

Uso de diferentes matrizes na construção da curva padrão para a dosagem de paracetamol por espectrofotometria visível

Use of different matrices to construct the standard curve for the paracetamol dosage by visible spectrophotometry

Caroline M. Barros; Andresa P. Silva; Juliana O. S. S. Mizael; Yoko Oshima-Franco

Universidade de Sorocaba, Sorocaba, São Paulo, Brasil.

RESUMO

Introdução: A intoxicação aguda pelo paracetamol é confirmada pela determinação de seu nível sérico e permite avaliar o risco de hepatotoxicidade, que pode ser monitorado pelo nomograma Rumack-Matthew para a administração do antídoto N-acetilcisteína, bem como para o prognóstico da intoxicação. **Objetivos:** Diante de sua importância analítica, avaliamos a influência de diferentes matrizes (água ultrapura, soro e plasma) na construção da curva de calibração do paracetamol, visando diminuir o custo analítico e facilitar a sua implantação em laboratórios clínicos e de urgência. **Material e métodos:** Obtivemos uma solução estoque padrão de paracetamol de 1 mg mL⁻¹, da qual originaram diluições apropriadas para se obter as concentrações de 20, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 mg L⁻¹ com as diferentes matrizes, em triplicata, com leituras em espectrofotômetro a 430 nm, sendo reproduzidas após três meses. Os resultados foram analisados estatisticamente ($p < 0,05$). **Resultados e discussão:** Nas boas práticas de laboratório, inclui-se o refazimento da curva de calibração quando os reagentes estoques são refeitos visando ao reajuste da equação de reta indicado por um instrumento de medição. As amostras biológicas indicadas como matrizes em uma curva de calibração são, usualmente, soro e plasma. Porém, esses produtos biológicos quando adquiridos comercialmente são de custo elevado. A água ultrapura pode substituir soro e plasma na curva de calibração do paracetamol em função da linearidade da curva, a qual mostrou a mesma linha de tendência para as três matrizes. **Conclusão:** As três matrizes podem ser utilizadas na construção da curva de calibração do paracetamol, mas o uso de água ultrapura diminui os custos da análise.

Unitermos: analgésicos; anti-inflamatórios; antipiréticos; acetaminofeno; espectrofotometria UV-Vis.

ABSTRACT

Introduction: Acute paracetamol poisoning is confirmed by the determination of its serum level and allows assessing the risk of hepatotoxicity, which can be monitored by the Rumack-Matthew nomogram for the administration of the N-Acetylcysteine antidote, as well as for the prognosis of intoxication. **Objective:** Because of its analytical importance, we evaluated the influence of different matrices (ultrapure water, serum, and plasma) on the construction of the paracetamol calibration curve, aiming to reduce the analytical cost and facilitate its implementation in clinical and emergency laboratories. **Material and methods:** A standard stock solution of paracetamol of 1 mg mL⁻¹ was obtained, from which appropriate dilutions originated the following concentrations 20, 50, 100, 150, 200, 250, and 300 mg L⁻¹ in the different matrices, in triplicate, reading at 430 nm in spectrophotometer, and reproduced after three months. The results were statistically analyzed ($p < 0.05$). **Results and discussion:** Good laboratory practices include remaking the calibration curve when stock reagents are remade aiming to readjust the line equation indicated by a measuring instrument. The biological samples indicated as matrices on a calibration curve are usually serum and plasma. However, these biological products, when commercially purchased, are of high cost. Ultrapure water can replace serum and

plasma in the paracetamol calibration curve according to the linearity of the curve, which showed the same trend line for the three matrices. **Conclusion:** The three matrices can be used in the construction of the paracetamol calibration curve, but the use of ultrapure water reduces the analysis costs.

Key words: analgesics drugs; anti-inflammatory drugs; antipyretics; acetaminophen; UV-Vis spectrophotometry.

