

## Artigo

## Validação Intralaboratorial da Determinação Voltamétrica do Paracetamol em Águas Naturais

Almeida, S. V.;\* Gouveia, M. E. M. B.; Leite, L. F.; Santos, K. M. M. G.; Felsner, M. L.; Galli, A.

Rev. Virtual Quim., 2019, 11 (1), 326-338. Data de publicação na Web: 4 de fevereiro de 2019

<http://rvq.sbq.org.br>

### In-House Validation of Voltammetric Determination of Paracetamol in Natural Waters

**Abstract:** Paracetamol is the most prescribed drug currently for headaches and fever. Therefore, because of the demand, it is considered an emergent ecosystem contaminant. In this context, this work presents an in-house validation study of a new voltammetric methodology for analysis of paracetamol in natural waters. A boron-doped diamond electrode (BDD) and a Britton-Robinson buffer solution 0.1 mol L<sup>-1</sup> as supporting electrolyte were used in the voltammetric determinations. The results were obtained by cyclic voltammetry (CV) and square-wave voltammetry (SWV). Analytical curves were constructed in the concentration range of 0.25 to 1.51 mg L<sup>-1</sup>, obtaining values of LOD and LOQ equal to 6.25 µg L<sup>-1</sup> and 20.82 µg L<sup>-1</sup>, respectively. The correlation coefficient (*r*) found was 0.997, while the determination coefficient (*R*<sup>2</sup>) was 99.6 %, indicating, along with the help of statistical tools, a good linearity of the method. Additionally, there were obtained values of RSD of 3.2 % for repeatability and 12.0 % for intermediary precision, as well as recovery rates in between 80.16 % and 116.45 %. That way, the method can be considered precise, exact and reliable for real samples determinations in routine analysis.

**Keywords:** Method validation; voltammetry; square wave voltammetry; paracetamol.

### Resumo

Paracetamol é o fármaco mais receitado atualmente para dores moderadas e febre. Assim, devido à demanda, é considerado um contaminante ecossistêmico emergente. Neste contexto, este trabalho apresenta um estudo de validação intralaboratorial de uma nova metodologia voltamétrica para análise de paracetamol em águas naturais. Um eletrodo de diamante dopado com boro (DDB) e uma solução de tampão Britton-Robinson 0,1 mol L<sup>-1</sup> como eletrólito suporte foram empregados nas determinações voltamétricas. Os resultados foram obtidos por voltametria cíclica (VC) e voltametria de onda quadrada (VOQ). Curvas analíticas foram construídas na faixa de concentração de 0,25 a 1,51 mg L<sup>-1</sup>, obtendo-se valores de LD e LQ iguais a 6,25 µg L<sup>-1</sup> e 20,82 µg L<sup>-1</sup>, respectivamente. O coeficiente de correlação (*r*) encontrado foi de 0,997, enquanto que o coeficiente de determinação (*R*<sup>2</sup>) foi de 99,6 %, indicando, juntamente com o auxílio de ferramentas estatísticas, a boa linearidade do método. Adicionalmente, foram obtidos os valores de DPR de 3,2 % para repetitividade e 12,0 % para precisão intermediária, bem como taxas de recuperação entre 80,16 % e 116,45 %. Deste modo, pode-se considerar o método preciso e exato para determinações em amostras reais, podendo ser utilizado confiavelmente em análises de rotina.

**Palavras-chave:** Validação de método; voltametria de onda quadrada; paracetamol.

\* Universidade Estadual do Centro-Oeste do Paraná, Departamento de Química, Campus CEDETEG, Rua Simeão Camargo Varela de Sá 3, Vila Carli, CEP 85040-080, Guarapuava-PR, Brasil.

✉ [sthefanevalmeida@yahoo.com](mailto:sthefanevalmeida@yahoo.com)

DOI: [10.21577/1984-6835.20190023](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20190023)

## Validação Intralaboratorial da Determinação Voltamétrica do Paracetamol em Águas Naturais

**Sthéfane V. de Almeida, Maria Eduarda M. B. Gouveia, Luana F. Leite, Késia Maria M. G. dos Santos, Maria Lurdes Felsner, Andressa Galli \***

Universidade Estadual do Centro-Oeste do Paraná, Departamento de Química, Campus CEDETEG, Rua Simeão Camargo Varela de Sá 3, Vila Carli, CEP 85040-080, Guarapuava-PR, Brasil.

\* [sthefanevalmeida@yahoo.com](mailto:sthefanevalmeida@yahoo.com)

*Recebido em 15 de agosto de 2018. Aceito para publicação em 16 de dezembro de 2018*

### 1. Introdução

### 2. Experimental

#### 2.1. Materiais e instrumentação

#### 2.2. Medidas voltamétricas

#### 2.3. Validação do método

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Estudo do comportamento eletroquímico do paracetamol por voltametria cíclica

#### 3.2. Parâmetros experimentais

#### 3.3. Validação do método

### 4. Conclusão

## 1. Introdução

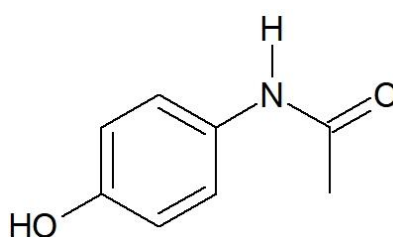
Nos últimos anos, o interesse por novos métodos eletroanalíticos para a determinação de compostos orgânicos aumentou acentuadamente, uma vez que as técnicas eletroquímicas possibilitam a quantificação de diferentes compostos de interesse de maneira robusta, com custo relativamente baixo e rapidez nas análises. Entretanto, o bom desempenho de um novo método analítico depende da qualidade das medidas, bem como da confiabilidade

estatística dos cálculos envolvidos, comprovando assim, sua eficiência ao propósito pretendido. Desta forma, a validação de uma nova metodologia torna-se parte essencial de seu desenvolvimento, de modo a garantir que o valor encontrado seja estatisticamente próximo ao valor real, garantindo assim, a conformidade com as exigências legais do método analítico.<sup>1</sup>

