



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Centro de Ciências Exatas e Tecnologia
Programa de Pós Graduação em Química



Antonio Marcos Jacques Barbosa

Orientador: Prof. Dr. Valdir Souza Ferreira

Campo Grande - 2012



Serviço Público Federal
Ministério da Educação



Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Centro de Ciências Exatas e Tecnologia
Programa de Pós Graduação em Química

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS PARA A
DETERMINAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÂMICOS COMO
CONTAMINANTES EM AMOSTRAS DE LEITE BOVINO E HUMANO
EMPREGANDO MÉTODOS VOLTAMÉTRICOS**

Antonio Marcos Jacques Barbosa

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multiinstitucional UFG/UFMS/UFU da Universidade Federal do Estado de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química (área de concentração: Química)

Orientador: Prof. Dr. Valdir Souza Ferreira.

Campo Grande - 2012

ANTONIO MARCOS JACQUES BARBOSA

**DESENVOLVIMENTO DE NOVAS METODOLOGIAS PARA A DETERMINAÇÃO
DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÂMICOS COMO CONTAMINANTES EM AMOSTRAS
DE LEITE BOVINO E HUMANO EMPREGANDO MÉTODOS VOLTAMÉTRICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multiinstitucional UFG/UFMS/UFU da Universidade Federal do Estado de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química.

Campo Grande, 31 de agosto de 2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Valdir Souza Ferreira (orientador)

Assinatura

Prof. Dra. Marcelina Ovelar Solaliendres

Assinatura

Prof. Dr. Antonio Rogério Fiorucci

Assinatura

Prof. Dra. Adriana Evaristo de Carvalho

Assinatura

Prof. Dr. Silvio César de Oliveira

Assinatura

DADOS CURRICULARES

1 DADOS PESSOAIS

1.1 Nome: Antonio Marcos Jacques Barbosa

1.2 Data de nascimento: 20 de junho de 1972

1.3 Naturalidade: Jardim – Mato Grosso do Sul

1.4 Nacionalidade: Brasileiro

1.5 Filiação: Sebastião Garcia Barbosa e

Joelcy Jacques Barbosa

1.6 Profissão: Químico

1.7 Endereço residencial: Rua Tupi, 109

Bairro: Jardim Antártica

Campo Grande – Mato Grosso do Sul

C.E.P 79.092-490

Telefone: (0xx67) 9912-5537

E-mail: antonio.jacques@saude.ms.gov.br

2 FORMAÇÃO ACADÊMICA

2.1 Graduação

2.1.1 Curso de licenciatura plena em Química: Concluído na Universidade Federal do Estado de Mato Grosso do Sul – UFMS

2.2 Pós-graduação

2.2.1 Curso de Pós-graduação em Química, área de concentração: Físico-Química no Departamento de Química da Universidade Federal do Estado de Mato Grosso do Sul – UFMS, concluído em 2001

TRABALHOS APRESENTADOS E PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS NO PERÍODO

1 Determinação eletroanalítica de resíduo de antibiótico β -lactâmico ceftiofur em amostras de leite bovino UHT por voltametria de onda quadrada. 17º SIBEE (Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica), Fortaleza-CE, 2009.

2 Desenvolvimento de metodologias eletroanalíticas para determinação do antioxidante ácido clorogênico em café solúvel e chá mate. 17º SIBEE (O Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica), Fortaleza-CE, 2009.

3 Influência de surfactante catiônico brometo de cetiltrimetil amônio para determinação do antioxidante t-butilhidroquinona em biodiesel. 17º SIBEE (Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica), Fortaleza-CE, 2009.

4 Avaliação dos níveis de contaminação por agrotóxicos organofosforados e carbamatos em águas utilizadas para o consumo humano em 04 municípios do Estado de Mato Grosso do Sul, 2008-2009. XVI ENAAL (Encontro Nacional e II Congresso-Latino Americano de Analistas de Alimentos), Belo Horizonte-MG, 2009.

5 Degradação fotoquímica do medicamento antineoplásico dicloridrato de mitoxantrona. o encontro nacional sobre aplicações ambientais de processos oxidativos avançados (EPOA), São Paulo-SP, 2009.

6 Biossensor baseado em polifenol oxidase imobilizada sobre quitosana reticulada com cloreto de cianúrico. XVIII SBQSUL (Encontro de Química da Região Sul), Curitiba-PR, 2010.

7 A presença de resíduos de antibióticos β -lactâmicos e tetraciclinas em amostras de leite bovino UHT e tipo C: problemas para a saúde da população e prejuízos para a indústria. XVII ENAAL (Encontro Nacional de Analistas de Alimentos e III Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos), Cuiabá-MT, 2011.

8 Contaminação por agrotóxico carbamatos e organofosforados em águas para consumo humano de dourados – MS, 2008-2009. XVII ENAAL (Encontro Nacional de Analistas de Alimentos e III Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos), Cuiabá-MT, 2011.

9 Determination of reference value of plasma colinesterase. XVII ENAAL (Encontro Nacional de Analistas de Alimentos e III Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos), Cuiabá-MT, 2011.

10 Efeito de níveis de higiene no pré-processo de fabricação de bananas (*musa spp.*) desidratadas osmoticamente. XVII ENAAL (Encontro Nacional de Analistas de Alimentos e III Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos), Cuiabá-MT, 2011.

11 Qualidade microbiológica de massas alimentícias e produtos de panificação semi-prontos e prontos para consumo. XVII ENAAL (Encontro Nacional de Analistas de Alimentos e III Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos), Cuiabá-MT, 2011.

12 Qualidade microbiológica de sorvetes comercializados no estado de mato grosso do sul. XVII ENAAL (Encontro Nacional de Analistas de Alimentos e III Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos), Cuiabá-MT, 2011.

13 Desenvolvimento de metodologias eletroanalíticas para determinação de molinato em amostras de água de rio. XX SIBAE (Congresso da Sociedade Iberoamericana de Eletroquímica), Fortaleza-CE, 2012.

TRABALHOS PUBLICADOS NO PERÍODO

- 1 de Araújo TA, Cardoso JC, Barbosa AMJ, Ferreira VS. Influence of the surfactant bromide of cetyltrimethyl ammonium in the determination of chlorogenic acid in instant coffee and mate tea samples. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2009 Oct-15;73(2):408-414. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.06.019>.
- 2 Fogliatto DK, Barbosa AMJ, Ferreira VS. Voltammetric determination of the phytoestrogen genistein in soy flours and soy based supplements using cationic surfactant cetyltrimethylammonium bromide. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010 Jul-1. 78(2):243-249. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.03.007>.
- 3 Moccelini, S.K.; Vieira, I.C.; de Lima, F.; Lucca, B.G.; Barbosa, A.M.J.; Ferreira, V.S. Determination of thiodicarb using a biosensor based on alfalfa sprout peroxidase immobilized in self-assembled monolayers. *Talanta*. 2010 Jun-30;82(1):164-170. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2010.04.015>.
- 4 de Araújo TA, Barbosa AMJ, Viana LH, Ferreira VS. Voltammetric determination of tert-butylhydroquinone in biodiesel using a carbon paste electrode in the presence of surfactant. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010 Sep-1;79(1):409-414. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.05.008>.
- 5 de Lima, F.; Lucca, B.G.; Barbosa, A.M.J.; Ferreira, V.S. Biosensor based on pequi polyphenol oxidase immobilized on chitosan crosslinked with cyanuric chloride for thiodicarb determination. *Enzyme Microb Technol*. 2010 Set-6;47(4):153-158. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.05.006>.
- 6 Barbosa, A.M.J.; de Araújo, T.A.; Trindade, M.A.G.; Ferreira, V.S. A simple method for electroanalytical determination of ceftiofur in UHT milk samples using square-wave voltammetry technique. *J Appl Electrochem*. 2010;41(2):249-255. DOI: DOI:10.1007/s10800-010-0232-5.
- 7 de Araujo, T.A.; Barbosa, A.M.J.; Viana, L.H.; Ferreira, V.S. Electroanalytical determination of TBHQ, a synthetic antioxidant, in soybean biodiesel samples. *Fuel (Guildford)*. 2010 Fev;90(2):707-712. DOI: DOI: 10.1016/j.fuel.2010.09.022.
- 8 Câmara SAV, Barbosa AMJ, Freire DCT, Rosa GMM, Almeida TN. Fator de risco para bócio: teor de iodo no sal para consumo humano em Mato Grosso do Sul. *Rev Saúde Pública de Mato Grosso do Sul*. 2010;4:16-22.
- 9 Barbosa AMJ, de Araujo TA, Trindade MG, Ferreira VS. A new indirect method based on square-wave voltammetry for ceftiofur determination in bovine milk using an alkaline degradation product. *Microchem J*. 2011 Jul;98(2):297-302. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2011.02.014>.
- 10 Fernandes, S.C.; Vieira, I.C.; Barbosa, A.M.J. ; Ferreira, V. S. Methomyl detection by inhibition of laccase using carbon ceramic biosensor. *Electroanalysis*. 2011 Jul;23(7):1623-1630. DOI: 10.1002/elan.201100044.

11 Zapp E, Brondani D, Vieira IC, Scheeren CW, Dupont J, Barbosa AMJ, Ferreira VS. Biomonitoring of methomyl pesticide by laccase inhibition on sensor containing platinum nanoparticles in ionic liquid phase supported in montmorillonite. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2011 Jul-5;155(1):331–339. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2011.04.015>.