RESUMEN

Introducción: La intoxicación aguda por paracetamol se confirma mediante la determinación de su nivel sérico y permite evaluar el riesgo de hepatotoxicidad, que puede ser monitorizado mediante el nomograma de Rumack-Matthew para la administración del antídoto N-acetilcisteína, así como para el pronóstico de intoxicación. **Objetivos:** Por su importancia analítica, se evaluó la influencia de diferentes matrizes (agua ultrapura, suero y plasma) en la construcción de la curva de calibración del paracetamol, con el objetivo de reducir el costo analítico y facilitar su implementación en laboratorios clínicos y de emergencia. **Material y métodos:** Se obtuvo una solución madre del estándar (stock) de paracetamol de 1 mg ml⁻¹, de la cual se originaron diluciones adecuadas para obtener las siguientes concentraciones de 20, 50, 100, 150, 200, 250 y 300 mg l⁻¹ con las diferentes matrizes, por triplicado, con lectura a 430 nm en espectrofotómetro, reproduciéndose a los tres meses. Los resultados se analizaron estadísticamente ($p < 0,05$). **Resultados y discusión:** Las buenas prácticas de laboratorio incluyen rebacer la curva de calibración cuando se rebacen los reactivos del estándar con el fin de reajustar la ecuación lineal indicada por un instrumento de medición. Las muestras biológicas indicadas como matrizes en una curva de calibración suelen ser suero y plasma. Sin embargo, estos productos biológicos cuando se compran comercialmente son de alto costo. El agua ultrapura puede reemplazar el suero y el plasma en la curva de calibración de paracetamol de acuerdo con la linealidad de la curva, que mostró la misma línea de tendencia para las tres matrizes. **Conclusión:** Las tres matrizes pueden usarse en la construcción de la curva de calibración de paracetamol, pero el uso de agua ultrapura reduce los costos de análisis.

Palabras clave: analgésicos; antiinflamatorios; antipiréticos; paracetamol; espectrofotometría UV-Vis.

INTRODUÇÃO

Paracetamol ou acetaminofeno é um anti-inflamatório não esteroide (AINE) inibidor da ciclo-oxigenase (COX), não seletivo para COX-1 e COX-2 e seletivo para COX-3; é expresso em maiores quantidades no córtex cerebral e no coração⁽¹⁾. Possui elevada ação antipirética, média ação analgésica e baixa ação anti-inflamatória. É recomendado para substituir o ácido acetilsalicílico (AAS), em casos de viroses; para evitar a síndrome de Reye⁽²⁾ e, em grávidas, para evitar a teratogênese, exceto em casos de alto risco de desenvolvimento de pré-eclâmpsia⁽³⁾.

O paracetamol é amplamente utilizado pela população, porém, devido ao seu efeito de hepatotoxicidade, é um dos analgésicos que mais causa intoxicação, também por ser um medicamento de venda livre, sem controle e fiscalização na sua comercialização⁽⁴⁾. A toxicidade desse medicamento está relacionada com a sua farmacocinética. Sua absorção no trato gastrointestinal é rápida e atinge o pico plasmático após 40-60 minutos (30 minutos em preparações líquidas). Em casos de sobredose, a maior parte é

absorvida em 2 horas, mas o pico plasmático não é atingido antes de 4 horas^(5,6).

A principal via de biotransformação (mais de 90% da quantidade absorvida) é a hepática, que ocorre por meio de três mecanismos metabólicos: conjugação com ácido glicurônico (40% a 67%), sulfatação (20% a 46%, principalmente em crianças) e oxidação (5% a 15%). A oxidação ocorre mesmo em doses terapêuticas por meio de enzimas microsossomais para formar um metabólito reativo denominado N-acetil-p-benzo-quinona-imina (NAPBQI). A conjugação do NAPBQI à molécula antioxidante hidrossolúvel glutatona (GSH), durante a reação de fase II da biotransformação, resulta em sua eliminação, sem qualquer consequência danosa ao organismo. Entretanto, em casos de sobredosagem, grandes quantidades de NAPBQI se ligam covalentemente à GSH, cuja depleção ocasiona a hepatotoxicidade^(5,7).

A análise da concentração sérica de paracetamol confirma o diagnóstico de intoxicação aguda. O resultado não só tem valor de certeza diagnóstica como também avalia o risco

de hepatotoxicidade, indicando o uso do antídoto específico (N-acetilcisteína), que é hidrolisado no organismo em cisteína e reabastece os níveis de glutatona⁽⁸⁾.

O nomograma de Rumack-Matthew (**Figura 1**), utilizado para monitorar a gravidade da intoxicação, tem como objetivo indicar se o antídoto deve ser administrado ao se avaliar a concentração sérica de paracetamol com o intervalo transcorrido desde a ingestão do medicamento até a coleta de sangue⁽⁹⁾. De acordo com o nomograma (Figura 1), os níveis séricos de paracetamol acima das retas desenhadas⁽¹⁰⁾, conhecidas como linhas de provável toxicidade, são preditivos de hepatotoxicidade⁽⁵⁾.