A necessidade de validar uma nova metodologia, em que são estabelecidas as figuras de mérito, é maior quando uma determinada técnica utilizada é recente, como é o caso das técnicas eletroanalíticas,

as quais não são aceitas por órgãos regulamentadores, uma vez que não são validadas. Embora as técnicas eletroanalíticas não sejam seletivas frente às consideradas padrão de análise, como as cromatográficas, a eletroanálise possui como vantagem a rapidez de obtenção dos resultados, um baixo custo e pouco ou nenhum pré-tratamento de amostra. Dentre os compostos orgânicos passíveis de determinação eletroanalítica, destaca-se o fármaco N-4-hidroxifenil etanamida, também conhecido como acetaminofeno ou paracetamol (Figura

1). É um composto fenólico que sofre oxidação em solução ácida por meio de ataque eletrolítico no anel aromático com remoção de dois elétrons e dois prótons, produzindo a N-acetil-p-quinonaimina que, mediante um processo puramente químico, dá como produto final a benzoquinona<sup>2</sup>. Devido ao tempo de meia-vida curto no plasma humano (cerca de 1,5 a 2,5 horas), este é o fármaco mais receitado atualmente. Entretanto, pode causar danos severos ao fígado, rins e estômago quando ingerido em dosagem errada<sup>3</sup>.



**Figura 1.** Fórmula estrutural do fármaco paracetamol

Devido à demanda, o paracetamol é também considerado um contaminante ecossistêmico, podendo ser encontrado na escala de  $\mu\text{g L}^{-1}$  em águas naturais e potáveis. Como ainda não possui legislação para controle ambiental, é considerado emergente, tendo seus efeitos no ambiente pouco estudados<sup>4</sup>. Em média, a concentração de paracetamol em águas de superfície é de  $0,055 \pm 0,051 \mu\text{g L}^{-1}$ , gerando também preocupação quanto à sua porcentagem de eliminação em estações de tratamento. Além disso, o fármaco pode produzir subprodutos tóxicos, dentre os quais se pode citar o 4-aminofenol, que apresenta elevada nefrotoxicidade e ação teratogênica, podendo causar deficiências renais e reprodutivas tanto em organismos aquáticos quanto em humanos<sup>5</sup>. Os ambientes aquáticos são os mais afetados, por conter formas de vida mais sensíveis. Assim, pequenas concentrações podem causar danos maiores do que causariam em outros sistemas. Por exemplo, peixes expostos a pequenas doses de paracetamol apresentaram inibição da produção de testosterona e aumento da produção de estradiol, de modo que pode afetar negativamente a reprodução<sup>6</sup>. Apesar disso, a detecção de paracetamol em águas

naturais ainda é discreta, principalmente utilizando técnicas eletroquímicas. Pode-se destacar o trabalho de Berto *et al.*<sup>7</sup>, que utiliza o eletrodo de carbono vítreo e a técnica de voltametria de pulso diferencial, obtendo um limite de detecção igual a  $1,8 \mu\text{g L}^{-1}$ . Também, Bouabi *et al.*<sup>8</sup> desenvolveram um método com voltametria de onda quadrada e eletrodo de pasta de carbono com quitosana, com limite de detecção de  $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

Entretanto, a maioria dos sensores eletroquímicos desenvolvidos para a determinação do paracetamol utilizam-se de eletrodos modificados, sendo poucos os trabalhos com materiais simples. Os eletrodos não modificados mais comuns são de pasta de carbono<sup>9</sup>, de carbono vítreo<sup>10</sup> e, principalmente, de diamante dopado com boro (DDB). Na literatura, há diversas metodologias referentes ao estudo da oxidação do paracetamol sobre DDB para determinações simultâneas com codeína<sup>11</sup>, ácido ascórbico<sup>12</sup>, nimesulida<sup>13</sup>, penicilina V<sup>14</sup>, dopamina<sup>15</sup>, ibuprofeno<sup>16</sup>, tramadol<sup>17</sup>, cafeína<sup>18,19</sup> e cafeína com propifenazona<sup>20</sup>, ibuprofeno<sup>21</sup>, orfenadrina<sup>22</sup> e aspirina<sup>23</sup>. Entretanto, até o momento não foram encontrados registros de metodologias

validadas utilizando ferramentas estatísticas, bem como de estudos realizados em águas naturais.

Deste modo, o processo de validação envolve a análise de diferentes parâmetros que confirmem a aplicabilidade analítica do método desenvolvido, avaliando assim sua adequação às análises de rotina. Esta pode ser realizada de forma parcial, caso a metodologia já tenha sido avaliada anteriormente, ou completa, como exigem os órgãos de regulamentação. Em geral, estes órgãos também demandam que a validação seja colaborativa, ou seja, aplicada em mais de um laboratório. Entretanto, órgãos como AOAC<sup>24</sup>, Eurachem<sup>25</sup> e IUPAC<sup>26</sup> desenvolveram protocolos para estudos intralaboratoriais, sendo utilizados em casos em que a validação interlaboratorial não é aplicável ou está indisponível ou como um pré-requisito para estudos colaborativos.

A validação intralaboratorial torna possível a avaliação de parâmetros como linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão, precisão e seletividade. Assim, neste trabalho é reportado o desenvolvimento de uma metodologia de baixo custo e elevada sensibilidade para a determinação e a quantificação de paracetamol em amostras de águas naturais, usando a técnica de voltametria de onda quadrada e o eletrodo DDB. Também, objetiva validar esta metodologia, uma vez que não foram encontrados, até então, relatos que aliem a técnica voltamétrica de onda quadrada, o eletrodo DDB e a validação eletroanalítica para fins ambientais.

## 2. Experimental

### 2.1. Materiais e Instrumentação

Todos os reagentes utilizados nos experimentos são de pureza analítica e todas as soluções foram preparadas com água ultrapura Milli-Q®, originadas em uma unidade de purificação Milli-Q, procedência Millipore Corporation®. Sulfato de sódio (99,8 %), perclorato de sódio (98,0 %), hidróxido de

sódio (98,0 %), fosfato dissódico (99,5 %), ácido nítrico (65,0 %) e ácido acético glacial (99,8 %) foram obtidos da Merck®. Ácido bórico (99,5 %), ácido sulfúrico (97,0%) e fosfato monopotássico (99,6 %) são provenientes da ACS®. O ácido fosfórico (85,0 %) foi obtido da Synth, o álcool etílico (99,9 %) da Baker e o cloreto de potássio (99,6 %) da Mallinckrodt®. O padrão paracetamol provém da VicoFarma®. A solução estoque de paracetamol (VicoFarma®; 99,7 %) utilizada para as medidas foi preparada com concentração de 0,189 g L<sup>-1</sup>.