12 Câmara SAV, Barbosa AMJ, Freire DCT, Rosa GMM, Almeida TN. Monitoramento do Teor de Iodo no Sal para Consumo Humano Comercializado em Campo Grande, MS. *Hig alim*. 2011;25(198/199):145-149.

13 Barbosa AMJ, de Araujo TA, Trindade MAG, Ferreira VS. Direct cefepime determination in human milk using solid mercury amalgam electrode manufactured with silver nanoparticles. *J Electroanal Chem*. 2012 Ago-1;681:127–132.

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais
Sebastião Garcia Barbosa e Joelcy Jacques Barbosa.*

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Valdir Souza Ferreira, o sincero agradecimento por esses anos de convivência e pesquisa, pelos valiosos ensinamentos não apenas no campo da Eletroanalítica, mas sobre a Ciência, em seu sentido mais amplo e principalmente por tratar seus alunos como pesquisadores, motivando-os ao exercício da pesquisa.
- Aos meus irmãos e sobrinhos, pelo apoio e incentivo à realização deste trabalho.
- Aos colegas e amigos do LP-5, Simone, Gisele, Edgard, Michelle, Daniela, Andréia, Hebert, Adriana, Bruno, Joseane e Fábio.
- À amiga de pós-graduação, Tatiane Alfonso de Araújo, pelo companheirismo e pela amizade, que levarei comigo por toda a vida.
- Ao Prof. Dr. Magno Aparecido Gonçalves Trindade pelas valiosas discussões e sugestões durante o processo de elaboração dos artigos.
- Aos amigos Cássia Cilene e Francisco, pelo apoio, incentivo, sem os quais eu jamais poderia ter chegado até aqui.
- A todos os professores que contribuíram para com a minha formação em Química, pela paciência, atenção e constante disponibilidade em ensinar.
- À amiga Sandra pela ajuda e presença nos momentos de dificuldades, além de compreender a minha constante ausência no Setor de Toxicologia do Lacen, devido aos compromissos assumidos.
- Aos amigos Dayse Christiane, Milene e Gabriel pela realização das análises físico-químicas das amostras de leite UAT.
- Aos colegas e amigos do Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Mato Grosso do Sul (Lacen/MS) pelo incentivo, apoio e compreensão.

- À direção do Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Mato Grosso do Sul, Lacen/MS, pelo apoio institucional e as facilidades oferecidas.
- À Sônia Aparecida Viana Câmara, gerente da Divisão de Bromatologia e Química do Lacen/MS, pelo apoio e as facilidades oferecidas.
- Ao Departamento de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pelo apoio institucional e as facilidades oferecidas.
- À PROPP/UFMS, pela concessão da bolsa de estudos.
- A todos que direta e indiretamente tenham contribuído para o desenvolvimento deste trabalho.

Sê

Se não puderes ser um pinheiro, no topo de uma colina,

Sê um arbusto no vale mas sê

O melhor arbusto à margem do regato.

Sê um ramo, se não puderes ser uma árvore.

Se não puderes ser um ramo, sê um pouco de relva

E dá alegria a algum caminho.

Se não puderes ser uma estrada,

Sê apenas uma senda,

Se não puderes ser o Sol, sê uma estrela.

Não é pelo tamanho que terás êxito ou fracasso...

Mas sê o melhor no que quer que sejas.

Pablo Neruda

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura básica de cefalosporinas.....	35
Figura 2 - Estrutura do ceftiofur.....	38
Figura 3 - Ataque nucleófilo ao anel β -lactâmico com subsequente eliminação do grupo em C3 [102].....	57
Figura 4 - Formação do desfuroilceftiofur a partir da degradação de ceftiofur em meio aquoso.....	58
Figura 5 - Fórmula estrutural da cefepima.....	59
Figura 6 - Curva de adição de padrão utilizada em polarografia/voltametria.....	68
Figura 7 - Voltamogramas obtidos através da redução de uma solução do CF $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR pH 2,5, utilizando as técnicas de VOQ e VPD. Condições para VOQ: $f = 60 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 25 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$; para VPD: tempo de modulação = 0,07 s, intervalo de tempo = 0,4 s, $E_{sw} = 25$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$	79
Figura 8 - Influência da variação da concentração do tampão Britton-Robinson sobre as correntes de pico de uma solução do CF $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,5: curva (a) – tampão BR $0,07 \text{ mol L}^{-1}$; curva (b) – tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ e curva (c) – tampão BR $0,10 \text{ mol L}^{-1}$	81
Figura 9 - Influência da variação da concentração do tampão Britton-Robinson sobre as correntes de pico de uma solução do CF $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0: curva (a) – tampão BR $0,07 \text{ mol L}^{-1}$; curva (b) – tampão BR $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e curva (c) – tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$	81
Figura 10 - Voltamogramas de onda quadrada para uma solução do CF $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,5: curva (a) – eletrólito suporte; curva (b) – ceftiofur $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$	82
Figura 11 - Voltamogramas e onda quadrada para uma solução do CF $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0: curva (a) – eletrólito suporte; curva (b) – ceftiofur $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, após pré-concentração de 50 s e -0,25 V.....	82
Figura 12 - Influência do pH na resposta da corrente de pico para redução eletroquímica de $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ do CF sobre a superfície do HMDE em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. Condições: $f = 60 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 2,5 \text{ mV}$ e $E_{sw} = 25 \text{ mV}$	83
Figura 13 - Voltamogramas de onda quadrada para o CF em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, em pH 5,0. Condições: $f = 60 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 2,5 \text{ mV}$ e $E_{sw} = 25 \text{ mV}$	84
Figura 14 - Relação entre potencial do pico 1C e 2 C em função da variação do pH do meio de 2,0 a 8,0. Condições: solução do CF $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$	85

- Figura 15 - Efeito do tempo de deposição sobre a corrente de pico do CF em pH 2,5.....87
- Figura 16 - Efeito do potencial de deposição na corrente de pico de redução do CF nas condições estabelecidas anteriormente.....89
- Figura 17 - Avaliação da aplicação da frequência de pulsos de onda quadrada na corrente de pico de redução do CF.....90
- Figura 18 - Voltamogramas obtidos através da variação da frequência de aplicação de pulsos nas correntes de picos do CF, onde: (a) branco, (b) 30 Hz, (c) 60 Hz, (d) 90 Hz, (e) 120 Hz, (f) 150 Hz, (g) 180 Hz e (i) 210 Hz.....90
- Figura 19 - Influência da amplitude de pulso na corrente de pico de redução do CF, para uma solução do CF $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,5.....91
- Figura 20 - Voltamogramas do CF em pH 2,5 para diferentes valores de amplitude de pulso (10 a 150 mV) em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,5. $f = 90 \text{ Hz}$; $t_{\text{dep}} = 50 \text{ s}$; $E_{\text{dep}} = -0,30 \text{ V}$92
- Figura 21 - Avaliação do incremento de potencial na corrente de pico do CF $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,5. $f = 90 \text{ Hz}$; $a = 30 \text{ mV}$; $t_{\text{dep}} = 50 \text{ s}$; $E_{\text{dep}} = -0,30 \text{ V}$93
- Figura 22 - Voltamogramas representativos da variação do incremento de varredura sobre corrente de pico de redução do CF, onde: (a) branco; (b) 2 mV; (c) 4 mV; (d) 6 mV; (f) 8 mV; (g) 10 mV. $f = 90 \text{ Hz}$; $E_{\text{sw}} = 30 \text{ mV}$; $t_{\text{dep}} = 50 \text{ s}$; $E_{\text{dep}} = -0,30 \text{ V}$93
- Figura 23 - Voltamogramas obtidos da curva analítica da Figura 23, onde: (a) branco; (b) $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$; (c) $2,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$; (d) $3,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$; (e) $4,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$; (f) $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$; (g) $6,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$; (h) $7,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$; (i) $8,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$; (j) $9,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e (k) $10,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ 95
- Figura 24 - Curva analítica do padrão CF em tampão BR: $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,5.....95
- Figura 25 - Voltamogramas obtidos para o CF na amostra A, nas condições: BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, pH 2,5 e demais condições otimizadas, onde: (a) branco tampão BR pH 2,5 $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, (b) amostra de leite UAT após extração (seção 2.3.2), (c) $2,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, (d) $4,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, (e) $6,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e (f) $8,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ 100
- Figura 26 - Curva de adição de padrão, obtidos para o CF na amostra A, nas condições: BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, pH 2,5 e demais condições otimizadas.....100
- Figura 27 - Perfil cromatográfico para uma solução $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ do antibiótico CF. Condições: Fase móvel: acetonitrila : água na forma gradiente vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ 102
- Figura 28 - Curva analítica obtida para a detecção do antibiótico em diferentes concentrações com detecção em 270 nm.....103
- Figura 29 - Cromatogramas registrados para análise de amostras de leite bovino UAT (amostra A). (a) Solução padrão $418,40 \text{ ng mL}^{-1}$ do antibiótico CF e (b) Amostra A contendo

