



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
GRUPO DE ELETROQUÍMICA E CORROSÃO**

CRISTIANE MARIA SAMPAIO FORTE

**DETERMINAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CEFALEXINA E CEFUROXIMA
EM DIFERENTES MATRIZES UTILIZANDO TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS**

**FORTALEZA
2012**

CRISTIANE MARIA SAMPAIO FORTE

**DETERMINAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CEFALEXINA E CEFUROXIMA
EM DIFERENTES MATRIZES UTILIZANDO TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS**

Tese de Doutorado apresentada à Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como um dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química (área de concentração Química Analítica)

Orientadora: Prof. Dra. Adriana Nunes Correia

**FORTALEZA
2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

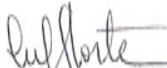
F841d Forte, Cristiane Maria Sampaio.
Determinação e quantificação de cefalexina e cefuroxima em diferentes matrizes utilizando
técnicas eletroquímicas / Cristiane Maria Sampaio Forte. – 2012.
100 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Química
Analítica e Físico-Química. Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2012.
Área de Concentração: Química Analítica.
Orientação: Profa. Dra. Adriana Nunes Correia

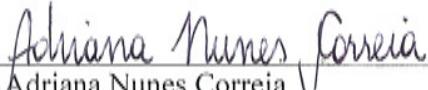
1. Cefuroxima. 2. Cefalexina. 3. Técnicas eletroquímicas. 4. Voltometria. I. Título.

CDD 545

Esta Tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Química, área de concentração Química Analítica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e em cuja Biblioteca Central encontra-se à disposição dos interessados.


Cristiane Maria Sampaio Forte

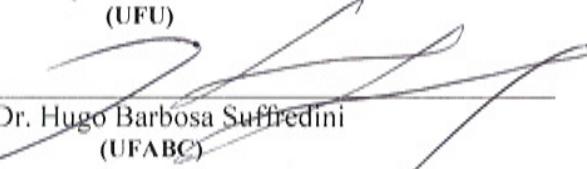
Tese aprovada em: 10/08/2012


Dra. Adriana Nunes Correia

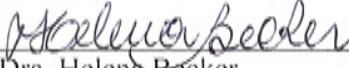
(Orientadora-UFC)


Dra. Djenaine de Souza

(UFU)


Dr. Hugo Barbosa Suffredini

(UFABC)


Dra. Helena Becker

(UFC)


Dr. Pedro de Lima Neto

(UFC)

*Aos meus pais, Manoel e Margarida
e a minha filha Margaridinha, razões
da minha existência.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu a vida e é o meu rochedo e minha Salvação.

Aos meus pais, Manoel e Margarida, mesmo não estando mais presentes fisicamente, continuam guiando meus passos e me protegendo com suas orações. A eles minha gratidão em reconhecimento ao amor incondicional a mim devotado, e pelo exemplo de vida que norteia minha existência.

À minha filhinha Margarida de Maria, grande prova do Amor de Deus na minha vida, que me brinda todos os dias com um sorriso que me renova e me dá forças para seguir em frente.

À Universidade Estadual do Ceará (UECE), pela liberação para realização deste curso e aos colegas professores do Curso de Química da Faculdade de Educação de Itapipoca (FACEDI) pelo apoio e incentivo.

À Universidade Federal do Ceará (UFC), ao Programa de Pós-Graduação em Química e ao GELCORR, pela possibilidade da realização deste curso.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo apoio financeiro através da bolsa de doutorado.

À Profa. Dra. Adriana Nunes Correia, pela orientação, apoio, amizade e confiança. Obrigada pelo grande incentivo para encarar este desafio e por contribuir para o meu crescimento pessoal e profissional. Com certeza foi um tempo de grande aprendizado.

Ao Prof. Dr. Pedro de Lima Neto, sempre presente nesta etapa da minha formação, agradeço por suas sugestões.

À Profa. Dra. Djenaine de Souza e ao Prof. Dr. Hugo Barbosa Suffredini por suas valiosas contribuições com a versão final desse trabalho.

Aos professores da Pós-Graduação em Química da UFC, que contribuíram para esta etapa da minha formação, em especial ao professor Ronaldo Ferreira do Nascimento, pelas preciosas aulas de Química Analítica Avançada.

À Profa. Helena Becker pelas amostras de água, apoio, valiosas sugestões e contribuição ao longo de toda minha formação, desde os tempos de Química Analítica I.

A todos os amigos do GELCORR, companheiros na luta, pela parceria e incentivo nos momentos mais difíceis e pela alegria nos momentos de descontração. Em especial aos amigos, Célia, Sanderlir, Leandro, Rafael, Wirley e Naftali pela amizade e carinho.

À minha família, em especial às minhas irmãs: Itinha, Pedrina, Lúcia, Socorro, Fátima, Cecília, Célia e Ruth, que juntas formamos o time das “nove meninas do Sr. Manoel”, por serem ao longo de toda minha vida, um porto seguro e por me apoiarem das mais diversas formas em todos os momentos da minha vida.

Ao meu cunhado José Berezuk, por me acompanhar sempre tão de perto, torcer por mim em cada batalha e vibrar em cada conquista, por seu apoio, por sua admiração e por festejar, ao lado da Lúcia, cada etapa da minha formação profissional e da minha vida pessoal, valeu Zé!

À minha sobrinha Priscila, que na reta final deste trabalho exerceu um papel importantíssimo sendo a “babá 2” da Margaridinha.

Ao Ésio, pelo apoio e força, pela presença naqueles momentos em que tudo parecia dar errado, e, principalmente, por ter sonhado junto e desejado ser o pai da nossa Margarida! O amor é o que o amor faz.

Enfim, a todas as pessoas, que mesmo não sendo aqui citadas, estão presentes na minha vida, fazem parte da minha história e, portanto foram importantes para que esse momento fosse possível.

Muito Obrigada!

“Um grande erro: crer-se mais importante do que se é e estimar-se menos do que se vale”

Johann Goethe

*"Foi o melhor dos tempos e o pior dos tempos,
a idade da sabedoria e da insensatez,
a era da fé e da incredulidade,
a primavera da esperança e o inverno do
desespero.*

Tínhamos tudo e nada tínhamos."

Charles Dickens, séc. XIX

RESUMO

Este trabalho descreve o comportamento eletroquímico dos antibióticos cefuroxima (CFX) e cefalexina (CFA) por voltametria cíclica (VC) e o desenvolvimento de metodologia eletroanalítica por voltametria de onda quadrada (VOQ) para a determinação de CFX e de CFA sobre eletrodo de gota pendente de mercúrio (HMDE, do inglês *Hanging Mercury Drop Electrode*). CFX apresentou dois processos catódicos irreversíveis em -0,35 V (pico 1) e em -1,03 V (pico 2), com a participação de dois elétrons e dois prótons tanto para o pico 1 como para o pico 2. Sugere-se que a reação de redução da molécula de CFX ocorre no grupo – C = N – para o pico 1 e no grupo – CH₂ – R para o pico 2. Os parâmetros experimentais e voltamétricos foram otimizados, com as respostas sendo obtidas em tampão BR pH 2,0, $f = 90 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados utilizando-se o pico 1, com LD = $4,92 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ e LQ = $1,64 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e recuperação 109,15% com desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standart Deviation*) de 2,39% ($n = 3$) em eletrólito de suporte. A metodologia desenvolvida foi aplicada em amostras de medicamentos, leite bovino e águas naturais, com recuperações variando de 96,40 a 129,4%. Para CFA constatou-se a presença de processos catódicos em -0,97 V (pico 1) e em -1,2 V (pico 2). Nesse caso, tem-se que a redução ocorre na dupla ligação do grupo etilênico envolvendo a transferência de dois elétrons e dois prótons. Os parâmetros experimentais e voltamétricos foram avaliados com as respostas otimizadas sendo obtidas em tampão BR pH 2,0, $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$. Considerando-se o pico em -1,2 V, curvas analíticas foram construídas, a partir delas os limites de detecção e de quantificação foram calculados, LD = $1,27 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e LQ = $4,23 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ com recuperação de 89,19% com RSD = 1,51% ($n = 3$) em eletrólito de suporte. A metodologia foi aplicada na quantificação de amostras de medicamentos, leite bovino e águas naturais, com percentuais de recuperação variando de 78,45 a 92,13%. Nas metodologias desenvolvidas, foram obtidos baixos valores de LD e de LQ, recuperação entre 78,00-130,0% e precisão intermediária com RSD < 5,00%, mostrando que estas metodologias apresentam ótima sensibilidade, eficiência e precisão.

Palavras-Chaves: Cefuroxima. Cefalexina. HMDE. Voltametria cíclica. Voltametria de onda quadrada. Águas naturais. Leite bovino.

ABSTRACT

The present work describes the electrochemical behavior of the antibiotic cefuroxime (CFX) and cephalexin (CFA) by cyclic voltammetry (CV) and the development of an electroanalytical methodology for CFX and CFA determination on mercury electrodes allied to the square wave voltammetry (SWV). In this work, CFX showed two irreversible reduction peak at -0.35 V (peak 1) and -1.03 V (peak 2), with the participation of two electrons and two protons for both peaks. It is suggested that the reduction reaction of the CFX occurs on the group – C = N – for the peak one and on the group – CH₂ – R for the peak two. Under optimized conditions, the results were obtained in BR buffer pH 2.0, $f = 90 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$ and $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. Considering the peak 1, analytical curves were constructed and the limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) were calculated with LOD = $4.92 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ and LOQ = $1.64 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. The recovery in electrolyte was 109.15% with RSD = 2.39% ($n = 3$). The methodology was applied in raw natural waters, commercial formulations and bovine milk obtaining recovery values from 96.40 to 129.4%. CFA reductions waves are observed at -0.97 V (peak 1) and -1.2 V (peak 2). These reduction waves are attributed to the reduction of ethylenic bond of CFA involving the transfer of two electrons and two protons. The optimized conditions were obtained in BR buffer pH 2.0, $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$ and $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$. Considering the peak at -1.2 V, analytical curves were constructed and were calculated with LOD = $1.27 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ and LOQ = $4.23 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. The recovery in electrolyte was 89.19% with RSD = 1.51% ($n = 3$). The methodology was applied to quantify in raw natural waters, commercial formulations and bovine milk obtaining recovery values from 78.45 to 92.13%. In developed methodologies, we obtained low values of LOD and LOQ, recovery between 78.00 to 130.00% and reproducibility below 5.00%, showing that those methods had excellent sensitivity, precision and efficiency.

Keywords: Cefuroxime. Cephalexin. HMDE. Cyclic voltammetry. Square wave voltammetry. Natural waters. Bovine milk.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Cefalosporinas	21
1.1.1 Cefalexina.....	23
1.1.2 Cefuroxima	24
1.2 Determinação de cefalexina e cefuroxima.....	25
2.1 Objetivo geral	36
2.2 Objetivos específicos	36
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Instrumentação.....	37
3.2 Eletrodos	37
3.3 Célula eletroquímica.....	37
3.4 Reagentes e Soluções	37
3.4.1 Reagentes.....	37
3.4.2 Soluções tampões.....	38
3.4.3 Soluções dos padrões de cefalexina e cefuroxima.....	39
3.4.4 Soluções da formulação comprimido de cefalexina e cefuroxima	39
3.4.5 Soluções da formulação suspensão de cefalexina e cefuroxima	40
3.4.6 Solução de amostra de leite bovino	40
3.5 Metodologia de trabalho.....	41
3.5.1 Voltametria cíclica	41
3.5.2 Voltametria de onda quadrada.....	41
3.5.3 Aplicação da metodologia desenvolvida	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 Cefuroxima	43

<i>4.1.1 Estudos preliminares</i>	43
<i>4.1.3 Voltametria de Onda Quadrada</i>	52
<i>4.1.4 Construção das curvas analíticas</i>	58
<i>4.1.6 Aplicação da metodologia em medicamentos</i>	65
<i>4.1.7 Aplicação da metodologia em leite bovino</i>	67
<i>4.1.8 Aplicação da metodologia em água natural</i>	69
4.2 Cefalexina.....	73
<i>4.2.1 Estudos preliminares</i>	73
<i>4.2.3 Voltametria de onda quadrada</i>	79
<i>4.2.3 Construção das curvas analíticas</i>	85
<i>4.2.5 Aplicação da metodologia em medicamentos</i>	89
<i>4.2.6 Aplicação da metodologia em leite bovino</i>	91
<i>4.2.7 Aplicação da metodologia em água natural</i>	93
5 CONCLUSÕES	95
REFERÊNCIAS	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura geral das cefalosporinas.....	22
Figura 2 – Fórmula estrutural da cefalexina.....	23
Figura 3 – Fórmula estrutural da cefuroxima	24
Figura 4 – Proposta de mecanismo para a reação de redução de CFA, sobre HMDE, em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ pH 2,0, segundo Xu <i>et al.</i>	30
Figura 5 – Mecanismo para a reação de redução (pico 1) de CFX, sobre HMDE, em meio de tampão BR0,04 mol L ⁻¹ pH 2,0 segundo Sengün <i>et al.</i>	31
Figura 6 – Mecanismo para a reação de redução (pico 2) de CFX, sobre HMDE, em meio de tampão BR0,04 mol L ⁻¹ pH 2,0 Sengün <i>et al.</i>	31
Figura 7 – Padrão típico de excitação do sinal para a voltametria cíclica.....	33
Figura 8 – Forma de aplicação do potencial na voltametria de onda quadrada.....	34
Figura 9 – Voltamogramas cílicos para CFX 2,91x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ sobre HMDE, em diferentes eletrólitos de suporte ajustados em pH = 4,0. v = 100 mV s ⁻¹	44
Figura 10 – Voltamogramas de onda quadrada para CFX 2,91x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ , sobre HMDE, em diferentes eletrólitos de suporte ajustados em pH = 4,0. <i>f</i> = 100 s ⁻¹ , <i>a</i> = 50 mV e ΔE_s = 2 mV.....	44
Figura 11 – Voltamogramas de onda quadrada para CFX 2,91x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ , sobre HMDE em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ sobre HMDE em diferentes valores de pH. <i>f</i> = 100 s ⁻¹ , <i>a</i> = 50 mV e ΔE_s = 2 mV.....	45
Figura 12 – Relação entre intensidade da corrente de pico (pico1) e pH obtida a partir dos voltamogramas de onda quadrada da Figura 11	46
Figura 13 – Relação entre potencial de pico de redução e pH obtida a partir dos voltamogramas cílicos de CFX 2,91x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ , sobre HMDE,em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ . v = 100 mV s ⁻¹	46
Figura 14 – Voltamogramas cílicos de CFX 2,91x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ , sobre HMDE, em meio de tampão BR pH 2,0. v = 100 mV s ⁻¹	47

Figura 15 – Voltamogramas cíclicos de CFX $2,91 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ , sobre HMDE, em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ pH 2,0. Velocidades de varredura entre 10 e 500 mV s ⁻¹	48
Figura 16 – Relações entre potencial de pico e logaritmo da velocidade de varredura para (A) Pico 1 e (B) Pico 2 obtidas a partir dos voltamogramas cíclicos da Figura 15	49
Figura 17 – Relação entre corrente de pico e velocidade de varredura para CFX $1,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos da Figura 15	50
Figura 18 – Relação entre o logaritmo da corrente de pico e o logaritmo da velocidade de varredura para CFX $1,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos da Figura 15.....	51
Figura 19 – Componentes de corrente obtidas a partir do voltamograma de onda quadrada de CFX $2,9 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ , sobre HMDE, em meio de tampão BR pH 2,0. $f = 100$ s ⁻¹ , $a = 50$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV	52
Figura 20 – Voltamogramas de onda quadrada para CFX $2,91 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ em tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ pH 2,0, sobre HMDE em diferentes frequências de aplicação de pulsos de potencial com $a = 50$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV	54
Figura 21– Relação entre intensidade da corrente de pico e frequência de aplicação dos pulsos de potencial obtida a partir dos voltamogramas de onda quadrada da Figura 20, para CFX $2,91 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ , sobre HMDE, em tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ pH 2,0. $a = 50$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV	54
Figura 22 – Relação entre potenciais de pico e logaritmo da frequência de aplicação dos pulsos de potencial para o pico 1 e pico 2 em (A) e (B), respectivamente, obtida a partir dos voltamogramas de onda quadrada,da Figura 20, para CFX $2,91 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ , sobre HMDE, em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ pH 2,0. $a = 50$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV.....	55
Figura 23 – (A) Voltamogramas de onda quadrada para CFX $2,91 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ , sobre HMDE, em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ pH 2,0, em diferentes amplitudes de pulsos de potencial. $f = 100$ s ⁻¹ e $\Delta E_s = 2$ mV. (B) Relação entre intensidade da corrente de pico e amplitude de aplicação dos pulsos de potencial obtida a partir dos voltamogramas de onda quadrada da Figura 23A.....	56
Figura 24 – (A) Voltamogramas de onda quadrada para CFX $2,91 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ , sobre HMDE, em tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ pH 2,0, em diferentes incrementos de aplicação de pulsos de potencial. $f = 100$ s ⁻¹ e $a = 50$ mV. (B) Relação entre intensidade da	

corrente de pico e incremento de varredura obtida a partir dos voltamogramas de onda quadrada da Figura 24A	58
Figura 25 – Voltamograma de onda quadrada para CFX $2,91 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ , sobre HMDE, em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ pH 2,0, com concentrações variando de $3,74 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹ a $3,61 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ . $f = 90$ s ⁻¹ , $a = 30$ mV e $\Delta E_s = 3$ mV.....	59
Figura 26 – Curva analítica para CFX, sobre HMDE, obtida a partir dos valores médios (n = 5) das correntes de pico com concentração, com suas respectivas barras de desvio padrão. $f = 90$ s ⁻¹ , $a = 30$ mV e $\Delta E_s = 3$ mV.....	60
Figura 27 – Curva de recuperação para CFX, sobre HMDE, em eletrólito de suporte, obtida a partir de valores médios (n = 3) de I_{pico} vs. [CFX], em meio de tampão BR pH 2,0. $f = 90$ s ⁻¹ , $a = 30$ mV e $\Delta E_s = 3$ mV.....	64
Figura 28 – (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes concentrações para recuperação em comprimido Zinnat®, sobre HMDE, em meio de tampão BR pH 2,0. $f = 90$ s ⁻¹ , $a = 30$ mV e $\Delta E_s = 3$ mV. (B) Relação entre corrente de pico e concentração de CFX para curva de recuperação em comprimido Zinnat®	66
Figura 29 – (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes concentrações para recuperação em suspensão oral de Zinnat®, sobre HMDE, em meio de tampão BR pH 2,0. $f = 90$ s ⁻¹ , $a = 30$ mV e $\Delta E_s = 3$ mV. (B) Relação entre corrente de pico e concentração de CFX para curva de recuperação em suspensão oral de Zinnat®	66
Figura 30 – (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes concentrações para recuperação em leite contendo CFX $2,00 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ , sobre HMDE, em meio de tampão BR pH 2,0. $f = 90$ s ⁻¹ , $a = 30$ mV, $\Delta E_s = 3$ mV. (B) Relação entre corrente de pico e concentração de CFX para curva de recuperação em leite.	69
Figura 31 – (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes concentrações para recuperação no eletrólito em meio de 2 mL de água natural + 18 mL de tampão BR pH 2,0 sobre HMDE com $f = 90$ s ⁻¹ , $a = 30$ mV e $\Delta E_s = 3$ mV (B) Relação entre corrente de pico e concentração de CFX para curva de recuperação em água natural	70
Figura 32 – Curvas analíticas para CFX sobre HMDE, em eletrólito de suporte preparado com água Milli-Q e em água de rio (2 mL de água do Açude Gavião + 18mL de tampão BR pH 2,0), nas condições otimizadas.....	71

Figura 33 – Relação entre corrente de pico e concentração de CFX para curva de recuperação em água natural contendo CFX $2,00 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ , sobre HMDE, em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ pH 2,0, $f = 90$ s ⁻¹ , $a = 30$ mV e $\Delta E_s = 3$ mV	72
Figura 34 – Voltamogramas cíclicos para CFA $2,91 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ , sobre HMDE, em diferentes eletrólitos de suporte todos ajustados para pH = 2,5. $v = 100$ mV s ⁻¹	73
Figura 35 – Voltamogramas de onda quadrada para CFA $2,91 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ , sobre HMDE, em diferentes eletrólitos de suporte, todos ajustados para pH = 2,5. $f = 100$ s ⁻¹ , $a = 50$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV	74
Figura 36 – Relação entre intensidade da corrente de pico e pH obtida a partir dos voltamogramas de onda quadrada para CFA $2,91 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ , sobre HMDE, em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ em diferentes valores de pH. $f = 100$ s ⁻¹ , $a = 50$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV	75
Figura 37 – Voltamogramas cíclicos para CFA $2,91 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ , sobre HMDE, em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ pH 2,0. velocidade de varredura de 20 até 800 mV s ⁻¹	76
Figura 38 – Relação entre o logaritmo da corrente de pico e o logaritmo da velocidade de varredura para CFA $2,91 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos da Figura 37.....	77
Figura 39 – Relação entre logaritmo da corrente de pico e logaritmo da velocidade de varredura para CFA $1,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos da Figura 36.....	78
Figura 40 – Componentes de corrente obtidas para voltamograma de onda quadrada para CFA $2,9 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ , sobre HMDE, em meio de tampão BR pH 2,0. $f = 100$ s ⁻¹ , $a = 50$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV	79
Figura 41 – Voltamogramas de onda quadrada para CFX $2,91 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ ,sobre HMDE,em tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ pH 2,0, em diferentes freqüências de aplicação de pulsos de potencial. $a = 50$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV	80
Figura 42 – Relação entre intensidade da corrente de pico e frequência de aplicação dos pulsos de potencial obtida a partir dos voltamogramas de onda quadrada, da Figura 40, para CFA $2,91 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ , sobre HMDE, em tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ pH 2,0. $a = 50$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV.....	81

Figura 43 – Relação entre potenciais de pico e logaritmo da frequência de aplicação dos pulsos de potencial, para CFA $2,91 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ , sobre HMDE, em tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ pH 2,0. $a = 50$ mV, $\Delta E_s = 2$ mV, $E_{acu} = -0,7$ V e $t_{acu} = 15$ s obtida a partir dos voltamogramas de onda quadrada da Figura 42	82
Figura 44 – (A) Voltamogramas de onda quadrada para CFA $2,91 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ , sobre HMDE, em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ pH 2,0, em diferentes amplitudes de pulsos de potencial com $f = 100$ s ⁻¹ e $\Delta E_s = 2$ mV. (B) Relação entre intensidade da corrente de pico e amplitude de aplicação dos pulsos de potencial obtida a partir dos voltamogramas de onda quadrada da Figura 44A	83
Figura 45 – (A) Voltamogramas de onda quadrada para CFA $2,91 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ , sobre HMDE, em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ pH 2,0, em diferentes incrementos de aplicação de pulsos de potencial, $f = 100$ s ⁻¹ e $a = 50$ mV. (B) Relação entre intensidade da corrente de pico e incremento de varredura obtida a partir dos voltamogramas de onda quadrada da Figura 46A	84
Figura 46 – Voltamogramas de onda quadrada para CFA $2,91 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ , sobre HMDE, em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ pH 2,0, com concentrações variando de $7,44 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹ a $3,96 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ . $f = 100$ s ⁻¹ , $a = 30$ mV, $\Delta E_s = 4$ mV, $E_{acu} = -0,70$ V e $t_{acu} = 15$ s.....	85
Figura 47 – Curva de recuperação para CFA em eletrólito de suporte, obtida a partir de valores médios ($n = 3$) de I_{pico} vs. [CFA], em meio de tampão BR pH 2,0 sobre HMDE com $f = 100$ s ⁻¹ , $a = 30$ mV, $\Delta E_s = 4$ mV, $E_{acu} = -0,70$ V e $t_{acu} = 15$ s.....	88
Figura 48 – (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes concentrações para recuperação em comprimido Keflex®, sobre HMDE, em meio de tampão BR pH 2,0. $f = 100$ s ⁻¹ , $a = 30$ mV, $\Delta E_s = 4$ mV, $E_{acu} = -0,70$ V e $t_{acu} = 15$ s. (B) Relação entre corrente de pico e concentração de CFA para curva de recuperação em comprimido Keflex®	90
Figura 49 – (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes concentrações para recuperação em suspensão oral de Keflex®, sobre HMDE, em meio de tampão BR pH 2,0. $f = 100$ s ⁻¹ , $a = 30$ mV, $\Delta E_s = 4$ mV, $E_{acu} = -0,70$ V e $t_{acu} = 15$ s. (B) Relação entre corrente de pico e concentração de CFA para curva de recuperação em suspensão oral de Keflex®	90

Figura 50 – (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes concentrações para recuperação em leite contendo CFA $2,00 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, sobre HMDE, em meio de tampão BR pH 2,0. $f = 100$ s⁻¹, $a = 30$ mV, $\Delta E_s = 4$ mV, $E_{acu} = -0,70$ V e $t_{acu} = 15$ s. (B) Relação entre corrente de pico e concentração de CFA para curva de recuperação em leite 92

Figura 51 – (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes concentrações para recuperação em meio de 2mL de água natural + 18 mL de tampão BR pH 2,0 sobre HMDE com $f = 100$ s⁻¹, $a = 30$ mV, $\Delta E_s = 4$ mV, $E_{acu} = -0,70$ V e $t_{acu} = 15$ s. (B) Relação entre corrente de pico e concentração de CFA para curva de recuperação em água natural 93

Figura 52 – Relação entre corrente de pico e concentração de CFA, sobre HMDE, para curva de recuperação em água natural contendo CFA $2,00 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ em meio de tampão BR $0,04$ mol L⁻¹ pH 2,0. $f = 100$ s⁻¹, $a = 30$ mV, $\Delta E_s = 4$ mV, $E_{acu} = -0,70$ V e $t_{acu} = 15$ s..... 94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lista de reagentes analíticos utilizados com as respectivas procedências.....	38
Tabela 2– Resultados obtidos para regressão linear das curvas de trabalho para CFX sobre HMDE em eletrólito de suporte (tampão BR 0,04 mol L ⁻¹) por VOQ. A varredura se deu na faixa de potencial de 0 V até 1,1 V. $f = 90 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$	62
Tabela 3 – Resultados obtidos para curvas de recuperação de CFX, sobre HMDE, em eletrólito em meio de tampão BR pH 2,0. $f = 90 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$	65
Tabela 4 – Resultados obtidos para curvas de recuperação de CFX, sobre HMDE, em medicamentos por VOQ. $f = 90 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$. [CFX] _{adicionalada} = $1,11 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	67
Tabela 5 – Resultados obtidos para curvas de recuperação de CFX, sobre HMDE, em leite bovino por VOQ. $f = 90 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$	69
Tabela 6 – Parâmetros calculados a partir das curvas analíticas para CFA, sobre HMDE, em tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ pH 2,0 por VOQ, com faixa de potencial entre -0,70 V e -1,30 V. $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$, $E_{acu} = -0,7 \text{ V}$ e $t_{acu} = 15 \text{ s}$	87
Tabela 7 – Resultados obtidos para curvas de recuperação de CFA, sobre HMDE, em meio de tampão BR pH 2,0. $f = 90 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$, $E_{acu} = -0,7 \text{ V}$ e $t_{acu} = 15 \text{ s}$	89
Tabela 8 – Resultados obtidos para curvas de recuperação de CFA, sobre HMDE, em medicamentos por VOQ. $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$, $E_{acu} = -0,7 \text{ V}$ e $t_{acu} = 15 \text{ s}$. [CFA] _{adicionalada} = $1,48 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	91
Tabela 9 – Resultados obtidos para curvas de recuperação de CFA, sobre HMDE, em leite bovino por VOQ. $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$, $E_{acu} = -0,7 \text{ V}$ e $t_{acu} = 15 \text{ s}$	92

1 INTRODUÇÃO

Os fármacos (substâncias químicas que são o princípio ativo de um medicamento, o qual deverá apresentar atividade farmacológica ou outro efeito direto no diagnóstico, cura, alívio, tratamento ou prevenção de doenças, ou ainda que afete qualquer função do organismo humano⁽¹⁾) têm sido denominados “contaminantes emergentes”⁽²⁾. Essa denominação se deve ao fato de se encontrarem entre substâncias recém-identificadas ou não reconhecidas e também porque podem causar efeitos nocivos, visto que suas altas taxas de transformação e remoção são compensadas pelas contínuas introduções no meio ambiente, principalmente nos corpos d’água⁽²⁾. Assim, na última década, a comunidade científica tem apresentado grande interesse e preocupação no assunto, pois alguns fármacos têm sido detectados em efluentes, em águas naturais e em águas para consumo humano em concentrações na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} ^(3,4,5).

Dentre os contaminantes emergentes, os fármacos, e dentre eles os antibióticos, são provavelmente os de maior preocupação em termos de Saúde Pública e de contaminação ambiental, devido ao potencial de seleção genética de bactérias resistentes, além de terem sido utilizados no Brasil de forma indiscriminada por anos^(6,7). Porém, em 28 de outubro de 2010, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou no Diário Oficial da União (DOU)⁽⁸⁾ novas regras para a comercialização desses medicamentos; a partir daquela data, essas substâncias têm sua venda controlada pelo Ministério da Saúde, e só poderão ser vendidas em farmácias mediante a apresentação da receita de controle especial em duas vias.

Por definição, substâncias antibacterianas produzidas por diversas espécies de microrganismos (bactérias, fungos e actinomicetos), são chamadas de antimicrobianos. O uso comum estendeu o termo *antibiótico* para incluir agentes antimicrobianos sintéticos, como as *sulfonamidas* e as *quinolonas*. Essas substâncias são antagonistas ao desenvolvimento de bactérias no meio, atuam por meio de processos essenciais à multiplicação da célula bacteriana e, por consequência, à sua sobrevivência. Os antibióticos diferem entre si nas suas propriedades físico-químicas e farmacológicas, no espectro antibacteriano e no mecanismo de ação^(9,10).

Os antibióticos β -lactâmicos, incluindo os subgrupos das penicilinas, cefalosporinas e como fração menor carbapenêmicos e outros, estão entre os mais consumidos por humanos na maioria dos países. Eles são responsáveis por aproximadamente 50-70% do

total de uso de antibióticos, tanto no que se refere ao consumo pela comunidade como em ambiente hospitalar⁽¹¹⁾.

Portanto, devido ao grande consumo e por serem excretados de forma praticamente inalterada, os antibióticos, como outras classes de fármacos, têm sido determinados em diversas amostras ambientais.

Um programa de monitoramento das águas subterrâneas de Baden-Württemberg foi elaborado por Sacher *et al.*⁽¹²⁾, os autores avaliaram 60 fármacos, incluindo antibióticos. Para tanto, foram utilizadas técnicas cromatográficas tais como cromatografia gasosa (CG) acoplada a espectrômetro de massa e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foram identificados sulfametoazol, sulfadiazina, sulfadimidina, ronidazol, roxitromicina, entre outros, em concentrações variando de 10 a 100 ng L⁻¹.