As determinações eletroquímicas foram realizadas no potenciostato microautolab Metrohm® tipo III. Para a execução dos experimentos utilizou-se uma célula de vidro Pyrex®, com capacidade para 40,0 mL, equipada com tampa em Teflon®, composta por três eletrodos: eletrodo de referência (Ag/AgCl em KCl 3,0 M), eletrodo de diamante dopado com boro (DDB), com área média de 0,62 cm<sup>2</sup>, e um contra-eletrodo de platina. Foi empregado o nitrogênio ultrapuro (99,99 % de pureza) como gás de purga para remoção de oxigênio da célula durante as medidas.

### 2.2. Medidas voltamétricas

Para a utilização do eletrodo foi necessário um pré-tratamento aplicando um potencial de 2,6 V durante 500 segundos para a remoção do filme hidrofóbico do eletrodo. Em seguida, foi aplicado um potencial de -2,6 V por 60 segundos visando a melhora da resposta voltamétrica.<sup>27</sup> No estudo inicial do comportamento anódico do paracetamol, utilizou-se a técnica de voltametria cíclica, avaliando o grau de reversibilidade da reação de oxidação do composto. Para isso, 45,35 mg L<sup>-1</sup> de paracetamol foram adicionados à cela eletroquímica contendo tampão B-R como eletrólito de suporte. Foi então avaliada a resposta voltamétrica do analito frente à variação de velocidade de varredura, compreendendo valores entre 10 e 500 mV s<sup>-1</sup>.

Para o desenvolvimento da metodologia de determinação e de quantificação do paracetamol foi utilizada a técnica de voltametria de onda quadrada (VOQ). Estudos iniciais foram realizados para a escolha do melhor eletrólito suporte (tampão B-R, tampão fosfato, tampão acetato e sulfato de sódio) e do pH do meio (entre 2,0 e 8,0). Os parâmetros da VOQ foram avaliados por meio do estudo da variação da frequência de aplicação dos pulsos de potencial (de 10 a 140 Hz), do incremento de varredura de potencial (de 2 a 10 mV) e da amplitude de potencial (de 10 a 100 mV).

O paracetamol foi determinado em águas naturais do rio Juquiá, em Goioxim, Paraná, Brasil, em três diferentes pontos: próximo à nascente, na cidade e próximo à foz. As amostras foram mantidas a 4 °C até a utilização, em frascos previamente higienizados com uma solução de HNO<sub>3</sub> 10 % e enxaguados com água ultrapura.

### 2.3. Validação do método

A validação da metodologia foi realizada pela análise dos parâmetros de linearidade, sensibilidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), seletividade, exatidão e precisão. Para a determinação do composto, curvas analíticas foram construídas pelo método padronização por adição de padrão. O limite de detecção do paracetamol foi calculado e experimentos de recuperação foram realizados. O intervalo de concentração para as curvas analíticas foi de 0,25 a 1,51 mg L<sup>-1</sup> com oito pontos (0,25, 0,38, 0,57, 0,76, 0,94, 1,13, 1,32 e 1,51 mg L<sup>-1</sup>), sendo cada ponto analisado em duplicata. A linearidade foi avaliada por meio da relação entre o sinal de corrente de pico do analito e a concentração do mesmo, pela aplicação da técnica de regressão linear, de um teste de falta de ajuste e do teste de Cochran no nível de 95 % de confiança. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram avaliados por meio dos parâmetros da curva analítica, segundo as equações  $LD = 3,3S_b/B$  e  $LQ = 10S_b/B$ , onde  $S_b$  é o desvio padrão residual da

linha de regressão e  $B$  é o valor do coeficiente angular da curva analítica<sup>28</sup>.

A precisão foi analisada por meio de ensaios de repetitividade, em que 5 replicatas foram realizadas em um único dia, e por ensaios de precisão intermediária, por meio de 5 medidas em 5 dias diferentes. Ambas estimativas foram avaliadas pelo cálculo dos desvios padrão relativos (DPR (%)). O estudo de exatidão foi realizado por ensaios de recuperação utilizando três amostras de água natural proveniente do rio Juquiá, em Goioxim, Paraná, Brasil. Para tal, uma solução contendo uma alíquota (proporção de 1:300) de cada amostra foi fortificada em três níveis de concentração do paracetamol (0,38; 0,76; 1,13 mg L<sup>-1</sup>)<sup>29,30</sup>.

A seletividade foi avaliada por meio da adição de uma concentração fixa de 1,13 mg L<sup>-1</sup> de paracetamol e de adições de ácido húmico em quatro níveis de concentração (0,38; 0,76; 0,94; 1,13 mg L<sup>-1</sup>), em um intervalo de potencial de 0,0 a 1,0 V visando observar possíveis respostas próximas ao potencial de pico do fármaco. O ácido húmico foi escolhido devido à sua abundância em águas naturais, estando provavelmente presente nas amostras utilizadas nos estudos de recuperação.

Os dados do estudo de validação foram avaliados por meio do software *MINITAB for Windows*, versão 16.2.2 (*Minitab, Minitab Incorporation, USA, 2010*).