- 418,40 ng mL⁻¹ do antibiótico CF, após ser submetida à extração como mencionado no procedimento seção 2.3.2.....104
- Figura 30 - Voltamograma de onda quadrada de solução de ceftiofur 5,0 x 10⁻⁷ mol L⁻¹ em pH 10,0. Curva – (a) Tampão Britton-Robinson 0,04 mol L⁻¹, curva (b) – Solução de ceftiofur 5,0 x 10⁻⁷ mol L⁻¹ após 60 minutos de hidrólise.....106
- Figura 31 - Influência do pH do eletrólito de suporte.....107
- Figura 32 - Influência da temperatura de hidrólise sobre a *i*_{p3C}, obtidas a partir de voltamogramas de onda quadrada de ceftiofur 5,0 x 10⁻⁷ mol L⁻¹, pré-aquecido por 20,30, 40, 50,60 70 e 80°C, em tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 10,0.....107
- Figura 33 - Influência do tempo de hidrólise sobre a *i*_{p3C}, obtidas a partir de voltamogramas de onda quadrada de ceftiofur 5,0 x 10⁻⁷ mol L⁻¹, pré-aquecido a 60°C, em tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 10,0.....108
- Figura 34 - Espectro UV/Vis do CF 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹, em tampão BR. Curva – (a) tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 10,0, curva – (b) CF 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹, curva – (c) CF 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ após 15 minutos de hidrólise, curva – (d) CF 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ após 30 minutos de hidrólise, curva - (e) CF 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ após 60 minutos de hidrólise.....110
- Figura 35 - Influência do tempo de acúmulo sobre a corrente de pico, obtida a partir de voltamogramas de onda quadrada de ceftiofur 5,0 x 10⁻⁷ mol L⁻¹, pré-aquecido por 60 minutos à temperatura de 60°C, em tampão BR 0,04 mol L⁻¹, pH10, E_{dep} = +0,05 V.....111
- Figura 36 - Influência do potencial de acúmulo sobre a corrente de pico, obtida a partir de voltamogramas de onda quadrada de ceftiofur 5,0 x 10⁻⁷ mol L⁻¹, pré-aquecido por 60 minutos à temperatura de 60°C, em tampão BR 0,04 mol L⁻¹, pH 10,0 e t_{dep} = 60s.....112
- Figura 37 - Influência da variação da *f* sobre os valores de *i*_{p3C} para redução eletroquímica de 5,0 x 10⁻⁷ mol L⁻¹ do CF em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹. Condições: E_{sw} = 30 mV, ΔE_s = 4 mV.....113
- Figura 38 - Influência da variação da E_{sw} sobre os valores de *i*_{p3C} para solução 5,0 x 10⁻⁷ mol L⁻¹ do CF em BR 0,04 mol L⁻¹. Condições: *f* = 120 Hz e ΔE_s = 4 mV.....114
- Figura 39 - Influência da variação do incremento de varredura sobre os valores de *i*_{p3C} para solução 5,0 x 10⁻⁷ mol L⁻¹ do CF em de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 10,0. Condições: *f* = 120 Hz e E_{sw} = 30 mV.....114
- Figura 40 - Voltamogramas obtidos da curva analítica da Figura 43, onde: (a) branco; (b) 6,0 x 10⁻⁸ mol L⁻¹; (c) 7,0 x 10⁻⁸ mol L⁻¹; (d) 8,0 x 10⁻⁸ mol L⁻¹; (e) 9,0 x 10⁻⁸ mol L⁻¹; (f) 10,0 x 10⁻⁸ mol L⁻¹; (g) 11,0 x 10⁻⁸ mol L⁻¹; (h) 12,0 x 10⁻⁸ mol L⁻¹, (i) 13,0 mol L⁻¹ (j) 14,0 x 10⁻⁸ mol L⁻¹ e (k) 15,0 x 10⁻⁸ mol L⁻¹.....116
- Figura 41 - Curva analítica do padrão CF em tampão BR: 0,04 mol L⁻¹ pH 10,0.....116
- Figura 42 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a determinação de ceftiofur usando a condição otimizada. (a) Amostra branco de leite fluido, (b) Amostra de leite fluido

fortificada com $8,40 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ de produto de hidrólise do padrão ceftiofur, (c-f) Sucessivas adições de produto de hidrólise do padrão ceftiofur; concentrações finais na célula: $1,5$, $3,0$, $4,5$, e $6,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. Parâmetros: $t_{\text{dep}} = 60 \text{ s}$, $E_{\text{dep}} = +0,10 \text{ V}$; $f = 90 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 4,0 \text{ mV}$, $E_{\text{sw}} = 30 \text{ mV}$119

Figura 43 - Curva analítica obtida para a determinação de ceftiofur usando a condição otimizada.....119

Figura 44 - Voltamograma de onda quadrada para cefepima $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre AgSAE em meio tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,5: curva (a) – eletrólito suporte; curva (b) – ceftiofur $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$120

Figura 45 - Influência do pH sobre a corrente de pico (a) e potencial de pico (b) para redução eletroquímica de $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de cefepima, sobre a superfície AgSAE, em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. Condições: $f = 60 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$ e $E_{\text{sw}} = 25 \text{ mV}$121

Figura 46 - Influência da variação do tempo de acúmulo sobre os valores de i_{p2C} para redução eletroquímica de $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de CEF sobre a superfície do AgSAE em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. Condições: $E_{\text{sw}} = 25 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$122

Figura 47 - Influência da variação do potencial de deposição sobre os valores de i_{p2C} para redução eletroquímica de $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de CEF sobre a superfície do AgSAE em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. Condições: $E_{\text{sw}} = 25 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$123

Figura 48 - Influência da variação da f sobre os valores de i_{p2C} para redução eletroquímica de $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de CEF sobre a superfície do AgSAE em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. Condições: $E_{\text{sw}} = 25 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$124

Figura 49 - Influência da variação da amplitude de pulso sobre os valores de i_{p2C} para redução eletroquímica de $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de CEF sobre a superfície do AgSAE em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. Condições: $f = 60 \text{ Hz}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$125

Figura 50 - Influência da variação do incremento de potencial sobre os valores de i_{p2C} para redução eletroquímica de $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de CEF sobre a superfície do AgSAE em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. Condições: $f = 60 \text{ Hz}$ e $E_{\text{sw}} = 30 \text{ mV}$126

Figura 51 - (A) Voltamogramas de onda quadrada registrados sobre a superfície do AgSAE em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,5 para: (a) branco, (b) $3,0 \times 10^{-7}$, (c) $6,0 \times 10^{-7}$, (d) $9,0 \times 10^{-7}$, (e) $12,0 \times 10^{-7}$, (f) $15,0 \times 10^{-7}$, (g) $18,0 \times 10^{-7}$, (h) $21,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de CEF. (B) Dependência da i_{p2C} em função do aumento da concentração de CEF. Condições: $f = 60 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ e $E_{\text{sw}} = 30 \text{ mV}$128

Figura 52 - (A) Voltamogramas de onda quadrada registrados sobre a superfície do AgSAE em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,5. (a) Tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,5, (b) Amostra de de leite humano, (c-g) adições sucessivas de $20 \mu\text{L}$ de solução padrão $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de CEF. (B) Curva de adição do padrão. Condições: $f = 60 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ e $E_{\text{sw}} = 30 \text{ mV}$130

Figura 53 - (A) Cromatograma obtido para separação em coluna C18 de amostra de leite humano fortificada contendo $3,03 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de CEF após extração e (B) solução padrão

$3,03 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de CEF eluídas em fase móvel contendo 10 mmol de K_2HPO_4 /metanol.
Condições: Gradiente 80 - 20% de K_2HPO_4 em 12 min, vazão = $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e $\lambda = 254 \text{ nm}$.

.....131

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estrutura química de algumas cefalosporinas já estudadas [16-18].....	35
Tabela 2 - Classificação mundial dos principais países produtores de leite bovino em 2010..	42
Tabela 3 - Parâmetros obtidos da curva analítica do fármaco CF	96
Tabela 4 - Limites de detecção e quantificação.....	96
Tabela 5 - Frequência de resíduos de β -lactâmicos e tetraciclinas em amostras de leite UHT integral e padronizado e leite pasteurizado tipo B e C produzidos no Estado de Mato Grosso do Sul, no período de agosto de 2009 a julho de 2010.....	98
Tabela 6 - Frequência de resíduos de β -lactâmicos e tetraciclinas em amostras de leite UAT integral e padronizado e leite pasteurizado tipo B e C produzidos no Estado de Mato Grosso do Sul segundo as marcas comerciais, no período de agosto de 2009 a julho de 2010.....	99
Tabela 7 - Determinação do CF utilizando o método proposto comparado com o HPLC.....	101
Tabela 8 - Parâmetros analíticos obtidos da curva analítica.....	102
Tabela 9 - Resultados de eficiência de extração obtidos para quantificação do antibiótico ceftiofur em amostras de leite bovino.....	105
Tabela 10 - Parâmetros otimizados.....	115
Tabela 11 - Parâmetros obtidos da curva analítica do fármaco CF.....	117
Tabela 12 - Resultados obtidos para a recuperação do produto de hidrólise do ceftiofur em mostras de leite fluído e em pó utilizando o método proposto.....	118
Tabela 13 - Parâmetros otimizados.....	127
Tabela 14 - Parâmetros obtidos da curva analítica.....	129
Tabela 15 - Resultados para as determinações de cefepima em leite humano por voltametria de onda quadrada e CLAE.....	132