Hirsch *et al.*⁽¹³⁾ examinaram amostras de água de rio e estações de tratamento de efluentes na Alemanha e detectaram 5 dos 18 compostos investigados (eritromicina, roxitromicina, claritromicina, sulfametoazol e trimetropima). As amostras foram pré-concentradas utilizando técnica de liofilização e em seguida os fármacos foram quantificados por CLAE. Os autores concluíram que esses antibióticos foram detectados em concentrações de 1 a 6 µg L⁻¹.

Martins *et al.*⁽¹⁴⁾ utilizaram a técnica cromatografia líquida com extração em fase sólida e em fase reversa com detector de fluorescência para determinar ciprofloxacina, em efluente hospitalar do Hospital da Universidade Federal de Santa Maria. Foram encontradas concentrações médias de ciprofloxacina 54±21 µg L⁻¹ e 65±45 µg L⁻¹ antes e depois da estação de tratamento do efluente, respectivamente.

Gulkowska *et al.*⁽¹⁵⁾ examinaram amostras de águas costeiras no litoral de Hong Kong. Um grupo de 8 antibióticos foram avaliados, entre eles três pertencentes ao grupo das cefalosporinas (cefalexina, cefazolina e cefotaxima). Para tanto, os autores utilizaram CLAE acoplada a espectrômetro de massa. O antibiótico cefalexina foi determinado nas concentrações de 10 a 182 ng L⁻¹, com os autores concluindo que cefazolina e cefotaxima não foram determinadas por estarem abaixo do limite de detecção do método.

Li e Zhang⁽¹⁶⁾ realizaram estudo em duas estações de tratamento de efluentes. Os autores investigaram 20 antibióticos de sete classes diferentes (fluoroquinonas, β-lactâmicos, macrolídeos, tetraciclinas, sulfonamidas, clorofenicol e trimetopina). Os antibióticos foram detectados, utilizando CLAE acoplada a espectrômetro de massa, em concentrações que variaram de 3,2 a 1718 ng L⁻¹ nas amostras de afluentes, 1,3 a 1176 ng L⁻¹ após tratamento secundário (por lodo ativado – LA) e 1,1 a 233 ng L⁻¹ após tratamento por desinfecção. Foi

constatado nesse estudo que, os antibióticos ampicilina, cefalexina, sulfametoxazol, sulfadiazina, sulfametazina, clortetraciclina e vancomicina foram efetivamente eliminados (entre 52 e 100%) por meio do tratamento com lodo ativado, enquanto os antibióticos cefalexina e ampicilina foram eliminados (91 – 99%) por desinfecção.

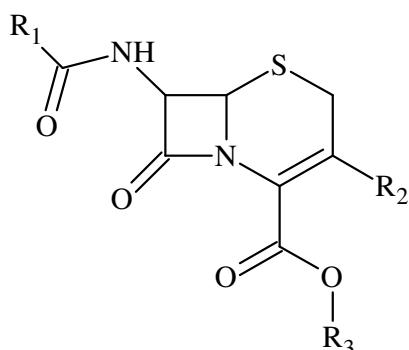
Gao *et al.*⁽¹⁷⁾ investigaram a ocorrência, eficiência de remoção e variação sazonal de 22 antibióticos, incluindo fluoroquinonas, sulfonamidas e macrolídeos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O estudo foi realizado em oito estações de tratamento de efluentes em Beijing, China. Os autores detectaram um total de 14 antibióticos nas amostras de águas residuais com concentrações entre 1,2 e 3,1 ng L⁻¹. A eficiência de remoção foi entre 34 e 72%. Os autores concluíram que, dos antibióticos estudados, as fluoquinonas apresentaram maior eficiência de remoção, provavelmente devido à sua adsorção no lodo ativado.

1.1 Cefalosporinas

As cefalosporinas formam, junto com as penicilinas, os dois maiores e mais importantes grupos de antibióticos por possuírem um amplo espectro de ação. Os primeiros estudos sobre as cefalosporinas datam de 1948, quando um fungo, *Cephalosporium acremonium*, foi isolado no mar próximo a uma saída de esgoto, na costa da Sardenha. Já se sabia então, que o filtrado não purificado deste fungo inibia o crescimento do *Staphylococcus aureus* e combatia a febre tifóide em humanos. Esse filtrado continha três antibióticos diferentes que foram denominados cefalosporina N, P e C. Com o isolamento do núcleo ativo da cefalosporina C, o ácido 7-aminocefalosporânico, e com a adição de cadeias laterais, tornou-se possível produzir compostos semi-sintéticos com atividade antibacteriana muito maior do que da substância original^(9,18).

As cefalosporinas pertencem ao grupo dos antibióticos β-lactâmicos e possuem uma estrutura semelhante a um importante componente da parede bacteriana, o peptidoglicano. A ação desse antibiótico está relacionada com a inibição da ligação final do peptidoglicano, impedindo a formação da parede bacteriana. Com a parede celular incompleta e enfraquecida, a célula bacteriana sofre ruptura e morre⁽¹⁹⁾. A Figura 1 apresenta a estrutura geral das cefalosporinas.

Figura 1 – Estrutura geral das cefalosporinas.



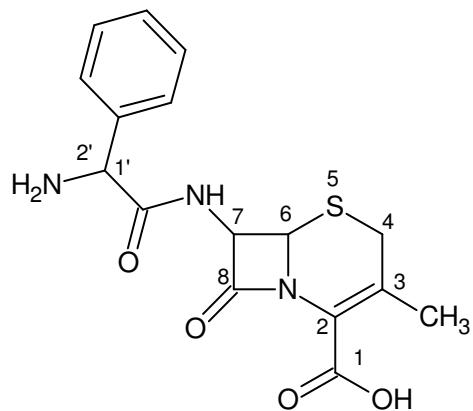
Fonte: EL-SHABOURY, S. R. *et al.*, **Journal Pharm. Biomed. Anal.**, v. 45, p. 1-19, 2007

Esse grupo de antibióticos semi-sintéticos é representado por vários compostos que podem ser classificados de acordo com sua estrutura química, suas características farmacológicas, sua resistência às β-lactamases e seu espectro de atividade. Entretanto, as cefalosporinas são classificadas em 1^a, 2^a, 3^a e 4^a gerações. Essa classificação se baseia nas características gerais de atividade antimicrobiana e são determinadas pela substituição dos grupamentos R₁, R₂ e R₃⁽²⁰⁾. As principais diferenças observadas entre as gerações das cefalosporinas referem-se ao espectro de ação. A atividade contra bactérias Gram-negativas como *Enterobacter*, *Moraxella*, *Hemophilus* e *Proteus* aumenta conforme as gerações. No entanto, a eficácia sobre bactérias Gram-positivas como estafilococos e estreptococos caminha em sentido oposto, e diminui à medida que avançam as gerações. Assim, as gerações mais “antigas” de cefalosporinas têm melhor eficácia sobre bactérias Gram-positivas do que as gerações “novas”, e ainda tem boa eficácia sobre *Escherichia coli* e *Klebsiella*. As gerações mais recentes apresentam como vantagem a menor frequência de doses necessárias à manutenção de níveis séricos terapêuticos. As cefalosporinas de terceira geração têm também tendência a serem resistentes às β-lactamases. De uma forma geral, as cefalosporinas, apresentam-se na forma de sais hidrossolúveis e são estáveis a pequenas variações de temperatura e pH; possuem meia-vida entre 0,5 e 4 h e são excretadas por via urinária, em média 80% na forma inalterada, ou seja, possuem propriedades físico-químicas e farmacocinéticas semelhantes em suas quatro gerações⁽²⁰⁾.

1.1.1 Cefalexina

A cefalexina (CFA), ácido (6R,7R)-7-[(2R)-2-amino-2-fenilacetamido]-3-metil-8-oxo-5-tia-1-azabiciclo[4.2.0]-oct-2-eno-2-carboxílico, cuja estrutura está apresentada na Figura 2, é um antibiótico do grupo das cefalosporinas de primeira geração que é indicado para o tratamento de infecções por bactérias sensíveis à cefalexina: sinusites (inflamações do seio da face), infecções do trato respiratório, otite média (inflamações no ouvido médio), infecções da pele e tecidos moles, infecções ósseas, infecções do trato geniturinário e infecções dentárias. Devido à sua semelhança com a família das penicilinas, ela costuma ser administrada em pacientes alérgicos àquele grupo de antibióticos⁽²¹⁾.

Figura 2 – Fórmula estrutural da cefalexina



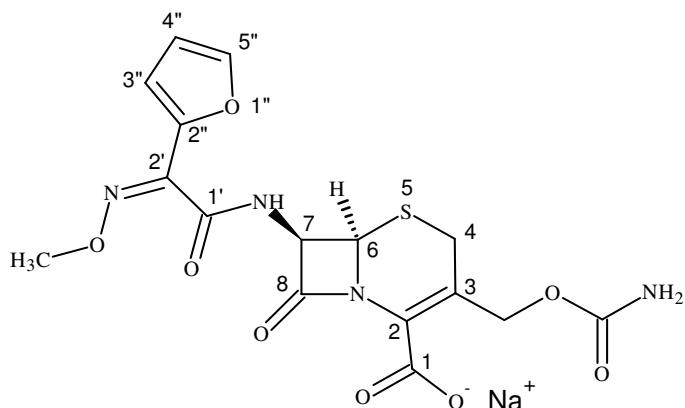
Fonte: XU, M.; MA, H.; SONG, J.; **Journal Pharm. Biomed. Anal.**, v. 35, p. 1075–1081, 2004.

A CFA está disponível para administração oral e possui o mesmo espectro antibacteriano das outras cefalosporinas de primeira geração. A terapia oral da cefalexina resulta em concentrações plasmáticas máximas de $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ após uma dose de 0,5g, sendo essa concentração adequada para inibição de muitos patógenos Gram-positivos e Gram-negativos. Assim como a maioria das cefalosporinas, a CFA não é metabolizada e em torno de 1 h (tempo de meia-vida) após a administração, cerca de 80% são excretados na urina⁽⁹⁾.

1.1.2 Cefuroxima

A cefuroxima sódica (CFX) (6R,7R)-3-[(carbamoiloximino)metil-7-[[*Z*]-2-furanil)-metoxiimino]acetil]amino]-8-oxo-5-tia-1-azabaciclo[4.2.0]-2-octeno-2-carboxilato de sódio, cuja estrutura está apresentada na Figura 3. A diferença estrutural entre a cefuroxima sódica e outras cefalosporinas é o grupo metoxiamino na posição 7 que apresenta estabilidade contra hidrolise de beta-lactamasas e o grupo carbamato na posição 3 que confere estabilidade metabólica. É um antibiótico do grupo das cefalosporinas de segunda geração, que é indicada no tratamento de pacientes com infecções causadas por cepas suscetíveis dos microorganismos relacionados às seguintes infecções: amigdalite e faringite, otite média, infecções do trato respiratório inferior (pneumonia e bronquite), infecções do trato urinário, infecções da pele, sinusite^(9,22).

Figura 3 – Fórmula estrutural da cefuroxima



Fonte: HARDMAN, J. G.; LIMBRID, L. E. (ED.). **Goodman e Gilman as bases farmacológicas da terapêutica**, 11^a ed. Rio de Janeiro: Mac Graw-Hill, 2007

A CFX está disponível para administração oral e injetável, a concentração inibitória mínima (CIM90) deste antibiótico varia na faixa de 1-4 mg/mL para a maioria das bactérias sensíveis. A CFX possui meia-vida de 1,7 h, é excretada principalmente pela urina, 48 a 52% são eliminados dentro de 12 horas e o total excretado em 24 horas está entre 90 e 95%⁽⁹⁾.

1.2 Determinação de cefalexina e cefuroxima

O método oficial para determinação de CFA^(23,24) e CFX^(25,26) é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção espectrofotométrica na região do ultravioleta (UV), conforme recomendado pelas farmacopéias americana⁽²⁷⁾ e britânica⁽²⁸⁾. Entretanto, diversos procedimentos analíticos para a determinação de CFA têm sido desenvolvidos e relatados na literatura empregando outras técnicas, tais como: quimioluminescência^(29,30), eletroforese capilar⁽³¹⁾, espectrofotometria^(32,33), espectrofluorimentria cinética⁽³⁴⁾ entre outros. Para quantificação de CFX, encontram-se diversos trabalhos em que métodos analíticos foram desenvolvidos, tais como: colorimetria e absorção atômica⁽³⁵⁾, potenciometria⁽³⁶⁾, espectrofotometria e espectrometria de absorção atômica^(37,38), eletroforese capilar^(39,40), cromatografia capilar eletrocinética micelar (MECC, do inglês *Micellar Electrophoresis Capillary Chromatography*)⁽⁴¹⁾.

Sun *et al.*⁽²⁹⁾ desenvolveram metodologia para determinação de cefalosporinas utilizando a técnica de quimioluminescência por injeção em fluxo (FL-CL, do inglês *Flow Injection Chemiluminescence*). Esse método é baseado no fato de que algumas cefalosporinas podem aumentar a reação de CL entre glioal e permanganato de potássio em meio ácido. Os autores indicaram que, sob condições otimizadas, foram determinadas três cefalosporinas: cefalexina ($LD = 10 \text{ ng mL}^{-1}$), cefadroxil ($LD = 2 \text{ ng mL}^{-1}$) e cefazolina sódica ($LD = 2 \text{ ng mL}^{-1}$). O método foi aplicado em amostras de medicamentos, apresentando resultados satisfatórios com recuperação entre 93,8 e 105,5% e com RSD entre 1,3 e 2,2%.

Vários antibióticos β -lactâmicos entre eles CFA, foram determinados por Liu *et al.*⁽³⁰⁾, em amostras de leite bovino utilizando quimioluminescência com sistema de microfluxo combinado com extração em fase sólida. Esse método é baseado no aumento que os antibióticos β -lactâmicos promovem na luminescência do sistema luminol- $K_3Fe(CN)_6$. O limite de detecção calculado para CFA foi de $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$. A recuperação nas amostras de leite bovino foi em torno de 99,7% com RSD 0,7%. Os resultados mostraram-se satisfatórios quando comparados à metodologia oficial (CLAE-UV^(23,24)), que apresentou resultados de recuperação na ordem de 93,8% com RSD 1,9%.

Mrestania *et al.*⁽³¹⁾ desenvolveram método de eletroforese capilar para determinação direta de cefalexina em meio biológico (urina e bile). Os autores informaram que as amostras de urina e bile foram analisadas utilizando curva de calibração com concentrações entre 10 e $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. Eles obtiveram limite de detecção $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ tanto para as amostra de urina como para as amostras de bile.

Com o objetivo de determinar CFA em formulações farmacêuticas, de Paula *et al.*⁽³²⁾ desenvolveram metodologia analítica na qual os autores exploraram a reação de transferência de carga da CFA com a quinalizarina (QLZ). As medidas espectrofotométricas foram realizadas em 479 nm. Foram realizados estudos com o objetivo de determinar a estequiometria e o mecanismo da reação. Os autores concluíram que essa reação ocorre com a transferência de um elétron de cada átomo de nitrogênio (dos grupamentos amino) de molécula de CFA para o centro deficiente de carga da QLZ. Isso promove a formação de um complexo de transferência de carga na proporção de uma molécula de CFA para duas de QLZ. Os limites de detecção e de quantificação da metodologia proposta foi de 0,46 mg L⁻¹ e 1,54 mg L⁻¹, respectivamente. A metodologia foi aplicada em formulações farmacêuticas contendo CFA, com percentuais de recuperação entre 92 e 105%.

Ahmed *et al.*⁽³³⁾ desenvolveram método espectrofotométrico para determinação de CFA em medicamentos baseado na derivatização do fármaco com ácido 1,2-naftoquinona-4-sulfônico (NQS). As condições otimizadas foram: pH 13,0; 80 °C; tempo de reação 10 min. e concentração de NQS 0,4%. As medidas espectrofotométricas do produto da reação entre NQS e CFA foram realizadas em 455 nm, com linearidade ($n = 6$) na faixa de concentração de 0,8 a 2,8 µg mL⁻¹. Os limites de detecção e de quantificação foram 0,168 µg mL⁻¹ e 0,509 µg mL⁻¹, respectivamente. A metodologia foi aplicada em amostras de medicamento contendo 500 mg de CFA, obtendo-se recuperação de 104,49%±0,009.

Para a determinação de sete cefalosporinas, entre elas cefalexina e cefuroxima sódica, Omar *et al.*⁽³⁴⁾ desenvolveram metodologia analítica utilizando espectrofluorimetria cinética. Os fármacos foram submetidos à degradação sob condições alcalinas. A reação foi seguida espectrofluorimetricamente a partir da medida da taxa de alteração da intensidade de fluorescência a um dado comprimento de onda de emissão. Para tanto, foram utilizados os métodos da taxa inicial e de tempo fixos, apresentando curvas de calibração com linearidade na faixa de concentração 0,2 a 1,2 µg mL⁻¹ para cefalexina e 0,2 a 2,2 µg mL⁻¹ para cefuroxima sódica, respectivamente. Após a otimização das condições experimentais, os limites de detecção (LD) foram calculados: LD = 0,2845 µg mL⁻¹ para CFA e LD = 0,278 µg mL⁻¹ para CFX. A metodologia foi aplicada em amostras comerciais e em plasma humano, apresentando eficiências de recuperação entre de 99,11 e 100,66% com desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*) entre 0,379 e 1,02% para CFA e recuperação entre 99,95 e 101,08% com RSD entre 0,48 e 0,70% para CFX.

Salem e Askal⁽³⁵⁾ utilizaram colorimetria e espectroscopia de absorção atômica para determinação de diversas cefalosporinas, entre elas CFX. A metodologia desenvolvida

consiste na reação dos fármacos com sal de Reinekeⁱ em meio ácido a 25 °C. Os autores concluíram que os procedimentos apresentaram boa precisão quando aplicados na análise dos antibióticos. O percentual de recuperação de CFX nas amostras do medicamento Zinnat (comprimido e suspensão) variou entre 99,1%±0,35 e 99,6%±0,33.

Lima *et al.*⁽³⁶⁾ desenvolveram eletrodos seletivos para cefuroxima usando 2-nitrofeniloctil éter (X), cefuroximatetraoctilâmônio (A) e 4-ter-otcylfenol (TOP). Os autores denominaram eletrodos com essa composição de XA-TOP e os utilizaram em sistema FIA. As medidas potenciométricas foram realizadas em meio de tampão fosfato (pH 3,5) e o valor de limite de detecção foi calculado como sendo na ordem de $1,3 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, com reprodutibilidade de 90,6 mV dia⁻¹.

Ayad *et al.*⁽³⁷⁾ desenvolveram metodologia para determinação de cefotaxina sódica e cefuroxima sódica utilizando espectrofotometria e espectrometria de absorção atômica (EAA). O método espectrofotométrico foi fundamentado na formação de complexos de transferência de carga entre os fármacos (n-doadores) e 7,7,8,8-teracianoquinodimetano (TCNQ) ou ácido *p*-cloranílico (*p*-CA) (π -receptores). O produto formado foi medido a 838 e 529 nm para TCNQ e *p*-CA, respectivamente. A determinação dos fármacos por EAA baseou-se na formação do precipitado formado entre os produtos da hidrólise alcalina dos fármacos com nitrato de prata ou acetato de chumbo em meio neutro, com o teor de prata ou chumbo dos precipitados formados sendo determinados direta ou indiretamente por EAA. A metodologia foi aplicada na determinação de CFX no medicamento Zinnat® (líquido) e apresentou valores de recuperação entre 100,16%±0,525 e 101,25%±1,021 por espectrofotometria e entre 100,28%±0,694 e 101,36%±0,733 por EAA.

El-Gindy *et al.*⁽³⁸⁾ desenvolveram duas metodologias para determinação de CFX em amostras de urina humana. A medida espectrofotométrica foi realizada a partir da derivada primeira de CFX em meio de 0,1 mol L⁻¹ de NaOH, a 292,5 nm, na faixa de concentração de 2 a 10 µg mL⁻¹. O limite de detecção calculado foi de 0,07 µg mL⁻¹. Para HPLC, foi utilizado coluna LiChrospher 100 RP-18 (5 mm) em temperatura ambiente, fase móvel água-acetonitrila-ácido acético (85:15:0,1 v/v) com uma taxa de fluxo de 1,5 mL min⁻¹. A quantificação foi realizada utilizando detector ultravioleta (UV) em 275 nm. A relação entre as áreas dos picos e concentração foi linear num intervalo entre 2 e 10 µg mL⁻¹ e o limite de detecção calculado foi de 0,07 µg mL⁻¹. Estudos de recuperação foram realizados em amostras de urina e calculados pela comparação da amplitude de pico (para o método da derivada

ⁱ Sal Reinecke (sal tetratiocianatodiaminocromato(III) de amônio), é usado na determinação quantitativa de fármacos como agente precipitante.

primeira) ou área de pico (para HPLC) na amostra de urina contaminada com concentração conhecida de CFX e o branco. A recuperação média ficou em torno de $100,6\% \pm 0,84$ usando derivada-primeira e $100,3\% \pm 0,61$ usando HPLC. Os autores concluíram que as metodologias desenvolvidas proporcionam análise quantitativa simples, precisa e sensível na determinação de CFX em urina e ainda concluíram que o método HPLC apresentou maior seletividade do que o método da derivada-primeira; porém, o segundo método apresenta como vantagens baixo custo e maior rapidez.

Choi e Song⁽³⁹⁾ determinaram CFX por sistema de eletroforese capilar (EC) usando solução 150 mmol L^{-1} de dodecil sulfato de sódio em 20 mmol L^{-1} de fosfato e borato de sódio (pH 9,0) como eletrólito com detector UV a 274 nm. A faixa de concentração da região de linearidade foi de 0,6 a $700 \mu\text{g mL}^{-1}$, apresentando limite de detecção de $0,28 \mu\text{mol L}^{-1}$. A metodologia foi aplicada em amostras de plasma humano, com percentuais de recuperação entre 98 e 101%.

Andrási *et al.*⁽⁴⁰⁾ apresentam trabalho procedimento para pré-tratamento amostras com elevada viscosidade para posterior análise por eletroforese capilar. Os autores utilizaram amostras de secreções brônquicas, cujo pré-tratamento consistiu em congelar as amostras que posteriormente foram liofilizadas por 12 h sob vácuo. O material poroso obtido foi solubilizado em uma mistura de água e metanol (1:1); as soluções obtidas foram, então, centrifugadas e o sobrenadante foi centrifugado por 2 h a 9.000 rpm a 4 °C. Foram analisados seis fármacos do grupo das cefalosporinas, entre eles a CFX, com o limite de detecção para essas moléculas nas amostras de secreções estando entre $0,42$ e $0,84 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Adegoke e Quadri⁽⁴¹⁾ desenvolveram método espectrofotométrico para determinação de cefalosporinas, baseado numa reação em duas etapas: diazotização das cefalosporinas com NaNO_2 a temperatura entre 0 e 5 °C seguido de “acoplamento” (*coupling*) com ρ -dimetilaminobenzaldeído (DMAB). Os produtos dessas reações absorvem entre 400 e 430 nm. O antibiótico cefuroxima foi determinado em 420 nm, apresentando região de linearidade na faixa de concentração entre 10 e $40 \mu\text{g mL}^{-1}$. A partir dos dados da regressão linear foram calculados os limites de detecção ($1,751 \mu\text{g mL}^{-1}$) e de quantificação ($5,84 \mu\text{g mL}^{-1}$). A metodologia desenvolvida foi aplicada em formulações farmacêuticas contendo CFX e apresentou valores de recuperação entre $98,71\% \pm 1,06$ e $103,48\% \pm 1,12$. Os autores propuseram que, por sua simplicidade, precisão e baixo custo, o método espectroscópico por eles desenvolvido pode ser utilizado no controle de qualidade de fármacos e medicamentos.

A sensibilidade analítica alcançada por esses métodos tem apresentado valores satisfatórios. Entretanto, a maioria deles necessita de etapas de pré-tratamento e extração das

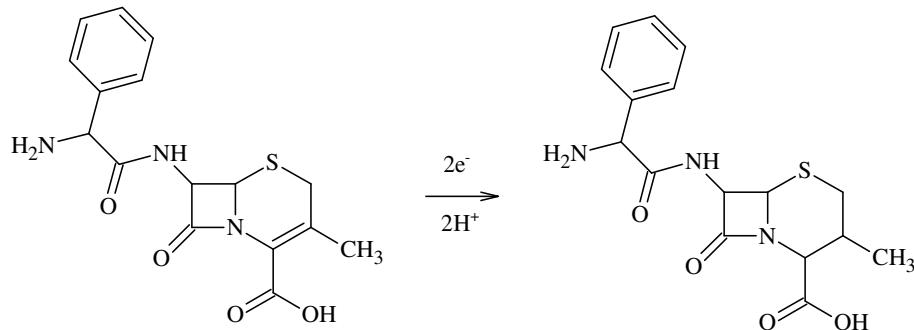
amostras, consumo de grande quantidade de solventes orgânicos de média e alta toxicidade, além de elevado custo e tempo de análise. Nesse contexto, as técnicas eletroanalíticas vêm se destacando nos últimos anos^(42,43,44,45) e se consolidando como uma alternativa viável para a determinação de diversas substâncias, tais como fármacos, pois são simples, de baixo custo no que se refere a instrumentação ou materiais utilizados quando comparadas às técnicas cromatográficas. Isso porque apresentam tempo relativamente curto de análise, ausência de etapas preliminares de extração e, quando há necessidade do preparo de amostras, são procedimentos relativamente simples e rápidos⁽⁴⁶⁾. Além disto, são capazes de fornecer limites de detecção baixos além de fornecerem informações que podem caracterizar e descrever eletroquimicamente os sistemas estudados⁽⁴⁷⁾.

Apesar do grande número de trabalhos publicados na literatura, utilizando técnicas voltamétricas para determinação de cefalosporinas, como citado por El-Shaboury *et al.*⁽²⁰⁾, são poucos os trabalhos que relatam a determinação de CFA e CFX utilizando as técnicas voltamétricas.

Ivaska e Nordström⁽⁴⁸⁾ utilizaram eletrodo gotejante de mercúrio (DME, do inglês *Dropping Mercury Electrode*) como eletrodo de trabalho para determinação de CFA em meio ácido, HCl 0,03 mol L⁻¹. Para tanto, foi aplicada a técnica de polarografia de pulso diferencial (DPP, do inglês *Differential Pulse Polarography*). O limite de detecção calculado foi LD = 2 µg/mL. O método proposto foi testado em amostras de formulações comerciais contendo CFA, com recuperação em torno de 106% com RSD de 2%.

Xu *et al.*⁽²¹⁾ eletrodo de gota pendente de mercúrio (HMDE, do inglês *Hanging Mercury Drop Electrode*), como eletrodos de trabalho para desenvolver metodologia analítica para determinação de CFA em tampão *Britton-Robinson* (BR) pH 2,0. Segundo os autores, a metodologia desenvolvida mostrou-se eficiente na determinação de CFA em amostras de formulações comerciais e em soro sanguíneo, apresentando percentuais de recuperação entre 96,4% e 101,0% com RSD entre 1,9 e 4,5%. Além disso, a metodologia apresentou a vantagem de ser rápida e apresentar baixo consumo de reagentes. Os autores relatam que, a redução de CFA sobre HMDE ocorre com a transferência de dois prótons e dois elétrons e que o sítio de redução da seria a dupla ligação (–C=C–) do grupo etilênico, envolvendo a transferência de dois elétrons e dois prótons, de acordo com a Figura 4.

Figura 4 – Proposta de mecanismo para a reação de redução de CFA, sobre HMDE, em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 2,0, segundo Xu *et al.*



Fonte: XU, M.; MA, H.; SONG, J.; **Journal Pharm. Biomed. Anal.**, v. 35, p. 1075–1081, 2004.

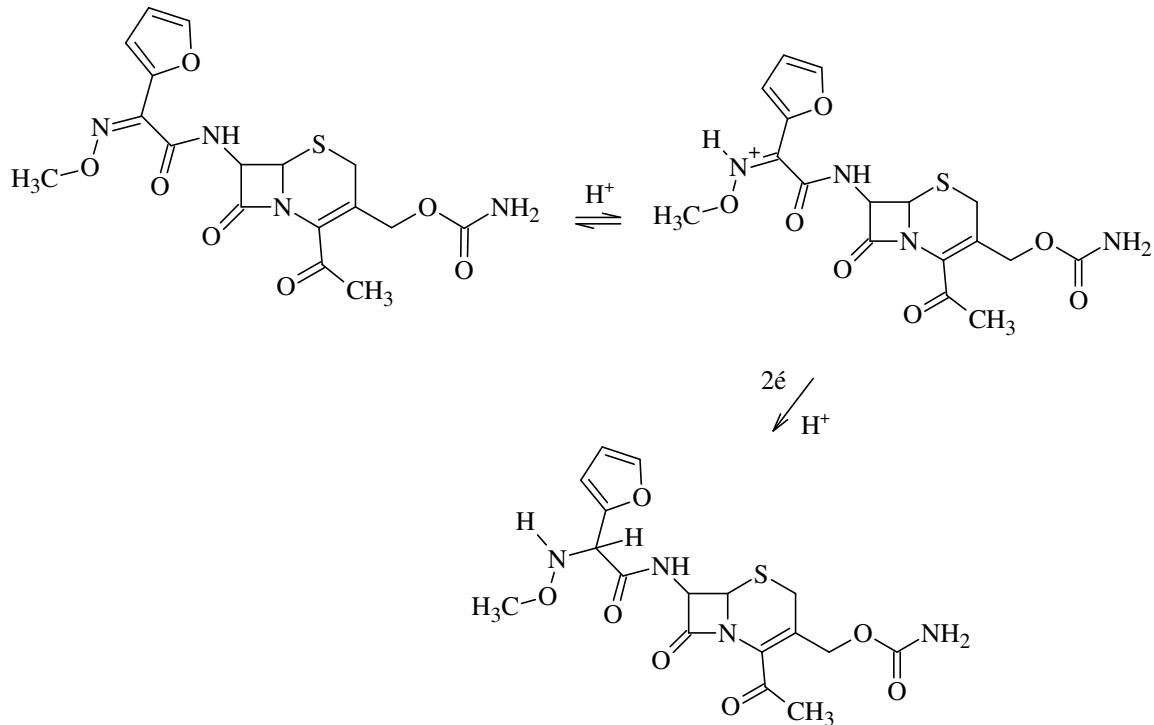
Mendez *et al.*⁽⁴⁹⁾ determinaram indiretamente CFA a partir do pico de redução de Ni (II) utilizando DME, esse estudo foi realizado em meio alcalino (pH 8,0). Após a otimização das condições experimentais, a curva de calibração foi construída na faixa de concentração de $2,4 \times 10^{-7}$ a $6,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de CFA com coeficiente de correlação (*R*) de 0,996. A precisão da metodologia foi avaliada utilizando 10 soluções de $2,4 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de CFA obtendo-se RSD = 3,8%. Os autores mostraram que a redução de Ni (II) é um processo reversível catalisado pela formação de um complexo entre o níquel e o ânion cefalexina adsorvido na superfície do eletrodo de mercúrio.