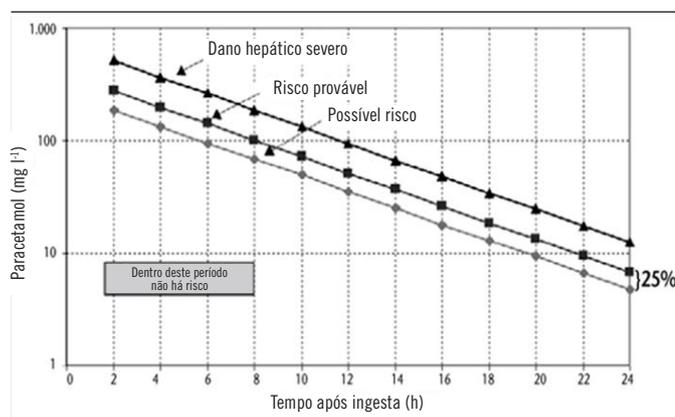


FIGURA 1 – Nomograma de Rumack-Matthew⁽¹¹⁾

Nesse contexto, a quantificação de paracetamol é fundamental, seja em formulações farmacêuticas visando a resultados confiáveis no controle de qualidade na indústria farmacêutica⁽¹¹⁾, seja em amostras biológicas^(5, 12). Os métodos analíticos empregados usualmente são os espectrofotométricos^(13, 14), os espectrofluorimétricos⁽¹⁵⁾, os cromatográficos⁽¹⁶⁻¹⁸⁾ e os voltamétricos^(19, 20). A espectrofotometria visível e ultravioleta é um método analítico eficiente para determinar os compostos orgânicos e inorgânicos, como a identificação de um ativo farmacêutico. Essa técnica se baseia na absorção molecular e identifica grupos funcionais, além de quantificar compostos que contêm grupos absorventes⁽²¹⁾, como no caso do paracetamol.

A obtenção de um resultado confiável, como a concentração sérica de paracetamol, é precedida pela calibração do espectrofotômetro a ser utilizado. A calibração é realizada por meio de um conjunto de padrões que apresentam uma quantidade do analito de interesse, uma etapa analítica conhecida como curva de calibração. Dessa forma, mede-se a resposta do instrumento para cada padrão, estabelecendo-se a relação entre a resposta do instrumento e a concentração do analito⁽²²⁾.

O objetivo deste trabalho foi testar a água ultrapura como matriz na construção da curva de calibração do paracetamol e compará-la com as matrizes soro e plasma⁽⁵⁾, que são amostras biológicas ideais para a quantificação de paracetamol para monitorar a intoxicação aguda, visando à diminuição do custo analítico.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras das matrizes

Plasma, soro e água ultrapura foram utilizados como matrizes na construção da curva de calibração.

Reagentes e equipamentos

Acetaminofeno (99%, código de catálogo A7085) e nitrito de sódio (99%, 563218) foram adquiridos do laboratório Sigma (St. Louis, EUA), enquanto ácido tricloroacético (99%, 01A1066.01.AE) e hidróxido de sódio (98%, 01H2000.01.AG), do laboratório Synth (Diadema, Brasil).

Plasmas e soros foram obtidos de sangue coletado com e sem anticoagulante, respectivamente, de uma jumenta do Hospital Veterinário da Universidade de Sorocaba (Uniso) e as amostras coletadas foram doadas pela Coordenação do Curso de Medicina Veterinária da Uniso para este estudo (Ofício nº 02/2020). As coletas de sangue quando realizadas no animal têm objetivo terapêutico ou profilático e não necessitam de autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

Obtivemos a água ultrapura do sistema de purificação de água Milli Q, Modelo Direct 8 (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, EUA). O equipamento utilizado foi o espectrofotômetro PerkinElmer (Perkin Elmer do Brasil, São Paulo, Brasil), e as leituras (em triplicata) foram realizadas utilizando cubetas de quartzo com 10 mm de caminho óptico.

