

# Determinação sérica de paracetamol por espectrofotometria e cromatografia líquida de alta eficiência

**Lívia Apolônio de Freitas Guimarães**

Farmacêutica graduada pelo Curso de Farmácia da Universidade Federal do Ceará;

E-mail: liviaafg@hotmail.com

**Janete Eliza de Sá Soares**

Professora doutora da Disciplina de Toxicologia de Alimentos, Departamento de Farmácia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará;

E-mail: janete@ufc.br

**Teresa Maria de Jesus Ponte Carvalho**

Professora doutora da Disciplina de Análises Toxicológicas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará.

E-mail: [tmonte@gmail.com](mailto:tmonte@gmail.com)

Correspondência: Teresa Maria de Jesus Ponte Carvalho (tmonte@gmail.com), Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Ceará, Rua Capitão Francisco Pedro, 1210 – Porangabussu, CEP 60.430-372, Fortaleza-Ceará, Fones: 085- 3366-8227/ 085- 9940-7083; Fax: 085- 3366-8292.

**RESUMO**

Os analgésicos representam agentes importantes como provocadores de intoxicações. Dentre estes está o paracetamol (acetaminofem), que é de uso frequente e de venda livre. A intoxicação aguda provocada por este agente leva à formação de um metabólito tóxico que pode provocar insuficiência hepática, além de danos ao sistema de coagulação e nefrotoxicidade. Logo, a determinação quantitativa de paracetamol, agregada aos sintomas clínicos essenciais irão contribuir para a condução do caso, confirmando o diagnóstico de intoxicação, mas também avaliando o risco de hepatotoxicidade. O presente trabalho teve como objetivo a padronização e validação de métodos analíticos para a quantificação sérica de paracetamol por Espectrofotometria e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE estabelecendo-se os parâmetros de linearidade, limite de quantificação, curva de calibração, precisão e exatidão. O estudo realizado é do tipo analítico, quantitativo. Foi realizado no Laboratório de Toxicologia da Universidade Federal do Ceará. O princípio do método espectrofotométrico consiste, inicialmente, na desproteinização do plasma com o ácido tricloroacético e em seguida, o desproteinizado, é tratado com nitrito de sódio com formação do 2,4-nitro-4-acetaminofenol, que assume coloração amarela em meio alcalino, o qual é lido em 430 nm. O método por CLAE se baseia na separação por fase reversa, em modo isocrático utilizando-se uma mistura de Tampão fosfato/Metanol/Acetonitrila e detector UV, em 240 nm. O método espectrofotométrico se mostrou linear nas concentrações plasmáticas de 20 a 300 µg/mL, com limite de quantificação de 20 µg/mL, enquanto o método por CLAE foi linear de 5 a 200 µg/mL com limite de quantificação de 5 µg/mL, mostrando-se preciso e exato e apresentando boa recuperação para os dois métodos. Conclui-se que os métodos desenvolvidos demonstraram possuir todos os parâmetros necessários para ser utilizado na quantificação de paracetamol em amostras de plasma ou soro humano para análise de emergência.

---

GUIMARÃES, Livia Apolônio de Freitas; SOARES, Janete Eliza de Sá; CARVALHO, Teresa Maria de Jesus Ponte. Determinação sérica de paracetamol por espectrofotometria e cromatografia líquida de alta eficiência. Revista Intertox-EcoAdvisor de Toxicologia Risco Ambiental e Sociedade, v. 8, n. 2, p. 08-25, jun. 2015.

*Palavras-chave: Paracetamol, toxicologia analítica, validação, hepatotoxicidade.*

## **ABSTRACT**

Analgesics represent important agents as intoxication provocateurs. Among them, there is paracetamol (acetaminophen), which is normally used and it is an over-the-counter (OTC) medication. The acute intoxication provoked by this agent, caused by the formation of a toxic metabolite, can lead to liver insufficiency, besides the damages on the coagulation system and kidney toxicity. Therefore, the quantitative determination of paracetamol, added to the essential clinic symptoms, will contribute to the conduction of the case, confirming the diagnosis of intoxication, but also evaluating the risk of liver toxicity. Given the above, the present work had the object of standardization and validation of analytic methods for the serum quantification of paracetamol by Spectrophotometry and High Performance Liquid Chromatography (HPLC), establishing the parameters of linearity, limit of quantification, calibration curve, accuracy, and precision. The present study is analytical, quantitative and it was made in the Toxicology Laboratory at the Federal University of Ceará. The principle of the method spectrophotometric consists, initially, in the deproteinization of the plasma with trichloroacetic acid. After, the deproteinized is treated with sodium nitrite, forming 2,4-nitro-4-acetaminophenol, which presents a yellow colour in a alkaline medium, that is read in 430 nm. The HPLC method is based on separation using reverse phase in isocratic mode using a mixture of phosphate buffer/methanol/acetonitrile and UV detector a 240 nm. The spectrophotometric method is linear of 20 to 300 µg/mL with a limit of quantification of 20 µg/mL, and the HPLC method of 5 to 200 µg/mL with a limit of quantification of 5 µg/mL proving itself to be precise and exact and presenting good recovery. It is concluded that the methods developed has all