Chailapakul *et al.*⁽⁵⁰⁾ testaram o comportamento eletroquímico da CFA sobre eletrodo de diamante dopado com boro (EDDB) e sobre eletrodo de carbono vítreo também em meio alcalino (pH 9,2), os autores reportam a existência de processos de redução em potencial 0,577 V e uma relação linear em baixas concentrações de CFA (na faixa de 10 a 25 mmol L⁻¹) utilizando o EDDB; não foi possível estabelecer região de linearidade quando foi utilizado eletrodo de carbono vítreo devido a baixa resposta de corrente, o que pode ser atribuída a adsorção de moléculas na superfície desse eletrodo.

Fogg *et al.*⁽⁵¹⁾ e Sengün *et al.*⁽⁵²⁾ realizaram um estudo do comportamento eletroquímico de CFX utilizando DPP. Os autores, nos dois trabalhos, reportam a existência de picos de redução em torno de -0,39 V e em torno -1,02 V, sendo o primeiro com potencial para determinação analítica. Os estudos foram realizados em meio ácido, utilizando tampão BR (pH 2,5) e tampão citrato (pH 2,0), respectivamente. Sengün *et al.*⁽⁵²⁾ aplicaram a metodologia desenvolvida em comprimidos de Zinacef® contendo 250, 750 e 1500 mg de CFX e obtiveram valores de recuperação que variaram entre 99% e 110% e %RSD em torno de 1%. Nesse estudo sugere-se que a reação de redução da molécula de CFX ocorre no grupo

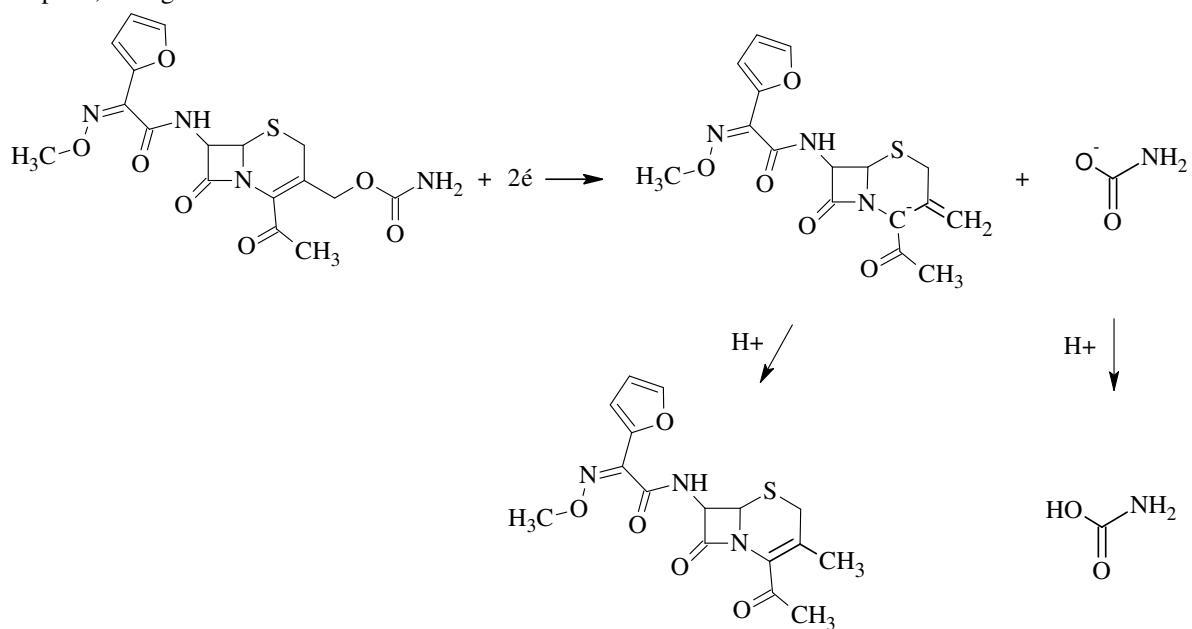
– C = N – para o pico 1 e deverá ocorrer no grupo – CH₂ – R para o pico 2 envolvendo a transferência de dois elétrons em cada pico conforme apresentado nas Figuras 5 e 6.

Figura 5 – Mecanismo para a reação de redução (pico 1) de CFX, sobre HMDE, em meio de tampão BR0,04 mol L⁻¹ pH 2,0 segundo Sengün *et al.*



Fonte: SENGÜN, F. I.; ULAS, K.; FEDAI, I., **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 3, p. 191-199, 1985

Figura 6 – Mecanismo para a reação de redução (pico 2) de CFX, sobre HMDE, em meio de tampão BR0,04 mol L⁻¹ pH 2,0 Sengün *et al.*



Fonte: SENGÜN, F. I.; ULAS, K.; FEDAI, I., **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 3, p. 191-199, 1985

1.3 Técnicas Voltamétricas

As técnicas voltamétricas apresentam grande aplicação nas mais diversas áreas do conhecimento tais como, medicina, bioquímica, química ambiental e físico-química, objetivando tanto a obtenção de informações fundamentais sobre propriedades intrínsecas das substâncias orgânicas e inorgânicas, quanto o desenvolvimento de métodos eletroanalíticos.

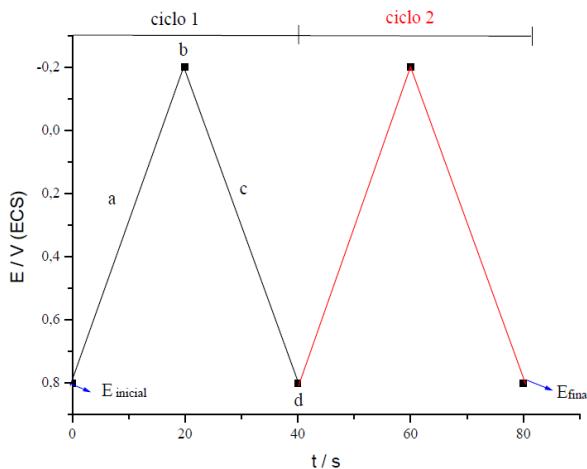
A voltametria compreende um grupo de métodos eletroanalíticos nos quais as informações sobre o analito se baseiam na medição da corrente resultante de uma oxidação ou redução na superfície de um eletrodo indicador ou de trabalho durante a aplicação de uma diferença de potencial na célula eletroquímica⁽⁵³⁾. Dentre as técnicas voltamétricas mais aplicadas em estudos eletroquímicos e desenvolvimento de métodos eletroanalíticos, destacam-se a Voltametria Cíclica (VC) e a voltametria de onda quadrada (VOQ).

1.3.1 Voltametria cíclica

A voltametria cíclica (VC) é a técnica mais comum usada para adquirir informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos. A eficiência desta técnica resulta da sua capacidade de fornecer rapidamente informações sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos adsorptivos⁽⁵⁴⁾.

Na VC, inicia-se a aplicação de um valor de potencial no qual não ocorre redução, e com o aumento do potencial para regiões mais negativas (catódicas) ocorre a redução da espécie química em solução, gerando um pico de corrente proporcional à concentração desta espécie; quando o potencial já tiver atingido um valor no qual nenhuma reação de redução ocorre, o potencial é varrido no sentido inverso, até o valor inicial. O tipo de voltamograma gerado depende do mecanismo redox que o composto em questão sofre no eletrodo, o que faz da voltametria cíclica uma ferramenta importante para estudos mecanísticos. Por essa razão, esta técnica é frequentemente o primeiro experimento utilizado em um estudo eletroquímico, pois permite a localização do potencial redox da espécie eletroativa e avaliação conveniente do efeito do meio no processo redox⁽⁵⁴⁾. A Figura 7 apresenta o padrão típico da excitação do sinal para a voltametria cíclica, potencial na forma de onda triangular.

Figura 7 – Padrão típico de excitação do sinal para a voltametria cíclica

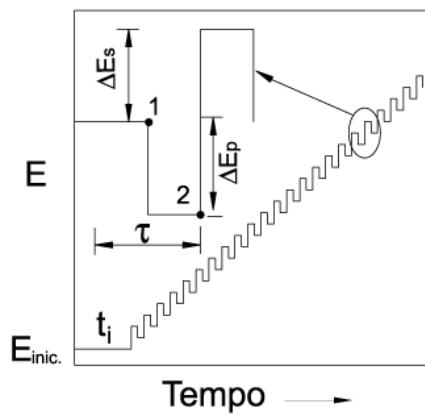


Fonte: GOSSER, JR. K. D.; **Cyclic Voltammetry: Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms**, New York, UCH Publishers, 1993

1.3.2 Voltametria de onda quadrada

Na voltametria de onda quadrada (VOQ), a forma da curva corrente-potencial é proveniente da aplicação de potenciais de altura ΔE_i (incremento de varredura de potenciais) que varia de acordo com uma escada de potencial com largura α (amplitude do pulso) e duração de τ (período). Na curva de potencial-tempo, a largura de pulso ($\tau/2$) é chamada t e a frequência de aplicação dos pulsos é chamada de f e é dada por $(1/t)$. As correntes elétricas são amostradas duas vezes, uma ao final do pulso direto, quando a direção do pulso é igual à direção da varredura, e outro ao final do pulso reverso, onde a direção do pulso é contrária à direção da varredura. O sinal é obtido como uma intensidade de corrente resultante (ΔI) de forma diferencial, e apresenta excelente sensibilidade, pois esta amostragem garante uma minimização da contribuição da corrente capacitativa sobre a corrente resultante⁽⁵⁵⁾. A forma de aplicação dos pulsos de potencial é apresentada na Figura 8.

Figura 8 – Forma de aplicação do potencial na voltametria de onda quadrada



Fonte: DE SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A.; **Química Nova**, v. 26, p. 81-89, 2003

As curvas de corrente-potencial apresentam um perfil bem definido e são, geralmente, simétricas, isso porque as correntes são medidas somente no final de um semi-período e as variações na altura e na largura do pulso de potencial são sempre constantes, para um determinado intervalo de potenciais. Os parâmetros eletroquímicos, corrente de pico (I_p) e potencial de pico (E_p), quando relacionados com a frequência de aplicação de pulsos de potencial, fornecem informações importantes sobre a reversibilidade dos sistemas estudados⁽⁵⁵⁾.

Nas respostas de corrente obtidas por VOQ, a corrente medida é uma resultante entre as correntes de varredura no sentido direto e no sentido reverso de aplicação de pulsos de potencial⁽⁵⁵⁾, conforme a equação:

$$I_{\text{Resultante}} = I_{\text{Direta}} - I_{\text{Reversa}} \quad (1)$$

A separação e demonstração destas correntes podem ser utilizadas para se observar a presença de picos em ambos os sentidos e, assim, realizar uma avaliação do tipo de reação redox que ocorre no sistema.

Portanto, a VOQ é uma das técnicas de pulso mais rápida e sensível, apresentam menor consumo de espécie eletroativa, diminuição dos problemas associados ao bloqueio da superfície do eletrodo por produtos de reação, e os limites de detecção podem ser comparados, em determinadas situações, aos das técnicas cromatográficas e espectroscópicas. Além disso, a análise dos resultados também possibilita a avaliação cinética e mecanística considerando-se espécies adsorvidas ou não à superfície do eletrodo de trabalho.

- ***Eletrólito de suporte***

Em sistemas eletroquímicos, o eletrólito de suporte é uma substância que, adicionada em altas concentrações (cerca de cem vezes maior do que a espécie eletroativa), pode minimizar o fenômeno de migração para o transporte de massa das espécies eletroativas e diminuir a espessura da dupla camada elétrica⁽⁵⁶⁾. Para ser utilizada como eletrólito de suporte uma substância deve ter alta solubilidade, alto grau de ionização, ser quimicamente estável, ou seja, não reagir com o analito eletroativo ou nenhum dos seus subprodutos e ser eletroquimicamente estável, ou seja, não deve sofrer reação de oxidação ou redução no intervalo de potencial em estudo⁽⁵⁷⁾. Essas propriedades possibilitam com que o eletrólito de suporte exerça funções importantes nos sistemas eletroquímicos, tais como: manter a baixa resistência da célula, já que, devido à sua alta concentração, é responsável por quase a totalidade da corrente iônica; o eletrólito de suporte também mantém constante a força iônica da solução, impedindo que a composição da interface entre a solução e o eletrodo mude significativamente com a corrente proveniente da reação. Finalmente, o eletrólito de suporte suprime a contribuição da corrente de migração (formação de um gradiente de carga elétrica) no transporte do analito para a superfície do eletrodo⁽⁵⁷⁾.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver metodologias eletroanalíticas para determinação de CFA e CFX, realizando também estudo do comportamento eletroquímico dessas moléculas sobre a superfície de mercúrio, utilizando as técnicas de voltametria cíclica e de onda quadrada.

2.2 Objetivos específicos

De acordo com o objetivo geral, seguem os objetivos específicos:

1. Otimização dos parâmetros experimentais e voltamétricos para o desenvolvimento de procedimentos analíticos para determinação dos antibióticos CFA e CFX;
2. Obtenção de informações sobre o mecanismo eletroquímico envolvido nas moléculas de CFA e CFX, empregando voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada;
4. Construção de curvas analíticas e cálculo dos limites de detecção e de quantificação, bem como avaliação da eficiência da metodologia por meio dos parâmetros de validação – repetibilidade, reproduzibilidade, seletividade, precisão, exatidão;
5. Aplicação da metodologia desenvolvida em amostras de formulações comerciais, de leite bovino e de águas naturais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Instrumentação

Os experimentos eletroquímicos foram realizados usando potenciómetro Autolab modelo PGSTAT 30 (Eco Chemie) controlado por um computador, usando o software GPES (General Purpose Electrochemical System) versão 4.9. A água empregada para preparação das soluções e lavagem das vidrarias foi purificada por um sistema Milli-Q (Millipore, Inc.), apresentando resistividade 18,2 MΩ cm. Todas as pesagens foram realizadas utilizando-se uma balança analítica Kern, modelo 410 com precisão de $\pm 0,1$ mg. As medidas de pH foram realizadas em um pHmetro modelo B474 (Micronal®) e um eletrodo de vidro combinado (Micronal®). No preparo das soluções e das amostras foi utilizado banho de ultrassom modelo D-40X (CTA do Brasil), frequência 40 KHz e capacidade 3,2 litros.

3.2 Eletrodos

Foi utilizado como eletrodo de trabalho um eletrodo de gota pendente de mercúrio (HMDE), de área $0,52\text{ mm}^2$, modelo VA Stand 663 (Metrohm). Um eletrodo de Ag/AgCl/Cl⁻ em meio de KCl saturado foi utilizado como sistema de referência. Como eletrodo auxiliar, foi utilizado carbono vítreo na forma de cilindro com 65 mm de comprimento e diâmetro de 2 mm (Metrohm).

3.3 Célula eletroquímica

Os experimentos voltamétricos foram realizados utilizando-se uma célula eletroquímica de compartimento único em vidro com capacidade de 50 mL, possuindo orifícios para encaixe dos eletrodos, entrada de tubo para desaeração da solução (entrada de gás inerte) e orifício para adição das alíquotas da solução contendo o analito.

3.4 Reagentes e Soluções

3.4.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados são de pureza analítica (P.A.) e estão apresentados na Tabela 1 com as suas respectivas procedências.

Tabela 1 – Lista de reagentes analíticos utilizados com as respectivas procedências

Reagente	Fórmula Química	Procedência
Ácido acético	CH ₃ COOH	VETEC®
Ácido fosfórico	H ₃ PO ₄	VETEC®
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	VETEC®
Ácido nítrico	HNO ₃	VETEC®
Ácido cítrico	C ₆ H ₈ O ₇	VETEC®
Cloreto de potássio	KCl	VETEC®
Etanol	CH ₃ CH ₂ OH	VETEC®
Hidróxido de sódio	NaOH	VETEC®
Fosfato de sódio dibásico anidro	Na ₂ HPO ₄	VETEC®
Fosfato de potássio dibásico anidro	K ₂ HPO ₄	VETEC®
Fosfato de potássio monodibásico anidro	KH ₂ PO ₄	VETEC®
Sulfato de amônio	(NH ₄) ₂ SO ₄	VETEC®
Hidróxido de potássio	KOH	VETEC®
Hidróxido de sódio	NaOH	Synth®
Cefalexina	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₄ S	Sigma-Aldrich®
Cefuroxima	C ₁₆ H ₁₆ N ₄ O ₈ S	Sigma-Aldrich®

O gás nitrogênio utilizado nos experimentos é de procedência da White Martins de pureza 4.6 (99,996%).

3.4.2 Soluções tampões

O tampão Britton-Robinson (BR) foi preparado adicionando-se em quantidades adequadas de ácido acético e ácido fosfórico, ambos em concentração 0,04 mol L⁻¹ e de ácido bórico em balão volumétrico de 500 mL e diluída com água até esse volume. O pH (2 a 12) foi ajustado com solução de NaOH 2,0 mol L⁻¹.

A solução tampão acetato foi preparada a partir da mistura de quantidades adequadas de acetato de sódio anidro e de ácido acético glacial. O pH (3,6 a 5,6) foi ajustado com solução de ácido acético⁽⁵⁸⁾.

O preparo da solução tampão fosfato foi realizado pela adição de fosfato de potássio dibásico anidro e de fosfato de potássio monobásico anidro, em quantidades adequadas com posterior dissolução em água em balão volumétrico de 500 mL. O pH (4 a 8) dessa solução foi ajustado com as soluções que compõem a mistura⁽⁵⁸⁾.

O tampão McIlvaine foi preparado pela mistura de quantidades adequadas de soluções de fosfato de sódio dibásico anidro e ácido cítrico, ambos em concentração 0,1 mol L⁻¹. O pH (2,2 a 8,0) foi ajustado com adição de solução de fosfato de sódio dibásico ou de ácido cítrico de acordo com a pH desejado⁽⁵⁸⁾.

3.4.3 Soluções dos padrões de cefalexina e cefuroxima

As soluções estoque de cefalexina e cefuroxima foram preparadas pesando-se uma quantidade adequada de cada composto a fim de se obter concentração de 1,0x10⁻³ mol L⁻¹, seguida de solubilização em água purificada e agitação por 5 minutos em banho de ultrassom para completa dissolução. A solução foi mantida ao abrigo de luz e sob refrigeração em torno de 4 °C. A partir da diluição desta solução foi preparada uma solução 1,0x10⁻⁴ mol L⁻¹ de cada composto.

3.4.4 Soluções da formulação comprimido de cefalexina e cefuroxima

O comprimido de Keflex® contém 500 mg de cefalexina e excipiente amarelo FD&C nº6 (*sunsetyellow*). A dissolução de Keflex® foi realizada pesando-se dez comprimidos com massa média de 0,61458 ± 1,68x10⁻² g e triturando-se em almofariz até a obtenção de pó fino homogêneo. Uma quantidade adequada dessa massa foi transferida para balão volumétrico de 25 mL e diluída com água até esse volume. O balão foi mantido em banho de ultrassom por 10 minutos para efetuar a completa dissolução do seu conteúdo. Da solução resultante com concentração 1,05x10⁻³ mol L⁻¹ foi retirada uma dada alíquota, que foi adicionada a um balão volumétrico de 10 mL, tendo seu volume completado com água para obtenção de solução 1,0x10⁻⁴ mol L⁻¹.

O comprimido de Zinnat® contém 250 mg de cefuroxima e excipientes celulose microcristalina, croscarmelose sódica, lauril sulfato de sódio, óleo vegetal hidrogenado, hidróxido de silício coloidal, metilhidroxipropil celulose, propilenoglicol, nipagin, nipasol e opapray branco. A dissolução de Zinnat® foi preparada de forma semelhante à solução de Keflex®. A massa média de dez comprimidos foi de 0,46311 ± 5,65x10⁻³g. Da solução resultante com concentração 1,01x10⁻³ mol L⁻¹ foi retirada uma dada alíquota, que foi adicionada a um balão volumétrico de 10 mL, tendo seu volume completado com água para obtenção de solução 1,0x10⁻⁴ mol L⁻¹.

3.4.5 Soluções da formulação suspensão de cefalexina e cefuroxima

A suspensão oral de Keflex[®] contém 500 mg de cefalexina por 5 mL de suspensão. Após reconstituição, cada 1 mL dessa preparação contém como excipientes 300,00 mg de sacarose, 0,60 mg de amarelo FD&C nº 6 com laca de alumínio (*sunsetyellow*) e 1,00 mg de amarelo FD&C nº 5 com laca de alumínio (tartrazina). A solução de Keflex[®] foi preparada pela transferência de alíquota adequada da suspensão oral para balão volumétrico de 25 mL, tendo seu volume completado com água para obtenção de solução $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. O balão foi mantido em banho de ultrassom por 10 minutos para garantir a completa dissolução do seu conteúdo. Então, uma alíquota apropriada foi retirada e transferida para balão volumétrico de 10 mL, tendo seu volume completado com água para obtenção de solução $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.

A suspensão oral de Zinnat[®] contém 250 mg de cefuroxima por 5 mL de suspensão. Após reconstituição, cada 1 mL dessa preparação contém como excipientes ácido esteárico, sacarose, aroma de tutti-frutti, polividona K30, aspartame, goma xantana e acessulfamepotássico. A solução de Zinnat[®] foi preparada pela transferência de alíquota adequada da suspensão oral para balão volumétrico de 100 mL, tendo seu volume completado com água para obtenção de solução $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. O balão foi mantido em banho de ultrassom por dez minutos para garantir a completa dissolução do analito e deixado em repouso até que toda a parte não dissolvida fosse depositada no fundo do balão. Então, uma alíquota apropriada foi retirada e transferida para balão volumétrico de 10 mL, tendo seu volume completado com água para concentração final de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.

3.4.6 Solução de amostra de leite bovino

As amostras de leite bovino contendo teor de gordura em torno de 5% foram adquiridas no comércio local. Em tubos de Falcon[®], cada amostra de leite foi fortificada com solução estoque de cefalexina e cefuroxima, na concentração de $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹. As amostras foram tratadas pelo método *salting-out* com sulfato de amônio (6 g por 20 mL de leite), centrifugadas durante 15 minutos a 1500 rotações por minuto (rpm)⁽⁵⁹⁾. Uma alíquota apropriada da solução sobrenadante foi retirada e transferida para balão volumétrico de 10 mL, tendo seu volume completado com água para concentração final de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.

3.5 Metodologia de trabalho

Para o desenvolvimento desse trabalho foram empregadas as técnicas Voltametria Cíclica (VC) e Voltametria de Onda Quadrada (VOQ), pelo fato de fornecerem informações a respeito dos processos redox sob estudo, além de fornecer excelente sensibilidade (no caso da VOQ) para o desenvolvimento de procedimentos eletroanalíticos.

3.5.1 Voltametria cíclica

A técnica de VC foi empregada inicialmente para avaliar o comportamento eletroquímico de CFA e CFX sobre HMDE, para escolha do eletrólito de suporte bem como do pH do meio tamponante em função de maior sensibilidade analítica. Essa técnica também foi empregada a fim de se obter informações acerca do mecanismo de redução dessas espécies. Para a realização desses experimentos foram adicionados 20 mL do eletrólito de suporte à célula eletroquímica e borbulhou-se nitrogênio por 8 minutos, para remoção de oxigênio dissolvido da solução⁽⁵⁴⁾.

3.5.2 Voltametria de onda quadrada

A técnica de VOQ foi empregada com o objetivo de desenvolver uma metodologia eletroanalítica para determinação de CFA e CFX sobre HMDE nas amostras estudadas. No desenvolvimento de metodologia eletroanalítica utilizando VOQ inicialmente foi realizada a otimização dos parâmetros voltamétricos, tais como frequência de aplicação dos pulsos de potencial (f), amplitude dos pulsos de potencial (a) e incremento de potencial (ΔE_s). A otimização foi realizada avaliando-se a intensidade da corrente de pico e o perfil voltamétrico, obtidos em função da variação de cada parâmetro separadamente. Após a obtenção das condições otimizadas, as curvas analíticas em eletrólito de suporte foram construídas pela adição de alíquotas da solução padrão na célula eletroquímica.

3.5.3 Aplicação da metodologia desenvolvida

Após otimização dos parâmetros experimentais (eletrólito de suporte e pH do meio) e voltamétricos (frequência, amplitude e incremento de potencial), aplicou-se a

metodologia desenvolvida para o cálculo dos percentuais de recuperação em eletrólito de suporte e nas diferentes amostras (medicamentos, leite e água natural). A precisão das metodologias desenvolvidas foi avaliada por meio da repetibilidade e da reproduzibilidade e estimada por meio do desvio padrão relativo, enquanto a exatidão foi avaliada pelos percentuais de recuperação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cefuroxima

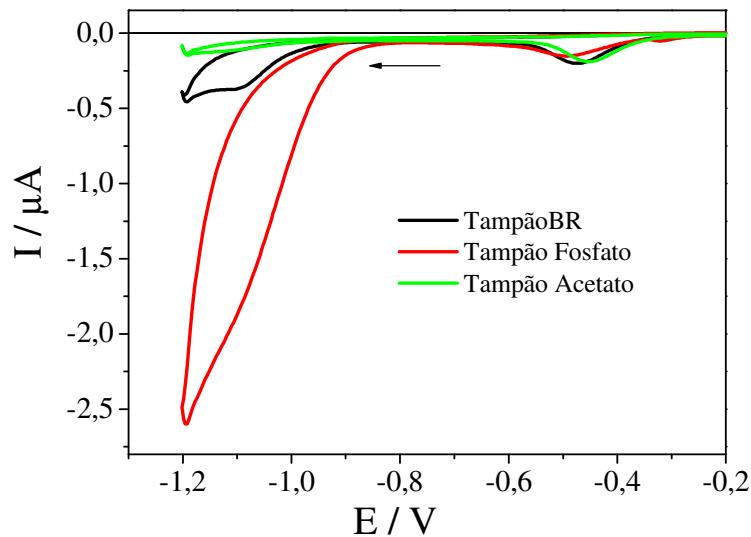
4.1.1 *Estudos preliminares*

Estudos preliminares foram realizados com o objetivo de encontrar condições experimentais otimizadas, que permitam tanto a avaliação do comportamento eletroquímico como o desenvolvimento de metodologia eletroanalítica sensível para determinação de CFX utilizando as técnicas voltamétricas adequadas, a saber: voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada.

4.1.1.1 *Escolha do eletrólito de suporte*

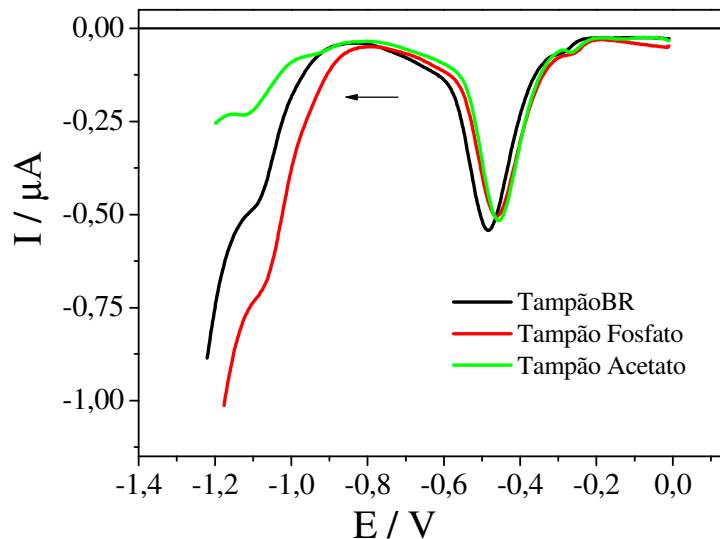
Para avaliar o eletrólito de suporte a ser empregado no desenvolvimento da metodologia para determinação de CFX, foram utilizadas as técnicas de voltametria cíclica (VC) com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} e voltametria de onda quadrada (VOQ), frequência de aplicação de pulso de 100 s^{-1} , amplitude de pulso de potencial de 50 mV , incremento de varredura de 2 mV , concentração de CFX de $1,0 \times 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$ e utilizando HMDE como eletrodo de trabalho. Foram testadas soluções dos tampões BR $0,04\text{ mol L}^{-1}$, fosfato $0,05\text{ mol L}^{-1}$ e acetato $0,05\text{ mol L}^{-1}$ todos ajustados para pH 4,0. As Figuras 9 e 10 apresentam, respectivamente, os voltamogramas cíclicos e de onda quadrada para CFX $1,0 \times 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$, sobre HMDE, nos diferentes tampões avaliados.

Figura 9 – Voltamogramas cíclicos para CFX $2,91 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ sobre HMDE, em diferentes eletrólitos de suporte ajustados em pH = 4,0. v = 100 mV s⁻¹



Fonte: A própria autora

Figura 10 – Voltamogramas de onda quadrada para CFX $2,91 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, sobre HMDE, em diferentes eletrólitos de suporte ajustados em pH = 4,0. f = 100 s⁻¹, a = 50 mV e ΔE_s = 2 mV.



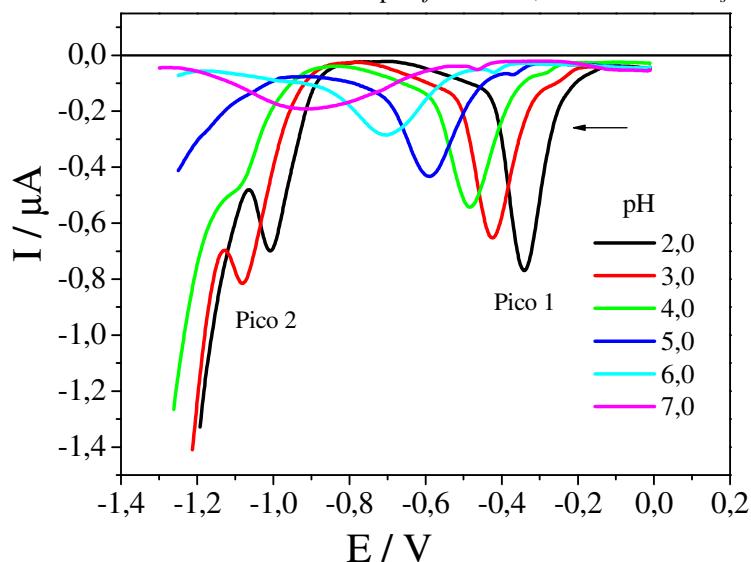
Fonte: A própria autora

As respostas voltamétricas em tampão BR apresentaram intensidades de corrente maiores que nos demais meios, bem como perfil mais definido por VC e por VOQ, sendo o escolhido para dar continuidade a este trabalho.