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Primeira etapa de redução.....	86
Esquema 2 - Segunda etapa de redução do Ceftiofur.....	86
Esquema 3 - Mecanismo de degradação de cefalosporinas contendo grupos α -amino.....	109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ΔE = variação de potencial elétrico
- AdSV = voltametria de redissolução adsortiva
- BR = Britton-Robinson
- CSV = voltametria de redissolução catódica
- DME = eletrodo gotejante de mercúrio
- DPP = polarografia de pulso diferencial
- E = potencial
- E_{dep} = potencial de depósito
- $E_{1/2}$ = potencial de meia onda
- E° = potencial padrão do eletrodo
- E_p = potencial de pico
- F = constante de Faraday
- HMDE = eletrodo de mercúrio de gota pendente
- HPLC = cromatografia líquida de alta eficiência
- LSV = voltametria de varredura linear
- n = número de elétrons
- s = segundos
- T = temperatura
- t_{acc} = tempo de acúmulo
- UV = ultra-violeta
- UV/VIS = ultra violeta-visível
- mV = mili-volts
- v = velocidade de varredura
- $W_{1/2}$ = largura da onda
- ® = marca registrada
- μ = micro
- A = ampere (unidade de corrente elétrica)
- Ag = prata
- AgCl = cloreto de prata
- ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- CF = ceftiofur
- C_{18} = coluna de fase reversa (OH^- substituído por CH_3)

CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência

CG = cromatografia em fase gasosa

CG-EM = cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa

DP = desvio padrão

EFS = extração em fase sólida

E_{sw} = amplitude de onda quadrada

FDA = Food and Drug Administration

f = frequência

Hz = Hertz

i_p = corrente de pico

i_d = corrente difusional

IUPAC = União Internacional de Química Pura e Aplicada

IV = infra-vermelho

k = constante estatística

LD = limite observado de detecção

LQ = limite observado de quantificação

LQS = limites observados de quantificação

M = concentração molar

$\mu\text{g mL}^{-1}$ = microgramas por mililitro

min = minutos

mg L^{-1} = miligramas por litro

μm = micrometro

μM = micro molar

mL = mililitros

mg kg^{-1} = ppm (miligramas por quilograma)

mol L^{-1} = concentração molar

mV = milivolt

nA = nanoampere

ng mL^{-1} = nanogramas por mililitros

nM = nanomolar

nm = nanômetro

nM = nanomolar

pH = potencial hidrogeniônico

R = coeficiente de correlação

rpm = rotações por minuto

V = volt

VOQ = voltametria de onda quadrada

V/s = volts por segundo

v/v = concentração volume-volume

MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

VRSA = Vancomycin Resistant *Staphylococcus aureus*

IV = via intra-venosa

IM = intra-muscular

DL₅₀ = dose letal mediana

CCS = Contagem de Células somáticas

CMT = Califórnia Mastitis Test

CFPZ = cefoperazona

CEF = cefepima

CP = proxetil cefpodoxima

CG = carbono vítreo

DAD = detector de arranjo de fotodiodos

SFNO = safranina

MB = azul de metileno

CV = coeficiente de variação

DPR = desvio padrão relativo

LC-ESI/MS/MS = cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em "tandem" com ionização por "electrospray"

EEG = eletroencefalografia

TFG = taxa de filtração glomerular

QC = controle de qualidade

MIC = concentração inibitória mínima que inibe 90% da população bacteriana inicial

Raio X = são emissões eletromagnéticas de natureza semelhante à luz visível

NaOH = Hidróxido de sódio

KH₂PO₄ = Hidrogenofosfato de Potássio

RESUMO

Neste trabalho foram desenvolvidos dois métodos eletroanalíticos para a determinação direta e indireta do antibiótico ceftiofur em leite bovino; empregando-se eletrodo de mercúrio. Além da utilização do HMDE; empregou-se também um eletrodo de amálgama de prata para a determinação de cefepima em leite humano. Inicialmente um método eletroanalítico simples foi desenvolvido para determinar o antibiótico ceftiofur (CF) em amostras de leite. O método é baseado no acúmulo adsortivo da droga em eletrodo de gota de mercúrio pendente (HMDE) e o acompanhamento inicial da onda quadrada na região negativa, a qual exibiu picos de redução bem definidos em -0,60 V (pico 1C) e -0,91 V (pico 2C) vs Ag/AgCl. Curvas de calibração foram construídas e os parâmetros estatísticos foram avaliados. Em pH 2,5, o método de voltametria de onda quadrada revelou boa linearidade de $52,4 - 524 \text{ } 10^{-9} \text{ g mL}^{-1}$ ($r = 0,997$), a qual está em conformidade com o nível de tolerância de $100 \text{ } 10^{-9} \text{ g mL}^{-1}$ para CF como um resíduo em leite bovino estabelecido pela Food and Drug Administration (FDA) e a União Europeia. Os limites de detecção e quantificação foram de 1,86 e $6,20 \text{ ng mL}^{-1}$, respectivamente. O método foi avaliado por meio da cromatografia líquida de alta eficiência como referência. A seguir, apresentamos método eletroanalítico para a determinação de ceftiofur baseado na hidrólise deste antibiótico em tampão Britton-Robinson $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 10 e $60 \text{ } ^\circ \text{ C}$ durante 60 min (pico de redução em -0,70 V). As condições foram otimizadas para a hidrólise completa e determinação quantitativa do ceftiofur em leite. O método pôde ser utilizado com sucesso para a determinação do antibiótico em amostras de leite fluído e leite em pó fortificados para concentrações de $6,0 \times 10^{-8}$, $8,0 \times 10^{-8}$, e $10 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. Os testes de recuperação obtidos foram em 98,28% a 100,83%. Os limites de detecção e quantificação foram de $3,73 \times 10^{-10}$ e $1,24 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. O método tem a vantagem de eliminar a interferência de proteínas presentes na amostra, suprimindo assim a necessidade da extração exaustiva, o que frequentemente torna outros procedimentos inviáveis em termos de tempo e custo dos reagentes. Além disso, a geração de resíduos foi menor do que em outros métodos. Eletrodos sólido de amálgama de prata (AgSAEs) representam uma alternativa apropriada aos eletrodos de mercúrio, devido às suas propriedades eletroquímicas semelhantes e não-toxicidade dos materiais amálgamados. Com base nesse conhecimento, este trabalho foi desenvolvido utilizando uma amálgama de prata sólida como eletrodo de trabalho para a determinação de cefepima em amostra de leite humano. O voltamograma de onda quadrada registrado para a cefepima, em tampão Britton-Robinson pH 2,5, apresentou dois picos de redução bem definidos, em -0,28 V (pico 1C) e -

0,45 V (pico 2C). Em condições otimizadas, as curvas de calibração apresentaram respostas lineares de $3,0 \times 10^{-7}$ a $2,1 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Os limites de detecção e quantificação foram calculados e constatou-se serem de $8,51 \times 10^{-9}$ e $2,84 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹, respectivamente. A aplicabilidade do método foi verificada através de amostras de leite humano fortificadas e as percentagens destas recuperações variaram de 98,0% a 100,5%. Os dados obtidos também foram comparados com os obtidos com a técnica de HPLC.

Palavras-chave: ceftiofur. cefepima. β -lactâmicos. leite humano. leite bovino. voltametria de onda quadrada.

ABSTRACT

We developed two electroanalytical methods for determining direct and indirect antibiotic ceftiofur in bovine milk; employing mercury electrode. In addition to using HMDE; employed is also a silver amalgam electrode for the determination of cefepime in human milk. Initially a simple electroanalytical method was developed to determine the antibiotic ceftiofur (CF) in milk. The method is based on the adsorptive accumulation of the drug on a hanging mercury-drop electrode (HMDE) and the accompanying initiation of a negative square wave, which yielded well-defined cathodic peaks at -0.60 V (1C) and -0.91 V (2C) vs. Ag/AgCl. Calibration graphs were constructed and statistical parameters were evaluated. At pH 2.5, the square-wave voltammetry method revealed linearity from 52.4 to 524 ng mL⁻¹ ($r = 0.997$), which is in accordance with the tolerance level of 100 ng mL⁻¹ for CF as a residue in bovine milk established by the Food and Drug Administration (FDA) and the European Union. The limits of detection and quantification were 1.86 and 6.20 ng mL⁻¹, respectively. The method was tested to determine CF in spiked milk samples using HPLC as reference method. Then we present a new electroanalytical method for determination of ceftiofur based on the hydrolysis of this antibiotic in 0.04 mol L⁻¹ Britton–Robinson buffer at pH 10 and 60 °C for 60 min (reduction peak at -0.70 V). Conditions were optimized for complete hydrolysis and quantitative determination of ceftiofur in milk. The method can be successfully used for determination of the antibiotic directly from samples of fluid milk and powder milk spiked to concentrations of 6.0×10^{-8} , 8.0×10^{-8} , and 10×10^{-8} mol L⁻¹, respectively. Recovery test ranged from 98.28% to 100.83%. The limits of detection and quantification were 3.73×10^{-10} and 1.24×10^{-9} mol L⁻¹, respectively. The method has the advantage of eliminating interference from proteins present in the sample, thus obviating the need for exhaustive extraction, which often renders other procedures unfeasible in terms of time and reagent cost. In addition, waste generation was found to be lower than in other methods. Solid silver mercury amalgam electrodes (AgSAE) represent a suitable alternative to mercury electrodes due to their similar electrochemical properties and non-toxicity of the amalgam material. Based on this knowledge, this paper was developed using a solid silver amalgam as working electrode to determine cefepime in human milk sample. Square-wave voltammogram registered for cefepime, Britton-Robinson buffer at pH 2.5, presented two well-defined reduction peaks, at -0.28 V (peak 1C) and -0.45 V (peak 2C). Under optimized condition, the calibration curves presented linear response from 3.0×10^{-7} to 2.1×10^{-6} mol L⁻¹. The limits of detection and quantification was calculated and found to be 8.51×10^{-9} and 2.84×10^{-8} mol

L^{-1} , respectively. The applicability of the method was verified using spiked human milk samples and testing recovery percentages, which were ranged from 98.0% to 100.5%. The obtained were also compared with those provided with the HPLC technique.