---

GUIMARÃES, Livia Apolônio de Freitas; SOARES, Janete Eliza de Sá; CARVALHO, Teresa Maria de Jesus Ponte. Determinação sérica de paracetamol por espectrofotometria e cromatografia líquida de alta eficiência. Revista Intertox-EcoAdvisor de Toxicologia Risco Ambiental e Sociedade, v. 8, n. 2, p. 08-25, jun. 2015.

the parameters required for it to be used in the quantification of paracetamol in plasma or human serum samples to emergency analysis.

*Key-words: paracetamol, analytical toxicology, validation, hepatotoxicity.*

## INTRODUÇÃO

O paracetamol (acetaminofem) apresenta ação antipirética alta, analgésica média e anti-inflamatória baixa (TAGLIATI, 2008; SEBBEN *et al.*, 2010). É um dos analgésicos mais populares e seguro quando administrado em condições terapêuticas recomendadas. No entanto, tem sido a principal causa de intoxicação por fármacos entre crianças e adultos, uma vez que pode ser vendido livremente em farmácias, sem a necessidade de apresentação de um receituário médico e também, porque pode ser encontrado em combinação com outros fármacos, geralmente para alívio da congestão nasal, tosse, expectoração e resfriado comum (MUNNE, *et al.*, 2003; LIBERAL, 2008).

Nos Estados Unidos, de todos os casos de insuficiência hepática aguda, 42 % foram atribuídas à overdose de paracetamol, uma vez que mais de 4 g / dia são prescritos a cerca de 6 % dos adultos. Logo, 30.000 pacientes são hospitalizados devido a toxicidade do paracetamol, existindo, portanto, uma recomendação do *Food and Drug Administration* (FDA) de que os médicos evitem prescrever este fármaco com doses maiores que 325 mg por medicamento (BLIEDEN *et al.*, 2014).

No Brasil, entre os anos de 2005 a 2009, foram registrados pelo Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX), 149.384 casos de intoxicações por medicamentos contribuindo com 28% do total de casos de intoxicações. Um estudo epidemiológico das intoxicações por paracetamol em Santa Catarina, entre os anos de 2003 e 2010, verificou-se que houve um aumento de 228 % nos casos de intoxicações

medicamentosas e uma elevação de 47 % no número de casos relacionados à intoxicação por paracetamol (NESSI, 2012).

No Centro de Intoxicação do Rio Grande do Sul (CIT/RS) foram notificados 2.572 casos de exposição ao paracetamol, contabilizando 63 % de todos os casos registrados de intoxicação por analgésico/antipirético. Nesse período, foram registrados no CIT/RS, cinco óbitos por intoxicação medicamentosa e, destes, dois relacionados à intoxicação por paracetamol (CORUJA, 2012).

Em um estudo sobre o perfil das exposições a medicamentos de 777 mulheres em idade reprodutiva atendidas por um Centro de Informações Toxicológicas, foi observado que 33,7 % destas utilizaram de dois a três medicamentos. Dentre estes estão, os medicamentos com atuação no Sistema Nervoso Central (antiepilépticos, antidepressivos, ansiolíticos e antipsicóticos); os analgésicos e antipiréticos e os anti-inflamatórios não-esteroidais. Dentre os princípios ativos mais envolvidos nas exposições/intoxicações estão: clonazepan, amitriptilina, fluoxetina, carbamazepina, diazepam, paracetamol, fenobarbital, dipirona e haloperidol (TAKAHAMA et al., 2014).