4.1.1.2 Influência do pH do meio

Após ser definido o eletrólito de suporte, é necessário realizar a otimização do pH do meio, pois, na maioria das determinações analíticas de compostos orgânicos, esse parâmetro pode afetar de maneira significativa as respostas voltamétricas da molécula em estudo. A Figura 11 apresenta os voltamogramas de onda quadrada obtidos para CFX $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹, cuja influência do pH foi avaliada no intervalo de 2,0 a 7,0.

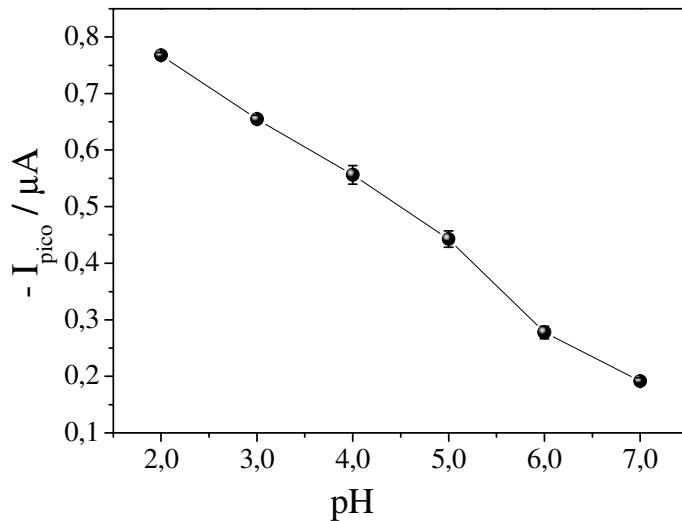
Figura 11 – Voltamogramas de onda quadrada para CFX $2,91 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, sobre HMDE em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ sobre HMDE em diferentes valores de pH. $f = 100$ s⁻¹, $a = 50$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV.



Fonte: A própria autora

Analizando os voltamogramas de onda quadrada resultantes da variação do pH, verificou-se que, à medida que a concentração hidrogeniônica diminui, os valores de potencial de pico (para os picos 1 e 2) do antibiótico CFX deslocaram-se para valores mais negativos, com diminuição na intensidade de corrente. Isso indica que o potencial de pico para a redução desse fármaco é influenciado pelo pH do meio. Este comportamento é característico de processos em que ocorre protonação da espécie eletroativa antecedendo a transferência de carga⁽⁵³⁾. A Figura 12 apresenta a relação entre intensidade de corrente de pico (pico 1) e pH obtida para a redução de CFX.

Figura 12 – Relação entre intensidade da corrente de pico (pico1) e pH obtida a partir dos voltamogramas de onda quadrada da Figura 11

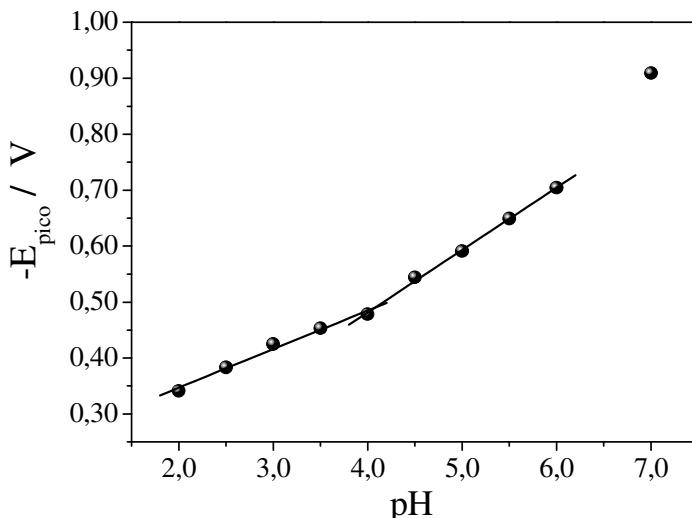


Fonte: A própria autora

Como pode ser observado na Figura 12, o pH 2,0 apresentou maior intensidade de corrente e, por consequência, maior sensibilidade analítica. Portanto, o pH 2,0 foi considerado ideal para o desenvolvimento da metodologia analítica para determinação de CFX.

A Figura 13 apresenta a relação entre potencial de pico de redução e pH do meio, a partir da qual se pode constatar a presença de duas regiões de linearidade. A primeira entre os valores de pH 2,0 a 4,0 e a segunda entre pH 4,0 e 6,0. As duas regiões de linearidade podem ser representadas pelas equações 2 e 3.

Figura 13 – Relação entre potencial de pico de redução e pH obtida a partir dos voltamogramas cíclicos de CFX $2,91 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, sobre HMDE, em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹. v = 100 mV s⁻¹



Fonte: A própria autora

$$\text{Região 1: } -E_{\text{pico}} (\text{V}) = 0,2096 + 0,0688 \text{ pH} \quad (2)$$

$$\text{Região 2: } -E_{\text{pico}} (\text{V}) = 0,0362 + 0,1114 \text{ pH} \quad (3)$$

Utilizando o valor da inclinação da reta de E_{pico} vs. pH (equação 1) é possível calcular os números de prótons envolvidos na reação utilizando a equação:

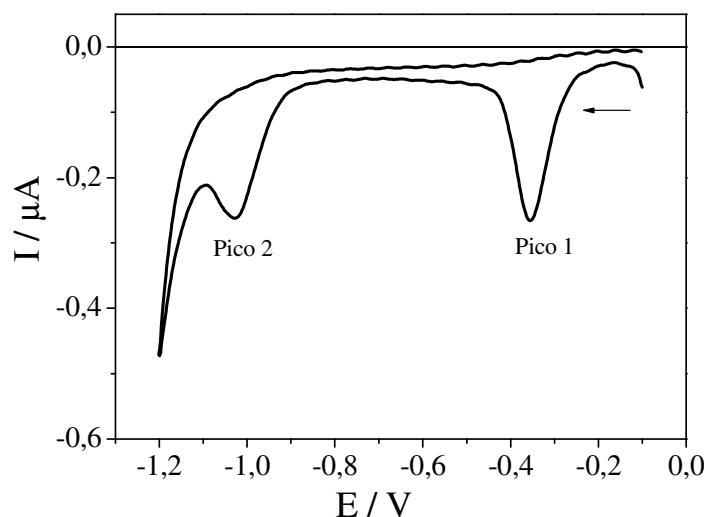
$$E_{\text{pico}} = E^{\circ} - \frac{2,303RTm}{nF} \text{ pH} \quad (4)$$

sendo que m é o número de prótons, R é a constante dos gases, T a temperatura, F a constante de Faraday e n número de elétrons. O valor da inclinação 68,8 mV / pH sugere que o número de prótons e elétrons que participam da reação é igual.

4.1.1.3 Comportamento eletroquímico

Foram realizados testes de eletroatividade da CFX sobre HMDE utilizando a técnica de voltametria cíclica, utilizada tanto nos estudos de eletroatividade de compostos quanto para diagnóstico de mecanismos de reações eletroquímicas⁽⁶⁰⁾. O comportamento eletroquímico da CFX sobre HMDE foi avaliado no intervalo de potencial de - 0,1 V a -1,2 V com velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹, como pode ser visualizado na Figura 14.

Figura 14 – Voltamogramas cíclicos de CFX $2,91 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, sobre HMDE, em meio de tampão BR pH 2,0. v = 100 mV s⁻¹



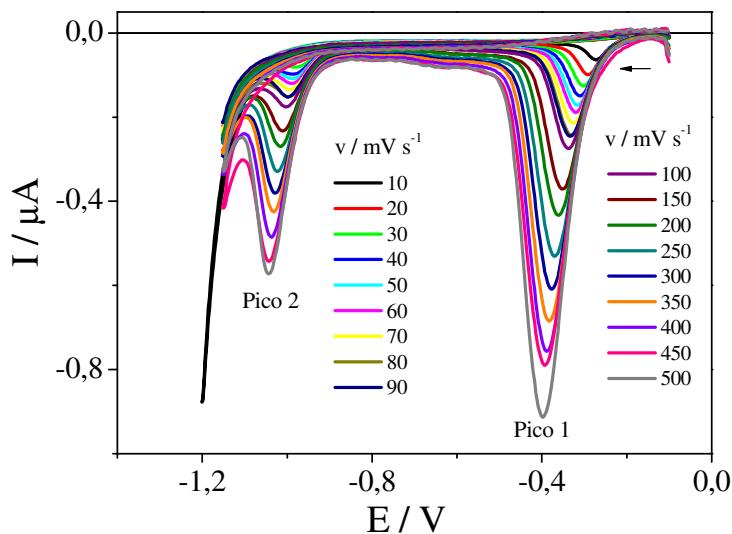
Fonte: A própria autora

Observou-se a presença de dois processos catódicos em - 0,35 V (pico 1) e em -1,03 V (pico 2), não sendo observado processo anódico, comportamento característico de processos irreversíveis.

4.1.1.4 Influência da velocidade de varredura

A influência da velocidade de varredura na corrente de pico e no potencial de pico de redução da CFX foi estudada no intervalo de 10 a 500 mV s⁻¹. Os voltamogramas obtidos em função da velocidade de varredura podem ser observados na Figura 15.

Figura 15 – Voltamogramas cíclicos de CFX 2,91x10⁻⁵ mol L⁻¹, sobre HMDE, em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 2,0. Velocidades de varredura entre 10 e 500 mV s⁻¹



Fonte: A própria autora

Pode-se observar a partir dos voltamogramas da Figura 15, que os potenciais de pico são deslocados para valores mais negativos, com ausência de picos de oxidação, confirmando a natureza irreversível do processo de redução da CFX sobre a superfície eletródica⁽⁵³⁾.

Para reações totalmente irreversíveis, a relação entre o potencial de pico e a velocidade de varredura é dada por:

$$E_{pico} = \left(\frac{2,303RT}{\alpha nF} \right) \log \left(\frac{RTk_f}{\alpha nF} \right) - \left(\frac{2,303RT}{\alpha nF} \right) \log v \quad (5)$$

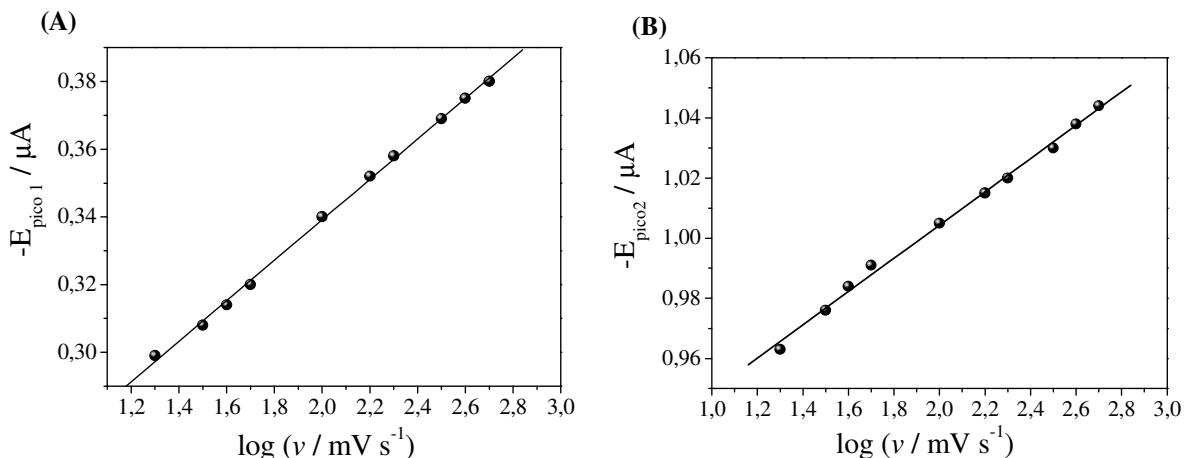
sendo que k_f constante de velocidade heterogênea, v a velocidade de varredura, α o coeficiente de transferência de carga, e os demais termos mantêm seus significados usuais⁽⁶⁰⁾.

Pela relação entre potencial de pico *versus* logaritmo da velocidade de varredura para os picos 1 e 2, os dois processos catódicos apresentaram relação linear com coeficiente de correlação (r) igual a 0,9993 e 0,9980, respectivamente. A Figura 16 apresenta a relação entre potencial de pico *versus* logaritmo da velocidade de varredura para o pico 1 (A) e para o pico 2 (B).

$$\text{Pico 1: } -E_{\text{pico1}} (\text{V}) = 0,2195 + 0,0598 \log (v / \text{mV s}^{-1}) \quad (6)$$

$$\text{Pico 2: } -E_{\text{pico2}} (\text{V}) = 0,8937 + 0,0553 \log (v / \text{mV s}^{-1}) \quad (7)$$

Figura 16 – Relações entre potencial de pico e logaritmo da velocidade de varredura para (A) Pico 1 e (B) Pico 2 obtidas a partir dos voltamogramas cíclicos da Figura 15



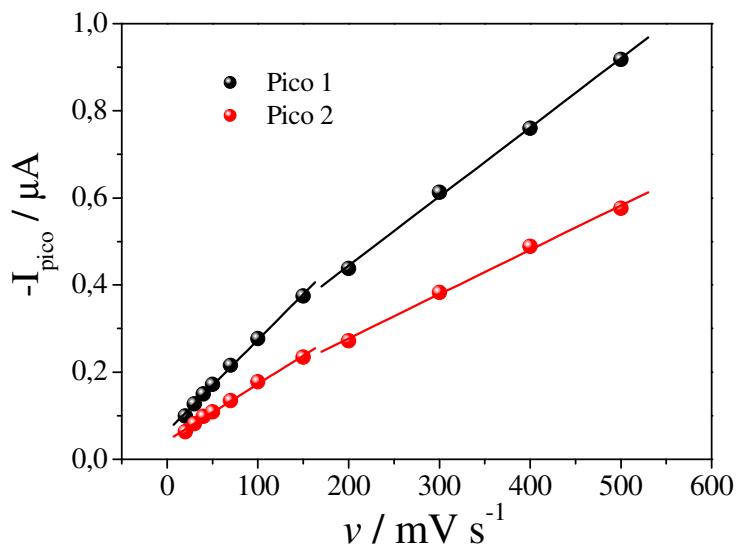
Fonte: A própria autora

Aplicando-se os parâmetros da inclinação obtida na equação 5 foi possível calcular o número de elétrons envolvidos nos processos. A partir dos valores dos coeficientes angulares das equações 6 e 7, calculou-se os valores de $\alpha n = 0,998$ para o pico 1 e $\alpha n = 1,07$ para o pico 2. Considerando que, para sistemas com moléculas orgânicas em soluções aquosas, o coeficiente de transferência eletrônica pode ser considerado igual a 0,5⁽⁵³⁾, tem-se $n = 2$, ou seja, dois elétrons participam do processo de redução da CFX tanto para o pico 1 como para o pico 2. Como foi discutido no item 4.1.1.2, o número de prótons e elétrons que participam da reação de redução nos dois picos da molécula de CFX é igual, portanto conclui-se que a reação consome dois prótons em cada pico por molécula de CFX reduzida. Esse

resultado está de acordo com Sengün *et al.*, onde propuseram que a reação de redução da molécula de CFX ocorre no grupo – C = N – para o pico 1 e deverá ocorrer no grupo – CH₂ – R para o pico 2 envolvendo a transferência de dois elétrons em cada pico⁽⁵²⁾.

Observou-se também que a corrente de pico varia linearmente com a velocidade de varredura no intervalo estudado, apresentando duas inclinações, conforme pode ser observado na Figura 17. Esse comportamento é um indicativo de que a etapa principal do transporte de massa é controlado por adsorção das espécies na superfície eletródica⁽⁶⁰⁾.

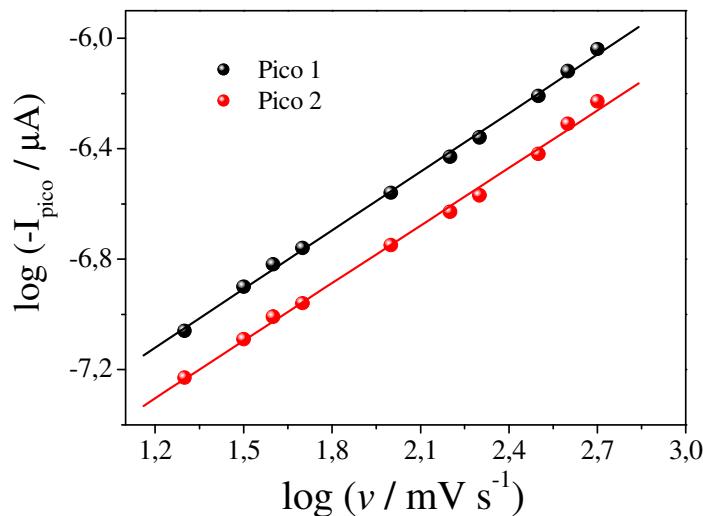
Figura 17 – Relação entre corrente de pico e velocidade de varredura para CFX 1,0x10⁻⁵ mol L⁻¹ obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos da Figura 15



Fonte: A própria autora

Adicionalmente, o resultado obtido pela relação entre a corrente de pico e a velocidade de varredura foi confirmado pela análise do coeficiente angular da relação entre logaritmo da intensidade de corrente de pico e logaritmo da velocidade de varredura, conforme é apresentado na Figura 18.

Figura 18 – Relação entre o logaritmo da corrente de pico e o logaritmo da velocidade de varredura para CFX $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos da Figura 15



Fonte: A própria autora

De acordo com Gosser⁽⁶¹⁾, se o coeficiente angular for próximo de 0,5 a etapa determinante da velocidade de reação é a difusão; por outro lado, se o coeficiente angular obtido for próximo da unidade, a etapa determinante é a adsorção das espécies eletroativas na superfície do eletrodo.

$$\text{Pico 1: } \log (-I / \mu\text{A}) = -7,97 + 0,71 \log (v / \text{mV s}^{-1}) \quad (8)$$

$$\text{Pico 2: } \log (-I / \mu\text{A}) = -8,14 + 0,70 \log (v / \text{mV s}^{-1}) \quad (9)$$

A relação linear obtida apresentou inclinação de 0,71 com $r = 0,9992$ (pico 1) e 0,70 com $r = 0,9984$ (pico 2) como pode ser visto nas equações 8 e 9, respectivamente. A inclinação apresentou um valor intermediário, que é um indicativo que há um controle misto envolvendo processos de difusão e de adsorção⁽⁶¹⁾. Jain *et al.* relataram comportamento eletroquímico semelhante para o antibiótico cefixima, cefalosporina de segunda geração, cuja estrutura é semelhante à da cefuroxima⁽⁴³⁾.

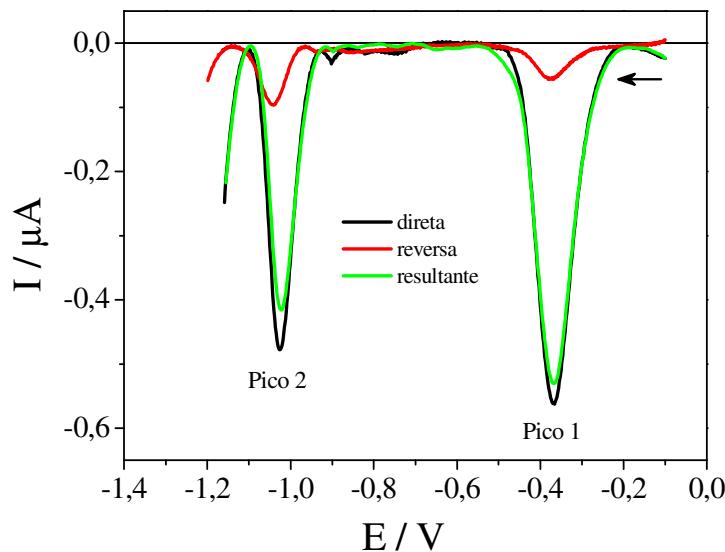
4.1.3 Voltametria de Onda Quadrada

A voltametria de onda quadrada, VOQ, é uma técnica voltamétrica de pulso que permite a utilização de elevadas velocidades de varredura possibilitando tempos experimentais muito mais curtos quando comparados àqueles obtidos a partir das técnicas de pulso clássicas. Os limites de detecção podem ser comparados aos das técnicas cromatográficas e espectroscópicas. Além disso, a análise dos parâmetros característicos desta técnica permite a aquisição de informações quanto à cinética e ao mecanismo do processo eletroquímico em questão.

4.1.3.1 Componentes de corrente

O comportamento voltamétrico da CFX sobre HMDE foi investigado utilizando como eletrólito de suporte tampão BR 0,04 mol L⁻¹ em pH 2,0, com o auxílio da técnica de VOQ, utilizando os parâmetros experimentais $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. A Figura 19 apresenta as componentes de corrente obtidas.

Figura 19 – Componentes de corrente obtidas a partir do voltamograma de onda quadrada de CFX $2,9 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, sobre HMDE, em meio de tampão BR pH 2,0, $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$



Fonte: A própria autora

De acordo com os critérios de diagnóstico da VOQ, os picos reversos no mesmo sentido dos pulsos diretos ocorrem somente quando a difusão das espécies reduzidas é muito lenta. Assim, quando o pulso reverso é aplicado, ainda ocorre a redução de reagentes. Além

disso, como a intensidade das correntes direta e reversa é diferente e somente ocorrem processos de redução tanto no pulso direto quanto no pulso reverso, pode-se concluir que o processo redox da CFX sobre HMDE é irreversível nas condições estudadas⁽⁶²⁾.

Assim, a partir da análise das componentes de corrente, foi possível confirmar o comportamento irreversível da reação da CFX sobre o eletrodo de gota pendente de mercúrio, como se pode observar na Figura 19. As intensidades de corrente direta e resultante têm praticamente os mesmos valores, indicando que a contribuição da corrente reversa é quase insignificante. As correntes direta e reversa apresentam-se no mesmo sentido, com este comportamento sugerindo que o pulso de potencial no sentido reverso não consegue oxidar o produto da reação, mas continua ocorrendo a reação de redução da CFX.

4.1.3.2 Avaliação dos parâmetros voltamétricos

Quando a técnica de voltametria de onda quadrada é utilizada, é de fundamental importância avaliar quais são os parâmetros voltamétricos que fornecem o melhor sinal analítico em termos de intensidade de corrente e perfil voltamétrico bem definido.

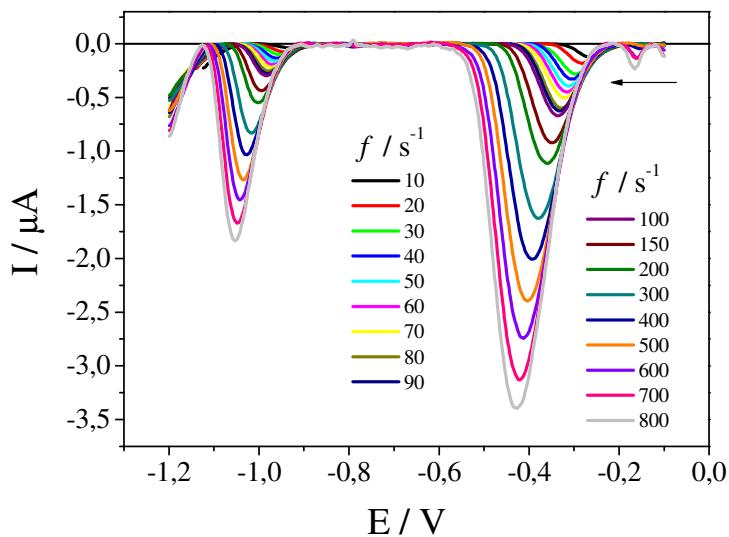
Frequência de aplicação de pulsos de potencial

A frequência de aplicação de pulsos está relacionada diretamente com a intensidade de corrente de pico e, consequentemente, com a sensibilidade do método, além de estar relacionada com a velocidade efetiva da voltametria de onda quadrada e fornecer informações a respeito do número de elétrons envolvidos na transferência eletrônica.

A Figura 20 apresenta os voltamogramas de onda quadrada obtidas para CFX $2,91 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ com frequência de aplicação de pulso variando entre 10 s⁻¹ e 800 s⁻¹, mantendo-se constante a amplitude de pulso em 50 mV e incremento de varredura em 2 mV.

Observa-se que, no processo de redução da CFX, a variação da frequência sobre as quais os pulsos de potencial foram aplicados provocou um aumento na intensidade da corrente de pico em ambos os picos voltamétricos. Também pode ser visto que ocorreu deslocamento dos potenciais de pico para regiões mais negativas. De acordo com a teoria desenvolvida para VOQ, esse comportamento é característico de reações totalmente irreversíveis com forte adsorção das espécies na superfície do eletrodo⁽⁶³⁾.

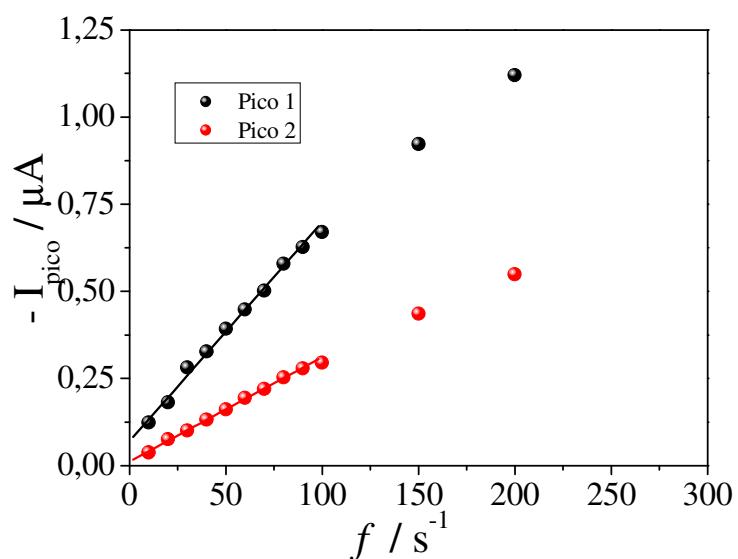
Figura 20 – Voltamogramas de onda quadrada para CFX $2,91 \times 10^{-5}$ mol L $^{-1}$ em tampão BR 0,04 mol L $^{-1}$ pH 2,0, sobre HMDE em diferentes frequências de aplicação de pulsos de potencial com $a = 50$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV



Fonte: A própria autora

A Figura 21 apresenta a relação entre a corrente de pico e a frequência de aplicação de pulsos de potencial obtida a partir dos voltamogramas de onda quadrada para CFX sobre HMDE.

Figura 21– Relação entre intensidade da corrente de pico e frequência de aplicação dos pulsos de potencial obtida a partir dos voltamogramas de onda quadrada da Figura 20, para CFX $2,91 \times 10^{-5}$ mol L $^{-1}$, sobre HMDE, em tampão BR 0,04 mol L $^{-1}$ pH 2,0. $a = 50$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV



Fonte: A própria autora

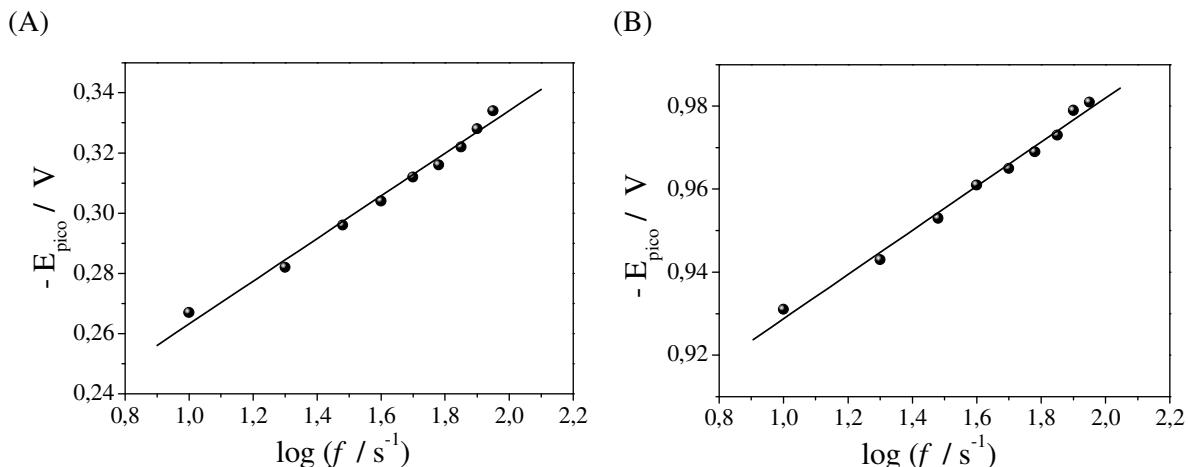
De acordo com os critérios de diagnóstico da teoria da voltametria de onda quadrada, em sistemas totalmente irreversíveis, a intensidade de corrente possui uma relação linear com a frequência de aplicação dos pulsos. Observou-se que, a partir da frequência 100 s⁻¹ ocorre o desvio da linearidade, com esse comportamento sendo associado a efeitos da resistência da solução⁽⁶²⁾. Entretanto, até a frequência de aplicação de pulsos de 90 s⁻¹ obteve-se melhor relação linear ($r = 0,9968$) do que até frequência 100 s⁻¹ ($r = 0,9961$), além de ter apresentado potenciais mais positivos. Por essas razões, a frequência 90 s⁻¹ foi selecionada para o desenvolvimento da metodologia eletroanalítica para determinação de CFX.

Como citado anteriormente, a relação dos potenciais de pico com a frequência de aplicação dos pulsos de potenciais pode fornecer uma estimativa para o número de elétrons envolvidos no processo redox. Para isto, avalia-se a inclinação da reta obtida a partir da relação do potencial de pico com o logaritmo da frequência, de acordo com a equação:

$$\frac{\partial E_{pico}}{\partial \log f} = -\frac{2,303RT}{\alpha nF} \quad (10)$$

A Figura 22 apresenta a relação entre o potencial de pico e o logaritmo da frequência da aplicação dos pulsos de potencial para o pico 1 (A) e para o pico 2 (B), considerando-se $\alpha = 50$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV.

Figura 22 – Relação entre potenciais de pico e logaritmo da frequência de aplicação dos pulsos de potencial para o pico 1 e pico 2 em (A) e (B), respectivamente, obtida a partir dos voltamogramas de onda quadrada, da Figura 20, para CFX 2,91x10⁻⁵ mol L⁻¹, sobre HMDE, em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 2,0. $\alpha = 50$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV.