Solução padrão

Para a solução estoque padrão, pesamos cerca de 10 mg de paracetamol, que foi transferido a um balão volumétrico de 10 ml e solubilizado com água purificada, obtendo-se uma solução estoque padrão de 1 mg l⁻¹. Diluições apropriadas da solução estoque com as diferentes matrizes (água ultrapura, plasma e soro) foram utilizadas para a construção de uma curva de calibração nas seguintes concentrações: 20, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 mg ml⁻¹ (**Tabela 1**).

TABELA 1 – Quantidade da diluição da SP com as diferentes matrizes (água ultrapura, soro e plasma)

[Total] (mg l ⁻¹)	SP (ml)	Matriz (ml)
20	0,1	4,9
50	0,25	4,75
100	0,5	4,5
150	0,75	4,25
200	1	4
250	1,25	3,75
300	1,5	3,5

SP: solução estoque padrão.

Princípio do método

O método baseia-se na reação do acetaminofeno (n-acetil-p-aminofenol), resultante da desproteínização da amostra, com o nitrito de sódio, formando 2,4-nitro-4-acetaminofenol, que assume coloração amarela em meio alcalino⁽⁵⁾.

Procedimento analítico

Em tubos de ensaio cônicos (tipo Falcon) adicionamos 500 µl de amostra (plasma, soro ou água ultrapura), desproteínizada pela adição de 5 ml de ácido tricloroacético 3% (TCA); em seguida, agitamos em *mixer* por 30 segundos. Após a centrifugação por 10 minutos a 3000 rotações por minuto (rpm), 2 ml do sobrenadante foram pipetados para outro tubo de ensaio, no qual adicionamos 0,5 ml de nitrito de sódio 0,07 M, recém-preparado; os tubos foram agitados em *mixer* por 5 segundos. Após 10 minutos de incubação em banho-maria a 37°C ± 1, adicionamos 100 µl de NaOH 8 M para o aparecimento da cor amarela. Após agitação em *mixer* por 30 segundos, as absorbâncias das amostras, em triplicata, foram obtidas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 430 nm. Utilizando o mesmo equipamento, porém, refazendo novas soluções padrões, repetimos a análise após três meses para verificar o impacto do refazimento de reagentes.

Análise dos dados

Por meio das absorbâncias obtidas das triplicatas de sete níveis de concentrações (20, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 mg l⁻¹), foram obtidas as respectivas médias e a equação de regressão linear, utilizando-se o ajuste dos dados pelo método dos mínimos quadrados. A equação da reta é dada por absorbância = a × paracetamol (mg l⁻¹) com coeficiente de correlação de, no mínimo, 0,98⁽²³⁾. Os resultados obtidos das duas curvas de calibrações foram analisados estatisticamente ($p < 0,05$) através do teste *t* de Student e Anova *one-way* (software OriginPro8, OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA).

RESULTADOS

Curvas analíticas das médias obtidas de triplicatas das amostras foram realizadas para cada matriz (Tabela 2). Essa leitura foi replicada em um intervalo de três meses para teste de reprodutibilidade, lidas sucessivamente ao procedimento.

TABELA 2 – Resultados das leituras obtidas das diferentes matrizes

Água ultrapura*				
Concentração total (mg l ⁻¹)	Média absorbância 1	DP	Média absorbância 2	DP
20	0,056	7,22	0,0427	6,93
50	0,0903	8,09	0,0877	5,38
100	0,1743	2,29	0,1746	1,4
150	0,2681	6,39	0,2477	5,15
200	0,3459	4,96	0,3347	7,7
250	0,4174	10,96	0,4031	6,47
300	0,5058	9,29	0,5007	2,64
Plasma*				
20	0,0594	10,72	0,0522	4,65
50	0,1086	4,82	0,093	1,56
100	0,1772	2,97	0,1756	4,5
150	0,2632	19,26	0,2584	6,53
200	0,3408	11,7	0,3248	5,91
250	0,4023	4,94	0,3952	4,5
300	0,4926	16,2	0,4567	6,98
Soro*				
20	0,0962	21	0,0586	2,18
50	0,1238	8,67	0,1097	5,04
100	0,197	6,1	0,1819	3,1
150	0,2531	8,7	0,2492	4,32
200	0,3479	8,13	0,3367	5,01
250	0,4429	6,46	0,4066	5,43
300	0,5099	8,58	0,4949	6,86

Análise estatística: água ultrapura – não houve diferença significativa entre os valores da primeira e da segunda análise ($p > 0,05$); plasma – não houve diferença significativa entre os valores da primeira e segunda análise ($p > 0,05$); soro – não houve diferença significativa entre os valores da primeira e segunda análise ($p > 0,05$).