O paracetamol atinge picos plasmáticos em 40-60 minutos após a administração, sendo bem absorvido através do trato digestivo. Mais de 90 % da quantidade absorvida sofre biotransformação hepática, por três mecanismos distintos: a conjugação com o ácido glicurônico por meio da ação da glicuroniltransferase (40-60 %); sulfatação, reação mediada pela ação da sulfotransferase (20-46 %) e a via oxidativa, que ocorre em menor grau, normalmente de 5-15%, por ação das enzimas do citocromo P<sub>450</sub> (CYP2E1). A conjugação e a sulfatação normalmente produzem metabólitos não-tóxicos que são eliminados pela urina. Já a oxidação é capaz de gerar um metabólito tóxico (N-acetil-benzo-quinonaimina - NAPQI), que em condições terapêuticas, se conjugam com a glutatona e formam conjugados não

---

GUIMARÃES, Livia Apolônio de Freitas; SOARES, Janete Eliza de Sá; CARVALHO, Teresa Maria de Jesus Ponte. Determinação sérica de paracetamol por espectrofotometria e cromatografia líquida de alta eficiência. Revista Intertox-EcoAdvisor de Toxicologia Risco Ambiental e Sociedade, v. 8, n. 2, p. 08-25, jun. 2015.

tóxicos. Entretanto, em situações de depleção da glutathione tais como, na sobredosagem de paracetamol, ingestão crônica de álcool e malnutrição, ocorrerá um acúmulo de NAPQI, que irá se ligar covalentemente a moléculas do hepatócito e gerar lesão (MUNNE, *et al.*, 2003; LANCASTER *et al.*, 2015).

Numa ingestão aguda por paracetamol (primeiras 24 horas), o paciente se encontrará assintomático ou com sintomas leves, como náuseas, vômitos, mal-estar e epigastria e os exames laboratoriais de função hepática estarão dentro dos níveis de normalidade. No segundo estágio (24 e 72 horas), observa-se que o tempo de protrombina e as provas de função hepática apresentam alterações com aumento das enzimas hepáticas, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) (MUNNE, *et al.*, 2003). No terceiro estágio o paciente pode apresentar hepatomegalia, icterícia, confusão mental, encefalopatia hepática, acidose metabólica, síndrome hepato-renal, sendo possível detectar nos exames laboratoriais a bilirrubinemia, hipoglicemia, valores de AST e ALT, 400 vezes acima do valor normal, elevação da fosfatase alcalina e prolongamento no tempo de protrombina (MUNNE, *et al.*, 2003; ROLDÁN; LÓPEZ, 2012).

As concentrações plasmáticas terapêuticas de paracetamol são de 10 a 20 µg/mL em 4 horas. É considerado dano hepático mínimo ou ausente quando se encontra 120 µg/mL em 4 horas ou 30 µg/mL em 12 horas. 300 µg/mL em 4 horas ou 45 µg/mL em 15 horas são concentrações tóxicas/letais (TURINI, *et al.*, 2005). Logo, a análise sérica de paracetamol irá confirmar o diagnóstico de intoxicação e avaliar o risco de hepatotoxicidade por meio da utilização do Nomograma de Rumack-Mathew, que relaciona as concentrações plasmáticas de paracetamol, o tempo transcorrido desde a ingestão desse fármaco e a probabilidade de dano hepático. Quando se conhece o tempo transcorrido após a ingestão, os níveis plasmáticos de paracetamol devem ser determinados quatro horas após o ocorrido. Quando

não se conhece a hora da ingestão do fármaco, deve-se realizar uma determinação plasmática no momento de chegada à unidade de saúde e outra, quatro horas depois (AGENCIA VALENCIANA DE SALUT, 2009). A análise toxicológica realizada antes de 4 horas após a ingestão, só apresenta valor diagnóstico, visto que não houve ainda a absorção completa e após 24 horas de ingestão, o fármaco já começa a ser metabolizado, podendo não ser mais detectado por meios analíticos, comprometendo o resultado do método (MUNNE, *et al.*, 2003).

A N-acetilcisteína (NAC) é o antídoto específico nas intoxicações por paracetamol e é recomendada quando os níveis de paracetamol estão acima da linha de toxicidade no nomograma de Rumack-Matthew ou quando as concentrações séricas desse fármaco não forem disponíveis. A NAC é composta por uma molécula de aminoácido L-cisteína, que é necessária para a produção de glutatona. Logo, ela é precursora da glutatona (GSH), aumentando a síntese de GSH hepática. Outros dois mecanismos pelos quais a NAC exerce sua função é como doadora de grupos sulfidríla (que substitui a glutatona hepática), neutralizando o metabólito tóxico NAPQI e aumentando a via metabólica de conjugação com sulfato, para produzir metabólitos não tóxicos (MUNNE, *et al.*, 2003; ARIPIN; CHOONARA, 2012).

