaco, levando ao aumento da concentração do mesmo na urina, produzindo a interferência observada. A hipótese levantada para explicar as interferências nas tiras foi de que teria sido atingido um platô de concentração sérica à época das coletas seguintes, associado a uma maior ingesta hídrica por ocasião das mesmas, o que poderia explicar a não manifestação da interferência nas amostras 3 e 4. Os resultados da quantificação do captopril parecem confirmar essa hipótese. Foi observado aumento na excreção do fármaco na amostra 2, sendo que nesta coleta houve, além de um maior intervalo entre as micções, também a menor ingesta hídrica em relação às outras amostras coletadas quando o paciente tomava 75 mg de captopril por dia.

**Tabela 11.** Variáveis observadas nas quatro coletas de urina realizadas no paciente C10.

<b>Amostras:</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
Captopril na urina (mg/dL)	0,15 ± 0,002	1,02 ± 0,006	0,33 ± 0,033	0,18 ± 0,003
Intervalo entre micções (h)	2:15	3:00	2:00	2:30
Tempo de jejum (h)	4:00	6:00	4:00	10:00
Ingesta hídrica diária (copos de água)	2	3	5	5
Intervalo entre a ingesta do captopril e coleta da urina	9:15	5:00	4:00	1:30

O **paciente C11** fazia uso de 150 mg/dia de captopril, associado com ácido acetilsalicílico, glibenclamida e metformina. Apresentou na

segunda amostra coletada uma reação falso-positiva (vestígios) estatisticamente significativa para cetonas (Tabela 10). Das variáveis avaliadas pôde-se observar (Tabela 12) que o intervalo entre as micções era curto, uma vez que o paciente é diabético e sofre de polaciúria (emissão frequente e em pequena quantidade de urina), não conseguindo ficar muito tempo com a urina na bexiga. Foi justamente no maior intervalo entre as micções que houve o aparecimento da falsa reação, onde a urina provavelmente estaria mais concentrada. O intervalo entre a ingesta do fármaco e a coleta da amostra de urina também foi menor na segunda amostra do que nas demais. Quando foi realizada a quantificação do fármaco nas amostras de urina, pôde-se observar que realmente a amostra 2 foi a que apresentou concentração mais elevada de captopril.

**Tabela 12.** Variáveis observadas nas três coletas de urina realizadas no paciente C11.

<b>Amostras:</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
Captopril na urina (mg/dL)	0,58 ± 0,061	1,12 ± 0,159	0,40 ± 0,054
Intervalo entre micções (h)	1:35	2:30	1:00
Tempo de jejum (h)	5:00	3:00	3:00
Ingesta hídrica diária (copos de água)	nenhum	1	1
Intervalo entre a ingesta do captopril e coleta da urina	5:35	3:00	3:30

A **paciente C12** apresentou resultados falso-positivos para cetonas nas três coletas de amostra de urina. Na primeira coleta, ela fazia uso de 50 mg/dia de captopril associado com outros fármacos (ácido fólico, sulfato ferroso e omeprazol). Observou-se que, das cinco replicatas, três apresentaram a falsa reação. Nas demais coletas, a dose de captopril foi aumentada para 75 mg/dia (3 comprimidos de 25 mg, 3 vezes ao dia). Nota-se que, com o aumento da dose, a falsa reação foi observada nas cinco replicatas, nas amostras 2 e 3 (Tabela 10). É interessante ressaltar que, na segunda amostra de urina coletada, houve também uma reação falso-positiva em uma das cinco replicatas realizadas com a tira Combur® 10 Test M (Roche), porém sem

significância estatística, pois somente uma das cinco replicatas apresentou a falsa reação (positivo 1+). O intervalo entre as micções variou de uma amostra para outra (Tabela 13), bem como o tempo de jejum, não influenciando de forma perceptível a manifestação da interferência. Mas, em todos os casos o intervalo entre a ingestão do captopril e a coleta de urina ultrapassou 6 horas e a ingestão hídrica não passou de 2 copos de água.

Apesar de todas as interferências falso-positivas observadas nas fitas de urina para esta paciente, quando o captopril foi quantificado nas amostras por CLAE não houve detecção de pico referente ao fármaco, sendo que o limite de detecção e quantificação na metodologia aplicada foi de 0,03 mg/dL e 0,09 mg/dL, respectivamente (apêndice G). A paciente C12 é do gênero feminino e estaria com anemia, a julgar pelo uso de sulfato ferroso. Este fármaco sofre interação farmacocinética com o omeprazol (KLASCO, 2011), também utilizado por esta paciente. Foi postulado que a presença de ferro excretado na urina, na forma de íon  $Fe^{+2}$ , poderia ser ao menos parcialmente responsável pela interferência observada na determinação de cetonas pelas tiras reativas. Para testar esta hipótese, avaliou-se o potencial de interferência *in vitro* do sulfato ferroso, com base na metodologia já utilizada anteriormente, mas nenhuma interferência foi verificada em concentrações estimadas como supratrapêutica e terapêutica.

**Tabela 13.** Variáveis observadas nas três coletas de urina realizadas no paciente C12.

<b>Amostras:</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
Captopril na urina (mg/dL)	ND*	ND*	ND*
Intervalo entre micções (h)	4:00	6:40	1:50
Tempo de jejum (h)	6:00	2:40	1:20
Ingesta hídrica diária (copos de água)	2	1	2
Intervalo entre a ingestão do captopril e coleta da urina	9:00	7:10	6:05

A **paciente C13** fez uso de captopril (75 mg/dia) associado com hidroclorotiazida. Na primeira amostra coletada, foi observada reação falso-positiva estatisticamente significativa no parâmetro cetona, nas

cinco replicatas realizadas (Tabela 10). Na segunda coleta, somente em uma das cinco replicatas observamos falsa reação para cetona, não sendo estatisticamente significativa, apesar da dose de captopril ser a mesma. Nota-se (Tabela 14) que o intervalo entre a tomada do medicamento e a coleta da segunda amostra de urina ultrapassou 12 h (15:20 h), pois a paciente era de uma cidade vizinha e viajou muito cedo para chegar na consulta em Florianópolis, esquecendo de tomar o medicamento na hora correta, podendo então a supressão de uma dose ter ocasionado a diminuição da interferência. Na terceira coleta, a paciente relatou que a pressão “estava boa”; por isso havia diminuído, por conta própria, a dose diária de captopril para 50 mg/dia (2 comprimidos/dia), não sendo detectada interferência nessa dose. Analisando a concentração determinada de captopril nas amostras, observa-se uma maior quantidade de fármaco excretada na primeira, o que condiz com os resultados de interferência observados na tira e com os relatos da paciente quanto à supressão de uma dose antes da segunda coleta e redução por conta própria da dose por ocasião da segunda coleta. A concentração na terceira amostra foi um pouco maior que na segunda, apesar da dose oral ter sido menor. Possivelmente, na segunda amostra, o maior intervalo entre a ingestão do captopril e a coleta, bem como a maior ingestão hídrica, em relação à terceira amostra, podem ter contribuído para a diferença de concentração observada.

**Tabela 14.** Variáveis observadas nas três coletas de urina realizadas no paciente C13.

<b>Amostras:</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
Captopril na urina (mg/dL)	0,37 ± 0,011	0,19 ± 0,003	0,23 ± 0,006
Intervalo entre micções (h)	5:00	4:20	5:50
Tempo de jejum (h)	4:30	4:20	2:30
Ingesta hídrica diária (copos de água)	1	1	Nenhum
Intervalo entre a ingestão do captopril e coleta da urina	8:00	15:20 com supressão de dose	9:20

O **paciente C14** fez uso de 75 mg/dia de captopril, associado com hidroclorotiazida, ácido acetilsalicílico, sinvastatina e omeprazol. A dose diária de captopril utilizada era de 75 mg/dia. Foram observadas interferências estatisticamente significativas no parâmetro cetona na

segunda e terceira coletas de urina (Tabela 10). Na segunda coleta, das 5 repetições, três apresentaram vestígios de cetona falsamente positivos. Na terceira coleta, as 5 repetições apresentaram interferência, sendo duas vestígios e três na intensidade de positivo 1+. Analisando as variáveis (Tabela 15), observamos que, nas duas amostras que apresentaram interferência, o intervalo entre a tomada do fármaco e a coleta da amostra foi menor (3:10 h) quando comparadas à primeira amostra coletada (7 h). Contrariamente à tendência que se observou em outros pacientes, antes da coleta de amostra que apresentou interferência com maior significância, a ingesta hídrica foi maior, porém a concentração excretada de captopril nas amostras de urina foi condizente com o número de vezes em que foram observadas interferências.

**Tabela 15.** Variáveis observadas nas três coletas de urina realizadas no paciente C14.

<b>Amostras:</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
Captopril na urina (mg/dL)	0,37 ± 0,008	0,68 ± 0,027	0,75 ± 0,020
Intervalo entre micções (h)	3:30	3:35	2:40
Tempo de jejum (h)	4:30	4:30	3:10
Ingesta hídrica diária (copos de água)	3	3	4
Intervalo entre a ingesta do captopril e coleta da urina	7:00	3:10	3:10

O **paciente C15** fazia uso de 125 mg/dia de captopril durante as duas primeiras coletas de amostra. Na terceira coleta, informou que passou a tomar um comprimido a mais, quatro dias antes, por orientação médica, chegando a uma dose diária de 150 mg. Foram observadas reações falso-positivas para cetonas estatisticamente significativas na segunda amostra de urina, em que, das cinco repetições, três apresentaram a falsa reação (Tabela 10). Na terceira amostra coletada, após aumento da dose diária, foi observada falsa reação para cetonas nas 5 repetições realizadas, o que está de acordo com as concentrações do fármaco nas amostras de urina (Tabela 16).

**Tabela 16.** Variáveis observadas nas três coletas de urina realizadas no paciente C15.

<b>Amostras:</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
Captopril na urina (mg/dL)	0,42 ± 0,032	0,52 ± 0,041	0,86 ± 0,063
Intervalo entre micções (h)	2:45	2:05	2:15
Tempo de jejum (h)	6:00	3:00	3:30
Ingesta hídrica diária (copos de água)	1	1	2
Intervalo entre a ingestão do captopril e coleta da urina	5:30	2:25	3:00

A determinação urinária de cetonas é importante no monitoramento de pacientes diabéticos. A presença de cetonas pode indicar uma cetoacidose iminente ou estabelecida, condição que requer atenção médica imediata. Recomenda-se que todas as pessoas com diabetes realizem o teste para cetonas na urina durante a doença aguda ou estresse, quando níveis de glicose estiverem >300 mg/dL (16,7 mmol/L), durante a gravidez ou quando sintomas de cetoacidose, como náuseas, vômitos ou dor abdominal, estiverem presentes (GOLDSTEIN et al., 2004). Neste estudo, apenas quatro dos pacientes em uso de captopril eram diabéticos, mas especialmente em idosos não é incomum que à hipertensão esteja associado o diabetes.

A determinação de cetonas na urina utiliza o nitroprusseto de sódio, baseado em sua reação em meio alcalino com ácido acetoacético e, em menor intensidade, com a acetona, sendo denominado teste de Legal. Esse teste não é específico para corpos cetônicos, e algumas substâncias endógenas (fenilcetonas) e fármacos são conhecidos por causar interferências. Fármacos que contenham um ou mais grupos sulfidríla (-SH ou tiol) livres, como por exemplo, captopril, mesna, N-acetilcisteína, dimercaprol e penicilamina, reagem diretamente com o nitroprusseto de sódio (CSAKO e ELIN, 1996). No caso específico do captopril, inclusive, esta reação é indicada como um dos testes para identificação do fármaco (MOFFAT et al., 2004).