Keywords: ceftiofur. cefepime. β -lactams. human milk. bovine milk. square wave voltammetry.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	ii
LISTA DE ESQUEMAS.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
INTRODUÇÃO.....	32
I.1 Considerações gerais.....	32
I.2 Cefalosporinas.....	33
I.3 Aspectos gerais sobre cefalosporinas.....	34
I.4 Ceftiofur.....	37
I.4.1 Características gerais.....	37
I.4.2 Toxicidade.....	39
I.5 Leite bovino.....	39
I.5.1 Produção de leite bovino.....	41
I.5.2 Características da contaminação do leite por antibióticos.....	42
I.6 Análises de compostos de interesse farmacêutico através de técnicas voltamétricas.....	47
I.7 Métodos químicos.....	48
I.8 Ensaio microbiológico.....	49
I.9 Métodos cromatográficos para a determinação de cefalosporinas.....	49
I.10 Eletroanálise de cefalosporinas.....	50
I.11 Métodos para a determinação de ceftiofur.....	53
I.12 Hidrólise de cefalosporinas.....	56
I.13 Hidrólise do ceftiofur.....	57
I. 14 Cefepima.....	58
I.14.1 Características gerais.....	58
I.14.2 Toxicidade.....	60
I.15 Leite humano.....	60
I.16 Características da contaminação do leite humano por antibióticos.....	61
I.17 Métodos para a determinação de cefepima.....	62
I.18 Eletrodos de trabalho.....	65
I.19 Eletrodos sólidos de amálgama.....	66

I.20 Validação.....	67
I.21 Método da adição de padrão.....	68
I.22 Objetivos.....	69
PARTE EXPERIMENTAL.....	71
II.1 Reagentes.....	71
II.2 Experimentos cromatográficos.....	72
II.3 Amostras de leite.....	72
II.4 Equipamentos.....	73
II.5 Experimentos voltamétricos.....	74
II.5 Experimentos voltamétricos.....	74
II.5.1 Estudo das condições experimentais e obtenção da curva analítica.....	74
II.5.2 - Polarografia de pulso diferencial.....	74
II.5.3 Voltametria de redissolução catódica.....	74
II.6 Determinação direta de ceftiofur em amostra de leite UAT.....	75
II.7 Determinação indireta de ceftiofur em amostra de leite UAT e leite em pó.....	75
II.8 Experimentos cromatográficos.....	75
II.8.1 Estudo das condições experimentais e obtenção da curva analítica.....	75
II.8.2 Determinação de ceftiofur em amostras de leite bovino por CLAE-UV/Vis.....	76
II.9 Experimentos espectrofotométricos.....	77
II.9.1 Estudo de degradação do ceftiofur em meio alcalino.....	77
II.10 Preparo e ativação do eletrodo de amálgama de prata.....	77
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	79
III.1 Comportamento eletroquímico do ceftiofur utilizando as técnicas voltamétricas de onda quadrada (VOQ) e pulso diferencial (VPD).....	79
III.2 Influência da concentração do eletrólito de suporte tampão Britton-Robinson.....	80
III.3 Efeito do pH.....	81
III.4 Avaliação dos parâmetros voltamétricos para determinação de ceftiofur por VOQ.....	87
III.4.1 Efeito do tempo de deposição.....	87
III.4.2 Efeito do potencial de deposição.....	88
III.4.3 Efeito da frequência de aplicação dos pulsos.....	89
III.4.4 Efeito da amplitude dos pulsos.....	90

III.4.5 Influência do incremento de varredura.....	92
III.5 Determinação da curva analítica do ceftiofur.....	94
III.6 Estudo de interferentes.....	92
III.7 Características físico-químicas das amostras de leite UAT.....	97
III.8 Ocorrência de resíduos de antibióticos β -lactâmicos em leite UAT e pasteurizado tipo C produzido e comercializado no Estado de Mato Grosso do Sul.....	98
III.9 Determinação do CF em amostras de leite UAT utilizando o método eletroquímico.....	99
III.10 Determinação do CF em amostras de leite UAT utilizando o método CLAE.....	101
III.11 Estudo da hidrólise do ceftiofur.....	105
III.11.1 Estudo do pH, tempo e temperatura de hidrólise do ceftiofur.....	106
III.12 Otimização dos parâmetros instrumentais.....	110
III.12.1 Efeito do tempo de deposição.....	111
III.12.2 Efeito do potencial de deposição.....	111
III.12.3 Efeito da frequência de aplicação dos pulsos.....	112
III.12.4 Efeito da amplitude dos pulsos.....	113
III.12.5 Influência do incremento de varredura.....	114
III.13 Determinação da curva analítica.....	115
III.14 Produto de hidrólise.....	117
III.15 Aplicação da metodologia desenvolvida para a determinação do produto de hidrólise do CF em amostras de leite UAT e em pó.....	117
III.16 Estudo do comportamento voltamétrico da CEF, por VOQ.....	119
III.16.1 Eletrólito de suporte tampão Britton-Robinson.....	120
III.16.2 Influência do pH.....	121
III.16.3 Efeito do tempo de deposição.....	122
III.16.4 Efeito do potencial de deposição.....	122
III.16.5 Efeito da frequência de aplicação dos pulsos.....	123
III.16.6 Efeito da amplitude dos pulsos.....	124
III.16.7 Influência do incremento de varredura.....	125
III.16.8 Determinação da curva analítica da cefepima.....	127
III.17 Determinação do CEF em amostras de humano utilizando o método eletroquímico...	129
III.18 Determinação de CEF em amostras de leite humano utilizando o método CLAE.....	130
IV CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	133

REFERÊNCIAS.....135

ANEXOS.....153

1 INTRODUÇÃO

I.1 Considerações gerais

Antibióticos são substâncias químicas derivadas de organismos vivos ou produzido por eles, capazes de inibir processos vitais de outros organismos [1].

Em 1875, o físico John Tryndall observou que a penicilina inibia o crescimento bacteriano limitando-se a expressar, de uma forma poética, que o “o *Penicillium* é particularmente belo”. Ernest Duchesne, 1897, publicou um ensaio sobre o efeito do *Penicillium glaucum* sobre as bactérias [2].

Contudo, a história da penicilina começa quando o primeiro antibiótico, a penicilina foi descoberta por Alexander Fleming em 1929, em um hospital londrino. Ele observou a inibição do crescimento em placa de uma cultura de *estafilococos* por um fungo, mais tarde identificado como *penicillium notatum*. Posteriormente, com advento da Segunda Guerra Mundial, foi imperativo que se estudasse e pesquisasse mais a quimioterapia moderna, pois com a guerra eram inevitáveis os ferimentos e, com eles, as infecções. A penicilina foi então extensamente utilizada contra *estafilococos* e *estreptococos*, grandes causadores de pneumonias, infecções aéreas superiores, espticemias, etc. O novo fármaco tinha grande capacidade de dizimar essas infecções e, ainda atuava de acordo com os princípios da quimioterapia moderna, ou seja, com toxicidade seletiva [3].

Após descobrir a penicilina, Fleming foi também o primeiro a observar a resistência natural de microorganismos aos antibióticos, descrevendo que bactérias do grupo coli-tifóide não eram inibidas pela penicilina. A causa dessa resistência foi descoberta por Abraham e Chain, que demonstraram em culturas de *Escherichia coli* uma enzima capaz de bloquear a ação da penicilina, denominada penicilinase pelos pesquisadores. Na década de 1940, a grande maioria dos *Staphylococcus aureus* era sensível à penicilina. No fim dos anos 50, a espécie *Staphylococcus aureus* tinha adquirido resistência a praticamente todos os antibióticos de uso parenteral, incluindo a eritromicina e a tetraciclina. A introdução das penicilinas resistentes a penicilinas, na década de 1960, possibilitou um avanço na terapêutica antiestafilocócica. Com o uso das penicilinas semi-sintéticas, como a meticilina empregada no tratamento de infecções estafilocócicas, surgiram cepas resistentes à meticilina denominadas MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), cujo padrão de resistência se estende a outros antibióticos β -lactâmicos. Em 1997, foram descobertas amostras de *S. aureus*

resistentes aos glicopeptídeos denominadas VRSA (Vancomycin Resistant *Staphylococcus aureus*) [4].

A resistência bacteriana tem emergido como um problema mundialmente importante, fazendo com que muitas classes de antimicrobianos tenham se tornado menos efetiva nos últimos anos. Muitas vezes, parte da emergência de resistência está relacionada ao uso intensivo ou inadequado desses compostos, ocasionando a seleção de patógenos resistentes. Pacientes infectados por bactérias resistentes necessitam de maior tempo de hospitalização, apresentam risco de mortalidade e utilizam antimicrobianos mais potentes, que normalmente são mais caros e/ou mais tóxicos. Esses fatores têm motivado a busca por drogas cada vez mais potentes e estáveis aos mecanismos de resistências bacterianos. Muitas vezes, modificações estruturais são realizadas nas moléculas de antimicrobianos já utilizados na prática clínica para que esse objetivo seja alcançado [5].

Há um consenso geral entre os pesquisadores de que a ampla utilização de agentes antimicrobianos impôs uma forte pressão seletiva que contribuiu para o surgimento de microorganismos multirresistentes.