*quando água ultrapura, plasma e soro foram analisados, não houve diferença significativa entre as matrizes ($p > 0,05$); DP: desvio padrão.

Estatisticamente, não houve diferença significativa entre as três matrizes ($p > 0,05$) na primeira análise, nas concentrações estudadas. Tampouco foi verificada qualquer diferença significativa na segunda análise, após três meses. Comparamos também estatisticamente as amostras biológicas entre as duas análises, e não houve diferença significativa para água, plasma e soro.

As seguintes equações de reta foram obtidas para cada matriz:

- água ultrapura

$$(A): y = 0,01859 + 0,00161x; r = 0,99727 \text{ e } (B): y = 0,01017 + 0,00161x; r = 0,99888;$$

- plasma

$$(A): y = 0,03219 + 0,00149x; r = 0,99856 \text{ e } (B): y = 0,02317 + 0,00150x; r = 0,99673;$$

• soro

(A): $y = 0,04295 + 0,00158x$; $r = 0,99636$ e (B): $y = 0,02862 + 0,00153x$; $r = 0,99915$.

As curvas de calibração das três matrizes são apresentadas na **Figura 2**, para as análises realizadas em tempos diferentes, sendo A para água pura; B para plasma; C para soro; e D curvas das três matrizes plotadas em conjunto.

Para melhor análise, a **Figura 3** ilustra os desvios padrão (DP) das diferentes matrizes. Note que, neste caso, as curvas das três matrizes, mesmo em diferentes tempos, achatam-se em virtude da escala do eixo y, sendo soro e plasma as matrizes com

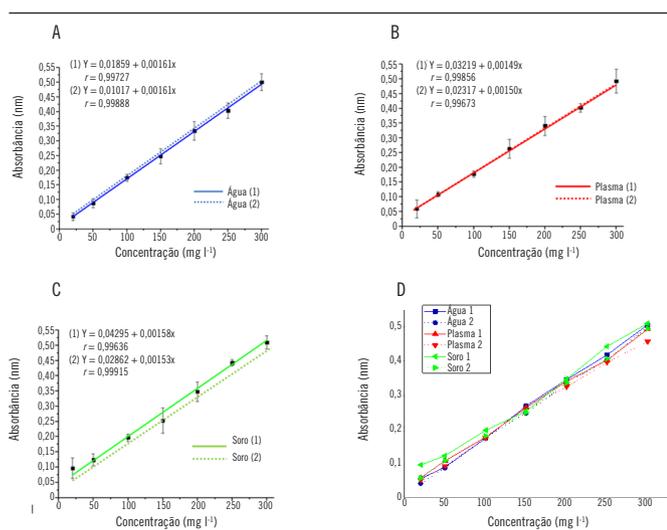


FIGURA 2 – Comparação entre as curvas de calibração em diferentes tempos (1) e três meses após (2) para as seguintes matrizes: A) água pura (n = 3); B) plasma (n = 3); C) soro (n = 3); e D) todas as curvas em conjunto

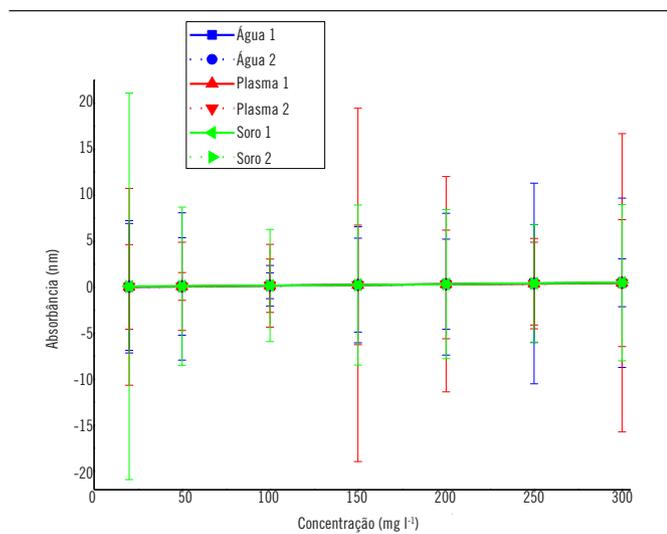


FIGURA 3 – Desvio padrão das diferentes matrizes

os maiores desvios em algumas concentrações de paracetamol. De modo geral, sob a perspectiva dos DP, demonstramos que as três matrizes podem ser utilizadas na confecção de uma curva padrão para a determinação analítica de paracetamol.