A interferência do captopril na determinação de cetona urinária já foi relatada por diversos autores. Graham e Naidoo (1987) relatam resultados falso-positivos do captopril no parâmetro cetona com a tira Ames Keto-Diastix, em uma concentração de 2,5 mg/dL (0,12 mmol/L). Também foram encontrados relatos de interferência em amostras



contendo 2 mmol/L de captopril, produzindo uma cor vermelho-púrpura em tiras Chemstrip (Boehringer Mannheim), interferência que é eliminada em 3 minutos com a adição de solução de 5% de iodoacetato. Porém, segundo os mesmos autores, esse reagente não funciona bem com tiras Multistix® (POON e HINBERG, 1990). As concentrações interferentes relatadas pelos autores correspondem a 2,5 mg/dL, com a tira Ames Keto-Diastix®, e 41,7 mg/dL, com a tira Chemstrip®. Em nosso estudo *in vitro* encontramos para o captopril concentrações mínimas interferentes de 5 mg/dL para as duas tiras Multistix® 10 SG (Bayer) e Combur® 10 Test M (Roche), sendo intermediárias em relação aos valores relatados, mas superiores aos valores de concentrações determinados nas urinas de pacientes. Este fato sugere que outros fatores, como metabólitos de outros fármacos utilizados, possam estar envolvidos nas interferências detectadas nas tiras reagentes.

Em relação às associações encontradas no estudo, somente foram encontrados relatos de interações farmacológicas do captopril com ácido acetilsalicílico, hidroclorotiazida e furosemida (KLASCO, 2011), porém nenhuma interação farmacocinética que resulte em aumento da excreção urinária de captopril na forma inalterada.

Segundo Young (2000), o ácido acetilsalicílico pode causar uma diminuição fisiológica de cetonas em pacientes diabéticos, bem como aumento analítico no teste de Gerhardt's (teste para determinação de ácido acetoacético, utilizando cloreto férrico). Dos 15 pacientes estudados, seis utilizavam também ácido acetilsalicílico, sendo que, em três deles, observou-se interferência falso-positiva estatisticamente significativa para cetonas. Porém não foram encontrados relatos de sua interferência na metodologia com nitroprusseto de sódio. Para os demais fármacos usados pelos pacientes, também não são relatadas interferências no parâmetro cetona (YOUNG, 2000).

Foram observadas interferências estatisticamente significativas apenas em pacientes utilizando doses iguais ou superiores a 50 mg/dia de captopril, mas a interferência observada não foi necessariamente proporcional à dose, tanto que o paciente C8, que ingeria 150 mg/dia, não apresentou interferência estatisticamente significativa. Apesar disso, para um mesmo paciente em que houve variação de dose ao longo do acompanhamento, observou-se que interferências foram mais pronunciadas em doses mais altas (C10, C12, C13 e C15).

Em relação à concentração do captopril detectada nas urinas dos pacientes por CLAE, não foi observada, entre pacientes, relação da dose ingerida do fármaco com a excreção urinária na forma inalterada.

Entretanto, em um mesmo paciente, pôde-se observar que, ao aumento da dose diária, correspondeu aumento da concentração urinária do fármaco (Tabelas 8 e 10). Em amostras de pacientes deste estudo, a menor concentração de captopril que apresentou interferência estatisticamente significativa em cetonas pela tira reagente foi 0,37 mg/dL (paciente C13). Entretanto, na paciente C12, que também apresentou interferência nas 3 amostras, o captopril não foi detectado. Além disso, em alguns pacientes a quantidade de captopril quantificada nas amostras foi superior a 0,37 mg/dL, não sendo, no entanto, detectadas interferências na tira reagente de urina. Entre os cinco pacientes para os quais foram observadas interferências estatisticamente significativas (C10 a C15), observou-se que as pacientes do gênero feminino (C12 e C13) apresentavam concentrações mais baixas de captopril do que os pacientes do gênero masculino, mas a pequena amostra analisada não permite concluir a este respeito.

Vale lembrar que neste trabalho foi determinada a concentração total de captopril, não apenas a forma livre (R-SH), que efetivamente interfere na avaliação de cetonas. Talvez, por esse motivo, não tenha sido possível encontrar uma correlação dose/interferência entre os pacientes, apenas para um mesmo paciente. Em princípio, o percentual de captopril excretado na forma oxidada é cerca de 2% (KRIPALANI et al., 1980), mas pode haver variações entre pacientes. Outra possível explicação para a ausência de uma relação inequívoca entre concentração do captopril na urina e a ocorrência de interferência seria o efeito adicional de outros metabólitos e/ou fármacos (que variaram de paciente para paciente), sobre os quais não há estudos de potencial de interferência. Alguns casos de grande variação na excreção urinária de fármacos podem ser explicados pelo polimorfismo genético, originando diferenças na absorção, metabolismo, distribuição e/ou excreção de fármacos entre indivíduos (SHIN et al., 2009), mas não encontramos na literatura qualquer estudo relatando variações farmacogenéticas envolvendo o captopril.

Em relação à ingesta hídrica, nos pacientes que apresentaram interferência estatisticamente significativa, a ingesta hídrica variou de um a quatro copos/dia. Este parâmetro pareceu influenciar, mesmo em pacientes em que a interferência não chegou a ser estatisticamente significativa, como o paciente C8 (ver apêndice H), que apenas apresentou interferência em amostra coletada após um dia em que sua ingesta hídrica direta foi nula (considerando apenas copos de água).

Em relação ao intervalo de tempo entre a ingesta do captopril e a coleta de urina, pode-se observar que, entre os pacientes que apresentaram interferência estatisticamente significativa, este parâmetro

variou de 2:25 h a 9:00 h. Este é um parâmetro cuja avaliação isolada não fornece evidências conclusivas, mas em associação ao intervalo entre as micções e a ingesta hídrica, é possível delinear uma tendência de que haveria um tempo mínimo e um máximo, que podem variar de paciente para paciente, em que a probabilidade de interferência seria maior. Considerando que o captopril apresenta pico de concentração sérica de 30 a 90 minutos, e meia-vida de eliminação de 1,9 h (KLASCO, 2011), pode-se esperar que a eliminação do fármaco ingerido na última dose se torne mais pronunciada após cerca de duas horas, mas a concentração final do fármaco na urina vai depender dos outros fatores já mencionados.

#### **4.2.2) Avaliação da interferência do ciprofloxacino**

A avaliação da interferência do fármaco ciprofloxacino foi realizada com nove pacientes que finalizaram a coleta das duas amostras de urina. Pela dificuldade em conseguir pacientes em monoterapia no Hospital Universitário/UFSC, optou-se por submeter o projeto à Comissão de Acompanhamentos dos Projetos de Pesquisa em Saúde da Secretaria Municipal de Saúde, Prefeitura Municipal de Florianópolis. A partir de então, pacientes atendidos no Centro de Saúde da Trindade passaram a ser convidados a participar da pesquisa assim que chegavam à farmácia para buscar o medicamento. Ainda assim, dos nove pacientes que finalizaram as duas coletas, somente três deles usavam apenas ciprofloxacino no momento da coleta. As demais associações são relacionadas na Tabela 17.

Pela menor duração do tratamento (em torno de sete dias), a obtenção de mais de uma amostra durante o mesmo mostrou-se inviável. Por isso e também devido ao menor número de pacientes, a avaliação da possível influência dos fatores ingesta hídrica, tempo de jejum e intervalo entre a tomada do medicamento e a coleta da amostra ficou prejudicada, não sendo possível observar tendências mais evidentes.

Confirmando os resultados obtidos no estudo *in vitro*, todas as amostras foram negativas para proteína, quando se utilizou a tira reagente Combur® 10 Test M (Roche). Todas as amostras, positivas ou negativas para proteína, foram submetidas ao teste de precipitação com ácido sulfossalicílico e também foram negativas, confirmando assim, algumas reações falso-positivas observadas com a tira reagente Multistix® 10 SG (Bayer). Essas interferências, bem como os resultados obtidos na quantificação das proteínas pelo método utilizando o vermelho de pirogalol-molibdato, são apresentadas na Tabela 14.

**Tabela 17.** Associações medicamentosas relatadas por pacientes em uso de ciprofloxacino, dose utilizada do fármaco e gênero dos pacientes.

Associações	Dose de Ciprofloxacino utilizada (mg/dia)	Paciente	Gênero
<b>Ciprofloxacino (Somente)</b>	1000	P3 P4 e P5	M F
<b>Ciprofloxacino / Rosuvastatina cálcica</b>	1000	P1	M
<b>Ciprofloxacino / Losartana / Hidroclorotiazida</b>	1000	P2	F
<b>Ciprofloxacino / Anticoncepcional oral</b>	1000	P6 - P9	F

Todos os pacientes que participaram do estudo faziam uso diário de 1000 mg/dia de ciprofloxacino, divididos em um comprimido de 500 mg, administrado duas vezes ao dia. Segundo a literatura consultada (KLASCO, 2011), nenhuma das associações medicamentosas utilizadas poderia resultar em alterações na farmacocinética do ciprofloxacino. Young (2000) não apresenta qualquer relato de estudo de potencial interferência no parâmetro proteína urinária, para os fármacos associados ao ciprofloxacino.

O **paciente P1** não apresentou qualquer alteração nos valores de proteína com as tiras analisadas. O teste com ácido sulfossalicílico confirmou a ausência de proteína nas amostras. É interessante ressaltar a elevada ingestão hídrica do paciente em ambas as coletas (Tabela 18).

**Tabela 18.** Pacientes que utilizaram ciprofloxacino: resultados de proteína urinária com a tira reagente Multistix® 10 SG (Bayer) e pelo método do vermelho de pirogalol-molibdato (VPM) em amostras coletadas durante o tratamento (a) e no mínimo 4 dias após o término do tratamento (b), e outros dados em relação à coleta. Valores de referência com VPM: 0-11,9 mg/dL

Paciente	Proteína urinária - Multistix® 10 SG (Bayer)	Proteína urinária (mg/dL) - VPM	Intervalo entre micções (h)	Ingesta hídrica diária (copos de água)	Intervalo entre a ingestão do fármaco e coleta da urina (h)
P1	a) Negativo b) Negativo	a) NR b) NR	a) 3:30 b) 2:50	a) 6 b) 5	a) 4:45
P2	a) Vestígios <sup>c</sup> b) Negativo	a) 45,77 ± 0,640 <sup>d</sup> b) 4,87 ± 0,058	a) 0:30 b) 1:00	a) 1 b) 3	a) 2:00
P3	a) Negativo b) Negativo	a) 2,80 ± 0,100 <sup>e</sup> b) 2,00 ± 0,200	a) 2:30 b) 2:50	a) 4 b) 2	a) 1:45
P4	a) Negativo b) Negativo	a) 18,63 ± 0,551 <sup>d</sup> b) 9,60 ± 0,656	a) 2:00 b) 3:30	a) 4 b) 2	a) 7:15
P5	a) Negativo b) Negativo	a) 6,70 ± 0,208 <sup>d</sup> b) 1,60 ± 0,068	a) 4:30 b) 4:50	a) zero b) zero	a) 11:00
P6	a) Negativo b) Negativo	a) 6,73 ± 0,251 b) 6,23 ± 0,305	a) 2:45 b) 2:00	a) 2 b) 2	a) 4:45
P7	a) Vestígios <sup>c</sup> b) Negativo	a) 31,73 ± 0,551 <sup>d</sup> b) 3,57 ± 0,252	a) 2:40 b) 1:00	a) 2 b) 4	a) 4:45
P8	a) Negativo b) Negativo	a) 13,50 ± 0,624 <sup>e</sup> b) 10,5 ± 0,115	a) 5:00 b) 3:30	a) 2 b) 3	a) 4:45
P9	a) Negativo b) Negativo	a) 3,50 ± 0,153 <sup>e</sup> b) 2,5 ± 0,115	a) 3:00 b) 1:40	a) 10 b) 6	a) 6:00

Todas as amostras foram avaliadas com a tira reagente Combur® 10 Test M e ácido sulfossilicífico, com resultados negativos.