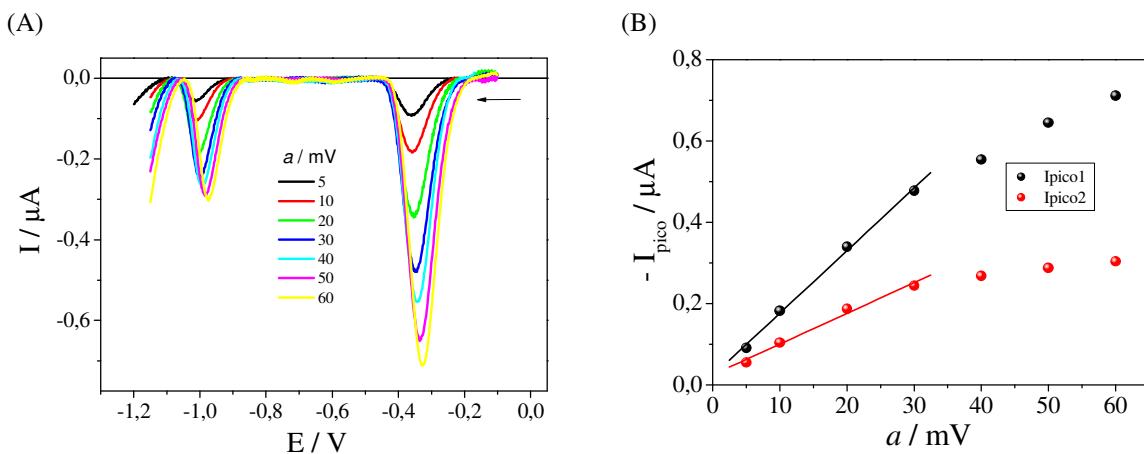
Fonte: A própria autora

A dependência do potencial de pico em função do logaritmo da frequência para CFX apresentou inclinação de 0,07088 e 0,05327 para os picos 1 e 2, respectivamente. Aplicando este valor na equação 10e considerando $\alpha = 0,5$, determinou-se que o número de elétrons que participam do processo de redução nos dois picos da molécula de CFX, é igual a dois, ratificando o resultado obtido por voltametria cíclica.

Amplitude dos pulsos de potencial

A amplitude de aplicação de pulsos de potencial é outro parâmetro importante a ser utilizado, pois o aumento da amplitude pode provocar um aumento da corrente de pico e, consequentemente, ganho na sensibilidade do método⁽⁶²⁾. No presente trabalho variou-se a amplitude de pulsos na faixa de 5 a 80 mV, mantendo-se constante a frequência de aplicação dos pulsos em 100 s^{-1} e o incremento de varredura em 2 mV. A Figura 23 apresenta os voltamogramas de onda quadrada para $2,91 \times 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$ em diferentes amplitudes (A) e a relação entre a corrente de pico e a amplitude (B).

Figura 23 – (A) Voltamogramas de onda quadrada para CFX $2,91 \times 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$, sobre HMDE, em meio de tampão BR $0,04\text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0, em diferentes amplitudes de pulsos de potencial. $f = 100\text{ s}^{-1}$ e $\Delta E_s = 2\text{ mV}$. (B) Relação entre intensidade da corrente de pico e amplitude de aplicação dos pulsos de potencial obtida a partir dos voltamogramas de onda quadrada da Figura 23A



Fonte: A própria autora

A partir dos voltamogramas da Figura 23A, observa-se um deslocamento dos potenciais de pico para valores mais positivos com aumento da amplitude, esse comportamento é característico de processos totalmente irreversíveis com forte adsorção de moléculas na superfície do eletrodo⁽⁶⁴⁾. Avaliando a intensidade de corrente em função da

amplitude de pulsos (Figura 23B), observou-se que há uma linearidade até o valor de 30 mV ($r = 0,9987$). Portanto, ficou definido que uma amplitude de pulso de 30 mV seria utilizada no desenvolvimento do método analítico. Em amplitudes maiores que 50 mV, pode-se observar que para o pico 1 não ocorre aumento significativo da corrente de pico e para o pico 2, a partir desse valor de amplitude, a corrente de pico é praticamente constante, não oferecendo nenhuma contribuição adicional à sensibilidade analítica. De acordo com os critérios de diagnóstico da teoria da VOQ, para sistemas irreversíveis em amplitudes acima de 50 mV, a corrente de pico é praticamente constante⁽⁶⁵⁾, confirmando, mais uma vez, a natureza irreversível do processo de redução da CFX sobre HMDE.

Ao avaliar a relação entre o potencial de pico e a amplitude de pulsos, observou-se relação linear para os dois picos, apresentando as seguintes equações da reta:

$$\text{Pico 1: } -E_{\text{pico}} (\text{V}) = 1,02 + 0,868 a (\text{V}) \quad \therefore r = 0,9987 \quad (11)$$

$$\text{Pico 2: } -E_{\text{pico}} (\text{V}) = 0,372 + 0,814 a (\text{V}) \quad \therefore r = 0,9941 \quad (12)$$

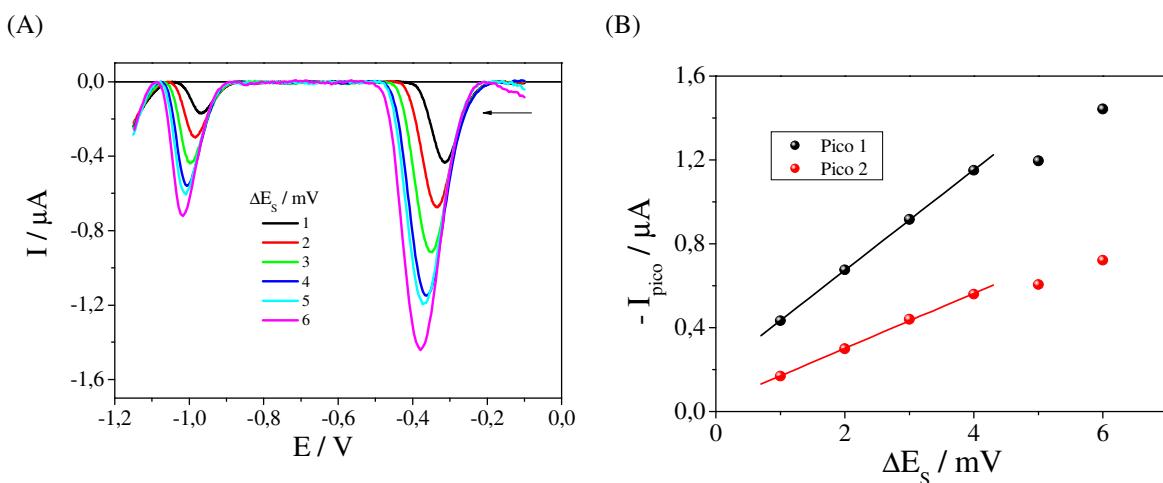
Segundo O'Dea *et al.*⁽⁶⁴⁾, uma reação de redução totalmente irreversível de moléculas adsorvidas na superfície do eletrodo fornece uma inclinação próxima à unidade. As equações 11e 12 apresentam inclinações 0,868 e 0,814 para o pico 1 e 2 respectivamente, ou seja, inclinações com valores próximos à unidade, sugerindo que a reação de redução da CFX é irreversível com adsorção do analito na superfície do eletrodo.

Incremento de varredura

O incremento de potencial também é um importante parâmetro a ser avaliado, pois, juntamente com a frequência, fornece a velocidade de varredura na voltametria de onda quadrada. Como a intensidade de corrente é proporcional à velocidade de varredura, um aumento no ΔE_s pode contribuir de forma positiva para a sensibilidade da técnica. No entanto, os altos valores de incremento podem provocar uma deformação no perfil voltamétrico.

Neste estudo, o incremento de potencial foi avaliado na faixa de 1 a 9 mV, como pode ser visto na Figura 24.

Figura 24 – (A) Voltamogramas de onda quadrada para CFX $2,91 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, sobre HMDE, em tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 2,0, em diferentes incrementos de aplicação de pulsos de potencial. $f = 100$ s⁻¹ e $a = 50$ mV. (B) Relação entre intensidade da corrente de pico e incremento de varredura obtida a partir dos voltamogramas de onda quadrada da Figura 24A



Fonte: A própria autora

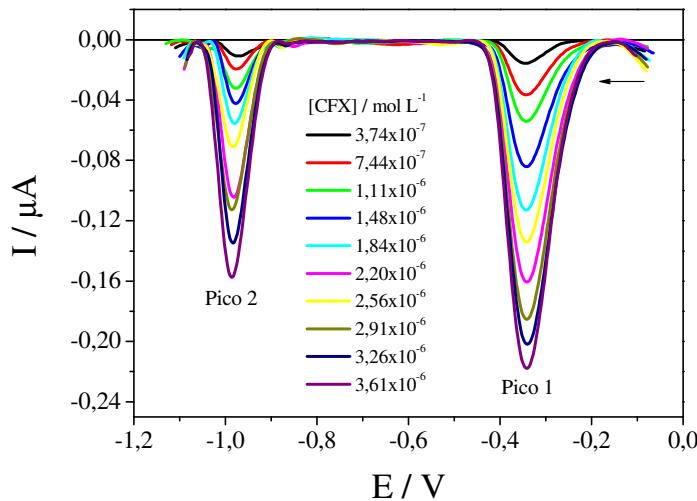
Os resultados da análise do incremento de potencial mostram que o potencial de pico é deslocado para valores mais negativos à medida que se aumenta o incremento, tal comportamento também é característico de processos irreversíveis⁽⁶⁴⁾. Observou-se que a corrente de pico aumenta com o crescimento de ΔE_s , apresentando relação linear até incremento igual a 4 mV. Porém, optou-se por trabalhar com o incremento de 3 mV, pois, em incrementos maiores, verificou-se deformação nos perfis voltamétricos.

4.1.4 Construção das curvas analíticas

Após a otimização dos parâmetros experimentais: eletrólito de suporte, tampão BR 0,04 mol L⁻¹ e pH 2,0, e voltamétricos: frequência de aplicação de pulsos de potencial de 90 s⁻¹, amplitude de pulso de potencial 30 mV e incremento de varredura de potencial de 3 mV, foram construídas curvas de analíticas. Para tanto, utilizou-se solução estoque de CFX $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. As curvas foram construídas empregando o método da adição de padrão e, neste procedimento, alíquotas da solução estoque de concentração conhecida do analito foram adicionadas à célula eletroquímica. A solução resultante era agitada após cada adição para homogeneização e, em seguida, as medidas voltamétricas eram realizadas.

Verificou-se um aumento linear entre corrente de pico e concentração de CFX, no intervalo de $3,74 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ a $3,61 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Os voltamogramas de onda quadrada são exibidos na Figura 25.

Figura 25 – Voltamograma de onda quadrada para CFX $2,91 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, sobre HMDE, em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 2,0, com concentrações variando de $3,74 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ a $3,61 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. $f = 90$ s⁻¹, $a = 30$ mV e $\Delta E_s = 3$ mV



Fonte: A própria autora

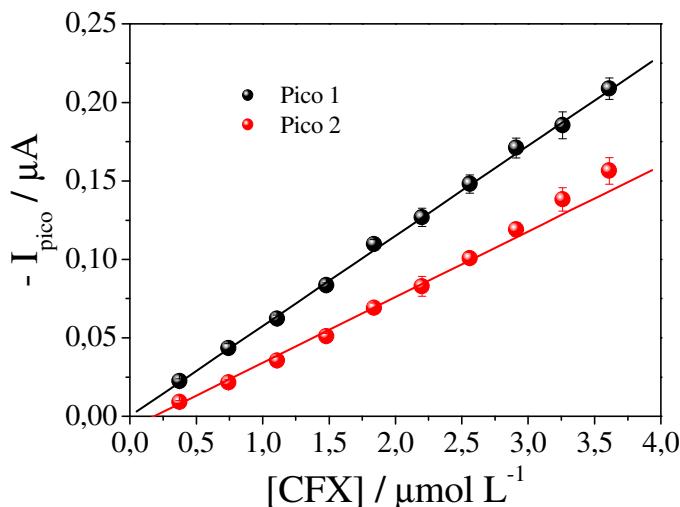
Analisando essa Figura, verifica-se que não há deslocamento dos potenciais de pico e que há um crescimento da corrente de pico em função da concentração, o que pode ser atribuído ao aumento da quantidade de espécies eletroativas em torno da superfície do eletrodo fazendo com que mais moléculas sejam reduzidas.

A Figura 26 apresenta a curva analítica com os valores médios de corrente de pico ($n = 5$) e com as respectivas barras de erro para cada ponto da curva obtida para CFX sobre HMDE. As equações da reta para a curva analítica, para os picos 1 e 2, com os respectivos intervalos de confiança de 95% para os valores dos coeficientes linear e angular são dadas por:

$$\text{Pico 1: } -I_{\text{pico}} (\mu\text{A}) = (1,61 \pm 0,37) \times 10^{-10} + (0,0574 \pm 0,0032) [\text{CFX}] \quad (13)$$

$$\text{Pico 2: } -I_{\text{pico}} (\mu\text{A}) = (-1,17 \pm 1,53) \times 10^{-8} + (0,0465 \pm 0,0075) [\text{CFX}] \quad (14)$$

Figura 26 – Curva analítica para CFX, sobre HMDE, obtida a partir dos valores médios ($n = 5$) das correntes de pico com concentração, com suas respectivas barras de desvio padrão. $f = 90 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$.



Fonte: A própria autora

As curvas analíticas indicaram aumento linear de corrente de pico em função do aumento da concentração tanto para o pico 1 como para o pico 2, porém o pico 1 foi escolhido para quantificação de CFX por apresentar melhor sensibilidade, além de potencial de redução menos negativo que o pico 2, o que pode ser observado na Figura 25. A partir dos valores dos coeficientes lineares e seus respectivos intervalos de confianças das equações da reta, apresentados nas equações 13 e 14, pode-se confirmar a escolha do pico 1 para quantificação da CFX, pois o pico 2 apresentou um valor elevado de desvio padrão indicando falta de reprodutibilidade.

A partir das informações obtidas das curvas analíticas foi possível calcular os valores do limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LQ). Por definição, LD é a concentração mínima de analito que pode ser detectada por um método analítico, porém não necessariamente pode ser quantificada. Já LQ é definido como a menor quantidade de analito que pode ser determinada quantitativamente. Os valores de LD e de LQ foram calculados seguindo os critérios recomendados pela IUPAC (do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*)⁽⁶⁶⁾ utilizando as seguintes expressões:

$$LD = \frac{3S_B}{b} \quad (15)$$

$$LQ = \frac{10S_B}{b} \quad (16)$$

em que S_B é o desvio padrão da média de medidas do branco (neste caso utilizou-se a média de 10 brancos) e b é a inclinação da reta da curva analítica.

Para efeito de comparação, também foram calculados os valores de LD e LQ utilizando os critérios recomendados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)⁽⁶⁷⁾:

$$LD = \frac{3S_{x/y}}{b} \quad (17)$$

$$LQ = \frac{10S_{x/y}}{b} \quad (18)$$

em que $S_{x/y}$ é o desvio padrão do intercepto (coeficiente linear) das curvas analíticas ($n = 5$).

A precisão de um método representa a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. Uma forma de estimar a precisão do procedimento é utilizando os valores de RSD, também conhecido como coeficiente de variação, que pode ser calculado pela equação 19:

$$\% RSD = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (19)$$

sendo que s é o desvio padrão da média das correntes de pico e \bar{x} é a média dos valores de corrente de pico. A precisão de uma metodologia pode ser avaliada por meio de experimentos de repetibilidade e de precisão intermediária⁽⁶⁸⁾.

A repetibilidade pode ser definida como o grau de graus de concordância entre os resultados de medições sucessivas, de uma mesma grandeza, efetuadas nas mesmas condições e em um curto intervalo de tempo⁽⁶⁹⁾. Assim, a repetibilidade foi testada considerando dez medidas sucessivas realizadas em uma mesma solução, contendo CFX $1,11 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, nas condições otimizadas.

A precisão intermediária refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo exatamente qual ou quais as condições serão variadas, tais como diferentes analistas, diferentes equipamentos e/ou diferentes tempos⁽⁶⁹⁾. Assim, a precisão intermediária

foi avaliada na mesma concentração de CFX na qual avaliou-se a repetibilidade, considerando cinco medidas em soluções e em dias diferentes.

A região de linearidade, a equação da curva analítica, o coeficiente de correlação (*r*), os valores de LD e de LQ, a repetibilidade (%RSD) e a precisão intermediária (%RSD) são apresentados na Tabela 2.

A partir valores dos limites de detecção e de quantificação apresentados na Tabela 2, observa-se que os resultados são bem elevados para o pico 2, o que pode ser explicado pela adsorção do fármaco nessa região de potencial, o que confirma mais uma vez a escolha do pico 1 para quantificação de CFX nas diversas amostras estudadas.

Tabela 2 – Resultados obtidos para regressão linear das curvas de trabalho para CFX sobre HMDE em eletrólito de suporte (tampão BR 0,04 mol L⁻¹) por VOQ. A varredura se deu na faixa de potencial de 0 V até -1,1 V. *f* = 90 s⁻¹, *a* = 30 mV, ΔE_s = 3mV

Região de linearidade	$3,74 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹ a $3,61 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹	
Parâmetro	Pico 1	Pico 2
Equação	$-I_{\text{pico}} = (1,61 \pm 0,37) \times 10^{-10} + (0,0574 \pm 0,0032)$ [CFX]	$-I_{\text{pico}} = (-1,17 \pm 1,53) \times 10^{-8} + (0,0465 \pm 0,0075)$ [CFX]
<i>r</i>	0,9991	0,9954
LD (mol L ⁻¹)	$4,92 \times 10^{-9}$ (2,19 µg L ⁻¹) – IUPAC $1,64 \times 10^{-7}$ (73,18 µg L ⁻¹) – ANVISA	$6,08 \times 10^{-9}$ (2,75 µg L ⁻¹) – IUPAC $9,94 \times 10^{-7}$ (443,4 µg L ⁻¹) – ANVISA
LQ (mol L ⁻¹)	$1,64 \times 10^{-8}$ (7,32 µg L ⁻¹) – IUPAC $1,43 \times 10^{-6}$ (638,4 µg L ⁻¹) – ANVISA	$2,03 \times 10^{-8}$ (9,05 µg L ⁻¹) – IUPAC $3,31 \times 10^{-6}$ (1,48mg L ⁻¹) – ANVISA
Repetibilidade (%)	1,33 (n = 10)	4,09 (n = 10)
Precisão intermediária (%)	2,74 (n = 5)	4,63 (n = 5)

Adicionalmente, pode-se observar que os valores de LD e LQ quando calculados utilizando a recomendação da IUPAC, apresentaram valores menores do que aqueles encontrados quando utilizamos a recomendação da ANVISA. Devido ao ruído da linha de base, as medidas dos valores de corrente apresentam uma baixa precisão com a ordem de

grandeza de sinais de 10^{-8} A. Entretanto, o valor de S_b pode ser reduzido se o analista realizar diversas medidas do branco e obtiver assim um valor muito pequeno, o que levará a valores de limites de detecção muito baixos na ordem de micromoles ou até nanomoles. Quando se utiliza a expressão recomendada pela ANVISA, o valor de $S_{x/y}$ permite registrar um sinal analítico significativamente diferente do ruído da linha de base e próximo dos pontos iniciais da curva analítica, fornecendo valores de LD e LQ maiores do que aqueles obtidos utilizando o desvio padrão dos brancos⁽⁷⁰⁾.

Os valores de LD e de LQ calculados a partir da metodologia proposta neste trabalho (segundo a IUPAC) foram de $2,19 \mu\text{g L}^{-1}$ ($4,92 \times 10^{-9}$ mol L $^{-1}$) e $7,32 \mu\text{g L}^{-1}$ ($1,64 \times 10^{-8}$ mol L $^{-1}$), respectivamente. Estes valores são bem menores do que aqueles publicados por Can *et al.*⁽⁷¹⁾, onde foi realizada a determinação de CFX empregando a técnica cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com coluna C₁₈ e detector de UV. Nesse trabalho foram obtidos LD igual a $1,35 \times 10^{-7}$ mol L $^{-1}$ e LQ igual a $4,08 \times 10^{-7}$ mol L $^{-1}$; já por Espectroscopia na região do ultravioleta e do visível, obteve-se LD de $1,91 \times 10^{-6}$ mol L $^{-1}$ e LQ de $5,79 \times 10^{-6}$ mol L $^{-1}$. Esses resultados sugerem que a metodologia eletroanalítica desenvolvida para determinação de CFX apresentou sensibilidade satisfatória e pode ser aplicada para determinação desse fármaco em nível de traços.

4.1.5 Estudo de recuperação em eletrólito

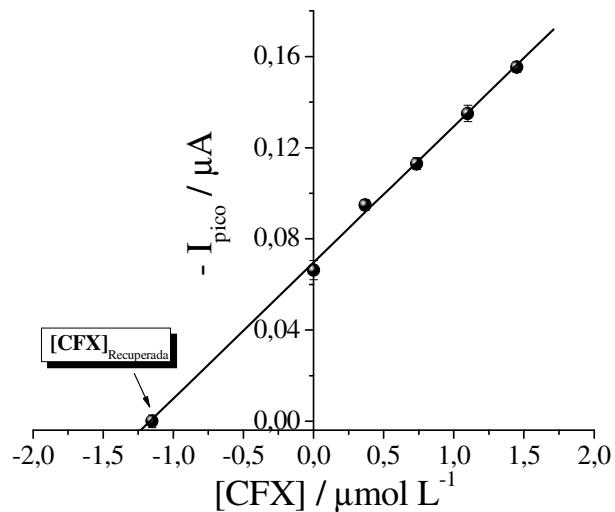
A eficiência da metodologia proposta foi avaliada utilizando-se testes de recuperação. Thompson *et al.* definem recuperação como a proporção da quantidade do analito de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e apresentada para quantificação⁽⁷²⁾. O método da adição de padrão foi empregado nos testes de recuperação, nesse método são adicionadas a uma amostra desconhecida, quantidades conhecidas do analito e a partir do aumento do sinal analítico, é deduzido quanto do constituinte estava presente na amostra original⁽⁷¹⁾.

A taxa de recuperação foi avaliada utilizando-se o método gráfico, onde o eixo x (eixo das concentrações) forneceu a concentração de padrão adicionado ao eletrólito e a extrapolação deste eixo mostrou a relação percentual entre as quantidades recuperadas e adicionadas, de acordo com a relação⁽⁷³⁾:

$$\% \text{ Rec} = \frac{[\text{analito}]_{\text{detectada}}}{[\text{analito}]_{\text{adicionada}}} \times 100 \quad (20)$$

A curva de recuperação foi obtida dentro da faixa de concentração investigada na curva analítica. Escolheu-se a concentração de $1,11 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (correspondente à terceira adição da curva analítica) como sendo a concentração adicionada. Na sequência, à amostra artificialmente contaminada, foram adicionadas alíquotas de 75 µL da solução do padrão de CFX $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ à solução tampão BR 0,04 mol L⁻¹ (pH = 2). A Figura 27 apresenta a curva de recuperação de CFX em eletrólito de suporte sobre HMDE com $f = 90$ s⁻¹, $a = 30$ mV e $\Delta E_s = 3$ mV em meio de tampão BR pH 2,0, que foi construída a partir dos valores médios de corrente de pico ($n = 3$), com suas respectivas barras de desvio padrão.

Figura 27 – Curva de recuperação para CFX, sobre HMDE, em eletrólito de suporte, obtida a partir de valores médios ($n = 3$) de I_{pico} vs. [CFX], em meio de tampão BR pH 2,0. $f = 90$ s⁻¹, $a = 30$ mV e $\Delta E_s = 3$ mV.



Fonte: a própria autora

Na avaliação entre corrente de pico e concentração adicionada de CFX ($1,11 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹), observou-se linearidade com coeficiente de correlação de 0,9993 cuja equação da reta é representada pela seguinte equação:

$$-I_{\text{pico}} (\mu\text{A}) = (6,895 \pm 0,1783) \times 10^{-8} + (0,0601 \pm 0,0014) [\text{CFX}] \quad (21)$$

Por meio das concentrações recuperadas, os percentuais de recuperação foram calculados usando a Equação 20. Os resultados obtidos no estudo de recuperação em eletrólito de suporte estão resumidos na Tabela 3.

Tabela 3 – Resultados obtidos para curvas de recuperação de CFX, sobre HMDE, em eletrólito em meio de tampão BR pH 2,0. $f = 90 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$

[CFX]adicionada (mol L ⁻¹)	[CFX]detectada (mol L ⁻¹)	Recuperação (%)	RDS (%)
$1,11 \times 10^{-6}$	$1,13 \times 10^{-6}$	101,38	1,22

Esses resultados indicam que a metodologia possui uma ótima precisão, pois se encontram dentro dos limites de confiança aceitáveis para metodologias analíticas, que varia entre 70% e 130%, comprovando, assim, a eficiência do método proposto⁽⁷⁴⁾, o que possibilita a aplicação em amostras complexas.

Assim, com o objetivo de confirmar a aplicabilidade da metodologia eletroanalítica desenvolvida, foram realizados testes de recuperação em amostras de medicamentos, leite bovino e água natural. Os resultados são apresentados nas seções seguintes.

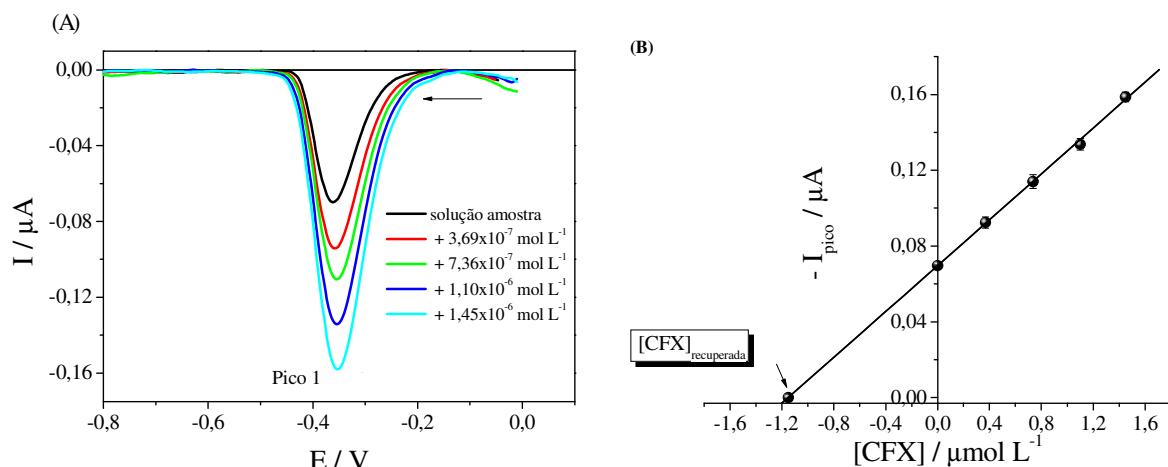
4.1.6 Aplicação da metodologia em medicamentos

Para aplicação da metodologia eletroanalítica em amostras de formulações comerciais, foram utilizadas amostras de comprimido e suspensão oral de Zinnat®, medicamento que contém CFX como princípio ativo. As amostras dos medicamentos foram preparadas conforme descrito no item 3.4.2.

As curvas de recuperação foram construídas a partir da adição de uma alíquota da solução amostra do medicamento de concentração de $1,11 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (correspondente à terceira adição da curva analítica). Na sequência, foram adicionadas alíquotas de 75 µL da solução do padrão de CFX $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ à solução tampão BR 0,04 mol L⁻¹ (pH = 2).

A Figura 28 apresenta os voltamogramas de onda quadrada (A) e a curva de recuperação para as amostras de comprimido de Zinnat®(B). Obtidos em diferentes concentrações para recuperação em comprimido Zinnat®, sobre HMDE,em meio de tampão BR pH 2,0. $f = 90 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$

Figura 28 – (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes concentrações para recuperação em comprimido Zinnat®, sobre HMDE, em meio de tampão BR pH 2,0. $f = 90 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$. (B) Relação entre corrente de pico e concentração de CFX para curva de recuperação em comprimido Zinnat®



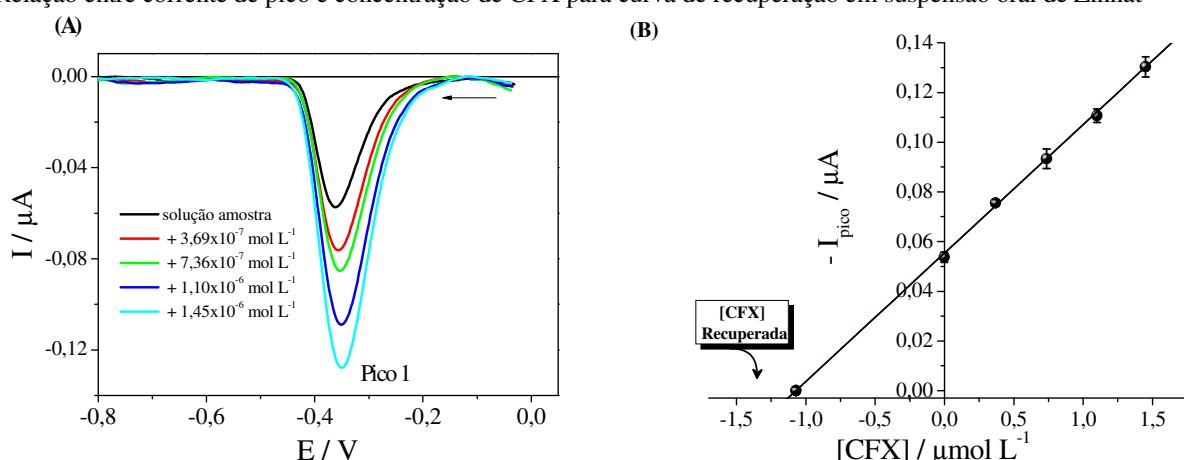
Fonte: A própria autora

Os voltamogramas apresentados na Figura 28A não apresentaram deslocamento dos potenciais de pico, evidenciando que o perfil voltamétrico não sofreu influência da matriz do comprimido. A curva de recuperação mostrada na Figura 28B apresentou um coeficiente de correlação $r = 0,9999$. A equação da reta para a intensidade da corrente de pico em função da concentração de CFX é representada pela seguinte equação:

$$-I_{\text{pico}} (\mu\text{A}) = (6,966 \pm 0,1012) \times 10^{-8} + (0,0604 \pm 0,0018) [CFX] \quad (22)$$

A Figura 29 apresenta os voltamogramas de onda quadrada (A) e a curva de recuperação (B) para as amostras de suspensão oral de Zinnat®.

Figura 29 – (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes concentrações para recuperação em suspensão oral de Zinnat®, sobre HMDE, em meio de tampão BR pH 2,0. $f = 90 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$. (B) Relação entre corrente de pico e concentração de CFX para curva de recuperação em suspensão oral de Zinnat®



Fonte: A própria autora

A equação da reta para a intensidade da corrente de pico em função da concentração de CFX, para n = 3, é representada pela seguinte equação:

$$-I_{\text{pico}} (\mu\text{A}) = (5,478 \pm 0,207) \times 10^{-8} + (0,0519 \pm 0,0032) [\text{CFX}] \quad (23)$$

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos para as curva de recuperação para a CFX, utilizando-se o medicamento Zinnat® nas apresentações comprimido e suspensão oral.