DISCUSSÃO

Todas as drogas são capazes de produzir efeitos benéficos ou prejudiciais, dependendo da dose. A natureza dos efeitos prejudiciais pertence a duas categorias associadas aos mecanismos de ação: 1. farmacodinâmica – efeitos relacionados com a ação farmacológica da droga (hipotensão decorrente da ação de um anti-hipertensivo, sangramento decorrente de um anticoagulante, por exemplo); e 2. toxicológica – efeitos não relacionados com a principal ação farmacológica da droga⁽²⁴⁾. Por exemplo, a ingestão de dose única de 10-15 g paracetamol em adultos e até 150 mg/kg em crianças pode causar hepatotoxicidade⁽¹⁾, um efeito que não está relacionado com o seu efeito farmacológico (antipirético > analgésico > anti-inflamatório) e, sim, com um efeito toxicológico.

A dose terapêutica do paracetamol em adultos não deve ultrapassar 4 g ao dia e nos alcoólatras crônicos, 2 g/dia. Já em crianças, pode-se administrar doses de até 50 mg/kg/dia⁽¹⁾. Depreende-se, portanto, que a hepatotoxicidade pode ocorrer com ingestões de 2-4 vezes maiores que a dose terapêutica e, por isso, é fundamental que os laboratórios de urgência e emergência estejam preparados para realizar a quantificação de paracetamol visando à biomonitorização da intoxicação, de acordo com as recomendações do nomograma de Rumack-Matthew para auxiliar no tratamento e no prognóstico do paciente intoxicado.

Os métodos analíticos para a detecção e a quantificação de fármacos em amostras biológicas são importantes instrumentos para o diagnóstico de intoxicações, justificando a necessidade de se contar com métodos bem caracterizados, validados e, portanto, confiáveis⁽⁵⁾. O método espectrofotométrico sugerido por Sebben *et al.* (2010)⁽⁵⁾ trouxe vantagens na sua utilização, substituindo as técnicas cromatográficas, como a cromatografia líquida de alta eficiência – considerada uma análise de alto custo de instrumentação e operação, que leva relativamente longo tempo de análise e requer a experiência no manuseio do equipamento e no tratamento de amostras⁽²⁵⁾, bem como a exposição do operador a reagentes tóxicos, como o fenol⁽¹²⁾.

Sebben *et al.* (2010)⁽⁵⁾ sugerem soro ou plasma como matrizes para a adição de padrão, o paracetamol, um método conhecido como método de adições de padrão (MAP), utilizado com

frequência em sistemas ambientais e bioquímicos e na análise de ultratrachos em geral⁽²⁶⁾. Barros Neto *et al.* (2002)⁽²⁶⁾ reportam que, ao existir, ou for esperado efeitos de matriz e não se dispuser de amostras de calibração com uma matriz semelhante, o MAP pode ser o mais indicado. Adicionando-se soluções padrão à amostra, um comportamento semelhante ao da amostra é produzido na série de calibração, desde que o analito no padrão adicionado esteja na mesma forma da amostra. Esse modelo baseia-se no pré-requisito de que o branco não apresenta valor estatisticamente diferente de zero ou que esse valor pode ser eliminado.

Diante do fato de que no trabalho de Sebben *et al.* (2010)⁽⁵⁾ não havia relato sobre o comportamento do paracetamol utilizando-se a água como matriz, no presente trabalho realizamos o mesmo procedimento desses autores, utilizando a água ultrapura para o preparo de soluções padrão com diferentes concentrações de paracetamol em comparação com o MAP realizado com plasma e soro. Em consonância às boas práticas de laboratório e como padrão de qualidade interno, é idealizado o refazimento da curva de calibração sempre que algum dos parâmetros que foram utilizados como balizadores sofrem alguma modificação, como no refazimento dos reagentes mantidos em estoque (solução estoque padrão de paracetamol de 1 mg ml⁻¹, TCA 3% ou NaOH 8 M) ou quando um novo lote de um produto químico é adquirido e deve ser idealmente confrontado com o lote anterior, ou até mesmo para a verificação do equipamento⁽²⁷⁾.