<sup>c</sup>  $P < 0,05$ , Wilcoxon, comparado com o respectivo controle.

<sup>d</sup>  $P < 0,001$ , <sup>e</sup>  $P < 0,05$  Teste  $t$  de Student para amostras pareadas, comparado com o respectivo controle (média de 3 determinações ± DP).

NR= Exame não realizado.

A **paciente P2** fazia uso contínuo de losartana e hidroclorotiazida no momento das coletas. De 13 a 35% da losartana é excretada na urina e somente 3 a 5% como fármaco inalterado. Já a hidroclorotiazida é excretada em grande parte na urina, na forma inalterada (50-70%). Em nossos testes *in vitro* (item 4.1.1), hidroclorotiazida não apresentou interferência falso-positiva na proteína urinária. A amostra coletada, quando em uso do ciprofloxacino, apresentou vestígios para proteína com a tira reagente Multistix® 10 SG e resultado negativo com a tira Combur® 10 Test M, sendo também negativo no teste confirmatório com ácido sulfossalicílico, caracterizando uma reação falso-positiva na tira Multistix® 10 SG.

A partir desse resultado, resolveu-se determinar quantitativamente a concentração de proteína na amostra, com o teste do vermelho de pirogalol-molibdato. Como o resultado foi bastante elevado, decidimos também avaliar *in vitro* a magnitude da interferência do ciprofloxacino e outras quinolonas nesse teste e, uma vez confirmado o potencial de interferência, incluímos essa determinação em todos os voluntários que participaram do estudo *in vivo* com ciprofloxacino (Tabela 5). No momento da segunda coleta do paciente P2 (sem uso de ciprofloxacino), reações falso-positivas não mais foram observadas. Os valores de proteína diminuíram quase 10 vezes comparados à primeira amostra de urina (Tabela 18) e resultados negativos foram observados com a tira reagente. Esses resultados foram publicados recentemente (SILVA e FALKENBERG, 2011).

Os **pacientes P3, P4 e P5** faziam uso somente de ciprofloxacino. Não foi observada interferência nas tiras reagentes em nenhum dos pacientes na amostra coletada durante o uso do fármaco, mas alterações estatisticamente significativas foram observadas entre as amostras coletadas durante e após o tratamento com o método vermelho de pirogalol-molibdato, apesar de apenas uma delas ter extrapolado os valores de referência preconizados para essa metodologia. Comparando as variáveis observadas durante o momento da coleta entre os pacientes (Tabela 18), observa-se que a paciente P5, apesar de não apresentar os maiores valores para proteína, foi aquela que apresentou maior diferença entre as duas determinações (durante e após o tratamento). Comparando com os demais, era a que apresentava maior intervalo entre as micções e era a que não havia ingerido sequer um copo de água nos dias de coleta, relatando que não tem o costume de tomar água. Talvez por esses motivos, a diferença tenha sido maior quando comparado com os outros pacientes que também utilizavam somente o ciprofloxacino.

As pacientes **P6, P7, P8 e P9** tinham em comum o uso de anticoncepcional oral durante o tratamento com ciprofloxacino. Destas, somente uma (P6) não apresentou diferença significativa entre as amostras coletadas durante e após o tratamento em qualquer metodologia utilizada. Apesar da paciente P7 ter apresentado valores acima dos de referência na metodologia do vermelho de pirogalol-molibdato, dez vezes maiores na amostra coletada em uso de ciprofloxacino, comparando com a coletada após o tratamento, não foram observadas entre as variáveis (Tabela 18) algo que pudesse justificar tal interferência, comparando-se com as outras pacientes que faziam uso de algum anticoncepcional oral no momento da coleta. As pacientes P8 e P9 apresentaram interferência falso-positiva estatisticamente significativa somente na metodologia utilizando o vermelho de pirogalol-molibdato. A paciente P9, que apresentou, entre elas, os menores valores quantificados para proteína, tinha, habitualmente, uma alta ingestão hídrica diária.

Pode-se observar que, nos pacientes com valores mais elevados de proteína pelo método do vermelho de pirogalol-molibdato (P2 e P7), foram verificadas também interferências na tira reagente Multistix® 10 SG, o que parece estar de acordo com nossos resultados de menor concentração interferente para ambas as metodologias, já que os valores mínimos para que ocorram tais interferências são bem mais elevados na tira reagente.

A possibilidade de quantificar o ciprofloxacino na urina dos pacientes, segundo a literatura, envolveria outras técnicas (cromatografia eletrocínica, entre outros) e a necessidade de validação e parceria com laboratórios externos à UFSC, não sendo, portanto, viável no âmbito desta tese de doutorado.

Estudos sobre a variabilidade biológica em amostras de urina somente são encontrados em alguns analitos quantificados, tanto em amostras de urina isoladas, quanto em amostras de urina de 24 horas (GOWANS e FRASER, 1987; RICÓS et al., 1994), não sendo encontrados dados sobre variabilidade biológica em tiras reagentes de urina. Para proteína urinária, somente foram encontrados estudos sobre variabilidade biológica com outra metodologia, que não a estudada.

### **4.2.3) Estudo transversal da interferência de fármacos nos parâmetros proteína ou cetonas**

As amostras triadas no laboratório de análises clínicas do HU que apresentaram reação positiva para proteínas ou cetonas foram separadas para a realização dos respectivos testes confirmatórios. Tanto em amostras verdadeiro-positivas, quanto em falso-positivas, foram analisados os dados nos prontuários dos pacientes, com o intuito de obter informações relacionadas aos medicamentos utilizados no momento da coleta da amostra. Como mencionado anteriormente (ver item 3.2.4), durante a triagem houve um problema mecânico com o leitor de tiras reagentes e durante o período de leitura visual foi observada maior ocorrência de resultados falso-positivos. Estas observações levaram a um estudo de comparação entre a leitura visual e automatizada das tiras reagentes de urina, o qual foi transformado em um artigo e submetido recentemente. Como esse estudo não tinha relação direta com os objetivos propostos para a tese de doutorado, seus resultados não serão apresentados aqui.

#### **4.2.3.1) Interferências em cetonas**

Cetose é quase sempre uma condição transitória caracterizada por níveis séricos elevados de corpos cetônicos. As causas mais comuns de cetose são fisiológicas, em que níveis leves a moderados de corpos cetônicos estão presentes em resposta ao jejum (especialmente durante a infância ou gravidez), exercício físico prolongado ou uma dieta cetogênica (rica em gorduras). Cetose também pode ser causada por processos patológicos, como diabetes, deficiência de cortisol e de hormônio do crescimento, ingestão tóxica de etanol ou salicilatos e alguns raros erros inatos do metabolismo (LAFFEL, 1999).

No período avaliado, foram registradas 95 amostras de pacientes que apresentaram reação verdadeiro-positiva para cetonas com a tira reagente Multistix® 10 SG (Bayer). Na análise dos prontuários (Tabela 19), 17 (17,9%) pacientes haviam sido atendidos na emergência e não tinham prontuário físico para análise, enquanto sete prontuários (7,4%) não foram encontrados, sendo um óbito. Dos demais analisados, em 36 (37,9%) não foram encontrados dados referentes à medicação utilizada no momento da coleta, e, apenas em 35 deles (36,8%), conseguiu-se obter os dados sobre a terapêutica.

No mesmo período foram registradas 135 amostras de pacientes com resultados falso-positivos para cetonas, após realizar-se testes confirmatórios. Destes, 27 pacientes (20,0%) haviam sido atendidos na



emergência do hospital e não tinham prontuário físico para análise, 20 prontuários (14,8%) não estavam disponíveis no momento da consulta, sendo 3 óbitos, e 88 foram efetivamente analisados, sendo que, em 42 deles (31,1%), a informação sobre a medicação utilizada não foi encontrada e em apenas 46 prontuários (34,1%), foi possível avaliar os fármacos utilizados no momento da coleta da amostra que apresentou a interferência.

Diante dos obstáculos burocráticos à análise de prontuários (apenas 30 podiam ser retirados por semana), optou-se por não buscar novamente prontuários indisponíveis para não comprometer a coleta de dados ao longo do período estabelecido.

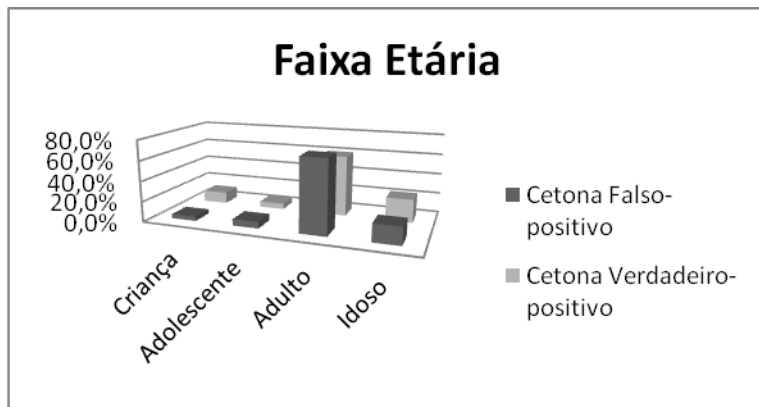
**Tabela 19.** Número de amostras analisadas no parâmetro cetona e dados sobre os prontuários analisados.

<b>Resultados de cetonas</b>	<b>Total de amostras</b>	<b>Pacientes sem prontuário</b>	<b>Prontuário não disponível</b>	<b>Prontuário sem dados de medicação</b>	<b>Prontuário com dados de medicação</b>
VP*	95	17 (17,9%)	7 (7,4%)	36 (37,9%)	35 (36,8%)
FP*	135	27 (20%)	20 (14,8%)	42 (31,1%)	46 (34,1%)

\* VP= Verdadeiro-positivo; FP= Falso-positivo

Das amostras em que foram obtidas informações sobre a terapêutica utilizada, foi encontrado um percentual maior de pacientes do gênero feminino, tanto em amostras falso-positivas, quanto naquelas verdadeiro-positivas (67,4% e 68,6%, respectivamente).

Os pacientes foram classificados segundo as faixas etárias: 0-12 anos incompletos (criança), 12-18 anos incompletos (adolescente), 18 anos em diante (adulto) e acima de 60 anos (idoso). Sendo assim, nos resultados verdadeiro-positivos, 11,4% eram crianças, 5,7% adolescentes, 60,0% adultos e 22,9% idosos. Nos falso-positivos 4,3% eram crianças, 6,6% adolescentes, 71,7% adultos e 17,4% idosos (Figura 5).



**Figura 5.** Distribuição, segundo a faixa etária, dos pacientes com resultados falso- e verdadeiro-positivos para cetonas com a tira reagente Multistix® 10 SG (Bayer).

Nas amostras com resultados **verdadeiro-positivos** para cetonas, observou-se que, dos 35 prontuários analisados com medicação, 11 tinham quadro clínico compatível (diabéticos). Os medicamentos que apareceram com maior frequência foram: captopril (11,4%), cloridrato de metoclopramida (28,6%), cloridrato de ranitidina (11,4%), dipirona (22,8%), insulina (17,1%) e metformina (20,0%).

