

Desenvolvimento de método analítico para quantificação de paracetamol em plasma com uso de aplicativo de celular

Palavras-Chave: PARACETAMOL; PLASMA; PHOTOMETRIX PRO

Autores:

Henrique Benvenuti, FCF – UNICAMP

Kauê de Oliveira Chinaglia, FCM – UNICAMP

Leonardo Costalonga Rodrigues, FCM – UNICAMP

Prof. Dr. José Luiz da Costa (orientador), FCF – UNICAMP

INTRODUÇÃO:

O paracetamol (acetaminofeno), é um medicamento amplamente utilizado pelas suas propriedades analgésicas e antipiréticas, e é pertencente a classe dos derivados de p-aminofenol. Os primeiros testes clínicos do paracetamol ocorreram em 1893, entretanto, sua comercialização só foi autorizada na década de 1950, nos Estados Unidos. Desde então, tem se tornado um dos medicamentos mais utilizadas ao redor do mundo, principalmente por ser um medicamento isento de prescrição médica em muitos países (1, 2).

A metabolização do paracetamol acontece principalmente no fígado, onde ocorre majoritariamente a conjugação do medicamento com ácido glicurônico e sulfato. Porém, uma menor fração do paracetamol é convertido pelo citocromo P450 em N-Acetil-p-benzo-quinona imina (NAPQI), um composto alquilante extremamente reativo que em baixa concentração é rapidamente neutralizado pela glutathione hepática. Entretanto, em altas doses de ingestão de paracetamol, pode haver depleção da glutathione hepática gerando um acúmulo de NAPQI que se liga fortemente em proteínas celulares, em especial, das mitocôndrias, causando disfunção respiratória nos hepatócitos (3, 4).

Quantificar o paracetamol presente no plasma do paciente suspeito de intoxicação é essencial para analisar a necessidade ou não da aplicação do antidoto, N-Acetilcisteína (NAC). No Brasil, essa análise é geralmente realizada através de espectrofotômetro, após uma reação colorimétrica com o plasma do paciente, ou por técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo linear de diodos (HPLC-DAD) (5 – 8).

O *PhotoMetrix PRO* é um aplicativo de celular que permite a determinação da concentração de substâncias em amostras através da captura de imagens pela câmera do próprio celular e da avaliação da coloração e da intensidade do sinal por análises uni e multivariada. Sendo assim, através da reação

colorimétrica é possível utilizar este aplicativo para realizar a quantificação de paracetamol em amostras de plasma (9).

METODOLOGIA:

Para o preparo dos pontos das curvas de calibração, uma solução estoque de paracetamol foi preparada em metanol, a 1 mg/mL. Em seguida, foi feita a diluição, em plasma, dessa solução, obtendo-se as concentrações da curva de calibração a 25, 50, 100, 200, 250 e 300 µg/mL. Também foram utilizados controles de qualidade (CQs) baixo (CQB), médio (CQM) e alto (CQA) com as respectivas concentrações: 75, 150 e 275 µg/mL, a partir da diluição da solução estoque.

O preparo de amostra se inicia com a transferência de 250 µL da amostra de plasma para um microtubo de 2,0 mL, seguido da adição de 500 µL de ácido tricloroacético 15% e agitação por 10 segundos em vórtex. As amostras então foram centrifugadas por 5 minutos a 1431 g e 500 µL do sobrenadante foi transferido para um tubo de ensaio, seguido da adição de 250 µL de ácido clorídrico 6 N e agitação em vórtex por 10 segundos. Em seguida, adicionou-se 200 µL de nitrito do sódio 10%, seguido de agitação por 10 segundos em vórtex. Então, foi transferido 500 µL de ácido sulfâmico 15% para o tubo de ensaio e realizou-se a agitação dos tubos novamente em vórtex, por 10 segundos. Por fim, adicionou-se 600 µL de hidróxido de sódio 30% e agitou-se os tubos por mais 15 segundos em vórtex, fazendo com que a amostra apresente coloração amarelada (10). Após o preparo, as amostras foram analisadas tanto no *PhotoMetrix PRO* quanto, no espectrofotômetro (DU-8200 Drawell®), no comprimento de onda em 420 nm. As análises através do *PhotoMetrix PRO* foram realizadas em uma caixa de madeira contendo um *ring light* de modo a padronizar a iluminação nas análises (Figura 1). O celular utilizado foi o *Samsung Galaxy S21 FE*, as análises no *PhotoMetrix PRO* foram feitas no modo de análise univariada pelo vetor RGB com as seguintes configurações: região de interesse 32x32, modo flash desativado, exposição 0, modo de foco infinito, balanço de cor branca automático e resolução 680x480 *pixels*.



Figura 1. Caixa para análise pelo *PhotoMetrix PRO*.