Na metodologia de Sebben *et al.* (2010)⁽⁵⁾, a quantidade requerida de plasma ou soro comercial para a construção da curva com várias concentrações, em triplicata, encarece o método pelo valor desses produtos biológicos no mercado. Nesse contexto, pelos resultados obtidos, a curva de calibração utilizando como matriz a água ultrapura mostrou-se linear ao soro e plasma nas análises realizadas. Além disso, o refazimento dos reagentes provenientes dos mesmos lotes, após três meses, apresentou pequena variabilidade nas curvas com o mesmo equipamento, mas é razoável apontar que os resultados poderiam ser impactantes se utilizados lotes de

reagentes de diferentes laboratórios ou equipamento diferente. Refazer a curva de calibração e obter a equação de reta reajustada aos novos reagentes como calibradores do equipamento é uma forma de registro importante para o controle interno de qualidade do laboratório⁽²⁷⁾.

Neste estudo, em todos os ensaios observamos a mesma linha de tendência nas três matrizes testadas. Entretanto, embora a composição do soro seja similar à do plasma sanguíneo, o primeiro não possui fibrinogênio e outros fatores que foram consumidos no processo de coagulação^(28, 29). Essa diferença indica que, ao se optar pela matriz água ultrapura para a construção da curva de calibração, a amostra mais adequada para a determinação do paracetamol é o soro. Essa medida pode ser facilmente adotada pelo laboratório, orientando a não utilização do anticoagulante durante a coleta de sangue do paciente.

CONCLUSÃO

Podemos afirmar que há linearidade entre as matrizes de soro e plasma com a água ultrapura, tanto estatisticamente como pelos coeficientes de correlação obtidos. O uso da água ultrapura na construção da curva de calibração para quantificar o nível sérico de paracetamol é vantajoso em relação ao soro ou plasma, pela significativa redução do custo da análise, pois prescinde da aquisição comercial de plasmas e soros liofilizados.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (Probic) da Uniso, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF)/Uniso e à Financiadora de Estudos e Projetos (Finep) nº 07/2010.

REFERÊNCIAS

1. Brayner AAS, Almeida FR. O risco do uso irracional do paracetamol na população brasileira e seus efeitos na hemostasia. *Rev Cient FASETE*. 2018; 1: 138-53.
2. Pesaro AE, D'Amico E, Aranha LF. Dengue: manifestações cardíacas e implicações na terapêutica antitrombótica. *Arq Bras Cardiol*. 2007; 89(2): e12-e15.
3. Ferreira SS, Martins AC, Magalhães AC, Martins H. Ácido acetilsalicílico na prevenção da pré-eclâmpsia: uma revisão baseada na evidência. *Rev Port Med Geral Fam*. 2017; 33(2): 118-32.
4. Farias PO. Aspectos epidemiológicos das intoxicações por analgésicos não opioides e anti-inflamatórios não esteroides em hospital de urgência e emergência da rede pública do Brasil. *Rev Med Minas Gerais*. 2016; 26(Supl 5): S11-S15.