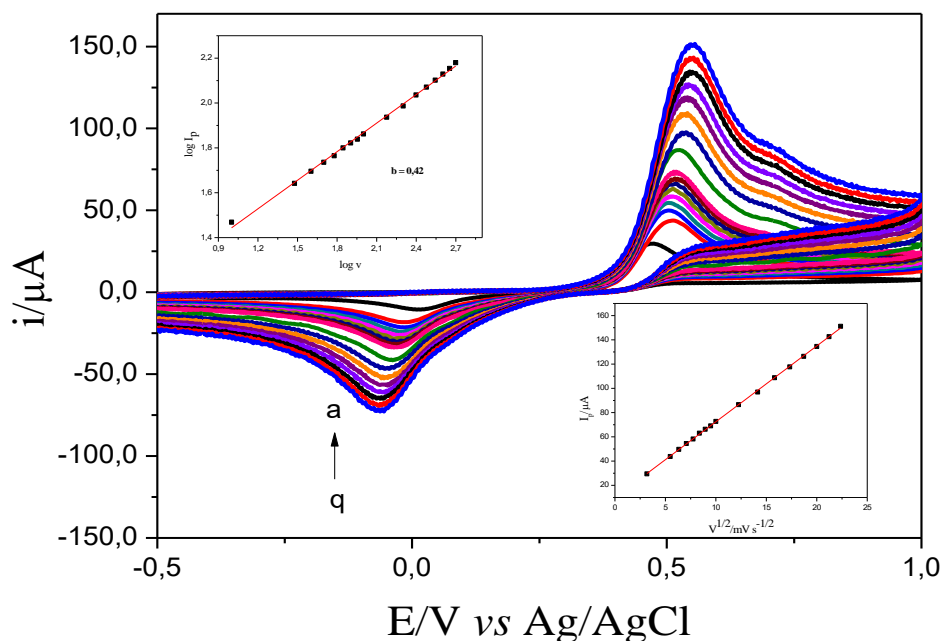
## 3. Resultados e Discussão

### 3.1. Estudo do comportamento eletroquímico do paracetamol por voltametria cíclica

Os voltamogramas cíclicos em função da velocidade de varredura, referentes ao estudo da eletroatividade do paracetamol são apresentados na Figura 2. Pode-se notar que o fármaco apresentou um pico de oxidação com características de processo (quase) reversível. Os picos de oxidação e de

redução do paracetamol foram observados nas regiões de 0,56 e 0,06 V vs Ag/AgCl, respectivamente. A corrente de pico ( $I_p$ ) varia linearmente com  $v^{1/2}$  e a relação do logaritmo da corrente de pico com o logaritmo da

velocidade de varredura mostra um coeficiente linear igual a 0,42, o que indica que o processo eletroquímico de oxidação do paracetamol é controlado pela difusão das espécies à superfície eletródica.



**Figura 2.** Influência da variação da velocidade de varredura no aspecto geral dos voltamogramas para o paracetamol sobre DDB (45,35 mg L<sup>-1</sup>, pH = 8,0, tampão BR 0,1 mol L<sup>-1</sup>): (a) 10, (b) 30, (c) 40, (d) 50, (e) 60, (f) 70, (g) 80, (h) 90, (i) 100, (j) 150, (k) 200, (l) 250, (m) 300, (n) 350, (o) 400, (p) 450, (q) 500 mV s<sup>-1</sup>. Inseridos: gráfico  $\log I_p$  vs  $\log v$  e gráfico  $I_p$  vs  $v^{1/2}$

### 3.2. Parâmetros experimentais

Para o estudo do eletrólito suporte, foram avaliadas as soluções de tampão Britton-Robinson (BR) pH 8,0, fosfato de sódio pH 6,1, sulfato de sódio pH 5,3 e acetato de sódio pH 4,0, todos na concentração de 0,1 mol L<sup>-1</sup> (Figura S1). A maior intensidade de corrente de pico referente à oxidação foi alcançada utilizando a solução de tampão BR, sendo este então escolhido para os demais estudos. A concentração hidrogeniônica do meio (Figura S2) apresentou maior corrente de pico, potencial de oxidação menor e melhor resolução de sinal analítico em pH = 8,0, sendo então este o escolhido para o

desenvolvimento da metodologia eletroanalítica.

Os parâmetros da voltametria de onda quadrada adotados para o trabalho foram  $\alpha = 60$  mV,  $\Delta E_s = 8$  mV e  $f = 100$  Hz, visando obter melhor definição de pico e maior sensibilidade analítica. A amplitude dos pulsos de potencial apresentou aumento de corrente de pico até 60 mV, sendo que os valores acima deste não variaram de forma significativa. Também, os valores de frequência dos pulsos de potencial acima de 120 Hz não mostraram influência significativa na corrente de pico, bem como o incremento acima de 8,0 mV. Entretanto, como a velocidade de varredura da onda quadrada é calculada considerando-se o produto da frequência pelo incremento, os dois

parâmetros devem ser avaliados em conjunto, visando não comprometer a resolução do gráfico ou a sensibilidade do método. Assim, optou-se por manter 8,0 mV de incremento e utilizar um valor menor de frequência, de modo que a velocidade não seja alta o suficiente para distorcer o voltamograma.

### 3.3. Validação do método

A Figura 3A apresenta os voltamogramas de onda quadrada para oito diferentes níveis de concentração de paracetamol, entre 0,25 e 1,51 mg L<sup>-1</sup>. Para verificar a linearidade na faixa de concentração investigada foi aplicado inicialmente o teste de Cochran para verificação da homogeneidade das variâncias. Os resultados do teste de Cochran ( $g_{calc} = 0,3725 < g_{critico(0,05; 2,8)} = 0,6798$ ) indicaram que não há heterogeneidade de variância nos dados da curva analítica. Em vista deste resultado, foi realizada uma análise de regressão linear e aplicado um teste de falta de ajuste no nível de 95 % de confiança aos dados da curva analítica de paracetamol. Assim, a Figura 3B mostra as curvas analíticas de adição de padrão para o paracetamol sobre DDB.

Os resultados da análise de regressão linear para a curva analítica são apresentados na Tabela 1. Os valores de  $r$  e  $R^2$  devem ser, respectivamente, próximos a 1 e 100 %. O valor de  $F_{regressão}$  ( $F_{regressão} > F_{crítico}$ ) indica que o modelo gerado pelos dados da curva analítica estabelece uma relação linear entre a concentração e a corrente de pico para o paracetamol<sup>31</sup>. O valor de  $F_{faj}$  ( $F_{faj} < F_{crítico}$ ) sugere que não existe falta de ajuste do modelo linear. Os respectivos valores de  $p < 0,05$  para regressão e de  $p > 0,05$  para o teste de falta de ajuste indicam um bom ajuste do modelo linear aos dados experimentais.