Para a determinação quantitativa de paracetamol em plasma, são utilizados métodos espectrofotométricos, os quais utilizam diversos reagentes, como o fenol, o nitroprussiato de sódio e ferricianeto de potássio, periodato de sódio e xilenol, o ácido bicinconínico e o sulfato cúprico, para a formação de cromóforos (NOVOTNY; ELSER, 1984; AFSHARI; LIU, 2001; CHIOU *et al.*, 2008; ZHAN *et al.*, 2011). E, os métodos cromatográficos, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a um detector UV-visível (GOTELLI *et al.*, 1977; CAMPANERO *et al.*, 1999; ALTUN, 2002; JENSEN *et al.*, 2004; DEVI *et al.*, 2013; HELMY; EL-BEDAIWY,

---

GUIMARÃES, Livia Apolônio de Freitas; SOARES, Janete Eliza de Sá; CARVALHO, Teresa Maria de Jesus Ponte. Determinação sérica de paracetamol por espectrofotometria e cromatografia líquida de alta eficiência. Revista Intertox-EcoAdvisor de Toxicologia Risco Ambiental e Sociedade, v. 8, n. 2, p. 08-25, jun. 2015.

2014) e por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a espectrômetro de massas (CELMA *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2010).

O trabalho teve por objetivo padronizar e validar métodos analíticos para a quantificação sérica de paracetamol por espectrofotometria e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

## MATERIAIS E MÉTODOS

A realização da análise quantitativa de paracetamol em plasma foi realizada por espectrofotometria (SEBBEN *et al.*, 2010) e por CLAE. As análises foram realizadas no Laboratório de Toxicologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Ceará. O método espectrofotométrico se baseia na reação do paracetamol da amostra com nitrito de sódio, formando o 2,4-nitro-4-acetaminofenol, assumindo coloração amarela em meio alcalino (após adição de NaOH), que pode ser quantificada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 430 nm. O método cromatográfico por CLAE se baseia na separação utilizando-se fase reversa, em modo isocrático utilizando-se uma mistura de Tampão fosfato/Metanol/Acetonitrila e detector UV, em comprimento de onda de 240 nm.

### Reagentes e soluções

Para o método espectrofotométrico: hidróxido de sódio e ácido tricloroacético P.A. (VETEC), nitrito de sódio P.A. (DINÂMICA). Soluções: NaOH 8M, Nitrito de Sódio 0,07M e ácido tricloroacético 3%. Para o método cromatográfico: éter metil tert-butílico (VETEC®); Carbonato de Potássio e Fosfato de Potássio Monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (VETEC®); Metanol e Acetonitrila grau HPLC (TEDIA®). A fase móvel utilizada para CLAE foi: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 4,9)/Metanol/Acetonitrila (88/09/03).

---

GUIMARÃES, Livia Apolônio de Freitas; SOARES, Janete Eliza de Sá; CARVALHO, Teresa Maria de Jesus Ponte. Determinação sérica de paracetamol por espectrofotometria e cromatografia líquida de alta eficiência. Revista Intertox-EcoAdvisor de Toxicologia Risco Ambiental e Sociedade, v. 8, n. 2, p. 08-25, jun. 2015.



## Equipamentos

Foram utilizados: balança analítica de precisão RK<sup>®</sup>-200, banho ultrassom QUIMIS<sup>®</sup> modelo Q335D, Sistema MilliQ - ELGA<sup>®</sup>(resistividade 18,2 MΩ.cm), bomba a vácuo GAST<sup>®</sup>, banho-maria Edulab<sup>®</sup>, espectrofotômetro *Thermo scientific*<sup>®</sup> modelo Genesys 10S UV-Vis e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com sistema de bombeamento, detector com arranjo de diodos (PDA) (*Accela Thermo Scientific*<sup>®</sup>) e sistema de aquisição de dados ChromQuest 5.0, coluna analítica ODS HYPERSIL C<sub>18</sub> (150 x 2,1 mm – 5 μm) da *Thermo Scientific*<sup>®</sup>.

## Curva de Calibração

Para a construção das curvas de calibração, foi preparada uma solução-estoque de paracetamol 10 mg/mL e a partir desta as soluções de trabalho. Para o método espectrofotométrico foram feitas as soluções de trabalho nas concentrações de 0,2; 0,5; 1; 1,5; 2 e 3 mg/mL em metanol e em seguida, foi retirado 50 μL destas soluções de trabalho e adicionadas a 500 μL de plasma, obtendo-se concentrações de 20; 50; 100; 150; 200; 300 μg/mL de plasma. Para o método cromatográfico foram feitas as soluções de trabalho nas concentrações de 0,05; 0,2; 0,5; 1; 1,5 e 2 mg/mL em metanol e em seguida, foi retirado 20 μL destas soluções de trabalho e adicionadas a 200 μL de plasma, obtendo-se concentrações de 5; 20; 50; 100; 150; 200 μg/mL de plasma. As curvas foram feitas em triplicata para os dois métodos.