A literatura compilada por Young (2000) não cita qualquer referência sobre potenciais interferências por estes fármacos, mas relata o aumento *fisiológico* de cetonas na urina com o uso de insulina, especialmente com reservas baixas de glicogênio hepático.

Nos 46 prontuários analisados com resultados **falso-positivos** para cetonas, foram registrados com mais frequência os seguintes fármacos: captopril (15,2%), cloridrato de metoclopramida (39,1%), dipirona (28,3%), dipirona e butilbrometo de escopolamina (17,4%), omeprazol (19,6%), paracetamol (10,9%), ranitidina (13%) e sinvastatina (15,2%). A presença de captopril em tantos prontuários parece estar de acordo com relatos existentes de interferência falso-positiva em testes para cetonas que utilizavam o nitroprusseto de sódio (CSAKO e ELIN, 1996; YOUNG, 2000; SILVA-COLOMBELI e FALKENBERG, 2006). Relatos de diminuição e aumento fisiológicos de cetonas são encontrados na literatura (YOUNG, 2000) para o AAS, mas a frequência deste nos prontuários foi baixa (6,5%).

Destes fármacos, o cloridrato de metoclopramida e ranitidina já foram avaliados *in vitro* e não foram observadas interferências analíticas no parâmetro cetona (SILVA-COLOMBELI e FALKENBERG, 2006), mas a possibilidade de interferência por metabólitos não pode ser descartada.

O teste do qui-quadrado possibilitou observar uma associação significativa entre o uso de insulina e testes verdadeiro-positivos, corroborando os relatos reportados por Young (2000), conforme citado anteriormente.

#### **4.2.3.2) Interferências em proteínas**

No período analisado, foram registradas 488 amostras de pacientes que apresentaram reação positiva verdadeira para proteínas com a tira reagente Multistix® 10 SG (Bayer). Analisando os prontuários (Tabela 20), 87 (17,8%) não foram localizados no momento da procura (destes, 29 eram de pacientes que foram a óbito), e 37 (7,6%) pacientes foram atendidos pela emergência e não possuíam prontuário físico para análise. Foram localizados 364 prontuários. Em 144 destes (29,5%), não foram encontrados dados referentes à medicação utilizada no momento da coleta e apenas em 220 (45,1%) conseguiu-se obter esta informação. No mesmo período de análise, foram encontradas 180 amostras de pacientes com resultados falso-positivos para proteína, após realizarmos testes confirmatórios. Destes, 17 pacientes (9,4%) haviam sido atendidos na emergência do hospital e não tinham prontuário físico para análise, 22 prontuários (12,2%) não estavam disponíveis no momento da consulta, sendo que dois dos pacientes foram a óbito. Um total de 141 prontuários foram localizados e analisados, sendo que 61 (33,9%) não continham dados sobre a medicação utilizada na data da coleta e em 80 prontuários (44,5%) conseguiu-se obter a lista de fármacos utilizados no dia em que foi observada a interferência.

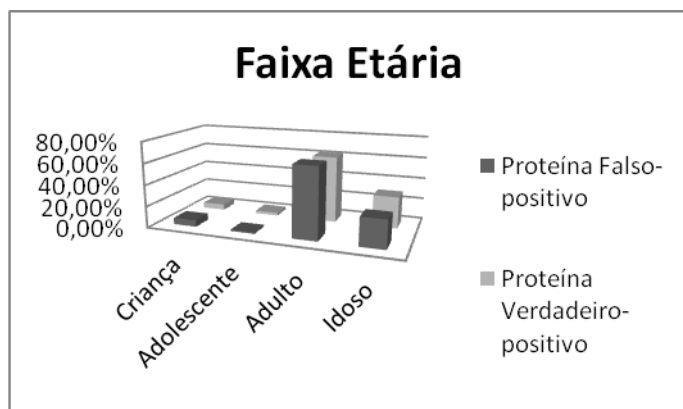
**Tabela 20.** Número de amostras analisadas no parâmetro proteína e dados sobre os prontuários analisados.

Resultados de proteínas	Total de amostras	Pacientes sem prontuário	Prontuário não disponível	Prontuário sem dados de medicação	Prontuário com dados de medicação
VP*	488	37 (7,6%)	87 (17,8%)	144 (29,5%)	220 (45,1%)
FP*	180	17 (9,4%)	22 (12,2%)	61 (33,9%)	80 (44,5%)

\* VP= Verdadeiro-positivo; FP= Falso-positivo

Tomando como base os prontuários onde foi possível obter informações sobre os medicamentos utilizados, a classificação segundo o gênero dos pacientes ficou muito semelhante, tanto nas amostras falso-positivas, quanto verdadeiro-positivas, com predomínio do gênero feminino em ambos os casos (63,7% e 63,2%, respectivamente).

Em relação à faixa etária, foi observado o predomínio de adultos (Figura 6), sendo observados 6,2% de crianças, 1,3% de adolescentes, 66,2% de adultos e 26,3% de idosos, nos casos de proteína falso-positiva. Em amostras verdadeiro-positivas para proteína, foram encontradas 5,5% de crianças, 2,7% de adolescentes, 62,3% de adultos e 29,5% de idosos.



**Figura 6.** Distribuição, segundo a faixa etária, dos pacientes com resultados falso- e verdadeiro-positivos para proteínas com a tira reagente Multistix® 10 SG (Bayer).

## 4.2.3.2.1) Reação positiva verdadeira

Nos prontuários dos pacientes com resultados verdadeiro-positivos, os fármacos mais comumente encontrados estão relacionados na Tabela 21.

Young (2000) apresenta relatos de aumento fisiológico de proteína na urina pelo uso dos fármacos captopril e enalapril, bem como a furosemida, e estes três apareceram em frequência maior que 15% no presente estudo. Os pacientes em uso de insulina (15,4%) são todos diabéticos e poder-se-ia supor que estivessem com um comprometimento renal que levasse ao aparecimento de proteína na urina.

**Tabela 21.** Relação dos fármacos encontrados com maior frequência nos prontuários de pacientes com resultados verdadeiro-positivos para proteína, com o uso da tira reagente Multistix® 10 SG (Bayer).

<b>Fármaco</b>	<b>Percentual encontrado nos 220 prontuários analisados (%)</b>
Ácido acetilsalicílico	17,3
Cálcio	12,3
Captopril	20,4
Cloridrato de metoclopramida	19,0
Dipirona	22,3
Enalapril	16,8
Furosemida	20,0
Hidroclorotiazida	14,1
Insulina	15,4
Losartana	10,4
Metformina	11,4
Omeprazol	29,5
Prednisona	19,5
Sinvastatina	14,5

Em um artigo publicado sobre fármacos que induzem a nefrotoxicidade, Naughton (2008) cita que fármacos que alteram a hemodinâmica intraglomerular, com atividade anti-prostaglandinas (ex.: anti-inflamatórios não esteroidais) ou aqueles com atividade anti-angiotensina II (ex.: inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina - ECA), podem interferir na habilidade renal em autorregular a pressão glomerular e diminuir a taxa de filtração glomerular.

Avaliando os resultados pelo teste do qui-quadrado, foi observada associação significativa do ácido acetilsalicílico, cálcio, captopril, carvedilol, furosemida, hidroclorotiazida e losartana com resultados verdadeiro-positivos para proteínas. Quando avaliado no modelo de regressão logística, o único fármaco que se manteve com significância foi o ácido acetilsalicílico. Segundo Young (2000), há relatos de aumento fisiológico de proteínas na urina com o uso prolongado de ácido acetilsalicílico, devido à nefrotoxicidade causada pelo fármaco. Alguns autores afirmam que a ingestão de salicilatos não estaria associada com dano renal crônico, mas que o ácido acetilsalicílico pode causar mudanças na função renal de pacientes por supressão aguda da síntese de prostaglandinas (PLOTZ e KIMBERLY, 1981; NANRA, 1983). Em estudo duplo-cego com 29 pacientes, 14 tomando placebo e 15 recebendo ácido acetilsalicílico (300 mg, 3 vezes ao dia, durante 7 dias), Lijnen e colaboradores (1984) não observaram mudanças na função renal dos pacientes tratados.

De acordo com dados clínicos disponíveis em alguns prontuários, pôde-se observar que alguns pacientes eram diabéticos, hipertensos, apresentavam Insuficiência Renal Crônica (IRC), Insuficiência Renal Aguda (IRA), lúpus eritematoso sistêmico (LES), nefrite e síndrome nefrótica, situações que poderiam justificar o aparecimento de proteína positiva na urina.

Esses são alguns achados que confirmam situações clínicas e dados sobre fármacos que podem causar um efeito fisiológico que venha a acarretar no aparecimento de proteína positiva na urina de pacientes.

#### 4.2.3.2.2) Reação falso-positiva

Do total de 180 pacientes com resultados falso-positivos para proteína com a tira utilizada, 80 prontuários foram encontrados com dados referentes à medicação utilizada. Os fármacos mais frequentemente encontrados estão listados na Tabela 22.

**Tabela 22.** Relação dos fármacos encontrados com maior frequência nos prontuários de pacientes com resultados falso-positivos para proteína, com o uso da tira reagente Multistix® 10 SG (Bayer).

<b>Fármaco</b>	<b>Percentual encontrado nos 220 prontuários analisados (%)</b>
Ácido fólico	12,5
Captopril	10,0
Cloridrato de metoclopramida	30,0
Dipirona	23,7
Enalapril	13,7
Omeprazol	23,7
Paracetamol	10,0
Prednisona	17,5
Ranitidina	10,0
Sinvastatina	11,2
Tramadol	10,0

Em trabalho anterior, foram avaliados os fármacos captopril nas concentrações de 123 mg/dL, 12,3 mg/dL e 1,23 mg/dL, cloridrato de metoclopramida (45,7 mg/dL, 4,57 mg/dL e 0,457 mg/dL) e ranitidina (70 mg/dL, 7,0 mg/dL e 0,7 mg/dL), e não foram observadas interferências analíticas no parâmetro proteína (SILVA-COLOMBELI e FALKENBERG, 2007). A metoclopramida estimula a motilidade gástrica (antagonista do receptor D<sub>2</sub> da dopamina) e acelera o esvaziamento do conteúdo gástrico, podendo eventualmente acelerar e aumentar a taxa de absorção de outros fármacos (RAO e CAMILLERI, 2010).

O fármaco enalapril foi avaliado nas concentrações de 10,0 mg/dL, 1,0 mg/dL e 0,1 mg/dL (Tabela 2) no mesmo trabalho, e também não apresentou interferências analíticas *in vitro* neste parâmetro.

Young (2000) relata aumento analítico do ácido acetilsalicílico na proteína urinária, com o uso do método de Fiolin Ciocalteau, sem qualquer relato de interferência em tiras reagentes. Este fármaco foi registrado em apenas dois (3,7%) dos prontuários analisados. A ranitidina também é citada pelo mesmo autor como possível interferente

analítico (bula do Zantac®) em tiras Multistix, relato conflitante com nossos achados em estudo anterior. O fármaco foi avaliado nas concentrações de 70 mg/dL, 7 mg/dL e 0,7 mg/dL e não apresentou interferência (SILVA-COLOMBELI e FALKENBERG, 2007), de modo que talvez a interferência possa estar relacionada a metabólitos.

Com o teste de qui-quadrado, foram observadas associações com resultados falso-positivos para proteína com o uso dos seguintes fármacos: cloridrato de metoclopramida, diazepam, dipirona + butilbrometo de escopolamina, heparina e sulbactam sódico.