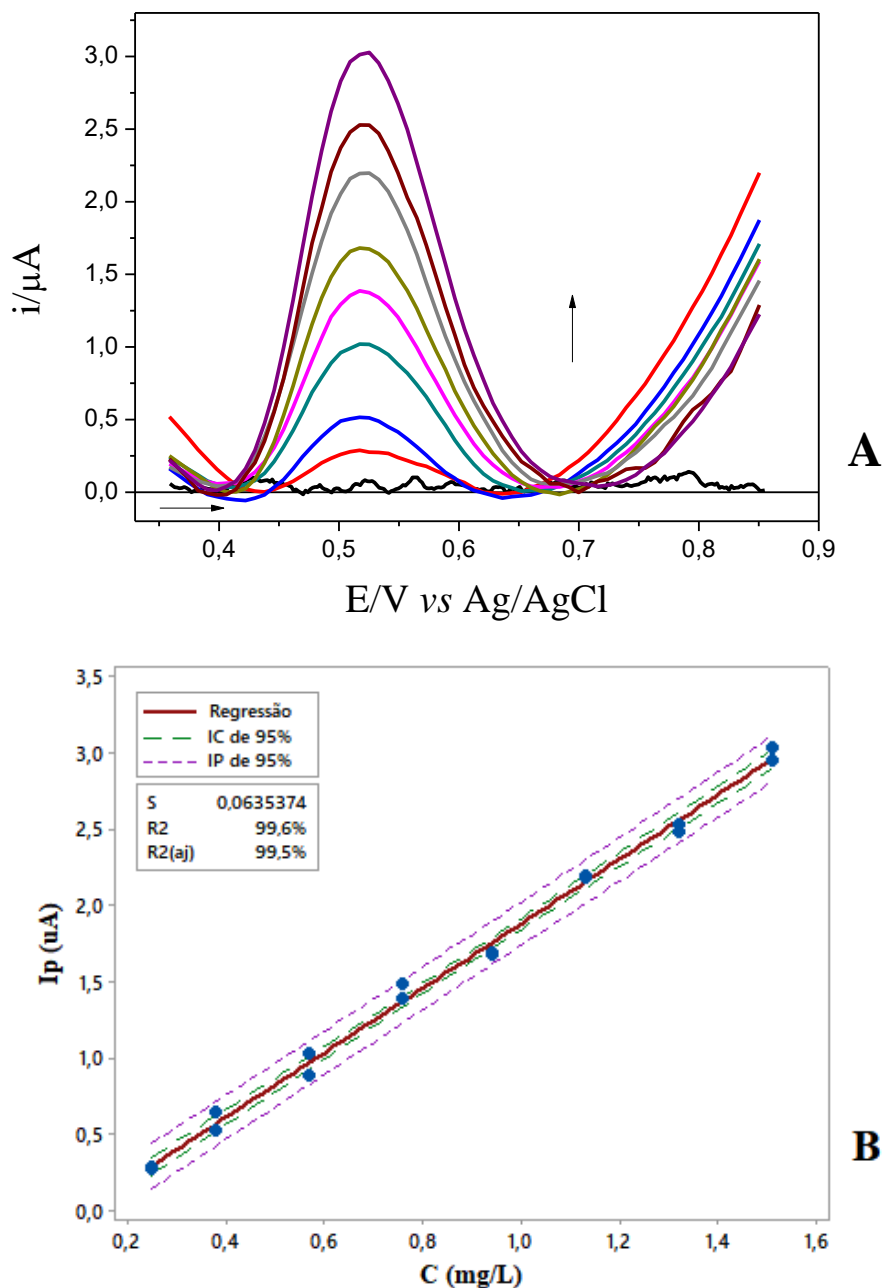
Ademais, foi aplicado um teste- $t$  no nível de 95 % de confiança, visando avaliar a significância dos coeficientes da reta de regressão. Ressalta-se que o sinal negativo indica a direção da relação entre a corrente

de pico e a concentração de paracetamol, de modo que o valor deve ser considerado sempre em módulo. Assim, tanto o intercepto quanto a inclinação apresentam  $t_{observado} > t_{crítico}$ , de forma que há diferença significativa de zero. Também, ambos os valores de  $p$  são menores que 0,05, confirmando a significância estatística dos dois coeficientes da reta.

Os gráficos de resíduos (Figura S3) da análise de regressão indicam que a distribuição dos dados é normal, com variância constante, o que corrobora os resultados do teste de Cochran, confirmando o bom ajuste do modelo linear por meio da regressão linear. Também, nota-se a independência dos resíduos, o que indica que não são originários de qualquer variável desconsiderada durante a análise.

Os limites de detecção e de quantificação calculados foram, respectivamente, 6,25 µg L<sup>-1</sup> e 20,82 µg L<sup>-1</sup>. Tendo em vista que os valores de LD e de LQ foram inferiores ao primeiro ponto da curva analítica, assume-se que o analito pode ser quantificado com precisão e exatidão adequadas na faixa linear de concentrações investigadas.

Os parâmetros analíticos validados de forma intralaboratorial para a determinação de paracetamol pelo método voltamétrico são comparados na Tabela 2, com aqueles reportados em outros métodos, que utilizam também o eletrodo DDB e a técnica de voltametria de onda quadrada, previamente relatados. Nota-se que o limite de detecção é mais baixo do que a maioria dos trabalhos encontrados na literatura e que não há perda de sensibilidade da técnica em uma faixa de trabalho mais restrita. Todavia, é possível justificar uma faixa menor de trabalho devido à aplicação em águas naturais, cuja concentração de paracetamol é muito menor que em fármacos, objeto de análise dos demais trabalhos. Novamente, ressalta-se que este é o primeiro trabalho a validar estatisticamente a determinação de paracetamol, também sendo o único até o momento a avaliar sua aplicabilidade em amostras de águas naturais.