Tabela 4 – Resultados obtidos para curvas de recuperação de CFX, sobre HMDE, em medicamentos por VOQ. $f = 90 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$. $[\text{CFX}]_{\text{adicionada}} = 1,11 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

	Zinnat® comprimido	Zinnat® suspensão
Dosagem nominal	250 mg / compr.	250 mg / 5mL
Massa CFX recup. (mg)	259	241
$[\text{CFX}]_{\text{rec}} / \text{mol L}^{-1}$	$1,15 \times 10^{-6}$	$1,07 \times 10^{-6}$
Recuperação(%)	103,60	96,40
RSD (%)	2,79	2,89

Valores de recuperação média de 103,80 % com RSD de 2,79 % obtidas para CFX nos comprimidos de Zinnat® e de 96,40% com RSD de 2,89 % obtidas para CFX na suspensão oral de Zinnat® estão dentro dos limites de confiança aceitáveis para metodologias analíticas, o que comprova a eficiência do método proposto.

4.1.7 Aplicação da metodologia em leite bovino

A presença de resíduos de antibióticos, mesmo que em baixas concentrações, representa um ponto crítico de controle de contaminação química do leite, o que constitui um risco potencial à saúde humana, seja exercendo pressão seletiva sobre a flora intestinal, favorecendo o crescimento de microorganismos com resistência natural ou adquirida, ou dando lugar, direta ou indiretamente, para o aparecimento de resistência em bactérias enteropatogênicas. Essa contaminação pode ocorrer por meio de fontes diretas, pela adulteração com o objetivo de prolongar a vida útil do leite, ou indireta, consequência do

tratamento de infecções, principalmente mastiteⁱⁱ ou ainda incorporados à alimentação animal como suplemento dietético^(75,76). Portanto, faz-se importante o desenvolvimento de metodologias analíticas que sejam capazes de detectar concentrações de antibióticos em leite em níveis de traços.

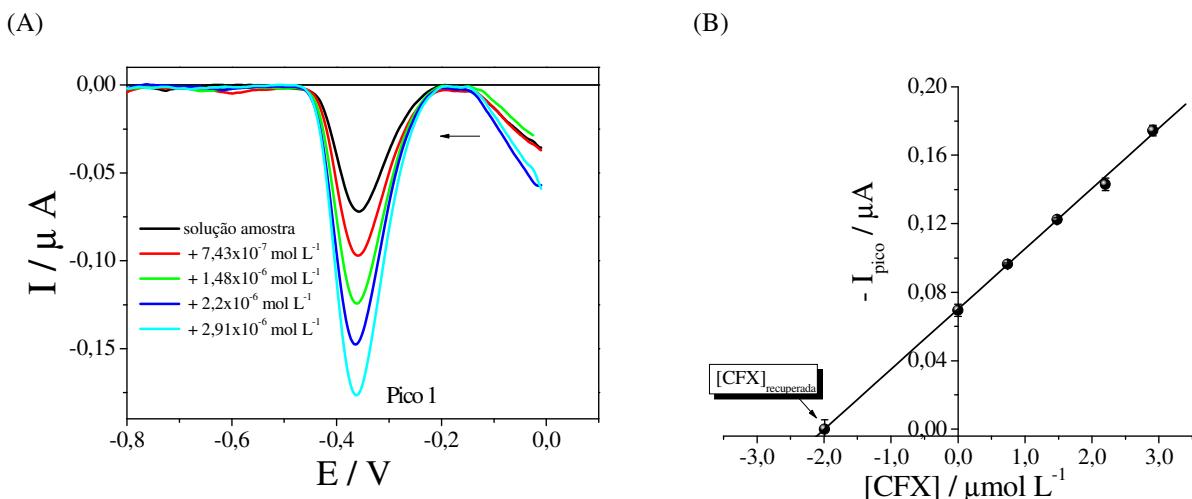
Diante do exposto e como a metodologia proposta apresentou-se eficiente em amostras de medicamentos, foram realizados testes de recuperação em amostras de leite bovino. As amostras de leite bovino foram tratadas conforme descrito anteriormente no item **3.4.6.** Antes de realizar os experimentos de recuperação, alíquotas de concentração conhecida do fármaco foram adicionadas ao leite antes e depois da separação das fases, seguidos do registro de medidas voltamétricas para verificar se não haveria arraste do fármaco para a fase sólida do leite. Após a constatação de que todo o fármaco adicionado ficava na fase líquida do leite, deu-se continuidade ao estudo da recuperação. A Figura 30 apresenta os voltamogramas de onda quadrada (A) e a curva de recuperação para a amostra de leite contaminada artificialmente, adicionando-se uma alíquota adequada da solução estoque do antibiótico resultando em uma concentração de $2,00 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de CFX, seguido da adição de sucessivas alíquotas de 75 µL da solução do padrão de CFX $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ à solução tampão BR 0,04 mol L⁻¹ (pH 2,0).

Os voltamogramas apresentados na Figura 29A não apresentaram deslocamento de potencial de pico, indicando que não houve interferência de componentes do soro do leite, tais como proteínas (albuminas e globulinas) e lactose. A curva de recuperação mostrada na Figura 29B apresentou um coeficiente de correlação $r = 0,9992$. A equação da reta para a intensidade da corrente de pico em função da concentração de CFX, para $n = 3$, é representada pela seguinte equação:

$$-I_{\text{pico}} (\mu\text{A}) = (6,892 \pm 0,101) \times 10^{-8} + (0,0355 \pm 0,00077) [\text{CFX}] \quad (24)$$

ⁱⁱ Mastite: inflamação no úbere da vaca

Figura 30 – (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes concentrações para recuperação em leite contendo CFX $2,00 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, sobre HMDE, em meio de tampão BR pH 2,0. $f = 90$ s⁻¹, $a = 30$ mV, $\Delta E_s = 3$ mV. (B) Relação entre corrente de pico e concentração de CFX para curva de recuperação em leite.



Fonte: A própria autora

A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos para as curvas de recuperação para a CFX em leite bovino.

Tabela 5 – Resultados obtidos para curvas de recuperação de CFX, sobre HMDE, em leite bovino por VOQ. $f = 90$ s⁻¹, $a = 30$ mV, $\Delta E_s = 3$ mV

$[CFX]_{\text{adicionada}}$ (mol L ⁻¹)	$[CFX]_{\text{detectada}}$ (mol L ⁻¹)	Recuperação (%)	RDS (%)
$2,00 \times 10^{-6}$	$1,94 \times 10^{-6}$	97,19	1,81

Pode-se perceber, pelos dados apresentados na Tabela 5, que o método proposto também apresentou-se eficiente para determinação de CFX em amostras de leite bovino, pois os valores de recuperação média de 97,19% com RSD de 1,81% estão dentro dos limites de confiança aceitáveis para metodologias analíticas, não sofrendo influência das substâncias que estão presentes na composição do leite bovino.

4.1.8 Aplicação da metodologia em água natural

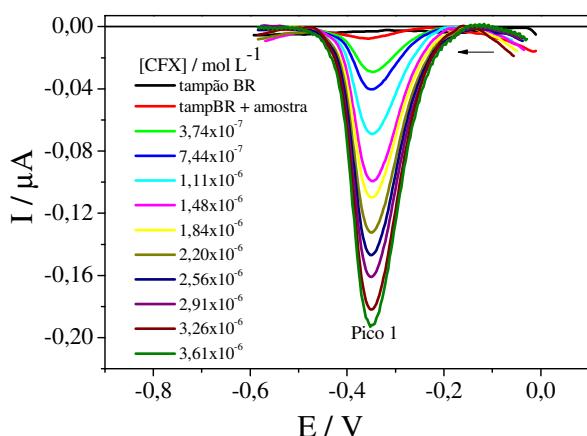
A metodologia desenvolvida neste trabalho também foi avaliada em amostra de água natural proveniente do açude Gavião, localizado no município de Pacatuba, Estado do Ceará. O Açude Gavião possui capacidade de armazenamento de 32,9 hm³ e área da bacia

hidráulica e hidrográfica de 07 e 97 km², respectivamente⁽⁷⁷⁾. O açude Gavião tem origem a partir do barramento do Rio Cocó, localizado a montante da Estação de Tratamento de Água (ETA), responsável pelo abastecimento de água potável da região metropolitana de Fortaleza. É um reservatório estratégico do Sistema de Abastecimento de Água Bruta da Região Metropolitana de Fortaleza – SAABRMF, fornecendo água bruta à ETA – Gavião, ocasionalmente ao Distrito Industrial, em Maracanaú, e as cidades de Maranguape, Pacatuba e Guaiuba⁽⁷⁸⁾.

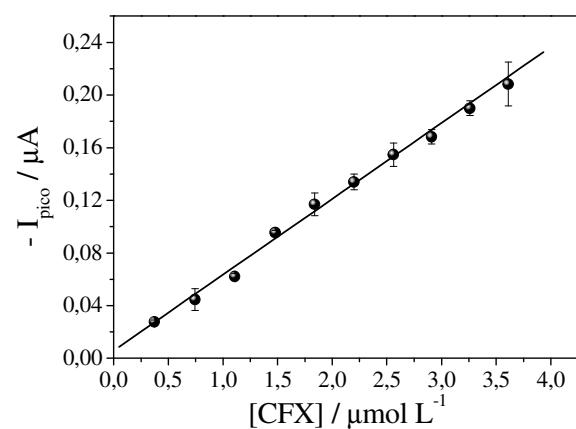
Antes de realizar os experimentos de recuperação em amostra de água do Açude Gavião, foram construídas curvas analíticas, empregando os parâmetros otimizados para CFX, em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ (pH 2,0). Utilizando uma solução estoque de CFX 1,0x10⁻⁵ mol L⁻¹. Os voltamogramas de onda quadrada obtidos são exibidos na Figura 31.

Figura 31 – (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes concentrações para recuperação no eletrólito em meio de 2 mL de água natural + 18 mL de tampão BR pH 2,0 sobre HMDE com $f = 90\text{ s}^{-1}$, $a = 30\text{ mV}$ e $\Delta E_s = 3\text{ mV}$ (B) Relação entre corrente de pico e concentração de CFX para curva de recuperação em água natural

(A)



(B)



Fonte: A própria autora

Os voltamogramas apresentados na Figura 31A mostram que, as adições sucessivas do padrão de CFX provocaram um aumento crescente da corrente de pico, indicando uma relação linear entre a corrente de pico e a concentração de CFX. Isso foi ratificado quando da construção da curva analítica apresentada na Figura 31B. Também não ocorreu deslocamento do potencial da corrente de pico, indicando que o processo de redução de CFX sobre HMDE não sofreu interferência das substâncias orgânicas e/ou inorgânicas presentes na composição da água natural.

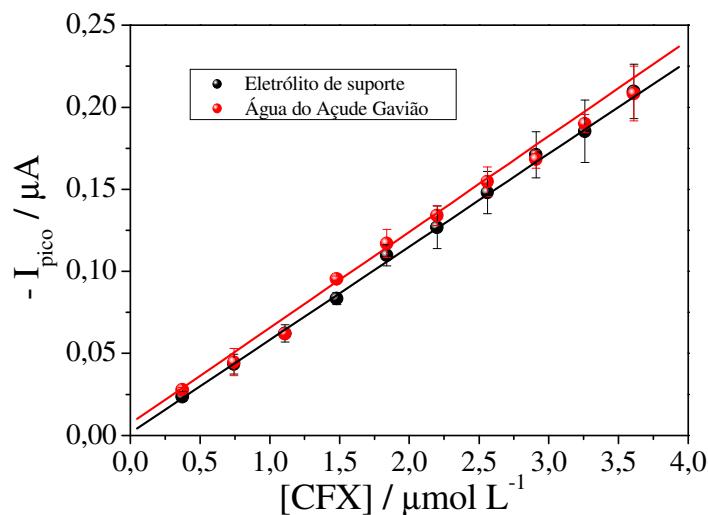
Adicionalmente, foram realizadas comparações entre os resultados das curvas analíticas feitas em eletrólito de suporte e em água natural. As equações 24 e 25 representam a relação linear entre a corrente de pico e a concentração de CFX em eletrólito de suporte e em água natural, respectivamente.

$$-I_{\text{pico}}(\mu\text{A}) = (1,61 \pm 0,37) \times 10^{-10} + (0,0574 \pm 0,0032) [\text{CFX}] \quad (24)$$

$$-I_{\text{pico}} (\mu\text{A}) = (6,63 \pm 0,83) \times 10^{-9} + (0,0580 \pm 0,00026) [\text{CFX}] \quad (25)$$

A equação 24 apresentou um coeficiente de correlação de 0,9991, e a equação 25, $r = 0,9950$. Comparando as curvas analíticas, observou-se que praticamente não houve mudança nas respostas voltamétricas, indicando não houve influência de componentes orgânicos e inorgânicos presentes nas amostras de água do açude. Esses resultados são melhores observados na Figura 32.

Figura 32 – Curvas analíticas para CFX sobre HMDE, em eletrólito de suporte preparado com água Milli-Q e em água de rio (2 mL de água do Açude Gavião + 18mL de tampão BR pH 2,0), nas condições otimizadas



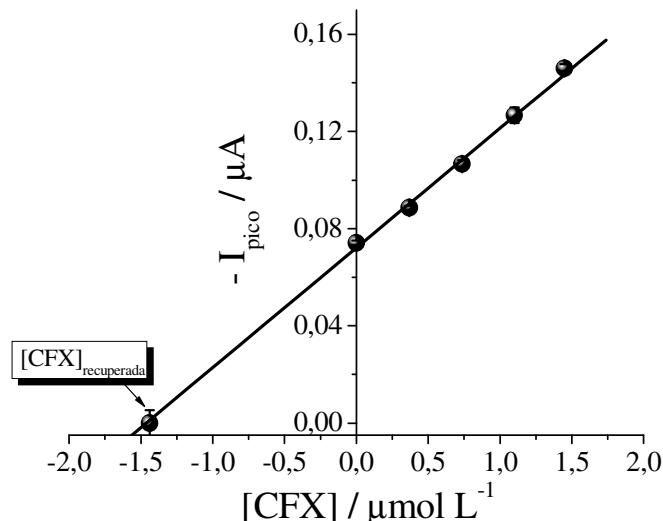
Fonte: A própria autora

Analisando esses resultados foi possível fazer uma comparação entre os métodos de padrão externo (curva em eletrólito de suporte) caracterizado pela ausência de interferentes, uma vez que essa curva foi construída em eletrólito de suporte preparado com água purificada, e o método da adição de padrão, que é um método indicado para ser utilizado em amostras complexas (neste caso, água do Açude Gavião). Assim, para a curva analítica construída com amostra de água do Açude Gavião, observou-se a que não há influência do efeito de matriz, já que os coeficientes angulares das duas curvas são praticamente iguais.

Os valores de LD e de LQ para CFX em água natural foram calculados a partir das curvas analíticas. Desse modo, determinou-se $LD = 4,87 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ e $LQ = 1,62 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. Esses valores são semelhantes àqueles calculados somente na presença de eletrólito de suporte, indicando mais uma vez que não há interferência da matriz. Assim, o método de adição de padrão também foi aplicado na quantificação da amostra.

Foram construídas curvas de recuperação, em condições semelhantes às das curvas de recuperação já descritas. Esses resultados são apresentados na Figura 33.

Figura 33 – Relação entre corrente de pico e concentração de CFX para curva de recuperação em água natural contendo $CFX 2,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, sobre HMDE, em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0. $f = 90 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$



Fonte: A própria autora

A concentração adicionada foi de $1,11 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, correspondente ao terceiro ponto da curva analítica em água natural. Calculou-se uma concentração recuperada média de $1,437 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, com percentual de recuperação média de 129,40% com RSD de 0,60%. Comparando o resultado da recuperação na amostra de água do açude Gavião com aquele obtido em meio de tampão BR (%Rec. = 101,38%), observa-se um acréscimo de aproximadamente 30% no valor do percentual de recuperação, isto pode estar relacionado com a corrente residual que a amostra apresentou antes do início da adição do padrão. Entretanto, os resultados obtidos mostram que a metodologia desenvolvida pode ser aplicada com sucesso na quantificação de CFX em águas naturais.

4.2 Cefalexina

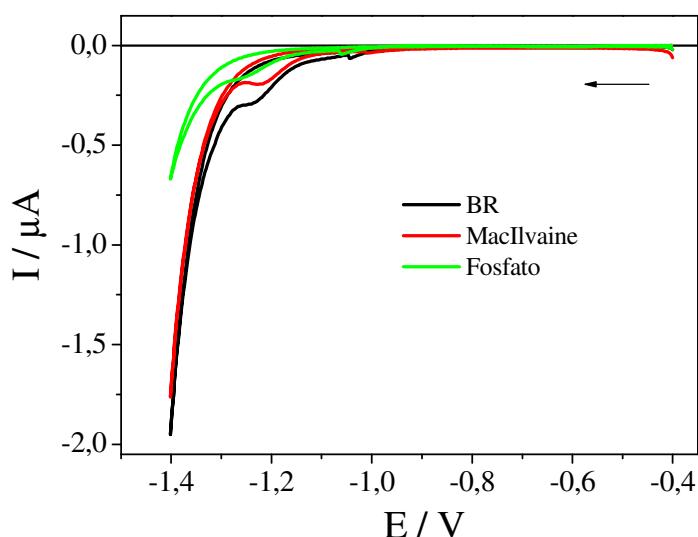
4.2.1 Estudos preliminares

Estudos preliminares foram realizados com o objetivo de encontrar condições experimentais ótimas, que permitam tanto a avaliação do comportamento eletroquímico como o desenvolvimento de metodologia eletroanalítica sensível para determinação de CFA utilizando as técnicas voltamétricas adequadas.

4.2.1.1 Escolha do eletrólito de suporte

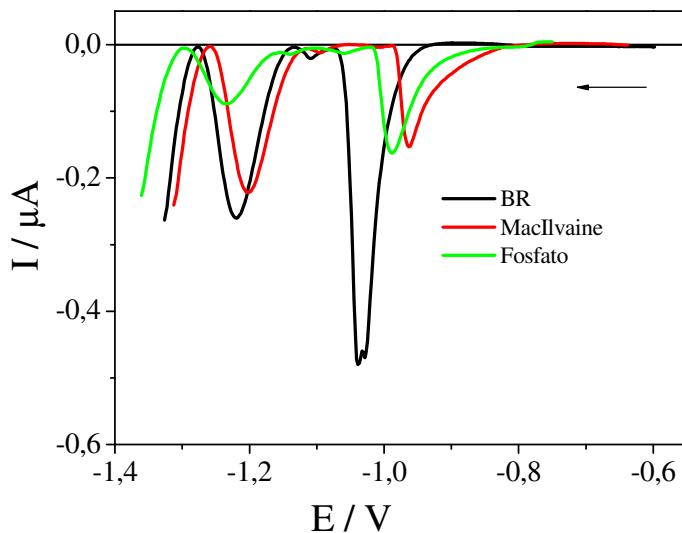
Para avaliar o eletrólito de suporte a ser empregado no desenvolvimento da metodologia para determinação de CFA, utilizou-se VC com velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹ e VOQ com frequência de aplicação de pulsos de potencial de 100 s⁻¹, amplitude de pulso de potencial de 50 mV e incremento de varredura de 2 mV, ambas com CFA 2,91x10⁻⁵ mol L⁻¹ e HMDE como eletrodo de trabalho. Foram testadas soluções dos tampões BR 0,04 mol L⁻¹, McIlvaine 0,05 mol L⁻¹ e fosfato 0,05 mol L⁻¹, todos ajustados para pH 2,5. As Figuras 34 e 35 apresentam respectivamente, os perfis de voltamogramas cíclicos e de onda quadrada para CFA 1,0x10⁻⁵ mol L⁻¹, sobre HMDE, nos diferentes tampões avaliados.

Figura 34 – Voltamogramas cíclicos para CFA 2,91x10⁻⁵ mol L⁻¹, sobre HMDE, em diferentes eletrólitos de suporte todos ajustados para pH = 2,5. v = 100 mV s⁻¹



Fonte: A própria autora

Figura 35 – Voltamogramas de onda quadrada para CFA $2,91 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, sobre HMDE, em diferentes eletrólitos de suporte, todos ajustados para pH = 2,5. $f = 100$ s⁻¹, $a = 50$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV



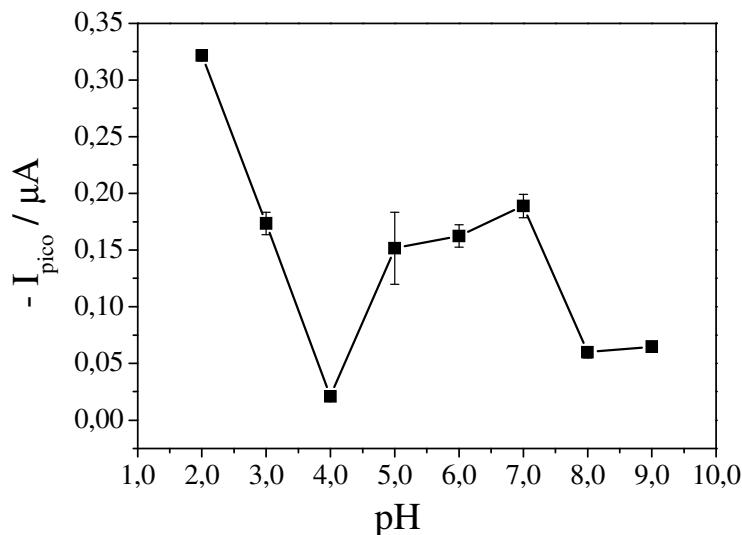
Fonte: A própria autora

As respostas voltamétricas em tampão BR apresentaram intensidades de corrente maiores que nos demais meios, bem como perfil voltamétrico mais definido por VC e por VOQ, sendo o escolhido para dar continuidade a este trabalho.

4.2.1.2 Influência do pH do meio

Após ser definido o eletrólito de suporte, foi realizado estudo para determinar o pH correspondente à melhor resposta eletroquímica em termos de intensidade de corrente e perfil voltamétrico. O estudo de pH foi realizado utilizando a técnica de VOQ, para CFA $2,91 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, sobre HMDE em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ em diferentes valores de pH com frequência de aplicação de pulsos de 100 s⁻¹, amplitude de pulsos de potencial de 50 mV e incremento de potencial de 2 mV. A relação entre intensidade de corrente de pico e pH para a redução de CFA está apresentada na Figura 36.

Figura 36 – Relação entre intensidade da corrente de pico e pH obtida a partir dos voltamogramas de onda quadrada para CFA $2,91 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, sobre HMDE, em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ em diferentes valores de pH. $f = 100$ s⁻¹, $a = 50$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV



Fonte: A própria autora

Como pode ser observado na Figura 36, o pH 2,0 apresentou maior intensidade de corrente e, por consequência, maior sensibilidade analítica. Portanto, o pH 2,0 foi considerado ideal para o desenvolvimento da metodologia analítica para determinação de CFA.

Ao avaliar a relação entre potencial de pico e pH não foi identificada faixa de linearidade no intervalo de pH estudado, não sendo possível, portanto, aplicar a equação 3, para calcular o número de prótons envolvidos na redução da CFA sobre HMDE utilizando tampão BR pH 2,0.

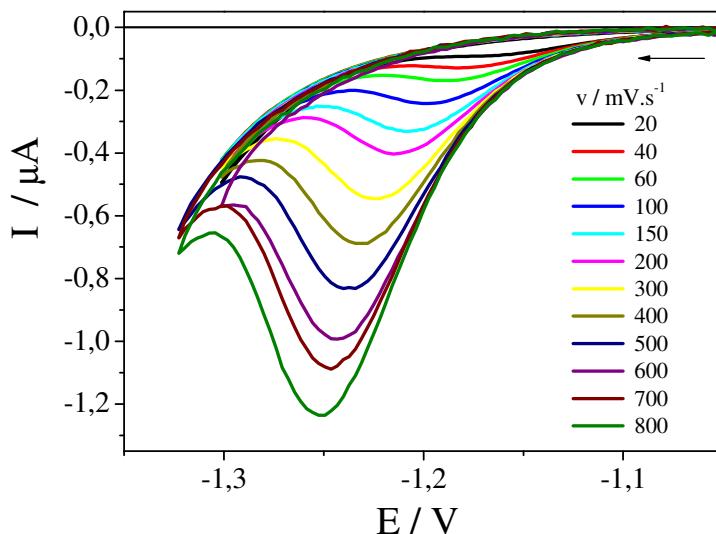
Entretanto, Xu *et al.*⁽²¹⁾ avaliaram o comportamento polarográfico da CFA utilizando HCl como eletrólito de suporte e encontraram uma região de linearidade na faixa de pH entre 0 e 3. Os autores encontraram valor de inclinação 68 mV / pH, sugerindo que o número de prótons e de elétrons que participam da reação é aproximadamente igual.

4.2.1.3 Comportamento eletroquímico

Foram realizados testes da eletroatividade da CFA sobre HMDE utilizando VC. O comportamento eletroquímico da CFA sobre HMDE foi avaliado no intervalo de potencial de -0,70 V a -1,30 V com velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹. Observou-se, a presença de um processo catódico de pequena intensidade em torno de -0,97 V (pico 1) e outro em -1,20 V (pico 2), não foi observado processo anódico, caracterizando-o como totalmente irreversível.

Na sequência, experimentos para a análise da variação da velocidade de varredura e sua influência corrente de pico e no potencial de pico de redução da CFA, foram realizados no intervalo de 20 a 800 mV s⁻¹. Os voltamogramas cíclicos de CFA 2,91x10⁻⁵ mol L⁻¹ sobre HMDE em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ (pH 2,0), obtidos em função da velocidade de varredura podem ser observados na Figura 37.

Figura 37 – Voltamogramas cíclicos para CFA 2,91x10⁻⁵ mol L⁻¹, sobre HMDE, em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 2,0. Velocidade de varredura de 20 até 800 mV s⁻¹



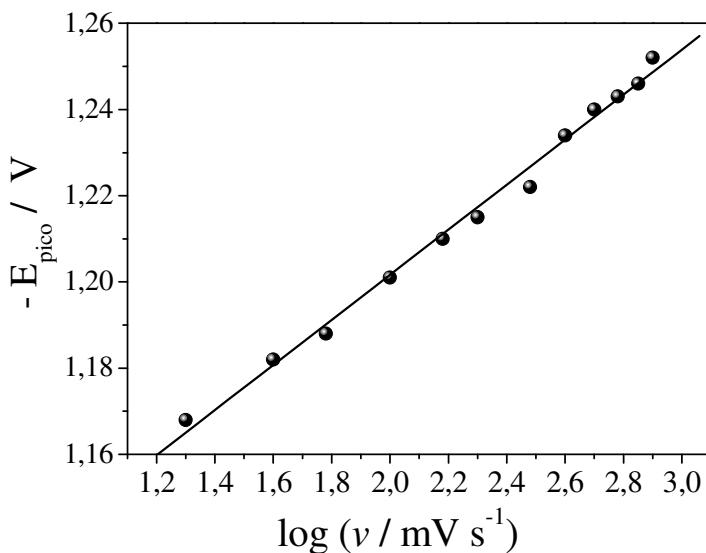
Fonte: A própria autora

Pode-se observar a partir dos voltamogramas da Figura 37, que os potenciais de pico são deslocados para valores mais negativos, além da ausência de picos de oxidação, confirmando a natureza irreversível do processo de redução da CFA sobre a superfície eletródica⁽⁵³⁾.

A Figura 38 apresenta a relação entre o potencial de pico e o logaritmo da velocidade de varredura, observa-se um comportamento linear com $r = 0,9965$ para o pico 2 que pode ser representado pela equação:

$$- E_{\text{pico}2} (\text{V}) = 1,099 + 0,0525 \log (v / \text{mV s}^{-1}) \quad (26)$$

Figura 38 – Relação entre o logaritmo da corrente de pico e o logaritmo da velocidade de varredura para CFA $2,91 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos da Figura 37



Fonte: A própria autora

A partir do valor do coeficiente angular da equação 26, calculou-se $\alpha n = 1,13$. Considerando que, para sistemas com moléculas orgânicas em soluções aquosas, o coeficiente de transferência eletrônica pode ser considerado igual a 0,5⁽⁵³⁾, tem-se $n \equiv 2$, ou seja, dois elétrons participam do processo de redução da CFA. Assim, como foi discutido no item 4.2.1.2, presume-se então que a reação consome dois prótons por molécula de CFA reduzida. Esse resultado está de acordo com Xu *et al.*⁽²¹⁾, que propuseram que a reação de redução de CFA em meio ácido sobre eletrodo de mercúrio ocorre na dupla ligação (– C = C –) do grupo etilênico, envolvendo a transferência de dois elétrons e dois prótons.

Observou-se também que a corrente de pico varia linearmente com a velocidade de varredura no intervalo estudado, de acordo com a equação 27:

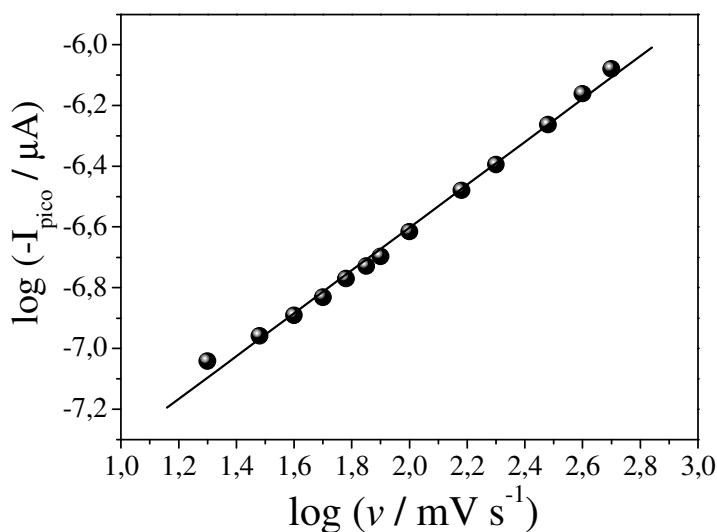
$$-I_{\text{pico}} = 9,189 \times 10^{-8} + 1,450 \times 10^{-9} (\nu / \text{mV s}^{-1}) \quad (27)$$

em que $r = 0,9987$. Esse comportamento é um indicativo de que o transporte de massa é controlado por adsorção das espécies na superfície eletródica⁽⁶⁰⁾.

De acordo com Gosser⁽⁶¹⁾, o tipo de transporte de massa envolvido no processo de redução da molécula, pode ser avaliado a partir da análise do coeficiente angular da relação entre logaritmo da intensidade de corrente de pico e logaritmo da velocidade de varredura. Se o coeficiente angular for próximo de 0,5 a etapa determinante da velocidade de reação é a

difusão; por outro lado, se o coeficiente angular obtido for próximo da unidade, a etapa determinante é a adsorção das espécies eletroativas na superfície do eletrodo. A Figura 38 apresenta a relação entre o logaritmo da intensidade de corrente de pico e logaritmo da velocidade de varredura para CFA $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ obtida a partir dos voltamogramas cíclicos da Figura 39.