O diazepam é um fármaco intensamente metabolizado e que sofre circulação enteroepática, sendo usado em baixa dosagem e excretado na urina na forma inalterada, em baixa concentração, dificultando o estudo de potenciais interferências *in vitro*. A mesma problemática é encontrada no caso da heparina, polímero excretado em pequenas quantidades na urina.

Por fim, dos fármacos que apresentaram interferência analítica para proteína na tira analisada, em 3,7% dos prontuários foram encontrados pacientes em uso de ciprofloxacino e o mesmo percentual, de hidroxicloquina.

Vargas e colaboradores (2006) analisaram a concordância entre as informações publicadas sobre prováveis interferências de medicamentos com resultados de análises clínicas, com foco nos 50 medicamentos mais prescritos no serviço de atenção primária de um hospital em Barcelona, nos anos 2002 e 2003. Anti-inflamatórios não esteroidais foi o grupo terapêutico com maior número de interferências teóricas. As interferências mais frequentes corresponderam ao aumento de transaminases, trombocitopenia, leucopenia, hiperglicemia e hiperuricemia, mas o trabalho contemplou também as interferências ditas fisiológicas e não encontrou interferências na determinação de proteinúria.

#### 4.3) Testes complementares

Novos testes de interferência analítica *in vitro* foram realizados, com base na metodologia descrita anteriormente (item 3.1), com fármacos que apareceram com maior frequência no estudo transversal e também no estudo *in vivo*. Os fármacos avaliados e as respectivas concentrações de teste estão relacionados tabela 23. Não foram observadas interferências analíticas com nenhuma das tiras analisadas.



**Tabela 23.** Fármacos selecionados e respectivas concentrações de teste, para avaliar potencial interferência em tiras reagentes para urinálise.

Fármacos	Concentração do fármaco na urina (mg/dL)	Proteína urinária	
		Multistix® 10 SG	Combur® 10 Test M
<b>Dipirona</b>	26,0 (ST)	(-)	(-)
	2,6 (T)	(-)	(-)
	0,26 (sT)	(-)	(-)
<b>Hidroclorotiazida</b>	150,0 (ST)	(-)	(-)
	15,0 (T)	(-)	(-)
	1,5 (sT)	(-)	(-)
<b>Omeprazol</b>	1,0 (ST)	(-)	(-)
	0,1 (T)	(-)	(-)
	0,01 (sT)	(-)	(-)
<b>Sulfato ferroso</b>	40,0 (ST)	(-)	(-)
	4,0 (T)	(-)	(-)
	0,4 (sT)	(-)	(-)

ST= Concentração Supraterapêutica, T= Concentração Terapêutica, sT= Concentração subterapêutica.

#### 4.4) Considerações finais

Pôde-se observar uma inter-relação entre os estudos *in vitro* e *in vivo*. Foi a partir da percepção, no estudo *in vivo*, da interferência do ciprofloxacino na tira reagente (não confirmada pelo ácido sulfossalicílico), que se decidiu fazer o teste de quantificação de proteína pelo vermelho de pirogalol-molibdato, levando à descoberta da interferência também de outros fármacos quinolônicos e quinolínicos.

A semelhança estrutural entre estes compostos interferentes tanto na fita quanto no vermelho de pirogalol-molibdato levou à curiosidade em termos de possível relação Estrutura-atividade, sendo buscada parceria (professor Eduardo Borges de Melo – Universidade Estadual do Oeste do Paraná) para avaliações de características moleculares, através de estudo de relação estrutura-atividade quantitativa (QSAR), que não foram incluídos na tese, mas estão em andamento.



## 5) CONCLUSÕES

### 5.1) Dos estudos *in vitro*:

- A maioria dos fármacos testados não apresentou interferência para proteína urinária quando se utilizou a tira Combur® 10 Test M;
- Fármacos quinolônicos (ciprofloxacino, levofloxacino, norfloxacino e ofloxacino) e quinolínicos (difosfato de cloroquina, sulfato de hidroxicloroquina e sulfato de quinina), testados neste estudo apresentaram interferência analítica para proteína urinária pelo método do vermelho de pirogalol-molibdato, em concentrações inferiores às interferentes na tira;
- No método do vermelho de pirogalol, fármacos quinolínicos apresentaram interferência em concentrações inferiores à concentração terapêutica estimada, com valores bem abaixo dos observados para fármacos quinolônicos;
- O potencial significado clínico das interferências detectadas é ainda maior por ocorrer também no teste do vermelho de pirogalol, que é usado para confirmação;

### 5.2) Dos estudos *in vivo*:

- Dos 15 pacientes em uso de captopril, em seis foi observada a ocorrência de interferência falso-positiva estatisticamente significativa com o uso da tira Multistix® 10 SG e somente três pacientes apresentaram interferência com a tira Combur® 10 Test M (Roche), porém nenhum com significância estatística;
- Pacientes que apresentaram interferências estatisticamente significativas utilizavam doses iguais ou superiores a 50 mg/dia de captopril, porém a interferência observada não foi

necessariamente proporcional à dose; porém, para um mesmo paciente, amostras com interferência falso-positiva na tira reagente apresentavam concentrações urinárias mais elevadas de captopril que amostras sem interferência;

- No estudo *in vivo* com nove pacientes em uso de ciprofloxacino, não houve interferência estatisticamente significativa para proteína utilizando a tira Combur® 10 Test M (Roche), enquanto dois apresentaram interferência falso-positiva estatisticamente significativa utilizando a tira Multistix® 10 SG (Bayer);
- Dos oito pacientes em que foi realizada a quantificação de proteínas com vermelho de pirogalol-molibdato, sete apresentaram interferência estatisticamente significativa, com valores acima da referência para o método;
- A comparação da frequência de uso de fármacos entre amostras verdadeiro-positivas e falso-positivas para cetonas e proteína urinária no estudo transversal, não permitiu identificar inequivocamente outros fármacos com potencial de interferência;
- O teste do qui-quadrado possibilitou observar uma associação significativa entre o uso de insulina e testes *verdadeiro-positivos para cetonas*;
- Avaliando os resultados pelo teste do qui-quadrado, foi observada associação significativa do ácido acetilsalicílico, cálcio, captopril, carvedilol, furosemida, hidroclorotiazida e losartana com resultados *verdadeiro-positivos para proteínas*. Pelo modelo de regressão logística, o único fármaco que se manteve com significância foi o ácido acetilsalicílico;
- Foram observadas associações com resultados *falso-positivos para proteína* com o uso dos seguintes fármacos: cloridrato de metoclopramida, diazepam, dipirona + butilbrometo de escopolamina, heparina e sulbactam sódico pelo teste de qui-quadrado;

- Nos estudos complementares, foram avaliados *in vitro* os fármacos dipirona, hidroclorotiazida, omeprazol e sulfato ferroso, nas concentrações supraterapêutica, terapêutica e subterapêutica estimadas, não sendo observada qualquer interferência para estes fármacos nas tiras testadas neste trabalho, não se podendo descartar a hipótese de interferências por metabólitos dos mesmos;
- O conhecimento do potencial de interferência possibilita estudos de otimização dos testes diagnósticos e/ou alerta sobre o risco de interferências, de modo a minimizar erros de diagnóstico.



## REFERÊNCIAS

- AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY. AACC **Young's Effects Online**. Disponível em: <<http://www.fxol.org>>. Acesso em: 22 abril 2010.
- AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Committee on Practice and Ambulatory Medicine. **Pediatrics**, v. 105, p. 604-605, 2000.
- AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Committee on Practice and Ambulatory Medicine. **Pediatrics**, v. 120, p. 1376, 2007.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Laboratório Clínico: Requisitos e recomendações para exames de urina. ABNT NBR 15268:2005, Rio de Janeiro, 2005.
- AKTORIES, K. et al. **Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie**. 9. Auflage. München: Elsevier, 2005.
- ALTEKIN, E. et al. New generation IQ-200 automated urine microscopy analyzer compared with KOVA cell chamber. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 24, p. 67-71, 2010.
- ALVES, M. A. R. Diagnóstico de doença renal crônica: avaliação de proteinúria e sedimento urinário. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. XXVI, n. 3, supl. 1, p. 6-8, 2004.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução RE nº 899, de 29/05/2003.
- BADEN, L. R. et al. Quinolones and false-positive urine screening for opiates by immunoassay technology. **The Journal of the American Medical Association**, v. 286, n. 24, p. 3115-3119, 2001.
- BARRATT, J. What to do with patients with abnormal dipstick urinalysis. **Medicine**, v. 35, n. 7, p. 365-367, 2007.
- BELL, D. A. et al. Plasma poltergeists: A negative cortisol interference leading to a false diagnosis of adrenal insufficiency. **Clinica Chimica Acta**, v. 413, p. 1298-1300, 2012.
- BEN-EZRA, J.; BORK, L.; McPHERSON, R. A. Evaluation of the Sysmex UF-100 automated urinalysis analyzer. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 1, p. 92-95, 1998.

BERG, B. et al. Guidelines for evaluation of reagent strips. Exemplified by analysis of urine albumin and glucose concentration using visually read reagent strips. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 49, p. 689-699, 1989.

BONINI, P. et al. Errors in laboratory medicine. **Clinical Chemistry**, v. 48, n. 5, p. 691-698, 2002.

BRAHM, N. C. et al. Commonly prescribed medications and potential false-positive urine drug screens. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 67, n. 16, p. 1344-1350, 2010.

BRIGDEN M. L. et al. High incidence of significant urinary ascorbic acid concentrations in a west coast population-implications for routine urinalysis. **Clinical Chemistry**, v. 38, n. 3, p. 426-431, 1992.

CHIEN, T. et al. Urine sediment examination: A comparison of automated urinalysis systems and manual microscopy. **Clinica Chimica Acta**, v. 382, p. 28-34, 2007.

CHRISTIAN, M. T.; WATSON, A. R. The investigation of proteinuria. **Current Paediatrics**, v. 14, p. 547-555, 2004.

CSAKO, G. False-positive results for ketone with the drug mesna and other free-sulphydryl compounds. **Clinical Chemistry**, v. 33, n. 2, p. 289-292, 1987.

CSAKO, G.; ELIN, R. J. Spurious ketonuria due to captopril and other free sulphydryl drugs. **Diabetes Care**, v. 19, n. 6, p. 673-674, 1996.

DELANGHE, J. New screening diagnostic techniques in urinalysis. **Acta Clinica Belgica**, v.62-3, p. 155-161, 2007.

DIMECH, W.; RONEY, K. Evaluation of an automated urinalysis system for testing urine chemistry, microscopy and culture. **Pathology**, v.34, p. 170-177, 2002)

DIMESKI, G. et al. Glucose meters: evaluation of the new formulation measuring strips from Roche (Accu-Chek) and Abbott (MediSense). **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 47, p. 358-365, 2010.

EUROPEAN CONFEDERATION OF LABORATORY MEDICINE. European urinalysis guidelines. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 60, p.1-96, 2000.