Paralelamente, as mesmas amostras também foram analisadas por HPLC-DAD (LC-40 NEXERA XR), como mais uma metodologia comparativa na validação. Para estas análises, as amostras foram preparadas da seguinte forma: 100 µL de plasma foram transferidos para um microtubo de 2,0 mL, seguido da adição de 300 µL de ácido fetilglioxílico 25 µg/mL, utilizado como padrão interno da análise. Após isso, a amostra foi agitada em homogeneizador por 2 minutos a 2500 RPM e posteriormente centrifugada por 5 minutos a 5010 g. Por fim, o sobrenadante foi transferido para um *vial* e 200 µL de água ultrapurificada foram adicionados à amostra, tornando-a pronta para análise.

A validação realizada para o método foi baseada no guia orientativo do INMETRO para validação de métodos analíticos (DOQ-CGCRE-008) revisto em 2020. Os parâmetros avaliados foram: Limite de Detecção e quantificação (LOD/LOQ), linearidade ($r^2 \geq 0.99$), imprecisão inter-dia e intra-dia e inexatidão, além da

comparação dos resultados obtidos através de análise por espectrofotometria UV-Vis e HPLC-DAD. O método em desenvolvimento e os métodos comparativos foram submetidos a 5 dias subsequentes de testes, onde foram feitas leituras de todos os pontos da curva de calibração escolhidos e triplicata de todos os controles de qualidade. O Coeficiente de Variação (CV) dos pontos da curva de calibração não poderiam ser iguais ou superiores a 20%, e os CQs iguais ou superiores a 30%.

Todos os dados obtidos nas análises foram analisados utilizando o *software Shimadzu Insight* e o *Microsoft Excel* (2016).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

O LOD/LOQ foram definidos ambos em 25 µg/mL pois é o menor valor de concentração em que o *PhotoMetrix PRO* consegue distinguir de uma amostra branca, devido a fraca coloração amarela de concentrações inferiores a esta.

A linearidade da curva de calibração foi avaliada utilizando pelo menos 5 dos 6 pontos preparados para a sua calibração, caso algum ponto se apresentasse como *outlier* ($CV \geq 20\%$) o mesmo era excluído da medida de linearidade do dia, com exceção do primeiro e do último ponto da curva de calibração, que não poderiam ser excluídos. Em todas as análises realizadas pelos diferentes métodos durante os 5 dias de validação, o valor de r^2 da curva de calibração foi superior a 0,99.

Nas tabelas (1, 2 e 3) abaixo, estão apresentados os valores obtidos para todos os controles de qualidade durante todos os 5 dias de validação e na tabela 4, um resumo geral destes dados, juntamente com os valores de inexatidão e imprecisão inter-dia e intra-dia.

	DIA1	DIA2	DIA3	DIA4	DIA5
CQB 1	87,67	73,86	74,00	79,83	72,29
CQB 2	84,33	75,29	77,33	81,50	70,86
CQB 3	91,00	73,86	75,67	84,83	72,29

	DIA1	DIA2	DIA3	DIA4	DIA5
CQB 1	75,90	74,37	65,30	68,07	87,40
CQB 2	85,01	94,15	74,23	73,94	87,40
CQB 3	70,23	58,91	95,21	84,52	84,04

	DIA1	DIA2	DIA3	DIA4	DIA5
CQM 1	147,67	122,43	149,00	161,50	145,14
CQM 2	152,67	161,00	155,67	166,50	148,00
CQM 3	147,67	159,57	159,00	164,83	145,14

	DIA1	DIA2	DIA3	DIA4	DIA5
CQM 1	133,40	139,77	149,88	164,56	167,36
CQM 2	153,44	165,82	159,83	173,13	156,30
CQM 3	142,41	155,76	180,34	155,69	164,74

	DIA1	DIA2	DIA3	DIA4	DIA5
CQA 1	284,33	272,43	282,33	283,17	246,57
CQA 2	284,33	273,86	275,67	296,50	246,57
CQA 3	291,00	275,29	295,67	293,17	248,00

	DIA1	DIA2	DIA3	DIA4	DIA5
CQA 1	303,29	255,03	295,10	296,10	271,27
CQA 2	281,74	293,34	304,15	307,94	284,23
CQA 3	296,20	245,99	313,62	275,09	271,27

Tabela 1. Valores dos controles de qualidade na análise por espectrofotometria UV-VIS.

Tabela 2. Valores dos controles de qualidade na análise pelo *PhotoMetrix PRO*.