Figura 39 – Relação entre logaritmo da corrente de pico e logaritmo da velocidade de varredura para CFA $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos da Figura 36



Fonte: A própria autora

A relação linear obtida apresentou inclinação de 0,73 com $r = 0,9978$ como pode ser visto na equação 28.

$$\log (-I / \mu\text{A}) = -8,04 + 0,73 \log (v / \text{mV s}^{-1}) \quad (28)$$

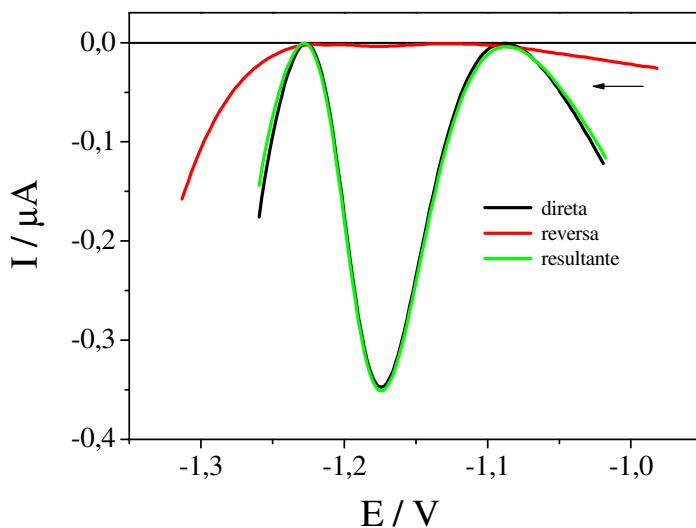
A inclinação apresentou um valor intermediário, que é um indicativo que há um controle misto envolvendo processos de difusão e de adsorção⁽⁶¹⁾. Esse comportamento é semelhante àquele observado para CFX e também ao observado Jain *et al.*⁽⁴³⁾ para o antibiótico cefixima, conforme citado anteriormente, o que pode ser um indicativo de comportamento do grupo das Cefalosporinas.

4.2.3 Voltametria de onda quadrada

4.2.2.1 Componentes de corrente

O comportamento voltamétrico da CFA sobre HMDE foi investigado utilizando como eletrólito de suporte tampão BR 0,04 mol L⁻¹ em pH 2,0, com o auxílio da técnica de VOQ, utilizando os parâmetros experimentais $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. A Figura 40 apresenta as componentes de corrente obtidas.

Figura 40 – Componentes de corrente obtidas para voltamograma de onda quadrada para CFA $2,9 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, sobre HMDE, em meio de tampão BR pH 2,0, $f=100 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$



Fonte: A própria autora

A partir da análise das componentes de corrente, foi possível confirmar o comportamento irreversível da reação da CFA sobre HMDE, como se pode observar na Figura 40. Como não foi observada corrente reversa, consequentemente as correntes direta e resultante apresentaram os mesmos valores. Assim, semelhante ao comportamento exibido pelo antibiótico CFX, sugere-se que o pulso de potencial no sentido reverso não consegue oxidar o produto da reação, mas continua ocorrendo a reação de redução da CFA.

A fim de observar se ocorre melhora nas respostas voltamétricas e consequente melhora na sensibilidade analítica, testes de potencial e tempo de acumulação foram realizados. Inicialmente, com o tempo de acumulação fixado em 30 s, variou-se o potencial de acumulação ($E_{acu.}$) de -0,70 V a -1,18 V.

A partir do estudo do potencial de acumulação, concluiu-se que em $E_{acu} = -0,70$ V tem-se aumento da corrente de pico em torno de 30%, havendo diminuição da corrente de pico em potenciais acima de -0,70V; portanto, esse potencial foi escolhido para estudos posteriores.

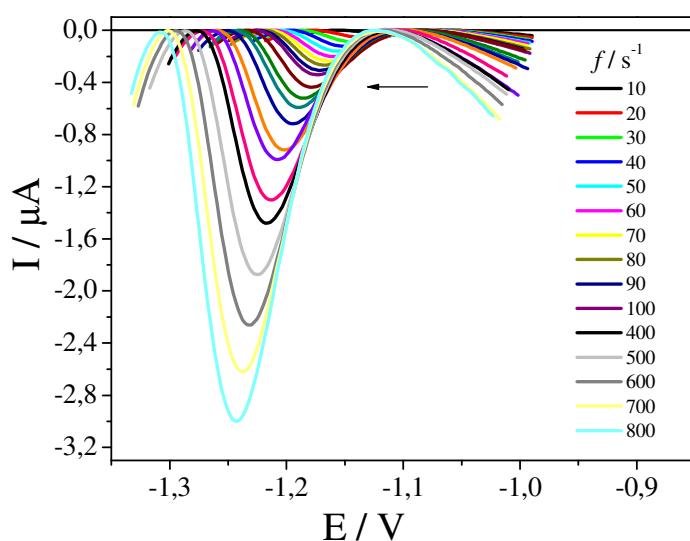
Em seguida, com o E_{acu} fixado em -0,70V variou-se o tempo de acumulação (t_{acu}) de 15s a 120s, observou-se que praticamente não há variação da corrente de pico após 15s de acumulação, ocorrendo inclusive uma perda de corrente com o tempo acumulação de 120s. Portanto, ficaram definidos como condições ótimas para dar continuidade ao desenvolvimento da metodologia analítica, o tempo de 15s e o potencial -0,70V.

4.2.2.2 Avaliação dos parâmetros voltamétricos

Frequência de aplicação de pulsos de potencial

A frequência de aplicação dos pulsos de potencial foi avaliada, variando de 10 s^{-1} a 800 s^{-1} . Nesse estudo manteve-se constante a amplitude de pulso de potencial de 50 mV, o incremento de varredura de 2 mV, potencial de acumulação em -0,70 V e tempo de acumulação de 15 s. A Figura 41, apresenta os voltamogramas de onda quadrada obtidos para CFA $2,91 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ com frequência de aplicação de pulso variando entre 10 s^{-1} e 800 s^{-1} , mantendo-se constante a amplitude de pulso em 50 mV e incremento de varredura em 2 mV.

Figura 41 – Voltamogramas de onda quadrada para CFX $2,91 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, sobre HMDE, em tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 2,0, em diferentes freqüências de aplicação de pulsos de potencial. $a = 50\text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2\text{ mV}$



Fonte: A própria autora

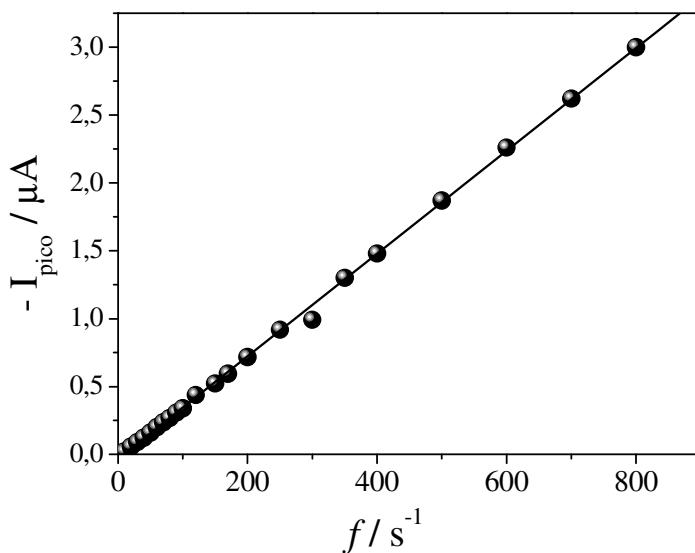
Observa-se um aumento da corrente de pico à medida que se aumenta a frequência, bem como o deslocamento do potencial de pico para valores mais negativos, comportamento semelhante àquele observado para a CFX. Isso confirma que o processo de redução da CFA também tem características de processo redox totalmente irreversível com forte adsorção das espécies na superfície do eletrodo⁽⁶³⁾.

A Figura 42 apresenta a relação entre corrente de pico e frequência de aplicação de pulsos de potencial obtida a partir dos voltamogramas de onda quadrada para CFA sobre HMDE, e é representado pela equação 28, com $r = 0,9996$.

$$-I_{\text{pico}} = -3,402 \times 10^{-8} + 3,783 \times 10^{-9} f(\text{s}^{-1}) \quad (29)$$

Adicionalmente, observou-se que ocorre aumento da largura do potencial de meia altura ($\Delta E_{p/2}$) em frequências maiores do que 100 s^{-1} . Dessa forma, a frequência 100 s^{-1} foi selecionada para desenvolvimento da metodologia eletroanalítica para determinação de CFA.

Figura 42 – Relação entre intensidade da corrente de pico e frequência de aplicação dos pulsos de potencial obtida a partir dos voltamogramas de onda quadrada, da Figura 40, para CFA $2,91 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, sobre HMDE, em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH $2,0$. $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$

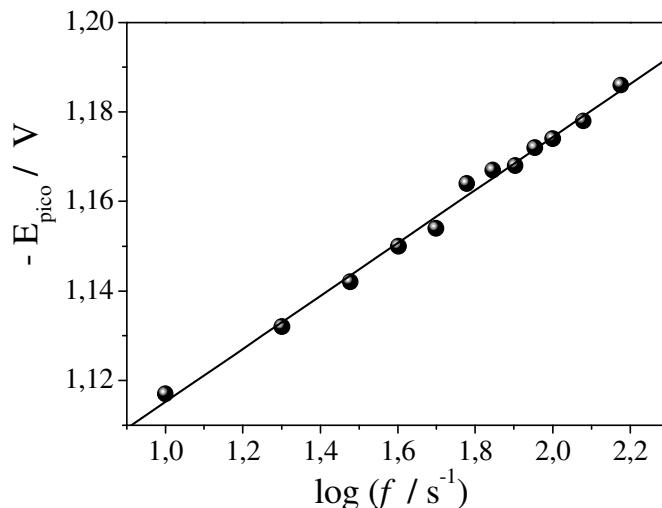


Fonte: A própria autora

Sabe-se que, a inclinação da reta obtida da relação entre os potenciais de pico e a frequência de aplicação dos pulsos de potenciais fornece uma estimativa do número de elétrons envolvidos no processo redox. Assim, a Figura 43 apresenta a relação entre o

potencial de pico e o logaritmo da frequência da aplicação dos pulsos de potencial para a redução da CFA, considerando-se $a = 50$ mV, $\Delta E_s = 2$ mV, $E_{acu} = -0,7$ V e $t_{acu} = 15$ s.

Figura 43 – Relação entre potenciais de pico e logaritmo da frequência de aplicação dos pulsos de potencial, para CFA $2,91 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, sobre HMDE, em tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 2,0. $a = 50$ mV, $\Delta E_s = 2$ mV, $E_{acu} = -0,7$ V e $t_{acu} = 15$ s obtida a partir dos voltamogramas de onda quadrada da Figura 42



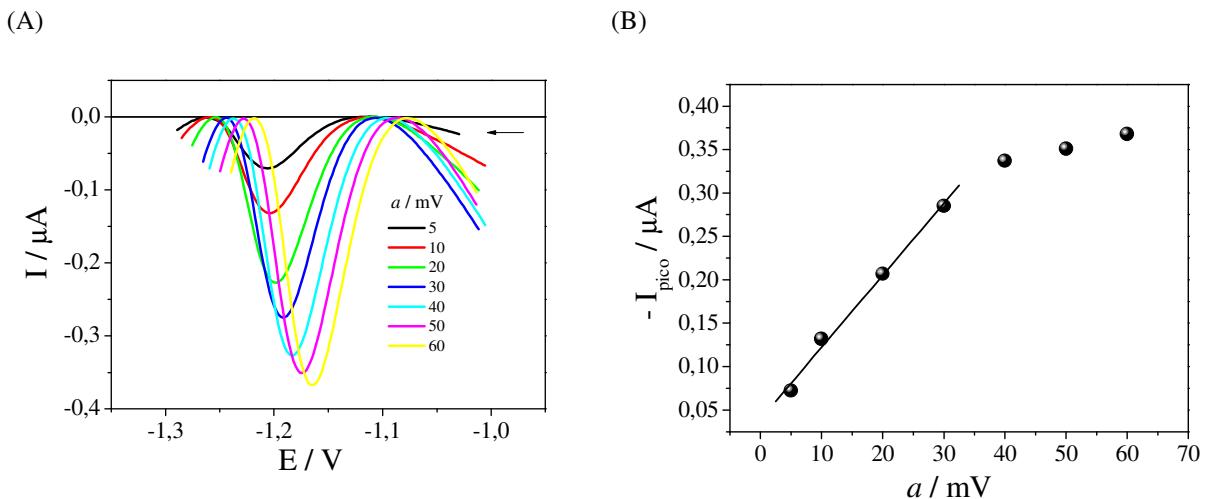
Fonte: A própria autora

A dependência do potencial de pico em função do logaritmo da frequência para CFA apresentou inclinação de 0,0592 com $r = 0,9969$. Aplicando este valor na equação 9 e considerando $\alpha = 0,5$, determinou-se que o número de elétrons que participam do processo de redução da molécula de CFA, é igual a dois, ratificando o resultado obtido por voltametria cíclica.

Amplitude dos pulsos de potencial

Variou-se a amplitude de pulsos na faixa de 5 a 80 mV, manteve-se constante a frequência de aplicação de pulso de potencial de 100 s^{-1} , o incremento de varredura de 2 mV, potencial de acumulação de -0,70 V e tempo de acumulação de 15 s. A Figura 44 traz os voltamogramas de onda quadrada para CFA $2,91 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em diferentes amplitudes (A) e a relação entre a corrente de pico e a amplitude (B).

Figura 44 – (A) Voltamogramas de onda quadrada para CFA $2,91 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, sobre HMDE, em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 2,0, em diferentes amplitudes de pulsos de potencial com $f = 100$ s⁻¹ e $\Delta E_s = 2$ mV. (B) Relação entre intensidade da corrente de pico e amplitude de aplicação dos pulsos de potencial obtida a partir dos voltamogramas de onda quadrada da Figura 44A



Fonte: A própria autora

Observou-se relação linear entre corrente de pico e amplitude obtida até 30 mV podendo ser expressa pela equação:

$$-I_{\text{pico}} = 3,938 \times 10^{-8} + 8,289 \times 10^{-9}a \text{ (mV)} \quad (30)$$

em que $r = 0,9965$. Portanto, ficou definido que amplitude de pulso de 30 mV seria utilizada no desenvolvimento do método analítico. Em amplitudes maiores que 40 mV, observou-se que não ocorre aumento significativo da corrente de pico, não oferecendo nenhuma contribuição adicional à sensibilidade analítica. De acordo com os critérios de diagnóstico da teoria da VOQ⁽⁶⁴⁾, para sistemas irreversíveis em amplitudes acima de 50 mV, a corrente de pico é praticamente constante, confirmando, mais uma vez, a natureza irreversível do processo de redução da CFA sobre HMDE.

Ao avaliar a relação entre o potencial de pico e a amplitude de pulsos, observou-se relação linear apresentando a seguinte equação da reta:

$$\text{Pico 1: } -E_{\text{pico}} (\text{V}) = 1,22 + 0,957 a \text{ (mV)} \quad (31)$$

em que $r = 0,9984$.

Segundo O'Dea *et al.*⁽⁶⁴⁾, a reação de redução totalmente irreversível de moléculas adsorvidas na superfície do eletrodo fornece inclinação próxima à unidade. Como a equação

30 apresenta inclinação 0,957, sugere-se que a reação de redução da CFA é irreversível com adsorção do analito na superfície do eletrodo.

Incremento de varredura

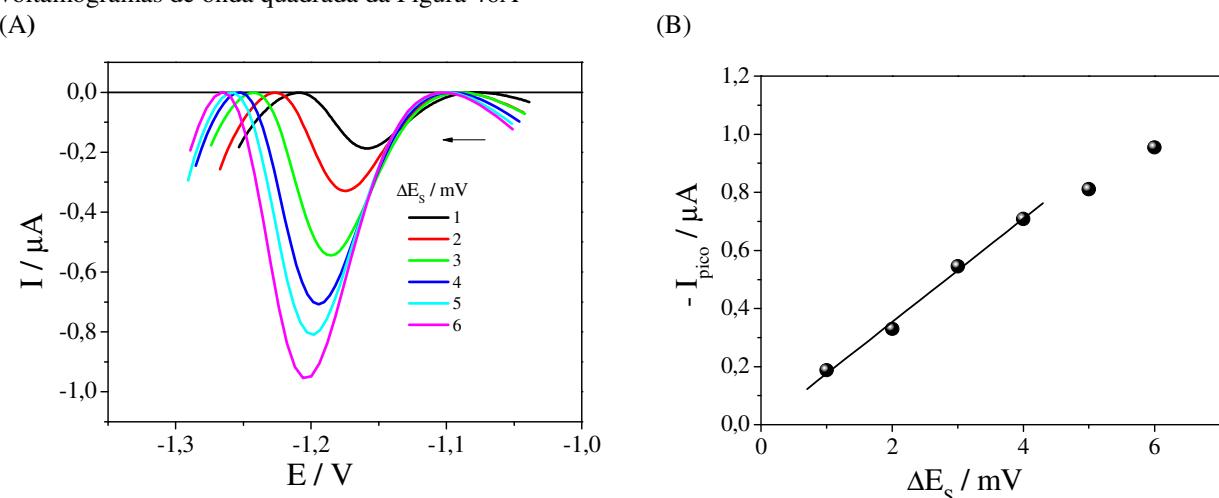
O estudo do incremento de potencial de varredura foi realizado no intervalo de 1 a 9 mV. Manteve-se constante a frequência de aplicação de pulso de potencial de 100 s^{-1} , a amplitude de pulso de potencial de 50 mV, potencial de acumulação em -0,70 V e tempo de acumulação de 15 s. A Figura 45 apresenta os voltamogramas de onda quadrada para CFA $2,91 \times 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$ em diferentes incrementos de potencial (A) e a relação entre a corrente de pico e o incremento (B).

Os voltamogramas apresentados na Figura 45 mostram que o potencial de pico é deslocado para valores mais negativos à medida que se aumenta ΔE_s , com tal comportamento sendo também característico de processos irreversíveis⁽⁶⁴⁾. Observou-se que a corrente de pico aumenta com o crescimento de ΔE_s , apresentando relação linear em toda a faixa de incremento estudada. Porém, até incremento igual a 4 mV, tem-se a equação:

$$-I_{\text{pico}} = -2,500 \times 10^{-9} + 1,779 \times 10^{-7} \Delta E_s \text{ (mV)} \quad (32)$$

em que $r = 0,9971$, maior coeficiente de correlação no intervalo estudado.

Figura 45 – (A) Voltamogramas de onda quadrada para CFA $2,91 \times 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$, sobre HMDE, em meio de tampão BR $0,04\text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0, em diferentes incrementos de aplicação de pulsos de potencial, $f = 100\text{ s}^{-1}$ e $a = 50\text{ mV}$. (B) Relação entre intensidade da corrente de pico e incremento de varredura obtida a partir dos voltamogramas de onda quadrada da Figura 46A



Fonte: A própria autora

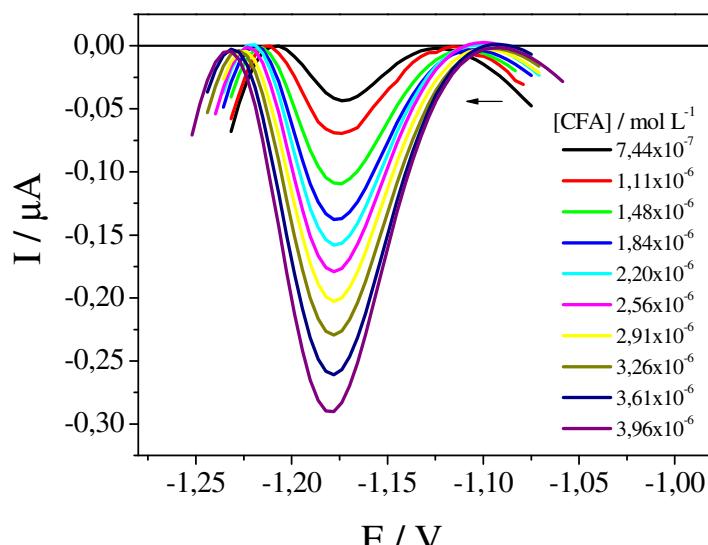
Além disso, a partir desse valor de ΔE_s ocorre alargamento dos voltamogramas comprometendo a seletividade da metodologia. Assim, optou-se por trabalhar com o incremento de 4 mV.

4.2.3 Construção das curvas analíticas

Após a otimização dos parâmetros experimentais: eletrólito de suporte, tampão BR 0,04 mol L⁻¹, pH 2,0, potencial de acumulação de -0,7 V e tempo de acumulação de 15 s, e voltamétricos: frequência de aplicação de pulsos de potencial de 100 s⁻¹, amplitude de pulso de potencial 30 mV e incremento de varredura de potencial de 4 mV, foram construídas curvas analíticas. Para tanto, utilizou-se solução estoque de CFA 1,0x10⁻⁵ mol L⁻¹. As curvas foram construídas, em cinco replicatas, empregando o método da adição de padrão e, neste procedimento, alíquotas da solução estoque de concentração conhecida do analito foram adicionadas à célula eletroquímica. A solução resultante era agitada após cada adição para homogeneização e, em seguida, as medidas voltamétricas eram realizadas.

Verificou-se aumento linear entre corrente de pico e concentração de CFA, no intervalo de 7,44x10⁻⁷ mol L⁻¹ a 3,96x10⁻⁶ mol L⁻¹. Os voltamogramas de onda quadrada são exibidos na Figura 46.

Figura 46 – Voltamogramas de onda quadrada para CFA 2,91x10⁻⁵ mol L⁻¹, sobre HMDE, em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 2,0, com concentrações variando de 7,44x10⁻⁷ mol L⁻¹ a 3,96x10⁻⁶ mol L⁻¹. $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$, $E_{acu} = -0,70 \text{ V}$ e $t_{acu} = 15 \text{ s}$



Fonte: A própria autora

Analisando a Figura 46 verifica-se que não há deslocamento dos potenciais de pico e que há aumento da corrente de pico em função da concentração adicionada, o que pode ser atribuído à quantidade de espécies eletroativas em torno da superfície do eletrodo, fazendo com que mais moléculas sejam reduzidas. A equação da reta para a curva analítica, com os respectivos intervalos de confiança de 95% para os valores dos coeficientes linear e angular é dada por:

$$- I_{\text{pico}} (\mu\text{A}) = (-3,24 \pm 2,76) \times 10^{-9} + (0,0701 \pm 0,0039) [\text{CFA}] \quad (33)$$

As curvas analíticas indicaram aumento linear de corrente de pico em função do aumento da concentração apresentando coeficiente de correlação $r = 0,9997$. Porém, o intercepto da equação da curva analítica apresentou um valor negativo, quando o valor considerado como real é zero. Entretanto, erros aleatórios fazem com que o valor medido raramente seja exatamente igual ao valor real. Para decidir se a diferença entre o valor medido e o valor padrão pode ser atribuído a erros aleatórios foi realizado um teste estatístico, conhecido como teste de significância⁽⁷⁹⁾, de acordo com a equação 33:

$$t = (\bar{x} - \mu) \frac{\sqrt{n}}{s} \quad (34)$$

em que \bar{x} é a média das amostras, μ é o valor considerado como verdadeiro, s é o desvio padrão da média e n é o número de determinações. O valor de t calculado foi comparado com t crítico para um nível de 95% de confiança. O valor de t calculado obtido foi 2,63 ($n = 5$) menor do que o t crítico de 2,78 ($n = 5$); portanto, conclui-se que não houve diferença significativa entre o valor médio do intercepto e o valor zero, a um nível de 95% de confiança.

Adicionalmente, partir das informações obtidas das curvas analíticas, foram calculados os valores LD e de LQ⁽⁶⁶⁾.

A precisão da metodologia foi avaliada por meio de experimentos de repetibilidade e de precisão intermediária⁽⁶⁸⁾, testados para solução contendo CFA $1,11 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, nas condições otimizadas seguindo o mesmo procedimento descrito para CFX no item 4.1.3.

A região de linearidade, a equação da curva analítica, o coeficiente de correlação (R), os valores de LD e de LQ, a repetibilidade (%RSD) e a precisão intermediária (%RSD) são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Parâmetros calculados a partir das curvas analíticas para CFA sobre HMDE em tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 2,0 por VOQ, com faixa de potencial entre -0,70V e -1,30 V. $f = 100\text{ s}^{-1}$, $a = 30\text{ mV}$, $\Delta E_s = 4\text{ mV}$, $E_{acu} = -0,70\text{ V}$ e $t_{acu} = 15\text{ s}$

Parâmetro	Pico
Região de linearidade	$7,44 \times 10^{-7}\text{ mol L}^{-1}$ a $3,96 \times 10^{-6}\text{ mol L}^{-1}$
Equação da reta (pico 1)	$-I_{\text{pico}} = (-3,24 \pm 2,76) \times 10^{-9} + (0,0701 \pm 0,0039) [\text{CFA}]$
r	0,9997
LD (mol L ⁻¹)	$1,27 \times 10^{-8}$ ($4,41\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$) – IUPAC $1,21 \times 10^{-7}$ ($42,4\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$) – ANVISA
LQ (mol L ⁻¹)	$4,23 \times 10^{-8}$ ($14,69\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$) – IUPAC $4,03 \times 10^{-7}$ ($140\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$) – ANVISA
Repetibilidade (%)	2,06 (n = 10)
Precisão intermediária (%)	3,60 (n = 5)

Os valores de LD e LQ determinados pela metodologia eletroanalítica desenvolvida, apresentaram resultados menores do que os valores obtidos por Hefnawy *et al.*⁽⁸⁰⁾, que utilizaram técnica espectrofluorométrica para determinação de CFA. Nesse trabalho, os autores obtiveram LD = $5\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ e LQ = $50\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$. Além disso, os resultados obtidos na metodologia desenvolvida neste trabalho utilizando VOQ, também são superiores aos publicados por Xu *et al.*⁽²¹⁾, com LD = $17,4\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$, cuja determinação de CFA foi realizada utilizando polarografia de pulso diferencial e HMDE. Esses resultados sugerem que a metodologia eletroanalítica desenvolvida para determinação de CFA por VOQ apresentou maior sensibilidade e pode ser aplicada para determinação desse fármaco em nível de traços.

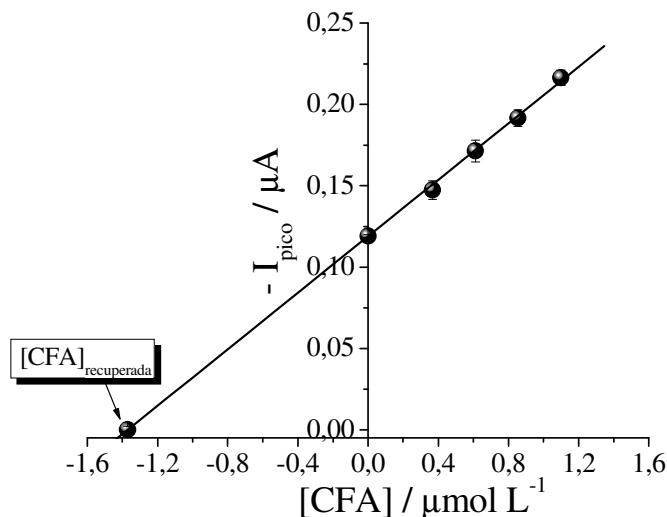
A eficiência da metodologia proposta foi avaliada utilizando-se testes de recuperação. O método da adição de padrão foi empregado nos testes de recuperação, conforme descrito anteriormente no item 4.1.3.

4.2.4 Estudo de recuperação em eletrólito de suporte

A eficiência da metodologia proposta foi avaliada utilizando-se testes de recuperação. O método da adição de padrão foi empregado nos testes de recuperação, conforme descrito no item 4.1.4.

A curva de recuperação foi obtida dentro da faixa de concentração investigada na curva analítica. Escolheu-se a concentração de $1,48 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (correspondente à terceira adição da curva analítica) como sendo a concentração adicionada. Na sequência, à amostra contaminada, foram adicionadas alíquotas de 75 µL de CFA $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ à tampão BR 0,04 mol L⁻¹ (pH 2,0). A Figura 47 apresenta a curva de recuperação construída a partir dos valores médios de corrente de pico ($n = 3$), com suas respectivas barras de erro.

Figura 47 – Curva de recuperação para CFA em eletrólito de suporte, obtida a partir de valores médios ($n = 3$) de I_{pico} vs. [CFA], em meio de tampão BR pH 2,0 sobre HMDE com $f = 100$ s⁻¹, $a = 30$ mV, $\Delta E_s = 4$ mV, $E_{\text{acu}} = -0,70$ V e $t_{\text{acu}} = 15$ s



Fonte: A própria autora

Na avaliação entre corrente de pico e concentração adicionada de CFA, observou-se linearidade com coeficiente de correlação de 0,9995. Por meio das concentrações recuperadas, as taxas de recuperação foram calculadas usando a Equação 20. Os resultados obtidos no estudo de recuperação em eletrólito de suporte estão resumidos na Tabela 7:

Tabela 7–Resultados obtidos para curvas de recuperação de CFA,sobre HMDE, em meio de tampão BR pH 2,0, $f = 90\text{ s}^{-1}$, $a = 30\text{ mV}$, $\Delta E_s = 3\text{ mV}$, $E_{acu} = -0,7\text{ V}$ e $t_{acu} = 15\text{ s}$

[CFA]adicionada (mol L ⁻¹)	[CFA]detectada (mol L ⁻¹)	Recuperação (%)	RDS (%)
$1,48 \times 10^{-6}$	$1,32 \times 10^{-6}$	89,19	1,51

Assim como foi constatado para CFX, esses valores conferem à metodologia uma ótima precisão, pois se encontram dentro dos limites de confiança aceitáveis para metodologias analíticas, indicando que o procedimento desenvolvido é eficiente e poderá ser aplicado em matrizes complexas. Nas seções seguintes são apresentados os resultados para os testes de recuperação de CFA em amostra de medicamentos, leite bovino e água natural.