## Procedimento de Análise

Para o método espectrofotométrico a 500 μL de plasma foi adicionado 5 mL de TCA 3 %, que após centrifugação (10 minutos), foram retirados 2 mL do sobrenadante, adicionando-se, 5 mL de nitrito de sódio 0,07 M. Deixou-se em banho-maria por 10 minutos a 37° C e adicionou-se 100 μL de hidróxido

de Sódio 8 M. Após a temperatura ambiente ser atingida, as amostras foram lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 430 nm.

Para o método cromatográfico a 200 µL de plasma foi adicionado 100 µL de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,1 %) e 3 mL de éter metil tert butílico, agitado por 10 minutos e centrifugado por 10 minutos. Foram retirados 2 mL do sobrenadante e evaporado em concentrador rotacional a 50° C por 40 minutos. O resíduo foi ressuspensão em 100 µL de metanol e 10 µL injetado no CLAE, fase móvel utilizada foi: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 4,9)/Metanol/Acetonitrila (88/09/03), coluna analítica ODS HYPERSIL C<sub>18</sub>, em fluxo de 1 mL/min e comprimento de onda de 240 nm.

### **Quantificação do paracetamol**

A média das absorvâncias para o método espectrofotométrico e as áreas para o método por CLAE foi utilizada para o cálculo da concentração de paracetamol nas amostras, com base na equação da reta gerada após a construção das curvas de calibração para cada método utilizando o software Microsoft Office Excel 2010®.

### **Validação**

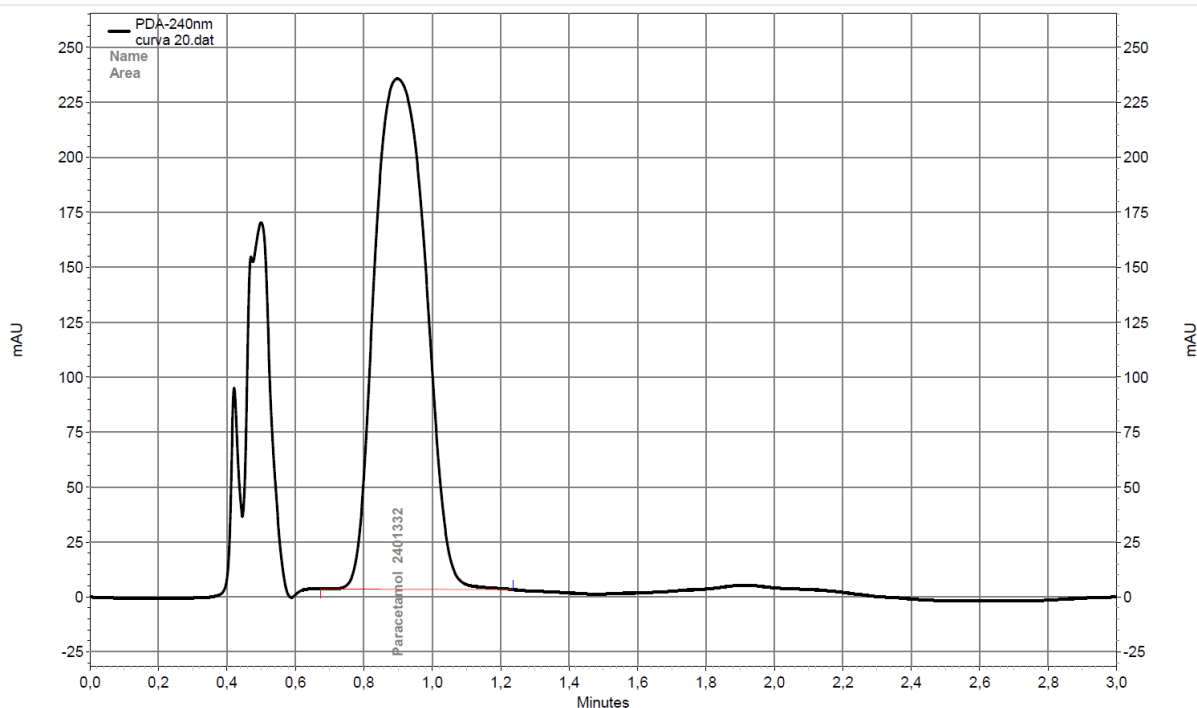
Para garantir que os métodos utilizados sejam apropriados para a finalidade pretendida fornecendo dados confiáveis, eles passaram por processos de validação conduzida com base na RDC n° 27 de 17 de maio de 2012, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2012). Para isso, os seguintes parâmetros foram avaliados: linearidade, precisão, exatidão, limite quantificação e curva de calibração. Para a determinação da linearidade para o método espectrofotométrico foram preparadas soluções padrão em seis concentrações distintas: 20, 50, 100, 150, 200 e 300 µg/mL de plasma e para o método por CLAE foram preparadas soluções de 5; 20; 50; 100; 150; 200 µg/mL de plasma.