5. Sebben VC, Lugoch RW, Schlinker CS, Arbo MD, Vianna RL. Validação de metodologia analítica e estudo de estabilidade para quantificação sérica de paracetamol. *J Bras Patol Med Lab.* 2010; 46(2): 143-48.
6. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. *Farmacologia.* 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012.
7. Oshima-Franco Y, Franco LM. Biotransformação: importância e toxicidade. *Saúde Rev.* 2003; 5(9): 69-76.
8. Castro PLP. *Farmacocinética do paracetamol [dissertação].* Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa; 2014.
9. Munné P, Saenz Bañuelos JJ, Izura JJ, Burillo-Putze G, Nogué S. Intoxicaciones medicamentosas (II): analgésicos y anticonvulsivantes. *Anales Sis San Navarra.* 26(Suppl 1): 65-97.
10. American Academy of Pediatrics. Acetaminophen toxicity in children. *Pediatrics.* 2001; 108(4): 1020-24.
11. Junior EJAG, Roeder JS, Oliveira KBL, Ferreira MP, Silva JG. Validação de método analítico para a quantificação de paracetamol em solução oral por espectrofotometria no UV. *Rev Virtual Quim.* 2017; 9(4): 1747-59.
12. Frings CS, Saloom JM. Colorimetric method for the quantitative determination of acetaminophen in serum. *Clin Toxicol.* 1978; 15(1): 67-73.
13. Pandya EJ, Kapupara P, Shah KV. Development and validation of simultaneous estimation of diclofenac potassium, paracetamol and serratiopeptidase by first order derivative UV spectroscopy method in pharmaceutical formulation. *J Chem Pharm Res.* 2014; 6(5): 912-24.
14. Khanage SG, Mohite PB, Jadhav S. Development and validation of UV-visible spectrophotometric method for simultaneous determination of eperisone and paracetamol in solid dosage form. *Adv Pharm Bull.* 2013; 3(2): 447-51.
15. Moreira AB, Dias ILT, Neto GO, Zagatto EAG, Kubota LT. Simultaneous spectrofluorimetric determination of paracetamol and caffeine in pharmaceutical preparations in solid-phase using partial least squares multivariate calibration. *Anal Letters.* 2006; 39(2): 349-60.
16. Dewani AP, Bakal RL, Shelke PG, et al. An gradient HPLC-DAD determination of phenylephrine, paracetamol, ambroxol and levocetizine in pharmaceutical formulation. *Indian J Chem Technol.* 2016; 23(5): 419-24.
17. Topkafa M, Ayyildiz HF, Memon FN, Kara H. New potential humic acid stationary phase toward drug components: development of a chemometric-assisted RP-HPLC method for the determination of paracetamol and caffeine in tablet formulations. *J Sep Sci.* 2016; 39(2): 2451-58.
18. Clausen DN, Oliveira FM, Casarin J, Sartori ER, Tarley CRT. Development of HPLC method for quantification of orphenadrine, paracetamol, and caffeine in pharmaceutical formulations. *Rev Virtual Quim.* 2014; 7(6): 2066-79.
19. Sipa K, Socha E, Skrzypek S, Krzyczmonik P. Electrodes modified with composite layers based on poly (3,4-ethylenedioxythiophene) as sensors for paracetamol. *Anal Sci.* 2017; 33(3): 287-92.
20. Kalambate PK, Srivastava AK. Simultaneous voltammetric determination of paracetamol, cetirizine and phenylephrine using a multiwalled carbon nanotube/platinum nanoparticles nanocomposite modified carbon paste electrode. *Sens Actuators B Chem.* 2016; 233(5): 237-48.
21. Saran LM. *Fundamentos de espectrofotometria molecular UV-visível.* Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Unesp; 2012.
22. Prichard L, Barwick V. Preparation of calibration curves – a guide to best practice. LGC/VAM/2003/032. Disponível em: <http://www.lgcgroup.com/our-science/national-measurement-laboratory/publications-and-resources/good-practice-guides/preparation-of-calibration-curves-a-guide-to-best/> [acesso em: 26 mar 2020].
23. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada – RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Brasília (DF): Diário Oficial da União; 2017.
24. Rang HP, Dale MM. Toxicidade de drogas. In: Rang HP, Dale MM, editores. *Farmacologia.* Guanabara Koogan SA; 1993. pp. 550-51.
25. Clausen DN, Oliveira FM, Casarin J, Sartori ER, Tarley CRT. Desenvolvimento de método por CLAE para quantificação de orfenadrina, paracetamol e cafeína em formulações farmacêuticas. *Rev Virtual Quim.* 2015; 7(6): 2066-79.
26. Barros Neto B, Pimentel MF, Araújo MCU. Recomendações para calibração em química analítica – parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). *Quim Nova.* 2002; 25(5): 856-65.
27. Séries Anvisa. Laboratório. Guia para qualidade em química analítica uma assistência à habilitação. Seleção, uso e interpretação de programas de ensaios de proficiência (EP) por laboratórios. 2000. Eurachem Nederland Laboratory of the Government Chemist of United Kingdom. Tradução: Anvisa. Brasília: SENAI/DN; 2005.
28. Bozzini CE, Molinas F. Hemostasia. In: Houssay AB, Cirgolani HE. *Fisiologia humana de Houssay.* 7 ed. Artmed: Porto Alegre; 2004.
29. Carlos MML, Sousa Freitas PDF. Study of blood coagulation cascade and the reference values. *Acta Vet Bras.* 2007; 1(2): 49-55.

AUTOR CORRESPONDENTE

Yoko Oshima-Franco  0000-0002-4972-8444
 e-mail: yoko.franco@prof.uniso.br



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.