- FALAKAFLAKI, B.; MOUSAVINASAB, S. N.; MAZLOOMZADEH, S. Dipstick urinalysis screening of healthy neonates. **Pediatrics and Neonatology**, n. 52, p. 161-164, 2011.
- GALTEAU, M. M.; SIEST, G. Drugs effects in clinical chemistry. Part 2, Guidelines for evaluation of analytical interference. IFCC: Document Stage 1, draft 4. **Annales de Biologie Clinique**, n. 42, p. 137-144, 1984.
- GOLDSTEIN, D. E. et al. Tests of glycemia in Diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, n. 7, p. 1761-1773, 2004.
- GOWANS, E. M. S.; FRASER, C. G. Biological variation in analyte concentrations in urine of apparently healthy men and women. **Clinical Chemistry**, v. 33, n. 6, p. 847-850, 1987.
- GRAHAM, P.; NAIDOO, D. False-positive ketostix in a diabetic on antihypertensive therapy. **Clinical Chemistry**, v. 33, n.8, 1987.
- HARTKE, K.; MUTSCHLER, E. (Eds.) **DAB 9 – Kommentar**. Stuttgart/Frankfurt: Wissenschaftliche/Govi, 1987. Band 1, p.407.
- HENRY, J. B. **Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais**. 20. ed. São Paulo: Manole, 2008.
- HORIKOSHI, S. et al. A new screening method for proteinuria using Erythrosin B and an automated analyzer – Rapid, sensitive and inexpensive determination. **Clinica Chimica Acta**, v. 413, p. 1087-1091, 2012.
- ICH. International Conference on Harmonisation. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology- Q2 (R1). London, 2005.
- IWATA, K.; NISHIKAZE, O. New micro-turbidimetric method for determination of protein in cerebrospinal fluid and urine. **Clinical Chemistry**, v. 25, n. 7, p. 1317-1319, 1979.
- JAFFEE, W. B. et al. Is this urine really negative? A systematic review of tampering methods in urine drug screening and testing. **Journal of Substance Abuse Treatment**, v. 33, p. 33-42, 2007.
- KALIA, S.; DUTZ, J. P. New concepts in antimalarial use and mode of action in dermatology. **Dermatologic Therapy**, v. 20, p. 160-174, 2007.
- KALLNER, A.; TRYDING, N. IFCC Guidelines to the evaluation of drug effects in clinical chemistry. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**. Suppl. 195, v. 49, p. 1-29, 1989.

KANEKO, K. et al. Simplified quantification of urinary protein excretion using a novel dipstick in children. **Pediatric Nephrology**, v. 20, p. 834-836, 2005.

KAPUR, B. M. False positive drugs of abuse immunoassays. **Clinical Biochemistry**, v. 45, p. 603-604, 2012.

KAZMIERCZAK, S. C.; CATROU, P. G. Analytical Interference. More than just a laboratory problem. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 113, p. 9-11, 2000.

KLASCO, R. K. (Ed) **DRUGDEX® System**, Greenwood Village: Thomson Micromedex, 2011. Disponível em: <<http://www.periodicos.capes.gov.br>>. Acesso em: 10 março 2011

KOERBIN, G. Aminoglycoside interference with the Dade Behring Pyrogallol Red-Molybdate method for the measurement of total urine protein. **Clinical Chemistry**, v. 47, n. 12, p. 2138-2183-2184, 2001.

KRIPALANI, K. J. et al. Disposition of captopril in normal subjects. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 27, n. 5, p. 636-641, 1980.

KROLL, M. H.; ELIN, R. J. Interference with clinical laboratory analyses. **Clinical Chemistry**, v. 40, n. 11, p. 1996-2005, 1994.

KUSMIEREK, K.; BALD, E. A simple liquid chromatography method for the determination of captopril in urine. **Chromatographia**, v. 66, p. 71-74, 2007.

KUSMIEREK, K.; CHWATKO, G.; BALD, E. Redox status of main urinary sulfur amino acids evaluation by liquid chromatography. **Chromatographia**, v. 68, p. S91-S95, 2008.

KUTTER, D. The urine test strip of the future. **Clinica Chimica Acta**, v. 297, p. 297-304, 2000.

LACHER, D. A.; HUGHES, J. P.; CARROLL, M. D. Estimate of biological variation of laboratory analytes based on the third national health and nutrition examination survey. **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 2, p. 450-452, 2005.

LACY, C. F. et al. **Drug Information Handbook**. 8. ed. Ohio: Lexi-Comp's Clinical Reference Library, 2000-2001.

LAFFEL, L. Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 15, p. 412-426, 1999.

LAMB, E. J.; MACKENZIE, F.; STEVENS, P. E. How should proteinuria be detected and measured? **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 46, p. 205-217, 2009.

LAMCHIAGDHASE, P. et al. Urine sediment examination: A comparison between the manual method and the iQ200 automated urine microscopy analyser. **Clinica Chimica Acta**, v. 358, p. 167-174, 2005.

LANGLOIS, M. R. et al. Automated flow cytometry compared with an automated dipstick reader of urinalysis. **Clinical Chemistry**, v. 45, n. 1, p. 118-122, 1999.

LEWIS, E. J. et al. The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. **The New England Journal of Medicine**, v. 329, n. 20, p. 1456-1462, 1993.

LIJNEN, P. et al. Effect of aspirin on renal function and the prostaglandin-kallikrein systems early after myocardial infarction. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 6, p. 455-459, 1984.

LIMA, O. A. et al. **Métodos de Laboratório aplicados à clínica – Técnica e interpretação**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 4.1-4.16.

LINDER, M. W.; VALDES JR, R. Mechanism and elimination of aspirin-induced interference in Emit II d.a.u. assays. **Clinical Chemistry**, v. 40, n. 80, p. 1512-1516, 1994.

LINKO, S. et al. Analytical performance of the Iris iQ200 automated urine microscopy analyzer. **Clinica Chimica Acta**, v. 372, p. 54-64, 2006.

LOTT, J. A.; STEPHAN, V. A.; PRITCHARD, K. A. Evaluation of the Coomassie Brilliant Blue G250 method for urinary protein. **Clinical Chemistry**, v. 29, n. 11, p. 1946-1950, 1983.

MARSHALL, T.; WILLIAMS, K. M. Comparison of Coomassie Brilliant Blue protein dye-binding assays for determination of urinary protein concentration. **Clinical Chemistry**, v. 33, n. 4, p. 577-578, 1987.

MARSHALL, T.; WILLIAMS, K. M. Total protein determination in urine: aminoglycoside interference. **Clinical Chemistry**, v. 49, n. 1, p. 202-203, 2003.

MARSHALL, T.; WILLIAMS, K. M. Elimination of the interference from aminoglycoside antibiotics in the pyrogallol red-molybdate protein dye-binding assay. **Clinical Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 1674-1675, 2004.

MARTINELLO, F.; SILVA, E. L. Ascorbic acid interference in the measurement of serum biochemical parameter: In vivo e in vitro studies. **Clinical Biochemistry**, v. 39, p. 396-403, 2006a.

MARTINELLO, F.; SILVA, E. L. Mechanism of ascorbic acid interference in biochemical tests that use peroxide and peroxidase to generate chromophore. **Clinica Chimica Acta**, v. 373, p. 108-116, 2006b.

MARZINKE, M. A. et al. Origin of a false positive urine pregnancy test in a patient with membranoproliferative glomerulonephritis type I. **Clinica Chimica Acta**, v. 413, p. 361-363, 2012.

MAYO, S. et al. Clinical laboratory automated urinalysis: Comparison among automated microscopy, flow cytometry, two test strips analyzers, and manual microscopic examination of the urine sediments. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 22, p. 262-270, 2008.

McAULIFFE, A. V. et al. Administration of ascorbic acid and an aldose reductase inhibitor (tolrestat) in diabetes: effect on urinary albumin excretion. **Nephron**, v. 80, n. 3, p. 277-284, 1998.

MILFORD, D. V. Investigating haematuria and proteinuria. **Paediatrics and Child Health**, v. 18, n. 8, p. 349-353, 2008.

MOFFAT, A. C.; OSSELTON, M. D.; WIDDOP, B. **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons – in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material**. 3. ed. v. 2, part 1. London – Chicago: Pharmaceutical Press, 2004.

MOTTA, V. T. **Bioquímica clínica para o laboratório: princípios e interpretações**. 4.ed. Porto Alegre: Editora médica Missau; São Paulo: Robe editorial, EDUCS- Caxias do Sul, 2003.

MURAMOTO, Y.; MATSUSHITA, M.; IRINO, T. Reduction of reaction differences between human mercaptalbumin and human nonmercaptalbumin measured by the bromocresol purple method. **Clinica Chimica Acta**, v. 289, p. 69-78, 1999.

NANRA, R. S. Renal effects of antipyretic analgesics. **The American Journal of Medicine**, v. 75, n. 5, 70-81, 1983.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Urinalysis and collection, transportation and preservation of urine specimens**; approved guideline. NCCLS document GP 16-A. Wayne, PA, NCCLS. 1995.

NAUGHTON, C. A. Drug-induced nephrotoxicity. **American Family Physician**, v. 78, n. 6, p. 743-750, 2008.

ORSONNEAU, J. et al. An improved Pyrogallol Red-Molybdate method for determining total urinary protein. **Clinical Chemistry**, v. 35, n. 11, p. 2233-2236, 1989.

PATEL, H. P. The abnormal urinalysis. **Pediatric Clinics of North America**, v. 53, p. 325-337, 2006.

PHILLIPOU, G. et al. Screening for microalbuminuria by use of a rapid, low-cost colorimetric assay. **Clinical Chemistry**, v. 35, n. 3, p. 456-458, 1989.

PLEBANI, M. Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine? **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 44, n. 6, p. 750-759, 2006.

PLOTZ, P. H.; KIMBERLY, R. P. Acute effects of aspirin and acetaminophen on renal function. **Archives of Internal Medicine**, v. 141, n. 3, p. 343-348, 1981.

POON, R.; HINBERG, I. One-step elimination of interference of free-sulfhydryl-containing drugs with Chemstrip ketone readings. **Clinical Chemistry**, v. 36, n. 8, p. 1527-1528, 1990.

PRICE, C. P.; NEWALL, R. G.; BOYD, J. C. Use of protein: creatinina ratio measurements on random urine samples for prediction of significant proteinuria: a systematic review. **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 9, p. 1577-1586, 2005.

PUGIA, M. J. et al. Albuminuria and proteinuria in hospitalized patients as measured by quantitative and dipstick methods. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 15, p. 295-300, 2001.

RALSTON, S. H. et al. Screening for proteinuria in a rheumatology clinic: comparison of dipstick testing, 24 hour urine quantitative protein, and protein/creatinina ratio in random urine samples. **Annals of Rheumatic Diseases**, v. 47, p. 759-763, 1988.

RAO, A. S.; CAMILLERI, M. Review article: metoclopramide and tardive dyskinesia. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 31, p. 11-19, 2010.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 771-780, 2004.

RICÓS, C. et al. Biological variations in urine samples used for analyte measurements. **Clinical Chemistry**, v. 40, n.3, p. 472-477, 1994.

RICÓS, C. et al. Current databases on biological variation: pros, cons and progress. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 59, p. 491-500, 1999.

RIN, G. Pre-analytical workstations: A tool for reducing laboratory errors. **Clinica Chimica Acta**, v. 404, p. 68-74, 2009.

ROLLINS, D. E.; JENNISON, T. A.; JONES, G. Investigation of interference by nonsteroidal anti-inflammatory drugs in urine tests for abused drugs. **Clinical Chemistry**, v. 36, n. 4, p. 602-606, 1990.

RUIZ-IRASTORZA, G. et al. Effect of antimalarials on thrombosis and survival in patients with systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 15, p. 577-583, 2006.

SHAJARI, A. et al. Benefits of urinalysis. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 76, p. 639-641, 2009.

SHAYANFAR, N. et al. Automated urinalysis: first experiences and a comparison between the Iris iQ200 urine microscopy system, the Sysmex UF-100 flow cytometer and manual microscopic particle counting. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 45, n. 9, p. 1251-1256, 2007.

SHER, P. P. Drug interferences with clinical laboratory tests. **Drugs**, v. 24, p. 24-63, 1982.

SHIEA, J. et al. Using matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry to rapidly screen for albuminuria. **Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM**, v. 22, n. 23, p. 3754-3760, 2008.