II.2 Cefalosporinas

A descoberta das cefalosporinas teve início durante a Segunda Guerra Mundial, quando o Professor Giuseppe Brotzu, da Universidade de Cagliari, Itália, desenvolvia uma pesquisa à procura de fungos que, à semelhança do *Penicillium notatum* (fungo do qual originou-se a penicilina), fossem dotados da capacidade de produzir substâncias antibacterianas. Em 1945, após experimentar centenas de microrganismos, Brotzu isolou no mar da Sardenha, próximo a desembocadura de um cano de esgoto, um fungo identificado depois como o *Cephalosporium acremonium* [6]. Em 1946, após a publicação dos seus resultados na Revista Lavori Dell Istituto Di igieni di Cagliari, Brotzu enviou o fungo ao Laboratório de Patologia da Universidade de Oxford. Ali Edward Abraham, que havia estudado a penicilina, estudou e conseguiu produzir os antibióticos hoje chamados de cefalosporinas, cujos derivados ainda são de grande importância no combate a bactérias resistentes às penicilinas [7].

Neste contexto outra classe de antibióticos estruturalmente relacionados à família das penicilinas surge, as cefalosporinas, indicadas para pacientes alérgicos a penicilinas [8]. As penicilinas e cefalosporinas (β -lactâmicos) afetam a síntese dos componentes do ptideoglicano inibindo uma etapa particular, em que ligações cruzadas são formadas entre as

cadeias de peptídeo glicano, este fato permite uma falha na sustentabilidade da parede celular. Os β -lactâmicos agem ligando-se às proteínas carreadoras de penicilina na parede celular bacteriana. A resistência a estes agentes geralmente envolve processos que interferem na atuação destas proteínas [9].

As cefalosporinas são divididas em quatro grupos ou gerações [10]:

- Primeira geração: cefalexina, cefalotina, cefalozina, cefapirina, cefradina e cefadroxil. Possuem boa atividade contra aeróbios Gram-positivos e Gram-negativos adquiridos na comunidade, como *Escherichia Colli* e *Proteus*, exceto contra *Haemophilus influenzae*. Atividade moderada contra demais Gram-negativos;
- Segunda geração: cefaclor, cefoxitina, cefuroxima, cefonicida, ceforanida, cefamandole, ceforanide, cefprozil e cefmetazole. Tem um espectro de ação semelhante às de primeira geração contra Gram-positivos de uma atividade maior contra alguns Gram-negativos, como *Escherichia coli*, *k. pneumoniae* e *Proteus mirabilis*;
- Terceira geração: cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, ceftizoxima, ceftiofur, cefoperazona, cefsulodina, cefmenoxima, cefixima, cefpodoxima e ceftibutem. São menos ativas contra as de primeira geração contra Gram-positivos, mas são muito ativas contra a maioria das bactérias Gram-negativas (exceto *Enterococos* e *Citrobacter*) e pouca atividade sobre aeróbios. A cefoperazona e a ceftazidima possuem atividade antipseudomonas;
- Quarta geração: cefepima e cefpiroma. Possuem atividade contra cocos Gram-positiva maior do que as cefalosporinas de terceira geração, e maior ação contra enterobactérias e pseudomonas aeruginosa.

II.3 Aspectos gerais sobre cefalosporinas

São antibióticos de amplo espectro antibacteriano e de extrema importância na farmacologia humana. São amplamente utilizadas no tratamento de doenças humanas e veterinárias [11]. Nos hospitais brasileiros são utilizadas em cerca de 70% das infecções chegando ao número de 92% em outros países [12]. São consideradas eficazes em septicemias de causa desconhecida e profilaxia cirúrgica e, também, indicadas em pacientes imunodeprimidos, sendo recomendadas em todas as idades [13]. As cefalosporinas que são utilizadas para fins terapêuticos são produtos semi-sintéticos [14]. Estes compostos são caracterizados por uma estrutura contendo um núcleo constituído por um anel de quatro membros, β -lactâmico, fundido com um anel dihidrotiazínico, como mostra a Figura 1.

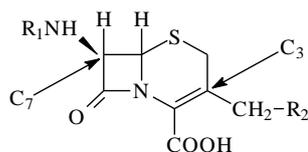


Figura 1 - Estrutura básica de cefalosporinas

Por meio da introdução de diferentes substituintes nos carbonos 7 e 3, é possível desenvolver um grande número de cefalosporinas com diferentes características, tais como: solubilidade, atividade e intensidade de ação antibacteriana [15].

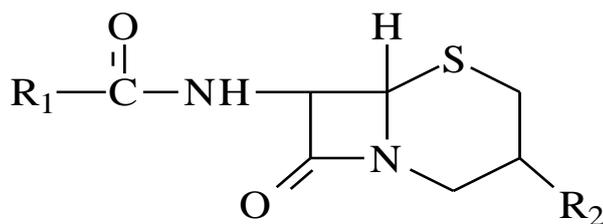
Atualmente existem duas novas classes de antibióticos β -lactâmicos, α -carbapenem e β -cefapenem [1].

- Carbapenem contém um grupamento metileno substituindo o átomo de enxofre no quinto anel tiazolidínico da penicilina. O primeiro membro desta classe é o imipenem, produzido por *Streptomyces cattleya*, um análogo da tienamicina. A ação é a mesma descrita para os antibióticos β -lactâmicos.

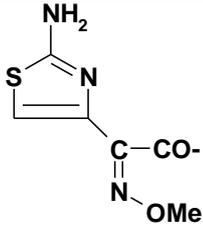
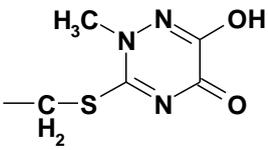
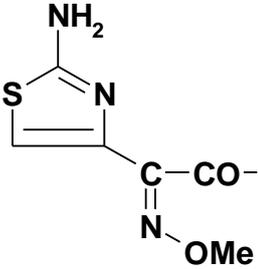
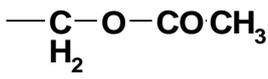
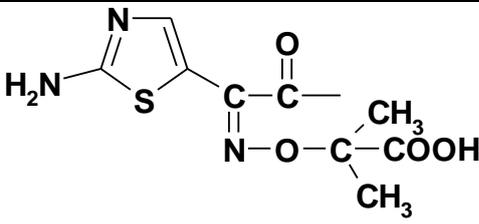
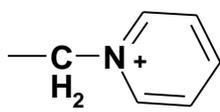
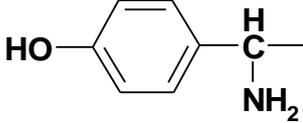
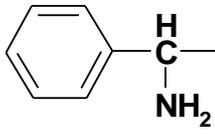
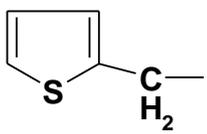
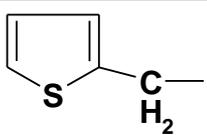
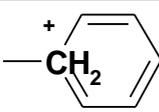
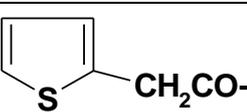
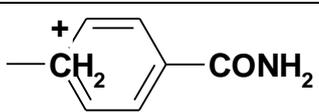
- Carbacefem contém um grupo metileno no lugar do enxofre no sexto membro do anel dihidrotiazínico da cefalosporina. O representante desta classe é o loracarbef. O loracarbef é o primeiro antibiótico β -lactâmico semi-sintético da classe carbacetem. É um análogo do cefaclor, cuja ação é a mesma descrita para os antibióticos β -lactâmicos.

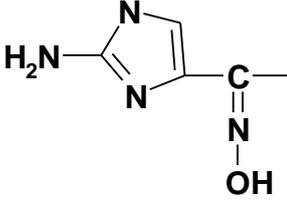
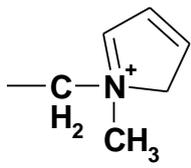
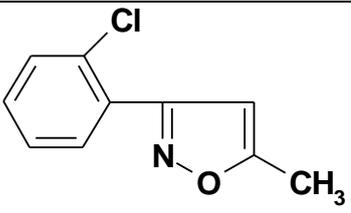
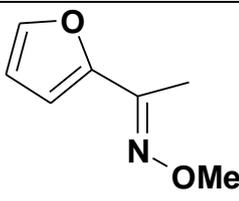
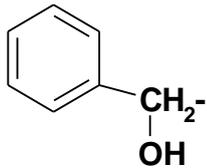
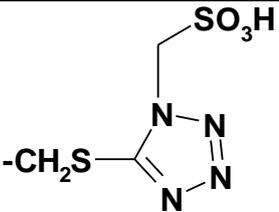
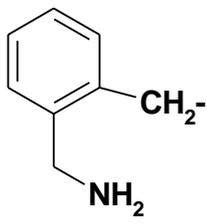
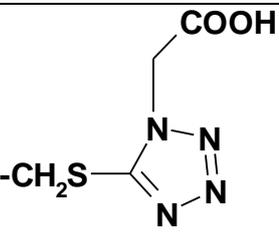
A Tabela 1 exhibe a estrutura química de algumas cefalosporinas de importância clínica, que serão descritas na revisão bibliográfica.