O Limite de quantificação avaliou a menor concentração do analito que pôde ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis. Para a GUIMARÃES, Livia Apolônio de Freitas; SOARES, Janete Eliza de Sá; CARVALHO, Teresa Maria de Jesus Ponte. Determinação sérica de paracetamol por espectrofotometria e cromatografia líquida de alta eficiência. Revista Intertox-EcoAdvisor de Toxicologia Risco Ambiental e Sociedade, v. 8, n. 2, p. 08-25, jun. 2015.

determinação da Precisão e Exatidão, foram realizados testes em um mesmo ensaio analítico (intra-ensaio) e em três em ensaios distintos (inter-ensaio). Cada ensaio foi feito em cinco replicatas, contendo as concentrações baixa, média e alta. Para o método espectrofotométrico, foram utilizadas as concentrações de 50, 150 e 250 µg/mL e para o método por CLAE as concentrações de 10, 80 e 150 µg/mL como as concentrações baixa, média e alta, respectivamente. Calculando-se o Coeficiente de Variação (CV %) para o cálculo da precisão e o erro padrão relativo (EPR) para o cálculo da exatidão, não sendo admitidos valores de coeficiente de variação inferiores a 15% (BRASIL, 2012).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo padronizou e validou duas metodologias, uma espectrofotométrica tomando como base um trabalho desenvolvido por Sebben *et al.* (2010), com um tempo total de análise de 30 minutos e um método cromatográfico por CLAE com um tempo total de análise foi em torno de 60 minutos, cujo tempo de retenção para o paracetamol foi 0,9 minutos (Figura 1), sem nenhuma interferência de picos de substâncias endógenas do plasma, sugerindo seletividade excelente.



**Figura 1.** Cromatograma do Paracetamol por CLAE. Fase Móvel:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 4,9)/Metanol/Acetonitrila (88/09/03), coluna  $\text{C}_{18}$ , fluxo 1 mL/min e 240 nm

### Curva de Calibração

Pelo método espectrofotométrico, a média das curvas de calibração, utilizando as concentrações de 20, 50, 100, 150, 200 e 300  $\mu\text{g/mL}$  de plasma, apresentou coeficiente de correlação ( $R^2$ ) igual a 0,9965, coeficiente linear igual a 0,0103 e coeficiente angular igual a 0,0007.

Para o método por CLAE, a média das curvas de calibração, utilizando as concentrações de 5, 10, 20, 50, 100, 150 e 200  $\mu\text{g/mL}$  de plasma, apresentou coeficiente de correlação ( $R^2$ ) igual a 0,9918, coeficiente linear igual a 471960 e coeficiente angular igual a 112716, cuja recuperação foi em média de 95 %, realizada comparando-se a área do extraído com a área do adicionado.

Os resultados obtidos demonstraram que há linearidade nos dois casos.

## Validação

### *Limite de quantificação*

Para o método espectrofotométrico, ficou estabelecido 20 µg/mL como o valor de Limite de Quantificação para o paracetamol, com valores de precisão e exatidão de 2,96 e 19,8 %, respectivamente.

Por CLAE, o Limite de Quantificação foi de 5 µg/mL com valores de precisão e exatidão de 2,95 e 10,98 %, respectivamente. Os métodos mostraram que o paracetamol pode ser quantificado adequadamente, de forma exata e precisa, uma vez que a ANVISA preconiza os valores de precisão e exatidão para o limite deve ser de até 20 %.

### *Exatidão e Precisão*

Os resultados de precisão e exatidão nos dois métodos estão apresentados na Tabela 1 e foram realizados de acordo com a metodologia pré-determinadas e com base na RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 da ANVISA.

Os métodos analisados para a determinação quantitativa de paracetamol apresentaram precisão e exatidão comprovadas e os resultados obtidos se encontraram dentro do intervalo de referência ( $\pm 15$  %) e os coeficientes de correlação obtidos nos dois métodos foram bem próximos da unidade, logo, as absorvâncias e áreas geradas foram diretamente proporcionais à concentração de paracetamol na matriz.

**Tabela 1-** Análise de precisão e exatidão intra-ensaio e inter-ensaio do método quantitativo de paracetamol por espectrofotometria e por CLAE.