**Figura 3.** (A) Voltamogramas de onda quadrada para a oxidação do paracetamol sobre DDB em diferentes concentrações de paracetamol: Concentrações (paracetamol  $\times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ ): branco (—); 0,25 (—); 0,38 (—); 0,57 (—); 0,76 (—); 0,94 (—); 1,13 (—); 1,32 (—); 1,51 (—). (B) Dados da regressão linear, incluindo os intervalos de confiança e de predição da curva analítica de adição de padrão construída considerando a relação da corrente de pico ( $I_p$ ) em função da concentração de paracetamol ( $f = 100 \text{ Hz}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 8 \text{ mV}$ , tampão B-R  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 8,0). IC = intervalo de confiança, IP = intervalo de predição, S = desvio padrão



**Tabela 1.** Resultados da análise de regressão linear no intervalo de 95 % de confiança

<b>Validação da Linearidade</b>					
<b>Regressão</b>		<b>Falta de ajuste</b>		<b>r</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>F<sub>regressão</sub>*</b>	<b>p</b>	<b>F<sub>faj</sub>**</b>	<b>P</b>		
<b>2859,48</b>	0,000	<b>1,76</b>	0,22	0,997	99,6 %
<b>Coefficientes da reta de regressão</b>				<b>P</b>	
Intercepto = -0,24	-6,34			0,000	
Inclinação = 2,12	53,47			0,000	
<b>Equação da curva de calibração</b>		<b>I<sub>p</sub> (μA) = -0,24 + 2,12 [paracetamol] (mg L<sup>-1</sup>)</b>			

\*F<sub>crítico</sub> (0,025; 1,14) = **4,60**. \*\*F<sub>crítico</sub> (0,025; 6,8) = **3,58**. \*\*\*t<sub>crítico</sub> (0,025; 14) = **2,15**.

**Tabela 2.** Comparação de métodos que utilizam a técnica de voltametria de onda quadrada para determinação de paracetamol sobre DDB

<b>Referência</b>	<b>Faixa de trabalho (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Sensibilidade (μA L mg<sup>-1</sup>)</b>	<b>LD (μg L<sup>-1</sup>)</b>
Eisele <i>et al.</i> <sup>22</sup>	0,03-15,12	1,12x10 <sup>18</sup>	34,77
Lourenção <i>et al.</i> <sup>19</sup>	0,091-12,55	86,16	69,53
Santos <i>et al.</i> <sup>11</sup>	0,03-14,48	30,23	2,72
Silva <i>et al.</i> <sup>20</sup>	1,00-50,00	110,00	5,00
Svorc <i>et al.</i> <sup>14</sup>	0,06-15,12	35,97	31,74
Este trabalho	0,52-1,51	2,12x10 <sup>3</sup>	6,25

A precisão foi avaliada pelo cálculo dos desvios padrão relativos (DPR) em dois níveis (de repetitividade e de precisão intermediária). De acordo com a AOAC<sup>24</sup>, os valores aceitáveis de DPR para ambos os parâmetros é de até 15,0 %. A repetitividade foi calculada a partir de cinco medidas consecutivas de corrente de pico para uma adição de 0,94 mg L<sup>-1</sup> de paracetamol, resultando em um DPR igual a 3,2 %. A estimativa de precisão intermediária foi determinada a partir de análises realizadas em cinco dias consecutivos, com um DPR igual a 12,0 %.

A exatidão foi avaliada por estudos de recuperação pelo método de adição de

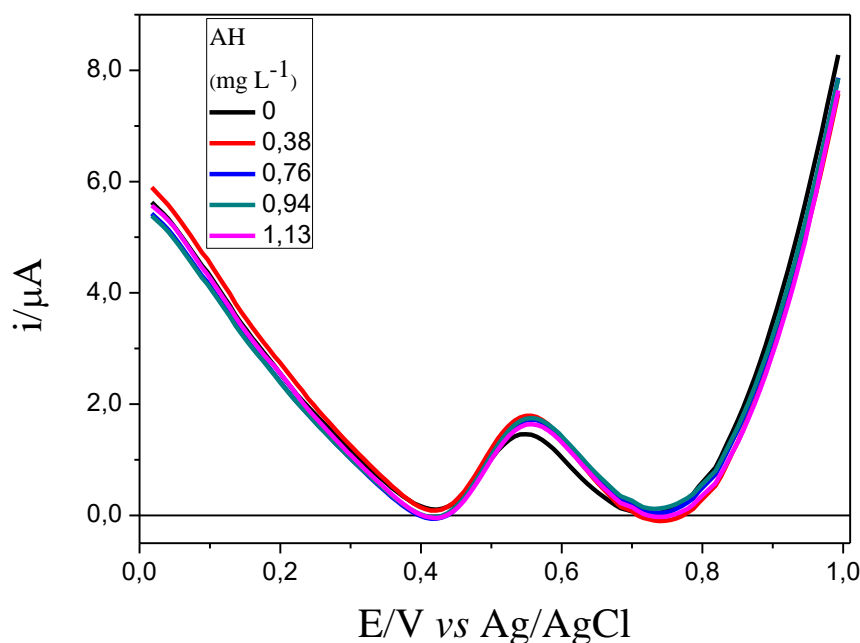
padrão em amostras de águas naturais do rio Juquiá, em Goioxim, Paraná sendo avaliada em três diferentes pontos: próximo à nascente, através da cidade e pouco antes do deságue. Desta maneira, foi possível a avaliação da influência dos interferentes, bem como do efeito de matriz. Os resultados são apresentados na Tabela 3. Pode-se observar que as taxas de recuperação se situaram dentro dos valores recomendados pela AOAC<sup>24</sup>, considerando-se os desvios-padrão associados a cada ensaio de recuperação (60,0 a 115,0 %). Desta forma, pode-se sugerir que o método voltamétrico apresenta exatidão adequada para a análise do paracetamol em amostras reais.