Tabela 1 - Estrutura química de algumas cefalosporinas já estudadas [16-18]



Anel cefema

Antibiótico	R1	R2
Ceftriaxona		
Cefotaxima		
Ceftazidima		
Cefadroxila		-CH ₃
Cefalor		-Cl
Cefalotina		-CH ₂ OCOCH ₃
Cefaloritina		
Cefalonium		

Cefepima		
Cafalosprina C	$\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COO}^-$	$\text{CH}_2\text{—O—COCH}_3$
Cefoxazole		$\text{—CH}_2\text{OCOCH}_3$
7-ADCA	<i>H</i> -	—CH_3
Cefuroxime		$\text{—CH}_2\text{OCONH}_2$
Cefonicida		
Ceforanida		

I.4 Ceftiofur

I.4.1 Características gerais

Ceftiofur é um antibiótico β -lactâmico de amplo espectro de uso veterinário da terceira geração da família das cefalosporinas, aprovado para utilização no tratamento de infecções em bovinos, suínos, aves e cães [19], cuja estrutura química é apresentada na

Figura 2. É ativo contra bactérias Gram-positivos e Gram-negativos, tais como: *Pasteurella multocida*, *haemophilus sommus* e *Escherichia Coli*, inclusive cepas produtoras de β -lactamase. *In vivo* e *in vitro* é mais eficaz que a ampicilina e as cefalosporinas precedentes [20]. Ceftiofur é pobremente absorvido após a administração oral e rapidamente absorvido após a administração intramuscular.

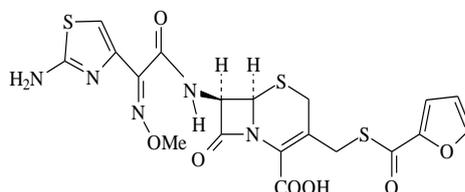


Figura 2 - Estrutura do ceftiofur

Assim como outras cefalosporinas, o ceftiofur inibe a síntese da parede celular em bactérias, mas a sua atividade de largo espectro, em parte, é atribuída à sua resistência ao ataque por β -lactamases bacterianas devido à presença da cadeia lateral contendo o grupo metoxi-imino [21].

Em todas as espécies, o ceftiofur é rapidamente metabolizado a desfuroilceftiofur (inicialmente) e ácido furóico [22]. A máxima concentração ceftiofur/metabólitos encontrada em sangue equino esteve no intervalo de 0,5 a 2 horas, após a sua administração. Quando administrado mais de 95% da dose foi excretada dentro de 24 horas; 60-80% na urina e o restante nas fezes. A maior parte do material excretado foi o desfuroilceftiofur e pequenas quantidades de ceftiofur não-metabolizado [23].

Na Comunidade Econômica Européia, foi incluído no Anexo I do Regulamento 2377/90 com um Limite Máximo de Resíduos estabelecido (LMR) em $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ no leite. No Brasil, utilizaram-se o LMR de medicamentos veterinários harmonizados no Mercosul pela Resolução GMC n°. 54/2000 ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$). Para aqueles medicamentos veterinários cujos valores de LMR não estão estabelecidos no Mercosul, utilizaram-se os valores preconizados pelo *Codex Alimentarius* e na ausência destes, aqueles estabelecidos pela União Européia.

Deste modo, após levantamento bibliográfico, optou-se inicialmente pela escolha do antibiótico ceftiofur, em razão de ser um membro de uma classe de antibióticos de grande importância clínica na medicina veterinária, sendo amplamente utilizado e terapêuticamente importante.

II.4.2 Toxicidade

Não é genotóxico, cancerígeno, teratogênico nem embriotóxico. Em estudos realizados em camundongos apresentou DL_{50} (dose letal mediana) para as vias IV (intravenosa) e IM (intra-muscular) de 2000 mg kg^{-1} e 3400 mg kg^{-1} , respectivamente [24]. Apesar da baixa toxicidade, alguns relatos indicam uma tendência a distúrbios hemorrágicos em neonatos submetidos a altas dosagens de agentes β -lactâmicos [25].

No entanto, foi observado que o ceftiofur pode produzir aberrações cromossômicas (principalmente cromátides e isocromátides com quebra e troca de fragmentos de cromossomos com pouca evidência de rearranjo) após 44h de exposição de culturas de células de hamster chinês e na ausência de ativação metabólica S9, nenhuma evidência de atividade clastogênica foi observada também na presença de ativação metabólica S9. A causa principal do clastogênese observado é o efeito citostático do antibiótico e não está relacionada com a penetração do fármaco em células ou a qualquer mutagenicidade direta (ou indireta) da droga em si. O ceftiofur não é um agente clastogênico *in vivo*, embora seja capaz de atingir as células alvo adequadamente na medula óssea. Assim, a descoberta inicial da quebra positiva de cromossomos *in vitro* não tem significado biológico e não há motivo de preocupação para mutagenicidade do ceftiofur [26].

I.5 Leite bovino

O leite bovino é um fluído composto por uma série de nutrientes sintetizados na glândula mamária, a partir de precursores derivados da alimentação e do metabolismo [27]. É um excelente alimento pelo seu valor nutritivo, constituído quimicamente de 87% de água, 3,8% de gordura, 3,5% de proteínas, 4,9% de lactose e 0,8% de sais, também apresenta pigmentos de riboflavina e caroteno, enzimas como lactoperoxidase, lipase, catalase, fosfatase e redutase; e vitaminas lipossolúveis e hidrossolúveis [28]. Do ponto de vista da saúde pública, ocupa lugar de destaque na nutrição humana, pois constitui-se de um alimento essencial para todas as idades, principalmente recém-nascidos, o mesmo se aplica para todos os derivados lácticos.

Tanto no leite humano como no leite bovino estão presentes todas as vitaminas conhecidas. As vitaminas A, D, E e K estão associadas aos glóbulos de gordura e as demais ocorrem na fase aquosa do leite. A concentração das vitaminas lipossolúveis depende da alimentação do gado, exceto a da vitamina K. Esta, como as vitaminas hidrossolúveis, é

sintetizada no sistema digestivo dos ruminantes [29]. Estudos sobre os hidrolisados protéicos obtidos a partir do soro de leite bovino mostram que estes, contendo peptídeos de pequeno tamanho, como os dipeptídeos e os tripeptídeos, são absorvidos em maior velocidade ao nível do lúmen intestinal e em órgãos periféricos, em relação aos aminoácidos livres e às proteínas intactas do soro. Desta forma, são mais eficientes em suas atividades fisiológicas [30]. A relação entre a caseína e as proteínas do soro é bastante variável entre as espécies de mamífero. Esta relação é de 80,0 : 20,0 (%) no leite bovino, de 20,0 : 80,0 (%) no leite humano, 80,0 : 20,0 (%) no leite de búfala e 82,2 : 15,8 (%) no de cabra. Observa-se que no leite humano a proporção de proteínas de soro é quatro vezes a das caseínas, comparadas com as do leite de vaca e de búfala. O leite bovino possui teor de gordura semelhante ao do leite humano e esta também apresenta uma boa assimilação por parte do organismo, representando um importante componente nutricional [31].

Segundo a Instrução Normativa N°. 51 [32], que aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e seu transporte a granel, o leite é classificado em tipos A, B e C, considerando as condições das instalações, saúde animal, ordenha, transporte e beneficiamento.

A qualidade do leite como alimento e matéria-prima para a indústria de laticínios dependem de sua composição bromatológica. Neste sentido, a composição do leite bovino varia de acordo com vários fatores – rebanho, região, ano, mês, período de conservação da amostra e escore de células somáticas [33].

Vários são os métodos disponíveis para as indústrias de alimentos que possibilitam o aumento do seu tempo de conservação. A maioria deles, como por exemplo, refrigeração, congelamento, desidratação, fermentação e adição de conservantes, agem prevenindo ou inibindo o crescimento dos microrganismos. Outros, por outro lado, agem inativando os microrganismos. Entre estes últimos, podem ser citadas a pasteurização, a esterilização e a irradiação. Na irradiação, o processo mais versátil é o que aplica a radiação ionizante. Esse processo faz com que o tempo de conservação do produto seja aumentado [34].

A utilização de tratamento térmico na garantia da qualidade dos alimentos tem ocupado um espaço relevante na evolução da tecnologia alimentar. Dentro deste segmento o leite UAT (ultra alta temperatura) tornou-se um produto de destaque pela facilidade de comercialização e consumo, fatores estes atribuídos à sua tecnologia. As empresas produtoras de leite UAT conseguiram expressivas taxas de crescimento de vendas no período de 1991 a

2000. A participação do leite UAT no mercado de leite fluido subiu de 4,4% em 1990 para 68,8% em 2000 e, em 2005, já representava 74% do leite fluido consumido no Brasil [35].

As combinações das tecnologias de ultrapasteurização de envase asséptico em embalagens longa vida e da retirada do ar no momento do fechamento da embalagem, garantem ao leite UAT a preservação de suas propriedades organolépticas e nutritivas, sem necessidade de conservantes e de refrigeração. O termo “esterilização comercial” indica que o alimento é microbiologicamente estável, visto que os microrganismos que sobreviveram à esterilização são espécies termófilas e só tem capacidade de se desenvolverem em temperaturas superiores a 45 °C e, portanto, não são capazes de se multiplicar nas condições normais de armazenamento do leite [36].

Contudo, por não serem técnicas tão eficientes ou até mesmo pela falta de cuidados pós-tratamento, surtos de intoxicações de origem alimentar são problemas freqüentes em todo o mundo. Já que a pasteurização, fervura e esterilização do leite não destroem os resíduos destas drogas de uso veterinário, constituindo risco para o consumidor e problema para a indústria. Por exemplo, para eliminar a penicilina do leite é necessário atingir 100 °C, durante três horas, ocorrendo o mesmo com a tetraciclina [37].