	DIA1	DIA2	DIA3	DIA4	DIA5
CQB 1	74,04	73,11	74,33	70,55	76,38
CQB 2	75,94	72,45	75,15	71,31	72,34
CQB 3	71,93	75,07	77,33	73,33	68,05

	DIA1	DIA2	DIA3	DIA4	DIA5
CQM 1	144,57	139,59	156,28	145,15	150,06
CQM 2	145,10	142,13	154,65	147,83	148,03
CQM 3	142,90	139,90	152,42	143,07	141,35

	DIA1	DIA2	DIA3	DIA4	DIA5
CQA 1	289,56	280,30	291,05	271,84	253,49
CQA 2	303,98	273,30	288,32	280,12	269,06
CQA 3	301,47	278,87	293,88	274,47	261,68

Tabela 3. Valores dos controles de qualidade na análise por HPLC-DAD.

Método	Média Geral			Inexatidão (%)			Imprecisão Intra-dia (%)			Imprecisão Inter-dia (%)		
	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA
Espectrofotômetro	78,3	152,4	276,6	4,4	1,6	0,6	2,7	6,7	2,1	11,8	7,9	9,1
<i>PhotoMetrix PRO</i>	78,6	157,5	286,3	4,8	5,0	4,1	14,8	7,1	5,3	11,7	9,2	8,4
HPLC-DAD	73,4	146,2	280,7	-2,1	-2,5	2,1	3,2	1,8	2,0	3,5	5,1	7,3

CQB= 75 µg/mL / CQM= 150 µg/mL / CQA= 275 µg/mL

Tabela 4. Resumo geral dos dados obtidos durante a validação.

Como mostram as tabelas acima, nenhum CQ apresentou CV superior a 30%. Além disso, os valores de Inexatidão, imprecisão intra-dia e inter-dia também foram favoráveis, sendo nenhum superior a 20%.

Análises estatísticas para verificação de diferença significativa intra-grupo (Teste de *Shapiro-Wilk*) e inter-grupo (Teste *T-Student*) também foram realizados após a validação com todos os valores de CQs obtidos durante os experimentos. Em ambos os testes, as concentrações encontradas para os CQs não apresentaram diferença significativa para os diferentes métodos ($p < 0,05$).

CONCLUSÕES:

O método desenvolvido utilizando o *PhotoMetrix PRO* foi validado com sucesso e apresentou resultados de concentração semelhantes aos métodos de referência utilizados para a análise de paracetamol em plasma.

Apesar de ser uma técnica simples, rápida e de baixo-custo, o *PhotoMetrix PRO* apresenta-se como uma ferramenta promissora para a Toxicologia Analítica e Clínica.

Na próxima etapa, esta metodologia será utilizada para análise de amostras de pacientes disponibilizadas pelo Centro de Informação e Assistência Toxicológica de Campinas (CIATox) (CAAE: 38918020.7.0000.5404).

BIBLIOGRAFIA

- 1 - Korolkovas, A.; Burckhalter, J. H.; Química Farmacêutica, Guanabara Dois: Rio de Janeiro, 1982, p. 159-197.
- 2 - Prescott LF. Paracetamol: past, present, and future. *Am J Ther.* 2000 Mar;7(2):143-7.
- 3 - Prescott LF. Kinetics and metabolism of paracetamol and phenacetin. *Br J Clin Pharmacol.* 1980;10 Suppl 2(Suppl 2):291S-298S.
- 4 - Brune K, Renner B, Tiegs G. Acetaminophen/paracetamol: A history of errors, failures and false decisions. *Eur J Pain.* 2015 Aug;19(7):953-65.
- 5 - Piotrowska N, Klukowska-Rötzler J, Lehmann B, Krummrey G, Haschke M, Exadaktylos A K, Loakoni A. Presentations Related to Acute Paracetamol Intoxication in an Urban Emergency Department in Switzerland. *Emergency Medicine Internacional.* Vol. 2019;
- 6 - Saccomano, Scott J. Acute acetaminophen toxicity in adults. *Nursing Critical Care.* 2010; 14(5):10-17.
- 7 - Rumack BH, Matthew H: Acetaminophen poisoning and toxicity. *Pediatrics* 55 (6): 871–876, 1975;
- 8 - Glynn JP, Kendal SE. Letter: paracetamol measurement. *Lancet.* 1975 May 17;1(7916):1147-8
- 9 - Fernanda C. Böck, Gilson A. Helfer, Adilson B. da Costa, Morgana B. Dessuy, Marco F. Ferrão. Low-cost method for copper determination in sugarcane spirits using Photometrix UVC® embedded in smartphone. *Food chemistry.* Vol. 367, 2022, 130669, ISSN 0308-8146.
- 10 - Shihana F, Dissanayake D, Dargan P, Dawson A. A modified low-cost colorimetric method for paracetamol (acetaminophen) measurement in plasma. *Clin Toxicol (Phila).* 2010 Jan;48(1):42-6.