**Tabela 3.** Resultados dos estudos de recuperação em águas naturais

Amostras				
	Água ultrapura	Nascente	Cidade	Foz
<b>Adicionado (<math>\text{mg L}^{-1}</math>)</b>	<b>Recuperação (%)</b>			
0,38	$102,42 \pm 11,16$	$87,01 \pm 2,84$	$116,45 \pm 6,02$	$87,20 \pm 3,64$
0,76	$104,78 \pm 4,17$	$80,16 \pm 1,07$	$112,64 \pm 5,89$	$81,60 \pm 4,79$
1,13	$101,28 \pm 0,50$	$83,64 \pm 2,89$	$112,23 \pm 10,95$	$81,92 \pm 1,36$

A seletividade foi estudada pela adição de quatro níveis de concentração de ácido húmico em solução já contendo  $1,13 \text{ mg L}^{-1}$  de paracetamol (Figura 4). Nota-se que não há aparecimento de picos próximos ao pico característico do paracetamol, que também não sofre deslocamento de potencial. Entretanto, a corrente de pico aumentou ligeiramente ( $1,50 \mu\text{A}$  para paracetamol e

$1,81 \mu\text{A}$  na presença de ácido húmico), de modo que há uma variação de 20,6 % acima do valor de corrente de pico quando comparado com solução apenas de paracetamol. No entanto, pode ser ressaltado que essa interferência não é significativa já que foram obtidas boas estimativas de precisão e exatidão para a metodologia em questão.



**Figura 4.** Estudo de interferência de ácido húmico na determinação de paracetamol sobre DDB ( $f = 100 \text{ Hz}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 8 \text{ mV}$ , tampão B-R  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 8,0). Concentração de paracetamol =  $1,13 \text{ mg L}^{-1}$

## 4. Conclusão

O eletrodo de diamante dopado com boro, aliado à voltametria de onda quadrada, foi empregado no desenvolvimento de uma metodologia eletroanalítica para a quantificação de paracetamol em águas naturais. O método voltamétrico desenvolvido foi validado e os parâmetros da validação intralaboratorial (seletividade, linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão e exatidão) encontraram-se dentro dos limites recomendados na literatura. A seletividade do método foi avaliada em relação à presença de ácido húmico e com base na interferência da matriz. Uma análise de regressão linear mostrou que a curva analítica investigada para o paracetamol apresentou boa linearidade na faixa de concentração estudada. Em relação aos limites de detecção e de quantificação, o método apresentou uma boa sensibilidade analítica quando comparado aos métodos voltamétricos reportados na literatura abordando a quantificação de paracetamol sobre o eletrodo DDB. Este fato mostra a viabilidade do uso da voltametria de onda quadrada e do eletrodo de diamante dopado com boro em análises de compostos orgânicos em níveis traço, especialmente em amostras ambientais. Adicionalmente, o método voltamétrico proposto destaca-se em relação à rapidez e baixo custo, pois não necessita de etapas de pré-tratamento para a concentração do analito, quando comparado a outras técnicas adotadas na análise do paracetamol.

## Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado concedida; Fundação Araucária e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo

financiamento; ao Grupo de Eletroanalítica e Materiais Nanoestruturados (GEMN), Laboratório do Grupo de Análise de Traços e Instrumentação (LabGATI) e a Unicentro pela estrutura.

## Referências Bibliográficas

- <sup>1</sup> González, A. G.; Herrador, M. A. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *TrAC* **2007**, *26*, 227. [CrossRef]
- <sup>2</sup> Van Benschoten, J. J.; Lewis, J. Y.; Heineman, W. R.; Roston, D. A.; Kissinger, P. T. Cyclic Voltammetry Experiment. *Journal of Chemical Education* **1983**, *60*, 772. [CrossRef]
- <sup>3</sup> Thi, V. H. T.; Lee, B. K. Effective photocatalytic degradation of paracetamol using La-doped ZnO photocatalyst under visible light irradiation. *Materials Research Bulletin* **2017**, *96*, 171. [CrossRef]
- <sup>4</sup> Blanchard, C. C.; Istamboulie, G.; Bontoux, M.; Plantard, G.; Goetz, V.; Noguer, T. Biosensor-based real-time monitoring of paracetamol photocatalytic degradation. *Chemosphere* **2015**, *131*, 124. [CrossRef][PubMed]
- <sup>5</sup> Wu, S.; Zhang, L.; Chen, J. Paracetamol in the environment and its degradation by microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2012**, *96*, 875. [CrossRef][PubMed]
- <sup>6</sup> Guiloski, I. C.; Ribas, J. L. C.; Piacini, L. D. S.; Dagostim, A. C.; Cirio, S. M.; Fávaro, L. F.; Boschen, S. L.; Cestari, M. M.; Cunha, C.; Assis, H. C. S. Paracetamol causes endocrine disruption and hepatotoxicity in male fish *Rhamdia quelen* after subchronic exposure. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **2017**, *53*, 111. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>7</sup> Berto, S.; Carena, L.; Valmacco, F.; Barolo, C.; Conca, E.; Vione, D.; Buscaino R.; Fiorito, M.; Bussi, C.; Abollino, O.; Malandrino, M. Application of an electro-activated glassy-carbon electrode to the determination of acetaminophen (paracetamol) in surface