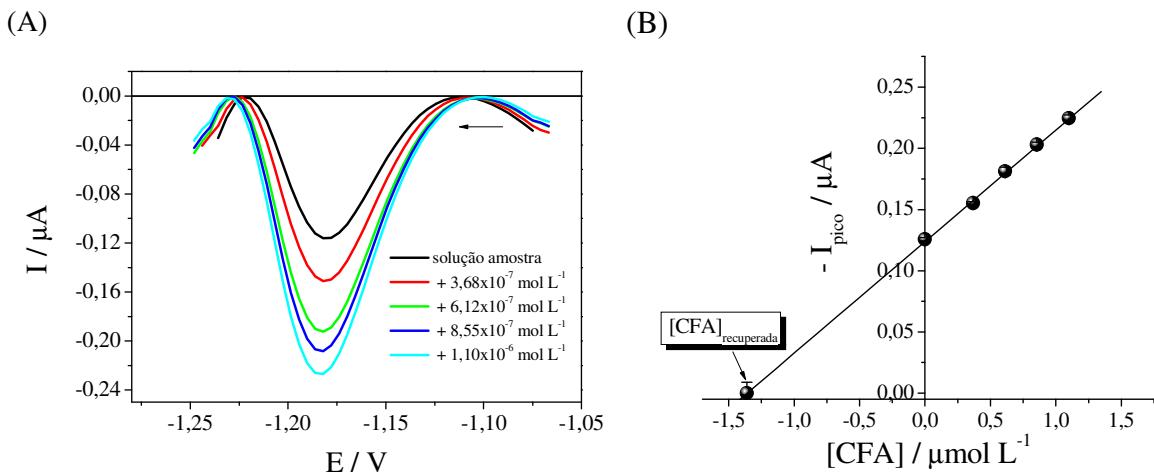
4.2.5 Aplicação da metodologia em medicamentos

Para aplicação da metodologia eletroanalítica em amostras de formulações comerciais, foram utilizadas amostras de comprimido e suspensão oral de Keflex®, preparadas conforme descrito no item 3.4.2. Conforme citado no item anterior, foi utilizado o método da adição de padrão sendo adicionada uma alíquota da solução amostra do medicamento, comprimido e suspensão oral, resultando em uma concentração final na célula eletroquímica de $1,48 \times 10^{-6}\text{ mol L}^{-1}$, que corresponde ao terceiro ponto da curva analítica.

A Figura 48 apresenta os voltamogramas de onda quadrada (A) e a curva de recuperação para as amostras de comprimido de Keflex® (B).

Os voltamogramas apresentados na Figura 48A não apresentaram deslocamento significativo dos potenciais de pico, evidenciando que o perfil voltamétrico não sofreu influência da matriz do comprimido. A curva de recuperação mostrada na Figura 48B apresentou um coeficiente de correlação $r = 0,9987$.

Figura 48 – (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes concentrações para recuperação em comprimido Keflex®, sobre HMDE, em meio de tampão BR pH 2,0, $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$, $E_{acu} = -0,70\text{V}$ e $t_{acu} = 15\text{s}$. (B) Relação entre corrente de pico e concentração de CFA para curva de recuperação em comprimido Keflex®



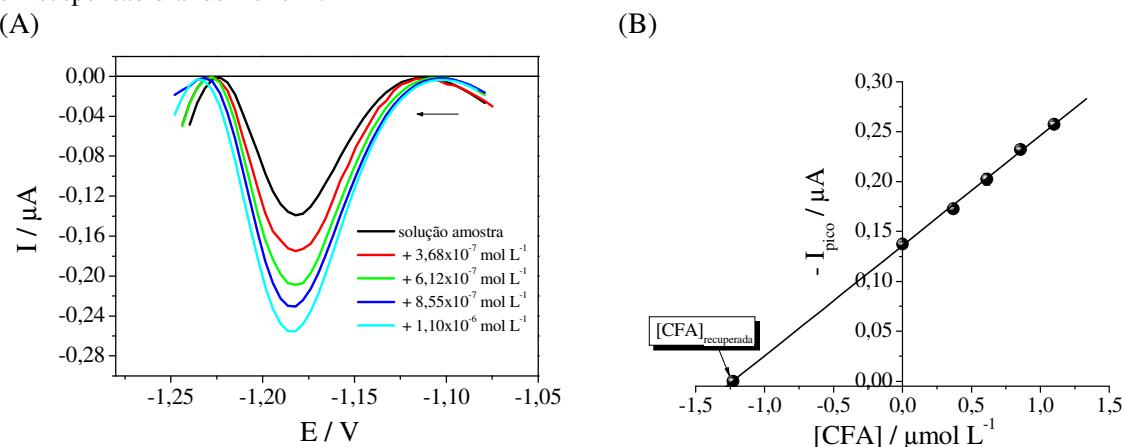
Fonte: A própria autora

A equação da reta para a intensidade da corrente de pico em função da concentração de CFA, para $n = 3$, é representada pela seguinte equação:

$$-I_{\text{pico}} (\mu\text{A}) = (1,24 \pm 0,011) \times 10^{-7} + (0,0912 \pm 0,0014) [\text{CFA}] \quad (35)$$

A Figura 49 apresenta os voltamogramas de onda quadrada (A) e a curva de recuperação (B) para as amostras de suspensão oral de Keflex®.

Figura 49 – (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes concentrações para recuperação em suspensão oral de Keflex®, sobre HMDE, em meio de tampão BR pH 2,0, $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$, $E_{acu} = -0,70\text{V}$ e $t_{acu} = 15\text{s}$. (B) Relação entre corrente de pico e concentração de CFA para curva de recuperação em suspensão oral de Keflex®.



Fonte: A própria autora

Os resultados apresentados nos voltamogramas da Figura 49 mostram que a matriz da suspensão oral do medicamento Keflex® também não influenciou no perfil voltamétrico como foi observado para a amostra do comprimido. A equação da reta para a intensidade da corrente de pico em função da concentração de CFA, para n = 3 e coeficiente de correlação r = 0,9988, é representada pela seguinte equação:

$$-I_{\text{pico}} (\mu\text{A}) = (1,36 \pm 0,016) \times 10^{-7} + (0,1102 \pm 0,0014) [\text{CFA}] \quad (36)$$

A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos para as curva de recuperação para a CFA utilizando-se o medicamento Keflex® nas apresentações comprimido e suspensão oral.

Tabela 8 – Resultados obtidos para curvas de recuperação de CFA, sobre HMDE, em medicamentos por VOQ, $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$, $E_{\text{acu}} = -0,70 \text{ V}$ e $t_{\text{acu}} = 15 \text{ s}$. $[\text{CFA}]_{\text{adicionada}} = 1,48 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$

	Keflex® comprimido	Keflex® suspensão
Dosagem nominal	500 mg / compr.	250 mg / 5mL
Massa de CFA recuperada (mg)	460,7	208,9
$[\text{CFA}]_{\text{rec}} / \text{mol L}^{-1}$	$1,36 \times 10^{-6}$	$1,23 \times 10^{-6}$
Recuperação(%)	92,13	83,56
RSD (%)	1,12	0,47

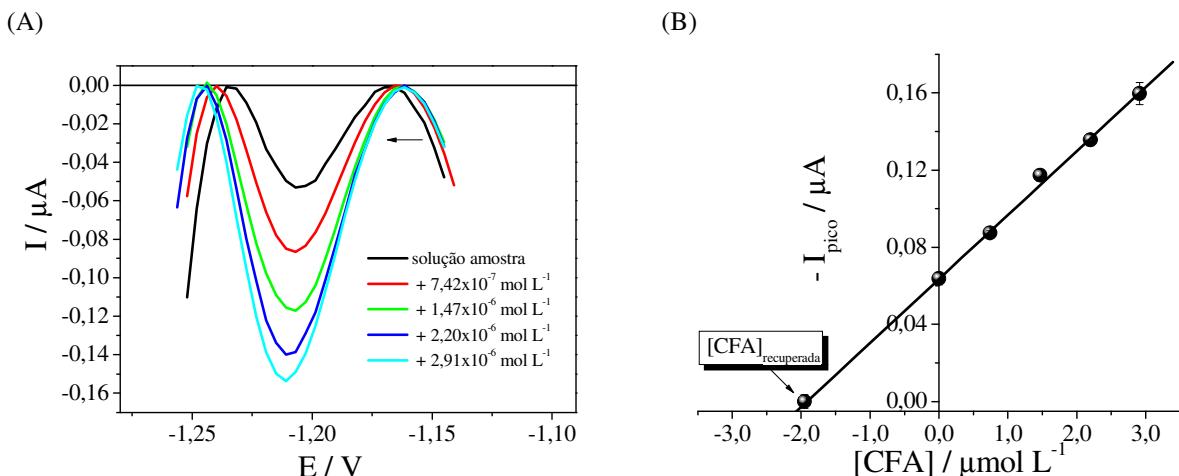
Valores de recuperação média de 92,13% com RSD de 1,12% obtidos para CFA nos comprimidos de Keflex® e de 83,56% com RSD de 0,47% obtidos para CFA na suspensão oral de Keflex® estão dentro dos limites de confiança aceitáveis para metodologias analíticas, o que comprova a eficiência do método proposto^(81,82).

4.2.6 Aplicação da metodologia em leite bovino

Foram realizados testes de recuperação em amostras de leite bovino, que necessitaram apenas de pré-tratamento simples, conforme descrito anteriormente no item **3.4.4**. Como a amostra de leite é mais complexa que as amostras de medicamentos, contendo um número bem maior de possíveis interferentes (componentes do soro do leite, conforme citado no item **4.1.5**), optou-se por aumentar a concentração adicionada com o objetivo de aumentar a sensibilidade das respostas voltamétricas. A Figura 50 apresenta os voltamogramas de onda quadrada (A) e a curva de recuperação para a amostra de leite

contaminada artificialmente, adicionando-se alíquota adequada da solução estoque do antibiótico resultando em CFA $2,00 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (B).

Figura 50 – (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes concentrações para recuperação em leite contendo CFA $2,00 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, sobre HMDE, em meio de tampão BR pH 2,0. $f = 100$ s⁻¹, $a = 30$ mV, $\Delta E_s = 4$ mV, $E_{acu} = -0,70$ V e $t_{acu} = 15$ s. (B) Relação entre corrente de pico e concentração de CFA para curva de recuperação em leite



Fonte: A própria autora

Os voltamogramas apresentados na Figura 50A não apresentaram deslocamento significativo de potencial de pico, indicando que, não houve interferência de componentes do soro do leite, como foi observado também na recuperação de CFX. A curva de recuperação mostrada na Figura 49B apresentou um coeficiente de correlação $r = 0,9986$. A equação da reta para a intensidade da corrente de pico em função da concentração de CFA, para $n = 3$, é representada pela seguinte equação:

$$-I_{\text{pico}} (\mu\text{A}) = (6,447 \pm 0,166) \times 10^{-8} + (0,0330 \pm 0,00044) [CFA] \quad (37)$$

A Tabela 9 apresenta os resultados obtidos para as curvas de recuperação para a CFA em leite bovino.

Tabela 9 – Resultados obtidos para curvas de recuperação de CFA, sobre HMDE, em leite bovino por VOQ. $f = 100$ s⁻¹, $a = 30$ mV, $\Delta E_s = 4$ mV, $E_{acu} = -0,70$ V e $t_{acu} = 15$ s

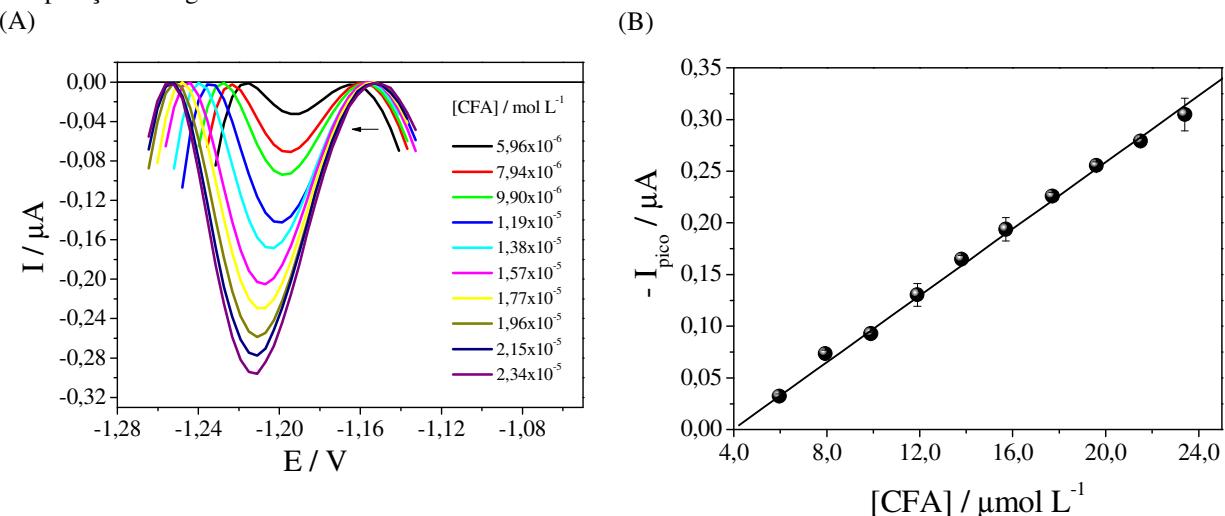
$[CFA]_{\text{adicionada}}$ (mol L ⁻¹)	$[CFA]_{\text{detectada}}$ (mol L ⁻¹)	Recuperação (%)	RDS (%)
$2,49 \times 10^{-6}$	$1,95 \times 10^{-6}$	78,45	1,80

Pode-se perceber, a partir dos dados apresentados na Tabela 9, que o método proposto também se apresentou eficiente para determinação de CFA em amostras de leite bovino.

4.2.7 Aplicação da metodologia em água natural

Antes de realizar os experimentos de recuperação em amostra de água do Açude Gavião, foram construídas curvas analíticas, empregando os parâmetros otimizados para CFA, em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 2,0. Utilizando solução estoque de CFA 1,0x10⁻³ mol L⁻¹. Os voltamogramas de onda quadrada obtidos são exibidos na Figura 51.

Figura 51 – (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes concentrações para recuperação em meio de 2mL de água natural + 18 mL de tampão BR pH 2,0 sobre HMDE com $f = 100\text{ s}^{-1}$, $a = 30\text{ mV}$, $\Delta E_s = 4\text{ mV}$, $E_{acu} = -0,70\text{ V}$ e $t_{acu} = 15\text{ s}$. (B) Relação entre corrente de pico e concentração de CFA para curva de recuperação em água natural



Fonte: A própria autora

Os voltamogramas apresentados na Figura 51A mostram que o potencial da corrente de pico sofreu pequeno deslocamento para valores mais negativos na ordem de 2 mV, da primeira para a décima adição, não sendo esse deslocamento significativo, indicando que o processo de redução de CFA sobre HMDE não sofreu interferência das substâncias orgânicas e/ou inorgânicas presentes na composição da água natural. As equações 38 e 39 representam a relação linear entre a corrente de pico e a concentração de CFA em eletrólito de suporte e em água natural, respectivamente:

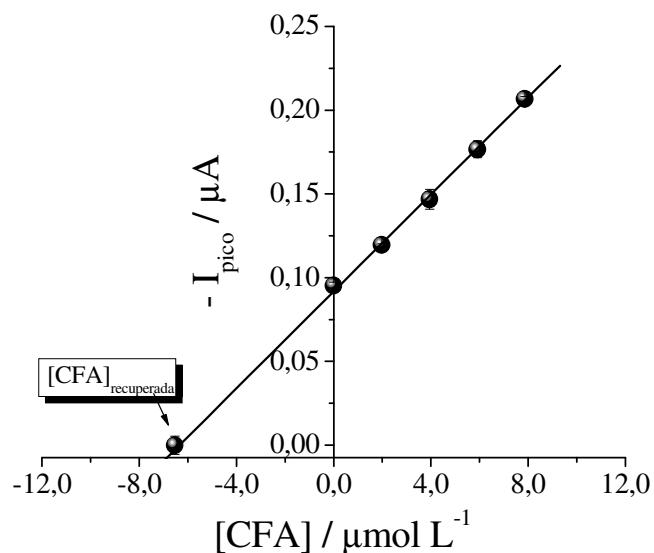
$$- I_{\text{pico}} (\mu\text{A}) = (-3,24 \pm 2,76) \times 10^{-9} + (0,0701 \pm 0,0039) [\text{CFA}] \quad (38)$$

$$-I_{\text{pico}} (\mu\text{A}) = (-6,313 \pm 0,355) \times 10^{-8} + (0,0157 \pm 0,00054) [\text{CFA}] \quad (39)$$

Comparando as duas equações da reta, em eletrólito de suporte e em água natural, observa-se uma diferença significativa nos coeficientes angulares, indicando que há interferência de matriz. Também foram calculados os valores de LD e de LQ para CFA em água natural, obtendo-se $LD = 4,87 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ e $LQ = 1,62 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. Observa-se que, mesmo havendo interferência de matriz os esses valores são semelhantes àqueles calculados somente na presença de eletrólito de suporte.

Utilizou-se o método da adição de padrão na quantificação da amostra, para tanto foram construídas curvas de recuperação, em condições semelhantes às das curvas de recuperação já descritas. Esses resultados são apresentados na Figura 52.

Figura 52 – Relação entre corrente de pico e concentração de CFA, sobre HMDE, para curva de recuperação em água natural contendo $CFA = 2,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0, $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$, $E_{\text{acu}} = -0,70 \text{ V}$ e $t_{\text{acu}} = 15 \text{ s}$



Fonte: A própria autora

A concentração adicionada foi de $7,94 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, correspondente ao segundo ponto da curva analítica em água natural. Calculou-se concentração recuperada média de $6,53 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, com percentual de recuperação média de 82,29% com RSD de 0,84%. Portanto, os resultados obtidos mostram que a metodologia desenvolvida pode ser aplicada com sucesso na quantificação de CFA em águas naturais.

5 CONCLUSÕES

Utilizando as técnicas de VC e de VOQ foi possível determinar que os processos de redução dos antibióticos CFX e CFA, ambos pertencentes ao grupo das cefalosporinas, sobre HMDE em meio de tampão BR pH 2,0 são irreversíveis com transporte de massa controlado por adsorção, não sendo observado processo anódico em ambas as moléculas.

O número de prótons e elétrons envolvidos no processo de redução das moléculas estudadas foi calculado. Observou-se que o processo de redução da CFX envolve a transferência de dois elétrons e dois prótons para cada pico, relacionados à redução dos grupos – C = N – para o pico 1 e grupo – CH₂ – R para o pico 2. O processo de redução de CFA, também envolve a participação de dois elétrons e dois prótons, relacionados à quebra da dupla ligação (– C = C –) do grupo etilênico.

Os valores dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), calculados utilizando a recomendação da IUPAC, bem como os resultados de repetibilidade e precisão intermediária, expressos como valores de RSD abaixo de 4%, indicam que os procedimentos desenvolvidos, apresentaram sensibilidade, eficiência e precisão. Os resultados obtidos foram superiores àqueles reportados na literatura, utilizando diferentes técnicas (cromatográficas, espectrométricas e eletroquímicas), tanto para CFX quanto para CFA.

A eficiência da metodologia proposta foi avaliada a partir de testes de recuperação em amostras de medicamentos, leite bovino e água natural. Os valores percentuais dos resultados obtidos encontraram-se dentro da faixa aceitável de porcentagem de recuperação e mostraram que a metodologia desenvolvida neste trabalho apresentou-se eficiente para determinação dos antibióticos CFX e CFA em amostras complexas, sem a necessidade de etapas complexas de preparo das amostras.

REFERÊNCIAS

1. <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeia/conteudo/glossario.pdf>. Acessado em 26/02/2011.
2. PEDROSO, R. C. R. **Desenvolvimento de métodos de análise por CLAE_UV para os antimicrobianos tetraciclina, sulfametoxanol e trimetoprima utilizando materiais à base de sílica e poliméricos como sistemas de pré-concentração**. 2007. 122 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007
3. ALONSO, S. G. *et al.* **Environment International**, n. 36, p. 195-201, 2010.
4. FATTA, D. *et al.* **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 6,p. 515-533. 2007.
5. MOMPÉLAT, S.; LEBOT, B.; THOMAS, O. **Environment International**, v. 35, p.803-814, 2009.
6. <http://www.180graus.com/farmacia/o-uso-indiscriminado-de-antibioticos-seleciona-bacterias-resistentes-371754.html>. Acessado em 17/03/2011.
7. MOTA, R. A. *et al.* **Brazilian Journal of Veter. Research and Animal Science**, v. 42, p. 465-473, 2005.
8. Portaria nº 1.524, de 27 de outubro de 2010. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em: <<http://www.in.gov.br/visualiza/index.jsp?data=28/10/2010&jornal=1&pagina=76&totalArquivos=104>>. Acesso em 25/04/2012.
9. HARDMAN, J. G.; LIMBRID, L. E. (ED.). **Goodman e Gilman as bases farmacológicas da terapêutica**, 11º.ed. Rio de Janeiro: Mac Graw-Hill, 2007.
10. BALBINO, C. A. ; AMADIO, J. R. A.. Klebsiellapneumoniae: produtora de Carbapenemase (KPC). **Nota Técnica CRF-MT** Nº 01 2011, 01.02.2011. Disponível em: <http://www.crf-mt.org.br/arqs/materia/978_a.pdf>. Acesso em 15/05/2012.
11. KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. **Chemosphere**, v. 75, p. 417 – 434, 2009.
12. SACHER, F. *et al.* **Journal of Chromatography A**, v. 938, p. 199-210, 2001.
13. HIRSCHA, R. *et al.* **The Science of the Total Environment**, v. 225,p. 109-118, 1999.
14. MARTINS, A. F. *et al.* **Clean – Soil, Air, Water**, v. 36, p. 264- 269, 2008.
15. GULKOWSKA, A. *et al.* **Marine Pollutin Bulletin**, v. 54, p. 1287-1306, 2007.
16. LI, B., ZHANG, T. **Chemosphere**, v. 83, p.131-141, 2011.
17. GAO, L. *et al.* **Chemosphere**, v. 86, p. 665–671, 2012.

18. ALLINGER, N. L. **Química Orgânica**, 2a. Edição, Rio de Janeiro, Editora Guanabara Dois, 1985.
19. McMURRY, J. **Química Orgânica**, 6^a. Edição, São Paulo, Editora Thomsom, 2005.
20. EL-SHABOURY, S. R. *et al.* **Journal Pharm. Biomed. Anal.**, v. 45, p. 1-19, 2007.
21. XU, M.; MA, H.; SONG, J. **Journal Pharm. Biomed. Anal.**, v. 35, p. 1075–1081, 2004.
22. VIEIRA, D. C. DE M. **Análise Químico-Farmacêutica e Estudo de Estabilidade de Cefuroxima Sódica Injetável**. Araraquara, 2010, Tese (Doutorado) Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.
23. OLIVEIRA, R. V.; De PIETRO, A. C.; CASS, Q. B. **Talanta**, v. 71, p. 1233-1238, 2007.
24. SAMANIDOU, V. F.; HAPESHI, E. A.; PAPADOYANNIS, I. N. **Journal of Chromatography B**, v. 788, p. 147-158, 2003.
25. PARTANI, P. *et al.* **Journal of Chromatography B**, v. 878, p.428–434, 2010.
26. TUERK, J. *et al.* **Journal of Chromatography B**, v. 831, p. 72–80, 2006.
27. **The United States Pharmacopeia – The National Formulary – USP 27; NF- 22**, 2004.
28. **European Pharmacopeia**. 4th edition., 2002.
29. SUN, Y. *et al.* **Talanta**, v. 64, p. 156-159, 2004.
30. LIU, W.; ZHANG, Z.; LIU, Z. **Analytica Chimica Acta**, v. 592, p. 187–192, 2007.
31. MRESTANIA, Y. *et al.* **Analytica Chimica Acta**, v. 349, p. 207-213, 1997.
32. DE PAULA, C. E. R., ALMEIDA, V. G. K., CASSELLA, R. J., **Química Nova**, v. 33, p. 914-919, 2010.
33. AHMED, S. M. A.; ELBASHIR, A. A.; ABOUL-ENEIN, H. Y., New spectrophotometric method for determination of cephalosporinsin pharmaceutical formulations. **Arabian Journal of Chemistry**, In Press, Corrected Proof, Available online 27 August 2011.
34. OMAR, M. A.; ABDELMAGEED, O. H.; ATTIA, T. Z. **Talanta**, v. 77, p. 1394-1404, 2009.
35. SALEM, H.; ASKAL, H. F. **Journal Pharm. Biomed. Anal.**, v. 29, p. 347–354, 2002.
36. LIMA, J. L.; MONTENEGRO,M. C.; SALES, M. G. **Journal Pharm. Biomed. Anal.**, v. 18, p. 93–103, 1998.
37. AYAD, M. M. *et al.* **Journal Pharm. Biomed. Anal.**, v. 18, p. 975–983, 1999.
38. EL-GINDY, A.; EL-WALILY, A. F. M.; BEDAIR,M. F. **Journal Pharm. Biomed. Anal.**, v. 23, p.341–352, 2000.

39. CHOI, O. K.; SONG, Y. S. **Journal Pharm. Biomed. Anal.**, v. 15, p.1265–1270, 1997.
40. ANDRÁSI, M.; GÁSPÁ, A.; KLEKNER, Á. **Journal of Chromatography B**, v. 846, p. 355–358, 2007.
41. ADEGOKE, O. A., QUADRI, M. O. Novel spectrophotometric determinations of some cephalosporins following azo dye formation with p-dimethylaminobenzaldehyde. **Arabian Journal of Chemistry**, (2012), doi:10.1016/j.arabjc.2012.02.005.
42. GUPTA, V. K. *et al.*, **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 350, p. 330–335, 2010.
43. JAIN, R.*et al.* **Analytical Biochemistry**, v. 407, p. 79–88, 2010.
44. RIBEIRO, F. W. P.; CARDOSO, A. S.; PORTELA, R.R.; LIMA, J. E. S.; MACHADO, S. A. S.; LIMA-NETO, P. de; De SOUZA, D.; CORREIA, A. N.; **Electroanalysis**, v. 20, p. 2031 – 2039, 2008.
45. DE JESUS, C. G.; FORTE, C. M. S.; WOHRNATH, K.; PESSOA, C. A.; SOARES, J. E. de S.; FUJIWARA, S. T.; LIMA-NETO, P. de; CORREIA, A.N. **Electroanalysis** v.23, p. 1814–1820, 2011.
46. CHEN, J.; GORTON, L.; ÅKESSON, B. **Analytica Chimica Acta**, v. 474, p. 137–146, 2002.
47. KUL, D.; GUMUSTAS, M.; USLU, B.; OZKAN, S. A. **Talanta**, v. 82, p. 286–295, 2010.
48. IVASKA, A.; NORDSTROM, F. **Analytica Chimica Acta**, v.146, p. 87-95, 1983.
49. MENDEZ, J. H. *et al.* **Analytica Chimica Acta**, v. 160, p. 335-340, 1984.
50. CHAILAPAKUL, O. *et al.* **Sensors and Actuators B**, v. 80, p.193-201, 2001.
51. FOGG, A. G. *et al.* **Analytica Chimica Acta**, v. 108, p. 205-211, 1979.
52. SENGÜN, F. I.; ULAS, K.; FEDAI, I. **Journal Pharm. Biomed. Anal.**, v. 3, p. 191-199, 1985.
53. BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methodos Fundamentals and Applications**, Wiley, New York, 2001.
54. WANG, J. **Analytical Eletrochemistry**. 2^a Ed. John Wiley & Sons, New York, 2001.
55. DE SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. **Química Nova**, v. 26, p. 81-89, 2003.
56. BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. **Eletroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações**. Coimbra: Almedina; 1996.
57. AGOSTINHO, S. M. L. *et al.* **Química Nova**, v. 27, p. 813-817, 2004.

58. MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. M. **Manual de soluções, reagentes & solventes: padronização, preparação, purificação.** 11º ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2001
59. CHEN, B.; MA, M.; SU, X. **Analytica Chimica Acta**, v. 674, p. 89–95, 2010.
60. WANG, J. **Analytical Electrochemistry**, Wiley, New York, 2000.
61. GOSSER, JR. K. D. **Cyclic Voltammetry: Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms**, New York, UCH Publishers., 1993.
62. MIRCESKI, V.; KOMORSKY-LOVRIC, S.; LOVRIC, M. **Square-Wave Voltammetry- Theory and Application**, Republic Macedonia: Springer, 2007.
63. LOVRIĆ, M. *et al.* **Electrochimica Acta**, v. 33, p. 739-744, 1988.
64. O'DEA, J. J.; RIBES, A.; OSTERYOUNG, J. G. **Journal Electroanalytical Chemistry**, v. 345, p. 287-301, 1993.
65. DE SOUZA, D. **Estudos Mecanísticos da Redução do Herbicida Picloram por Voltametria de Onda Quadrada**. São Carlos, 2000, Dissertação (Mestrado) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
66. MOCAK, J.; BOND, M.; MITCHEL, S.; SCOLLARY, G. **Pure and Applied Chemistry**, v. 69, p. 297-328, 1997.
67. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**, RE nº 899, de 29/05/2003.
68. HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa.**, 5ª. Ed., Rio de Janeiro, Editora Livros Técnicos e Científicos. 2001.
69. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). **Orientação sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos**. DOQ-CGCRC-008, Revisão 03. 2010.
70. OKUMURA, F. **Estudo voltamétrico e desenvolvimento de metodologia eletroanalítica pra determinação do inseticida fipronil utilizando o eletrodo compósito de grafite-poliuretana**. 2009. 97 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade Estadual de São Paulo. São Carlos. 2009.
71. CAN, N. Ö.; ALTIOKKA, G.; ABOUL-ENEIN, H. Y. **Analytica Chimica Acta**, v. 576, p. 246–252, 2006.
72. THOMPSON, M. *et al.* **Pure and Applied Chemistry**, v. 71, p. 337-348, 1999.
73. LEITE, F. **Validação em Análise Química**. Campinas, 3ª. Ed., Editora Átomo, São Paulo. 1998
74. ICH-Q2(R1) - **Validations of analytical procedures: methodology (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)**. Geneva, Switzerland, November 2005.

-
75. DE SOUSA, F. C. *et al.* **Revista Verde**, v. 5, p. 10 – 14, 2010.
76. NERO, L. A. *et al.* **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, p. 391-393, 2007.
77. COGERH, **Bacia Hidrográfica Metropolitana**, disponível em <http://portal.cogerh.com.br/categoria2>. Acesso em 03/06/2012.
78. VIDAL, T. F. **Balanço de macronutrientes no Açude Gavião/Ce – Uma Nova Abordagem**. 2011. 184 p. Dissertação (Mestrado). Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza.
79. MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**, Pearson Prentice Hall, UK 2005.
80. HEFNAWY, M.; EL-SHABRAWY, Y.; BELAL, F. **Journal Pharm. Biomed. Anal.**, v. 21, p. 703–707, 1999.
81. DOQ-CGCRE-008 - **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos**, Junho/2007. Disponível em http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_02.pdf. Acesso em 08/06/2011.
82. ICH-Q2Bn - **Validations of analytical procedures: methodology (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)**. Geneva, Switzerland, November, 1996.