SHIN, J; KAYSER, S. R.; LANGAEE, T. Y. Pharmacogenetics: from discovery to patient care. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 66, p. 625-637, 2009.

SIEST, G.; DAWKINS, S. J.; GALTEAU, M. M. Drug effects on clinical laboratory tests. **Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis**, v. 1, n. 3, p. 247-257, 1983.

SILVA-COLOMBELI, A. S. **Avaliação do potencial de interferência analítica de fármacos na análise química do exame de urina**. 2006. 156 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

SILVA-COLOMBELI, A. S.; FALKENBERG, M. Comparação de bulas de duas marcas de tiras reagentes utilizadas no exame químico de urina. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 2, p. 85-93, 2006.

SILVA-COLOMBELI, A. S.; FALKENBERG, M. Analytical interferences of drugs in the chemical examination of urinary protein. **Clinical Biochemistry**, v. 40, p. 1074-1076, 2007.

SILVA, A. S.; FALKENBERG, M. Analytical interference of quinolone antibiotics and quinine derived drugs on urinary protein determined by reagent strips and the pyrogallol red-molybdate protein assay. **Clinical Biochemistry**, v. 44, p. 1000-1004, 2011.

SILVA, E. L. et al. Avaliação da interferência do ácido ascórbico nas reações para detecção de glicose e hemoglobina urinárias. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 32, n. 1, p. 15-20, 2000.

SIMERVILLE, J. A.; MAXTED, W. C.; PAHIRA, J. J. Urinalysis: A comprehensive review. **American Family Physician**, v. 71, n. 6, p. 1153-1162, 2005.

SONNTAG, O.; SCHOLER, A. Drug interference in clinical chemistry: recommendation of drugs and their concentrations to be used in drug interference studies. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 38, p. 376-385, 2001.

SONNTAG, O. Analytical interference and analytical quality. **Clinica Chimica Acta**, v. 404, p. 37-40, 2009.

SPELLING, P. F. et al. Perniose: perfil clínico de uma causística atendida em ambulatório de reumatologia pediátrica. **Pediatria**, v. 23, n. 2, p. 154-158, 2001.

STANKOVIC, A. K.; DiLAURI, E. Quality improvements in the preanalytical phase: focus on urine specimen workflow. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 28, p. 339-350, 2008.

STRASINGER, S. K. **Uroanálise e Fluidos Biológicos**, 3. ed. São Paulo: Premier, 1996. p. 1-75.

SUZUKI, Y. V. Theoretical analysis concerning the characteristics of a dye-binding methods for determining serum protein based on protein error of pH indicator: Effect of buffer concentration of the color reagent on the color development. **Analytical Sciences**, v. 21, p. 83-88, 2005.

VANAVANAN, S. et al. Performance of a new interference-resistant glucose meter. **Clinical Biochemistry**, v. 43, p. 186-192, 2010.

VARGAS, R. et al. Revisión de las interferencias entre los medicamentos más prescritos en el servicio de atención primaria de L'Hospitalet de Llobregat (ICS) y los análisis clínicos. **Atención Primaria**, v. 37, n.3, p. 133-141, 2006.

WAH, D. T.; WISES, P. K.; BUTCH, A. W. Analytic performance of the iQ200 automated urine microscopy analyser and comparison with manual counts using Fuchs-Rosenthal cell chambers. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 123, n. 2, p. 290-296, feb. 2005.

WARREN, S. E. False-positive urine ketone test with captopril. **The New England Journal of Medicine**, v. 33, v.17, p. 1003-1004, oct 1980.

WATANABE, N. et al. Urinary protein as measured with a Pyrogallol Red-Molybdate complex, manually and in a Hitachi 726 automated analyzer. **Clinical Chemistry**, v. 32, n. 8, p. 1551-1554, 1986.

WATANABE, M. et al. Using protein/creatinina ratios in random urine. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 19, p. 160-166, 2005.

WILLIAMS, K. M. et al. An evaluation of protein assays for quantitative determination of drugs. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 57, p. 45-55, 2003.

YAMAGATA, K. et al. Chronic kidney disease perspectives in Japan and the importance of urinalysis screening. **Clinical and Experimental Nephrology**, v. 12, p. 1-8, 2008.

YANG, J. Y. et al. Heparin interference in the cerebrospinal fluid protein assay measured with a pyrogallol red-molybdate complex. **Clinica Chimica Acta**, v. 408, p. 75-78, 2009.

YANG, X.; PEREZ, O. A.; ENGLISH, J. C. Successful treatment of pemphigus with hydroxychloroquine. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 9, n. 10, p. 1242-1246, 2010.

YOUNG, D. S. et al. Effects of drugs on clinical laboratory tests. **Clinical Chemistry**, v. 18, n. 10, p. 1041-1303, 1972.

YOUNG, D. S. **Effects of drugs on clinical laboratory tests**. Volume one: Listing by test. 4 ed. Washington: AACC, 1995.



YOUNG, D. S. Effects of drugs on clinical laboratory tests. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 34, p. 579-581, 1997.

YOUNG, D. S. **Effects of drugs on clinical laboratory tests**. Volume one: Listing by test. 5 ed. Washington: AACC, 2000.

ZACHER, J. L.; GIVONE, D. M. False-positive urine opiate screening associated with fluoroquinolone use. **The Annals of Pharmacotherapy**, v. 38, n. 9, p. 1525-1528, 2004.

ZWEIG, M. H.; JACKSON, A. Ascorbic acid interference in reagent-strip reactions for assay of urinary glucose and hemoglobin. **Clinical Chemistry**, v. 32, n. 4, p.674-677, 1986.



## APÊNDICES

### APÊNDICE A- Modelo do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para os voluntários que forneceram amostras para o *pool* de urina

#### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Meu nome é Adriana Scotti da Silva e estou desenvolvendo a pesquisa “Avaliação da interferência analítica de fármacos na determinação de proteínas e cetonas no exame químico de urina – estudos *in vitro* e *in vivo*”, com o objetivo de aprofundar o estudo sobre interferências analíticas de fármacos nos resultados dos exames de urina. Este estudo é necessário porque a presença de fármacos em amostras de urina e sangue pode levar a falsos resultados na determinação de diversos analitos de importância no diagnóstico e monitoramento de patologias. Tendo em vista ser o exame de urina muito solicitado pelos médicos, tanto em caráter de rotina, quanto em variadas patologias e como existem poucos estudos de interferência em análises de urina considerou-se importante estudar possíveis interferências. Serão realizadas coletas de urina em frascos próprios, com prévia higienização e desprezo do primeiro jato da amostra. Posteriormente esta amostra será misturada às amostras de urina de outros voluntários, obtendo assim um *pool* de amostras para realização do estudo. Isto não traz qualquer risco e você estará contribuindo para a garantia da qualidade de exames laboratoriais. Se você tiver alguma dúvida em relação ao estudo ou não quiser mais fazer parte do mesmo, pode entrar em contato pelo telefone (48) 3721.8134. Se você estiver de acordo em participar, posso garantir que as informações fornecidas serão confidenciais (ou material coletado) e só serão utilizados neste trabalho.

Assinaturas:

Pesquisador principal \_\_\_\_\_

Pesquisador responsável \_\_\_\_\_

Eu, \_\_\_\_\_, fui esclarecido sobre a pesquisa Avaliação da interferência analítica de fármacos na determinação de proteínas e cetonas no exame químico de urina – estudos *in vitro* e *in vivo* e concordo que meus dados sejam utilizados na realização da mesma.

Assinatura: \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_ e-mail: \_\_\_\_\_

Florianópolis, SC, \_\_\_\_ de \_\_\_\_ de \_\_\_\_.

**APÊNDICE B** – Modelo de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para os pacientes usuários de captopril do estudo *in vivo*

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Meu nome é Adriana Scotti da Silva e estou desenvolvendo a pesquisa “Avaliação da interferência analítica de fármacos na determinação de proteínas e cetonas no exame químico de urina – estudos *in vitro* e *in vivo*”, com o objetivo de avaliar possíveis interferências do captopril no exame de urina. Este estudo é necessário porque este fármaco é eliminado através da urina e em um estudo anterior percebemos que ele pode causar falsos resultados na determinação de cetonas na urina. Estes falsos resultados podem levar o médico a conclusões equivocadas sobre o estado do paciente e mesmo a solicitação de outros exames, sem necessidade, aumentando os gastos do sistema de saúde. A sua participação será fornecer três amostras de urina em dias diferentes durante o tratamento. Você também será solicitado a dar algumas informações, como a dose do seu medicamento e a quantidade aproximadamente de água que você ingeriu no dia anterior. Nenhum dado pessoal seu será divulgado. A coleta de urina será feita no laboratório do HU. Pela sua participação você não terá nenhuma despesa nem risco e você estará contribuindo para a garantia da qualidade de exames laboratoriais. Se você tiver alguma dúvida em relação ao estudo ou não quiser mais fazer parte do mesmo, pode entrar em contato pelo telefone (48) 3721.8134.

Assinaturas:

Pesquisador principal \_\_\_\_\_

Pesquisador responsável \_\_\_\_\_

Eu, \_\_\_\_\_, fui esclarecido sobre a pesquisa Avaliação da interferência analítica de fármacos na determinação de proteínas e cetonas no exame químico de urina – estudos *in vitro* e *in vivo* e concordo que meus dados sejam utilizados na realização da mesma.

Assinatura: \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_ e-mail: \_\_\_\_\_

Florianópolis, SC, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

**APÊNDICE C-** Modelo de questionário para pacientes em uso de captopril

**QUESTIONÁRIO PARA PACIENTES QUE PARTICIPAM DO PROJETO:**

**Avaliação da interferência analítica de fármacos na determinação de proteínas e cetonas no exame químico de urina – estudos *in vitro* e *in vivo***

Nome:

Data:

Telefone:

Número do prontuário:

Idade:

Amostra: ( )1 ( )2 ( )3

Sexo:

Horário da coleta:

Requisição:

**CAPTOPRIL**

- 1) Há quanto tempo faz uso deste medicamento?\*
- 2) Qual o número de comprimidos que utiliza por dia?
- 3) Qual a dose unitária? (mg)\*
- 4) Que horas tomou o medicamento pela última vez?  
Número de horas decorrido entre tomada e coleta:
- 5) Há quantas horas está em jejum?
- 6) Quantos copos de água tomou no dia?
- 7) Está usando (ou usou nos últimos 3 dias) algum outro medicamento? Quais?

Nome comercial	Nome genérico	Dose

- 8) Quando urinou pela última vez?
- 9) Ingeriu algum tipo de bebida alcoólica (em qualquer quantidade) no dia anterior?
- 10) Está usando algum produto fitoterápico?