- waters. *Electrochimica Acta* **2018**, 284, 279. [[CrossRef](#)]
- <sup>8</sup> El Bouabi, Y.; Farahi, A.; Labjar, N.; El Hajjaji, S.; Bakasse, M.; El Mhammedi, M. A. Square wave voltammetric determination of paracetamol at chitosan modified carbon paste electrode: Application in natural water samples, commercial tablets and human urines. *Materials Science and Engineering C* **2016**, 58, 70. [[CrossRef](#)]
- <sup>9</sup> Mao, A.; Li, H.; Jin, D.; Yu, L.; Hu, X. Fabrication of electrochemical sensor for paracetamol based on multi-walled carbon nanotubes and chitosan–copper complex by self-assembly technique. *Talanta* **2015**, 144, 252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>10</sup> Chitravathi, S.; Munichandraiah, N. Voltammetric determination of paracetamol, tramadol and caffeine using poly(Nile blue) modified glassy carbon electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2016**, 764, 93. [[CrossRef](#)]
- <sup>11</sup> Santos, A. M.; Vicentini, F. C.; Deroco, P. B.; Rocha-Filho, R. C.; Fatibello-Filho, O. Square-Wave Voltammetric Determination of Paracetamol and Codeine in Pharmaceutical and Human Body Fluid Samples Using a Cathodically Pretreated Boron-Doped Diamond Electrode. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **2015**, 26, 2159. [[CrossRef](#)]
- <sup>12</sup> Tyszczyk-Rotko, K.; Beczkowska, I.; Wójciak-Kosior, M.; Sowa, I. Simultaneous voltammetric determination of paracetamol and ascorbic acid using a boron-doped Diamond electrode modified with Nafion and lead films. *Talanta* **2014**, 129, 384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>13</sup> Pereira, P. F.; Marra, M. C.; Lima, A. B.; Santos, W. T. P.; Munoz, R. A. A.; Ritcher, E. M. Fast and simultaneous determination of nimesulide and paracetamol by batch injection analysis with amperometric detection on bare boron-doped diamond electrode. *Diamond and Related Materials* **2013**, 39, 41. [[CrossRef](#)]
- <sup>14</sup> Svorc, L.; Sochr, J.; Tomčík, P.; Rievaj, M.; Bustin, D. Simultaneous determination of paracetamol and penicillin V by square-wave voltammetry at a bare boron-doped diamond electrode. *Electrochimica Acta* **2012**, 68, 227. [[CrossRef](#)]
- <sup>15</sup> Tyszczyk-Rotko, K.; Sadok, I. The New Application of Boron Doped Diamond Electrode Modified with Nafion and Lead Films for Simultaneous Voltammetric Determination of Dopamine and Paracetamol. *Electroanalysis* **2016**, 28, 2178. [[CrossRef](#)]
- <sup>16</sup> Lima, A. B.; Torres, L. M. F. C.; Guimarães, C. F. R. C.; Verly, R. M.; Silva, L. M.; Carvalho Junior, A. D.; Santos, W. T. P. Simultaneous Determination of Paracetamol and Ibuprofen in Pharmaceutical Samples by Differential Pulse Voltammetry Using a Boron-Doped Diamond Electrode. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2014**, 25, 478. [[CrossRef](#)]
- <sup>17</sup> Santos, A. M.; Vicentini, F. C.; Figueiredo-Filho, L. C. S.; Deroco, P. B.; Fatibello-Filho, O. Flow injection simultaneous determination of acetaminophen and tramadol in pharmaceutical and biological samples using multiple pulse amperometric detection with a boron-doped diamond electrode. *Diamond and Related Materials* **2015**, 60, 1. [[CrossRef](#)]
- <sup>18</sup> Sadok, I.; Rotko, K. T.; Wiercinska, A. N. Bismuth particles Nafion covered boron-doped diamond electrode for simultaneous and individual voltammetric assays of paracetamol and caffeine. *Sensors and Actuators B* **2016**, 235, 263. [[CrossRef](#)]
- <sup>19</sup> Lourenção, B. C., Medeiros, R. A., Rocha-Filho, R. C., Mazoa, L. H., Fatibello-Filho, O. Simultaneous Voltammetric Determination of Paracetamol and Caffeine in Pharmaceutical Formulations Using a Boron-Doped Diamond Electrode. *Talanta* **2009**, 78, 748. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>20</sup> Silva, W. P.; Silva, L. A. J.; França, C. H.; Sousa, R. M. F.; Muñoz, R. A. A.; Ritcher, E. T. Square-wave Voltammetric Determination of Propyphenazone, Paracetamol, and Caffeine: Comparative Study between Batch Injection Analysis and Conventional Electrochemical

- Systems. *Electroanalysis* **2017**, *29*, 1860. [[CrossRef](#)]
- <sup>21</sup> Chaves, S. C.; Aguiar, P. N. C.; Torres, L. M. F. C.; Gil, E. S.; Luz, R. C. S.; Damos, F. S.; Munoz, R. A. A.; Ritcher, E. M.; Santos, W. T. P. Simultaneous Determination of Caffeine, Ibuprofen, and Paracetamol by Flow-injection Analysis with Multiplepulse Amperometric Detection on Boron-doped Diamond Electrode. *Electroanalysis* **2015**, *27*, 2785. [[CrossRef](#)]
- <sup>22</sup> Eisele, A. P. P.; Clausen, D. N. C.; Tarley, C. R. T.; Dall'Antonia, L. H.; Sartori, E. R. Simultaneous Square-Wave Voltammetric Determination of Paracetamol, Caffeine and Orphenadrine in Pharmaceutical Formulations Using a Cathodically Pretreated Boron-Doped Diamond Electrode. *Electroanalysis* **2013**, *25*, 1734. [[CrossRef](#)]
- <sup>23</sup> Yigit, A.; Yardim, Y.; Sentürk, Z. Voltammetric Sensor Based on Boron-Doped Diamond Electrode for Simultaneous Determination of Paracetamol, Caffeine and Aspirin in Pharmaceutical Formulations. *IEEE Sensors Journal* **2016**, *16*, 1674. [[CrossRef](#)]
- <sup>24</sup> AOAC, Association of Official Analytical Chemists. *Guideline for Standard Method Performance Requirements: Appendix F*, **2016**. [[Link](#)]
- <sup>25</sup> Magnusson, B.; Örnemark, U.; *Eurachem guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, 2014. [[Link](#)]
- <sup>26</sup> IUPAC: Technical Report, Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Applied Chemistry* **2002**, *74*, 835. [[Link](#)]
- <sup>27</sup> Yagi, I.; Ishida, T.; Uosaki, K. Electrocatalytic reduction of oxygen to water at Au nanoclusters vacuum-evaporated on boron-doped diamond in acidic solution. *Electrochemistry Communications* **2004**, *6*, 773. [[CrossRef](#)]
- <sup>28</sup> ICH: *Validation of analytical procedures:Text and methodology Q2(R1)*, 2005. [[Link](#)]
- <sup>29</sup> Suffredini, H. B.; Pedrosa, V. A.; Codognoto, L., Rocha-Filho, R. C.; Avaca, L. A. Enhanced electrochemical response of boron-doped diamond electrodes brought on by a cathodic surface pre-treatment. *Electrochimica Acta* **2004**, *49*, 4021. [[CrossRef](#)]
- <sup>30</sup> Mirceski, V.; Gulaboski, R. The Surface Catalytic Mechanism: A Comparative Study with Square-Wave and Staircase Cyclic Voltammetry. *Journal of Solid State Electrochemistry* **2003**, *7*, 157. [[CrossRef](#)]
- <sup>31</sup> NATA: National Association of Testing Authorities. *Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative methods*. Technical Note 17. Australia, 2013. [[Link](#)]