Concentração ug/mL	Intra-ensaio (n=5)		Inter-ensaio (n=15)	
	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR%)	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR%)
<b>Método Espectrofotométrico</b>				
50	9,72	14,60	10,90	14,85
150	1,64	-4,10	6,24	-2,24
250	1,55	-3,56	4,80	1,96
<b>Método Cromatográfico (CLAE)</b>				
10	6,10	-10,88	7,96	-9,46
80	7,84	8,20	7,36	10,66
150	2,89	0,13	4,72	-2,43

Deve-se ressaltar também que os níveis terapêuticos desse fármaco se encontram na faixa de 10 – 30 µg/mL, e os níveis tóxicos acima de 200 µg/mL e os valores de concentrações plasmáticas de paracetamol vão de 5 a 200 µg/mL para a avaliação de hepatotoxicidade, utilizando-se o Nomograma de Rumack-Matthew, o qual leva em conta o tempo transcorrido em vinte e quatro horas desde a ingestão do fármaco, logo o método por CLAE apresentou uma sensibilidade mais adequada para a avaliação do dano hepático, através do Nomograma de Rumack-Matthew, extremamente importante no direcionamento do tratamento do paciente, apesar de levar a um maior tempo de análise, principalmente no que diz respeito ao tratamento da amostra.

## CONCLUSÃO

O exame fundamental para confirmar o diagnóstico e avaliar o risco de hepatotoxicidade é a análise sérica de paracetamol. Logo, a padronização e a

validação das metodologias analíticas demonstraram-se apropriadas para as finalidades pretendidas.

A espectrofotometria é uma metodologia simples, que envolve poucas etapas de preparação de amostras e reagentes, minimizando os problemas com interferentes e possíveis perdas do analito em estudo, pouco dispendiosa e de rápida execução, no entanto, possui sensibilidade limitada quando comparado ao método por CLAE, o qual é mais adequado, principalmente quando se quer avaliar o dano hepático, através do Nomograma, visto que é de extrema importância no direcionamento do tratamento do paciente.

Agradecimentos a FUNCAP – Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

## REFERÊNCIAS

AFSHARI, J.T.; LIU, T. Rapid spectrophotometric method for the quantitation of acetaminophen in serum. *Anal. Chem. Acta*, v. 443, n. 1, p. 165-169, 2001.

AGENCIA VALENCIANA DE SALUT (Espanha). Hospital General Universitario de Alicante. Intoxicación por paracetamol. 2009. Disponível em: <<http://www.dep19.san.gva.es/servicios/urgencias/files/paracetamol.pdf>>. Acesso em: 04 ago. 2014.

ALTUN, N. HPLC method for the analysis of paracetamol, caffeine and dipyrone. *Turk. J. Chem.*, v. 26, p. 521-528, 2002.

ARIPIN, K.N.B.N.; CHOONARA, I. The management of paracetamol poisoning. *J. Paediatr. Child Health* v. 19, n. 11, p. 492-497, 2009.

BLIEDEN M. et al. A perspective on the epidemiology of acetaminophen exposure and toxicity in the United States. **Expert Rev Clin Pharmacol** v. 7, p.341–348, 2014.

---

GUIMARÃES, Livia Apolônio de Freitas; SOARES, Janete Eliza de Sá; CARVALHO, Teresa Maria de Jesus Ponte. Determinação sérica de paracetamol por espectrofotometria e cromatografia líquida de alta eficiência. *Revista Intertox-EcoAdvisor de Toxicologia Risco Ambiental e Sociedade*, v. 8, n. 2, p. 08-25, jun. 2015.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 27/2012, de 17 de maio de 2012 – **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 mai. 2012.

CAMPANERO, M. A. *et al.* Rapid liquid chromatography assay for the determination of acetaminophen in plasma after propacetamol administration: application to pharmacokinetic studies. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 20, n.1-2, p. 327-334, 1999.

CELMA, C. *et al.* Simultaneous determination of paracetamol and chlorpheniramine in human plasma by liquid chromatography - tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 870, n.1-2, p. 77 – 86, 2000.

CHIOU, J. *et al.* Novel spectrophotometric method for RAPID quantifying acetaminophen concentration in emergent situation. **J. Food Drug Anal.**, v.16, n.2, p. 36-40, 2008.

CORUJA, C.I.K. **Intoxicação por paracetamol no Rio Grande do Sul**. 2012. 40 p. Monografia (Especialização em Saúde Pública) – Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

DEVI, T.A. P. *et al.* Method development and validation of paracetamol drug by RP-HPLC. **J. Med. Allied Sci.**, v. 3, n. 1, p. 8-14, 2013.

GOTELLI, G.R.; KABRA, P.M.; MARTON, L.J. Determination of acetaminophen and phenacetin in plasma by high-pressure liquid chromatography. **Clin. Chem.**, v. 23, n.6, p.957-959, 1977.