## APÊNDICE D - Espectroscopia no infra-vermelho do tetrafluorborato de 2-cloro-1-metilquinolina (CMQT) e 2-cloroquinolina

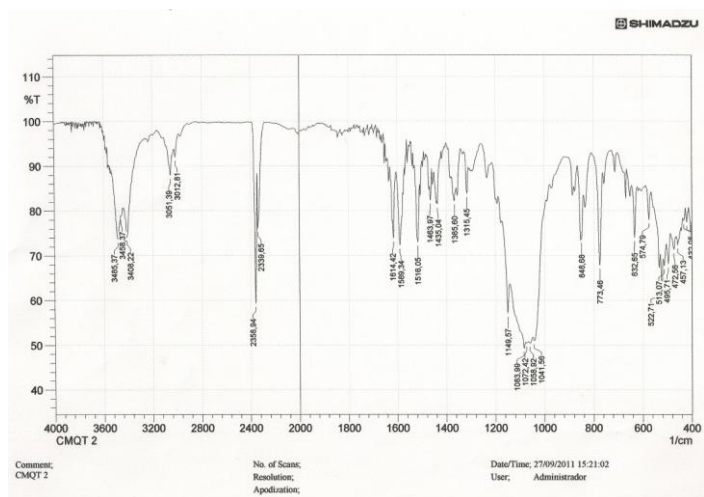


Figura 1. Espectroscopia no infra-vermelho do tetrafluorborato de 2-cloro-1-metilquinolina (CMQT)

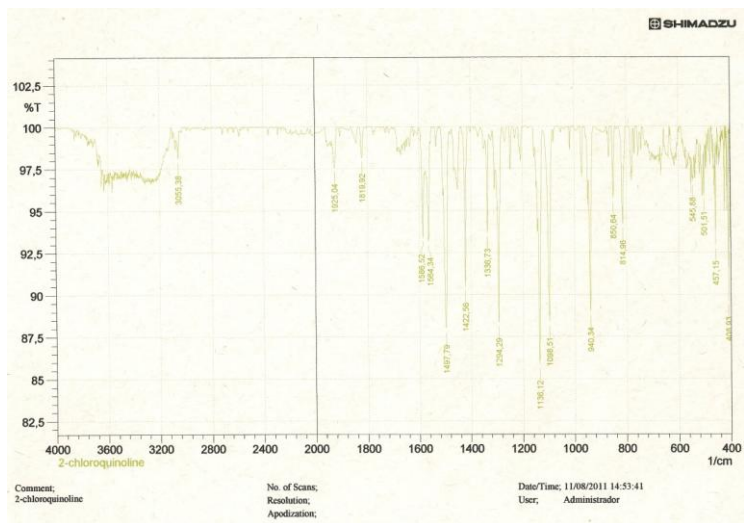


Figura 2. Espectroscopia no infra-vermelho da 2-cloroquinolina

**APÊNDICE E – Modelo de Termo de Consentimento Livre e  
Esclarecido para os pacientes usuários de ciprofloxacino do estudo *in vivo***

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Meu nome é Adriana Scotti da Silva e estou desenvolvendo a pesquisa “Avaliação da interferência analítica de fármacos na determinação de proteínas e cetonas no exame químico de urina – estudos *in vitro* e *in vivo*”, com o objetivo de avaliar possíveis interferências do ciprofloxacino no exame de urina. Este estudo é necessário porque este fármaco é eliminado através da urina e em um estudo anterior percebemos que ele pode causar falsos resultados na determinação de proteínas na urina. Estes falsos resultados podem levar o médico a conclusões equivocadas sobre o estado do paciente e mesmo a solicitação de outros exames, sem necessidade, aumentando os gastos do sistema de saúde. A sua participação será fornecer uma amostra de urina durante o tratamento com ciprofloxacino e outra amostra de urina após o tratamento. Você também será solicitado a dar algumas informações, como a dose do seu medicamento e a quantidade aproximadamente de água que você ingeriu no dia anterior. Nenhum dado pessoal seu será divulgado. A coleta de urina será feita no laboratório do HU. Pela sua participação você não terá nenhuma despesa nem risco e você estará contribuindo para a garantia da qualidade de exames laboratoriais. Se você tiver alguma dúvida em relação ao estudo ou não quiser mais fazer parte do mesmo, pode entrar em contato pelo telefone (48) 3721.8134.

Assinaturas:

Pesquisador principal \_\_\_\_\_

Pesquisador responsável \_\_\_\_\_

Eu, \_\_\_\_\_, fui esclarecido sobre a pesquisa Avaliação da interferência analítica de fármacos na determinação de proteínas e cetonas no exame químico de urina – estudos *in vitro* e *in vivo* e concordo que meus dados sejam utilizados na realização da mesma.

Assinatura: \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_ e-mail: \_\_\_\_\_

Florianópolis, SC, \_\_\_\_ de \_\_\_\_ de \_\_\_\_.

**APÊNDICE F-** Modelo de questionário para pacientes em uso de ciprofloxacino

**QUESTIONÁRIO PARA PACIENTES QUE PARTICIPAM DO PROJETO:**

**Avaliação da interferência analítica de fármacos na determinação de proteínas e cetonas no exame químico de urina – estudos *in vitro* e *in vivo***

Nome:

Data:

Telefone:

Número do prontuário:

Idade:

Amostra: ( ) 1 ( ) 2

Sexo:

Hora da coleta:

**CIPROFLOXACINO**

- 1) Há quanto tempo faz uso deste medicamento?\*
- 2) Qual o número de comprimidos que utiliza por dia?\*
- 3) Qual a dose unitária? (mg)\*
- 4) Que horas tomou o medicamento pela última vez?  
Número de horas decorrido entre tomada e coleta: .....h
- 5) Há quantas horas está em jejum?
- 6) Quantos copos de água tomou no dia anterior? (Ingesta hídrica)
- 7) Está usando (ou usou nos últimos e dias) algum outro medicamento?

Quais?

Nome comercial	Nome genérico	Dose

- 8) Quando urinou pela última vez?
- 9) Ingeriu qualquer tipo de bebida alcoólica no dia anterior? Em qualquer quantidade?
- 10) Está usando algum produto fitoterápico?

\* CASO O PACIENTE NÃO SE LEMBRE DE ALGUM DADO SOBRE OS MEDICAMENTOS: ( ) Autorizo a consulta ao meu médico ou ao meu prontuário para confirmar informações sobre o(s) medicamento(s) que estou utilizando.

---

Assinatura



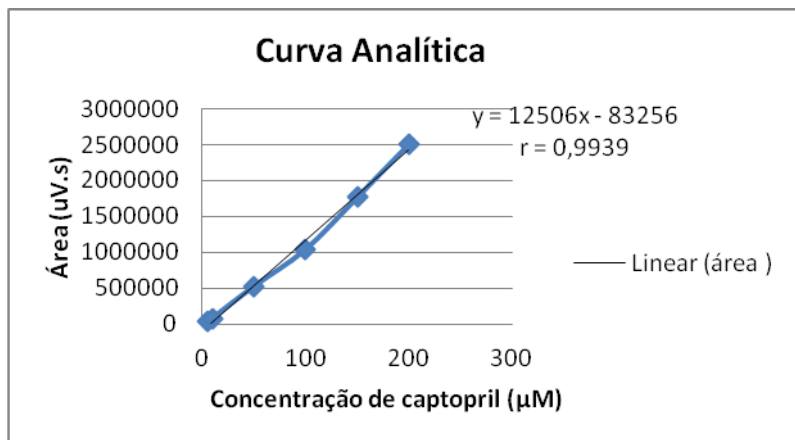
## APÊNDICE G- Validação da metodologia de quantificação do captopril por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

### Validação da metodologia de quantificação do captopril por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

#### *Linearidade*

A linearidade corresponde à capacidade do método cromatográfico de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma faixa de aplicação. A relação matemática entre o sinal obtido e a concentração da espécie a ser quantificada pode ser expressa como uma equação de reta chamada curva de calibração (RIBANI et al., 2004).

A curva de calibração obtida (Figura 1) relaciona a área do pico *versus* concentração de captopril. Obteve-se coeficiente de correlação linear ( $r$ ) igual a 0,9939 (Tabela 1), estando de acordo com a especificação da ANVISA (2003) que exige para este parâmetro valor  $\geq 0,98$ .



**Figura 1.** Curva analítica média de determinação de captopril na urina por CLAE.

**Tabela 1.** Dados de linearidade obtidos para validação da quantificação de captopril pelo método adaptado de CLAE.

	<b>Intervalo de linearidade (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Equação de reta</b>	<b>Coefficiente de correlação (r)</b>
<b>Captopril</b>	5-200	$y = 12506x - 83256$	0,9939

### *Precisão*

A repetibilidade foi representada por desvios padrões relativos inferiores ao valor máximo estabelecido pela ANVISA (2003), de no máximo 15% para métodos bioanalíticos (Tabela 2).

**Tabela 2.** Dados de precisão: repetibilidade obtida para a metodologia adaptada de quantificação de captopril por CLAE

	<b>Repetibilidade</b>	
	<b>Concentração (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>DPR (%)</b>
<b>Captopril</b>	50	8,99
	100	3,88
	150	1,02

DPR= Desvio Padrão Relativo

### *Exatidão*

A exatidão de um método analítico corresponde à proximidade entre os resultados obtidos por um determinado método e o valor verdadeiro. A exatidão pode ser avaliada por amostras, às quais são adicionadas quantidades conhecidas do analito, sendo expressa como porcentagem de recuperação (ICH, 2005; ANVISA, 2003). Utilizando a metodologia adotada, a exatidão foi de 94,99% (Tabela 3), estando de acordo com os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos, que geralmente estão entre 70 e 120% com precisão de até  $\pm 20\%$  (RIBANI et al., 2004).

**Tabela 3.** Taxa percentual de recuperação para as concentrações testadas de captopril com a metodologia adaptada.

Concentração de captopril ( $\mu\text{M}$ )	Concentração teórica	% recuperação
50	48,39 $\pm$ 3,75	96,79
100	89,61 $\pm$ 3,22	89,61
150	147,86 $\pm$ 1,44	98,57
	<b>Média</b>	94,99

#### *Limite de detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)*

Os limites de detecção e quantificação foram determinados a partir da elaboração de três curvas de calibração, sendo calculados conforme descrito no item 3.2.1.1.3. Os resultados são apresentados na tabela 4; os limites de detecção e quantificação foram de 1,40 e 4,25  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Esses valores foram convertidos para mg/dL, para facilitar a discussão dos resultados, correspondendo então os limites de detecção e quantificação a 0,03 e 0,09 mg/dL, respectivamente.

**Tabela 4.** Intercepto e inclinação da curva das três curvas de calibração elaboradas.

	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média	DP
<b>Intercepto</b>	84998	88720	76050	83256	5317,151
<b>Inclinação da curva</b>	12529	12796	12194	12506,33	246,2875

**APÊNDICE H** - Variáveis observadas nas amostras dos pacientes que apresentaram ao menos uma falsa reação positiva no parâmetro cetona (não estatisticamente significativa)

**Tabela 1.** Variáveis observadas nas três coletas de urina realizadas no paciente C6.

<b>Amostras:</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
Intervalo entre micções (h)	4:45	1:00	1:00
Tempo de jejum (h)	5:15	3:30	3:30
Ingesta hídrica diária (copos de água)	3	2	2
Intervalo entre a ingestão do captopril e coleta da urina	10:15	8:00	1:00

**Tabela 2.** Variáveis observadas nas três coletas de urina realizadas no paciente C7.

<b>Amostras:</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
Intervalo entre micções (h)	4:00	2:30	2:10
Tempo de jejum (h)	1:00	0:30	1:00
Ingesta hídrica diária (copos de água)	4	3	5
Intervalo entre a ingestão do captopril e coleta da urina	1:00	1:00	1:40

**Tabela 3.** Variáveis observadas nas três coletas de urina realizadas no paciente C8.

<b>Amostras:</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
Intervalo entre micções (h)	5:50	1:00	3:30
Tempo de jejum (h)	5:50	4:00	3:30
Ingesta hídrica diária (copos de água)	nenhum	3	3
Intervalo entre a ingestão do captopril e coleta da urina	9:50	4:00	8:30

**Tabela 4.** Variáveis observadas nas três coletas de urina realizadas no paciente C9.

<b>Amostras:</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
Intervalo entre micções (h)	6:00	4:30	2:30
Tempo de jejum (h)	1:00	4:30	2:30
Ingesta hídrica diária (copos de água)	4	2	2
Intervalo entre a ingestão do captopril e coleta da urina	2:00	8:00	5:45