HELMY, S.; EL-BEDAIWY, H. Simultaneous determination of paracetamol and methocarbamol in human plasma By HPLC using UV detection with time programming: application to pharmacokinetic study. **Drug Res.** v. 64, n. 7, p. 363-367, 2014.

JENSEN, L.S. *et al.* The quantification of paracetamol, paracetamol glucuronide and paracetamol sulphate in plasma and urine using a single high-performance liquid chromatography assay. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 34, n. 3, p. 585-593, 2004.

LANCASTER, E.M.; HIATT, J.R.; ZARRINPAR, A. Acetaminophen hepatotoxicity: an updated review, **Arch Toxicol.** v. 89, P.193–199, 2015.

---

GUIMARÃES, Livia Apolônio de Freitas; SOARES, Janete Eliza de Sá; CARVALHO, Teresa Maria de Jesus Ponte. Determinação sérica de paracetamol por espectrofotometria e cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Intertox-EcoAdvisor de Toxicologia Risco Ambiental e Sociedade**, v. 8, n. 2, p. 08-25, jun. 2015.



LI, H. et al. Simultaneous quantitation of paracetamol, caffeine, pseudoephedrine, chlorpheniramine and cloperastine in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 51, n. 3, p. 716-722, 2010.

LIBERAL, J.P.M. Desenvolvimento e caracterização de comprimidos matriciais de dupla camada contendo paracetamol. 2008. Dissertação (Mestrado em Controle de Qualidade) - Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, 2008.

LOPES, J.; MATHEUS, M. E. Risco de hepatotoxicidade do paracetamol (Acetaminophen). *Rev. Bras. Farm.*, Rio de Janeiro, v. 93, n. 4, p. 411-414, 2012.

MOREAU, R.L. M.; SIQUEIRA, M.E.P.B. Ciências Farmacêuticas: Toxicologia Analítica. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 334 p.

MUNNE, P. et al. Intoxicaciones medicamentosas (II): Analgésicos y anticonvulsivantes. *Anales Sis San Navarra*, v. 26, n.1, p. 65-97, 2003.

NESSI, R.S. **Estudo clínico-epidemiológico das intoxicações por paracetamol registradas no centro de informações toxicológicas de Santa Catarina no período de janeiro de 2003 a dezembro de 2010.** 2012. 29 p. Monografia (Graduação em Medicina) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

NOVOTNY, P.E.; ELSER, R.C. Indophenol Method for Acetaminophen in Serum Examined. *Clin. Chem.*, v. 30, n. 6, p. 884-886, 1984.

ROLDÁN, T.; LÓPEZ, A. Intoxicación por acetaminofén en pediatría aprocimación y manejo. *Univ. Méd. Bogotá (Colombia)*, v. 53, n. 1, p. 56-57, 2012.

SEBBEN, V.C. et al. Validação de metodologia analítica e estudo de estabilidade para quantificação sérica do Paracetamol. *Rev. Bras. Patol. Med. Lab.*, Rio de Janeiro, v. 46, n. 2, p. 143-148, 2010.

TAGLIATI, C.A. Antiinflamatórios. In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. Fundamentos de toxicologia. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 535-552.

---

GUIMARÃES, Livia Apolônio de Freitas; SOARES, Janete Eliza de Sá; CARVALHO, Teresa Maria de Jesus Ponte. Determinação sérica de paracetamol por espectrofotometria e cromatografia líquida de alta eficiência. *Revista Intertox-EcoAdvisor de Toxicologia Risco Ambiental e Sociedade*, v. 8, n. 2, p. 08-25, jun. 2015.

TURINI, C.A. et al. Atendimento inicial ao paciente intoxicado. 2005. Disponível em: <http://ltc.nutes.ufrj.br/toxicologia/mlv.dim.htm>. Acesso em: 17 set. 2014.

ZHAN, Y. et al. Selective spectrophotometric determination of paracetamol with sodium nitroprusside in pharmaceutical and biological samples. *J. Anal. Chem.*, v. 66, n. 2, p. 215-220, 2011.

ZHANG, Y. et al. A tandem mass spectrometry assay for the simultaneous determination of acetaminophen, caffeine, phenytoin, ranitidine, and theophylline in small volume pediatric plasma specimens. *Clin. Chim. Acta*, v. 398, n. 1-2, p. 105–112, 2008.

TAKAHAMA, C.H.; TURINI, C.A.; GIROTTO, E. Perfil das exposições a medicamentos por mulheres em idade reprodutiva atendidas por um Centro de Informações Toxicológicas *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 19, n. 4, p. 1191-1199, 2014.