I.5.1 Produção de leite bovino

Além de sua importância nutricional, o leite pode ser considerado um dos produtos mais importantes na produção agropecuária nacional, pois representa uma parte significativa na geração de renda e empregos no meio rural. No Estado de Mato Grosso do Sul a produção de leite tem se tornado ao longo dos anos uma atividade de destaque na economia local.

O Brasil é o sexto maior produtor de leite do mundo (Tabela 2). Entretanto, os sistemas de produção praticados em todo o território nacional apresentam grande variabilidade. No Brasil, o volume médio por propriedade passou de 28 litros/dia para 52 litros/dia, que resulta em um crescimento de 85,2%. Apesar do alto crescimento, a produção por propriedade ainda é muito baixa em relação a alguns países. Nos Estados Unidos, por exemplo, a média supera a dois mil litros/dia. Na Nova Zelândia e Austrália, a média diária é próxima de três mil litros por fazenda. No Brasil, o mais comum são sistemas de produção extensivos ou semi-extensivos, com animais de baixa produção e pouca suplementação volumosa no período da seca [38]. O leite está entre os seis produtos mais importantes, à frente até de *commodities* tradicionais como o café e o suco de laranja. Em 2003, o valor bruto da produção agropecuária fechou em 99 bilhões de reais, sendo que o leite bovino

contribuiu com 9,7 bilhões de reais. Vale salientar, ainda, que de cada dez reais produzidos na agropecuária, um real é oriundo do leite e que, entre os produtos pecuários, somente a carne bovina e a carne de frango estão à frente do leite bovino [39].

Tabela 2 - Classificação mundial dos principais países produtores de leite bovino em 2010

	Países	Volume produzido (toneladas)	% do total
1°	Estados Unidos da América	87.461.300	14,6
2°	Índia	50.300.000	8,4
3°	China	36.022.650	6,0
4°	Rússia	31.895.100	5,3
5°	Brasil	31.667.600	5,3
6°	Alemanha	29.628.900	4,9
7°	França	23.301.200	3,9
8°	Nova Zelândia	17.010.500	2,8
9°	Reino Unido	13.960.000	2,3
10°	Turquia	12.480.100	2,1

Fonte: FAO/Faostat

Elaboração: Embrapa Gado de Leite

Atualização: fevereiro/2012

Em dezembro de 2007, o comércio do setor lácteo brasileiro apresentou rendimento de US\$ 35,9 milhões. Durante esse ano, as exportações somaram US\$ 298,8 milhões, equivalentes a 103,5 mil toneladas de leite. As importações totalizaram US\$ 151,5 milhões, que equivalem a uma quantidade importada de 64,2 mil toneladas [40]

I.5.2 Características da contaminação do leite por antibióticos

O uso de aditivos químicos em alimentos é prática muito antiga, tendo surgido da necessidade de se conservar as propriedades físicas e organolépticas destes, preservando-os para o consumo humano. Atualmente, na maior parte dos alimentos industrializados há emprego de aditivos, com a finalidade de mantê-los íntegros. O aditivo incidental sendo aquele que aparece em decorrência do tratamento preliminar do alimento merece cuidado especial [41]. Nas últimas décadas, o interesse por alimentos puros vem crescendo, impulsionando o mercado a apontar soluções para os atuais problemas de saúde causados pelo alto consumo de alimentos contaminados por metais pesados, agrotóxicos, antibióticos e hormônios [42].

A presença de resíduos de antibióticos no leite, com destaque os β -lactâmicos, é consequência direta de tratamentos terapêuticos aplicados no animal em fase de lactação, principalmente no combate às doenças infecciosas da glândula mamária [43], tal como a mastite.

A mastite é a inflamação do parênquima da glândula mamária independente da causa, caracterizando-se por uma série de alterações físicas e químicas do leite bem como modificações patológicas no tecido glandular. As alterações mais importantes, observadas no leite, é a descoloração, o aparecimento de coágulos e a presença de grande número de leucócitos. A glândula mamária apresenta aumento de volume, elevação da temperatura, e endurecimento em muitos casos clínicos. Contudo, uma grande proporção de glândulas acometidas não é facilmente identificada pela palpação manual ou no exame visual do leite empregando a caneca telada ou o caneco de fundo preto [44]. A mastite é causada frequentemente por *Staphylococcus aureus*. Por ser uma doença altamente prejudicial aos rebanhos leiteiros, muitos estudos sobre essa doença são feitos, e programas de manejo tentam melhorar a saúde da glândula mamária. Esse microrganismo tem sido isolado com frequência em quartos mamários investigados [45]. Relevantes ainda são aqueles microorganismos de origem ambiental como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes*, entre outros [46]. Perante este cenário, as bactérias, conhecidas pela sua plasticidade, foram capazes de desenvolver uma série de mecanismos que permitiram torná-las resistentes aos antibióticos. Apesar de medidas preventivas evitarem a transmissão do patógeno de um animal a outro e reduzirem a incidência da doença, as infecções originadas de outras fontes como a ordenhadeira, o ar, a pele do animal e humanos, contribuem para a manutenção da doença no rebanho [48].

A interferência da mastite sobre a qualidade do leite deve-se, principalmente, à redução dos teores de lactose, gordura e caseína. Há ainda correlação entre alta CCS (Contagem de Células Somáticas) e características físicas como: viscosidade, valores de pH, ponto de congelamento e capacidade tamponante. O tempo de coagulação é retardado, quando há aumento do número de CCS, levando a diferenças essenciais na fase primária de coagulação. Mudança do teor de proteína, rendimento do queijo e conteúdos sólidos são também observados; isto não pode ser corrigido, nem mesmo pela pasteurização ou centrifugação. O leite com alta CCS apresenta diferentes propriedades organolépticas, pois o teor de cloretos é aumentado e o teor de lactose é reduzido, proporcionando ao leite uma vida de prateleira mais curta e sabor rançoso, pela presença de ácidos graxos livres [49].

A mastite bovina é o fator que mais provoca perdas econômicas da cadeia produtiva do leite [50]. Um quarto infectado no úbere pode reduzir a produção de leite de 10% a 12% na mesma lactação. Se a infecção ocorrer no período seco, a perda pode chegar a 40% no potencial do quarto na lactação seguinte [51].

Existem duas definições usadas para classificar a mastite que são: mastite clínica e subclínica e essas definições permitem diferenciar o processo inflamatório. A mastite clínica caracteriza-se por modificações visíveis no leite como a presença de grumos, fibrina ou secreção purulenta no mesmo e muitas vezes alterações na glândula mamária como aumento de volume, presença de dor, aumento de temperatura e rubor.

Já a mastite subclínica não apresenta sinais clínicos evidentes, o leite apresenta aspecto macroscópico normal e não há sinais visíveis de inflamação do úbere, podendo ser detectada somente por provas indiretas com o leite, como o Califórnia Mastitis Test (CMT). A realização do CMT consiste na comparação do escore de viscosidade da mistura (leite + reagente próprio) e a intensidade do processo inflamatório na glândula mamária [52].

A diminuição da duração das infecções intramamárias constitui-se em importante objetivo dos programas de controle de mastites, meta que pode ser alcançada com a antibióticoterapia realizada durante a lactação [53].

Contudo, a antibióticoterapia massiva provoca a presença intensa de resíduos de antibióticos no leite, acarretando sérias dificuldades especialmente tecnológicas. O principal problema para a indústria é a inibição de culturas lácteas sensíveis, utilizadas na fabricação de queijos, iogurtes e outros produtos fermentados, dificultando a obtenção destes produtos ou alterando sua qualidade. Daí a preocupação de pesquisar novas técnicas para identificar estes resíduos no leite, para que a indústria laticinista possa rapidamente, classificar ou selecionar, e assim dispor de matéria prima isenta de inibidores resultando num produto final de qualidade [54].

O consumo de leite contendo resíduos de antibióticos também põe em risco a saúde da população, podendo desencadear fenômenos alérgicos em indivíduos sensíveis [55-57], efeitos tóxicos e carcinogênicos, alterações no equilíbrio da flora intestinal e seleção de bactérias resistentes no trato digestivo dos consumidores [58].

Os antibióticos podem ser encontrados no leite por introdução voluntária fraudulenta, para prolongar a durabilidade do leite, ou por via indireta oriunda do tratamento terapêutico de vacas em lactação e a utilização do leite destes animais para consumo humano antes do término do período de carência, necessário após a última aplicação do antibiótico. Este fato revela um manejo inadequado da antibióticoterapia em vacas em lactação e a má qualidade

higiênico-sanitária do leite comercializado [59]. Na prática agrícola moderna, drogas veterinárias estão sendo usadas em larga escala e administrados como aditivos alimentares ou através da água potável a fim de evitar o surto de doenças [60].

A autenticidade dos alimentos tornou-se um problema global. É cada vez mais importante detectar a introdução no mercado de produtos fraudulentamente rotulados e de produtos de qualidade inferior, quer por razões econômicas, quer por razões de saúde pública [61].

De acordo com literatura várias pesquisas visando à determinação de resíduos de antibióticos no leite já foram realizadas, podendo-se citar algumas.

Biacchi *et al.* [62] avaliaram 100 amostras de leite, cru e pasteurizado, tipos B e C na região do Vale do Paraíba, São Paulo, para a presença de resíduos de antibióticos. Culturas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foram semeadas em ágar Muller Hinton e a seguir discos embebidos com as amostras de leite foram aplicadas na superfície e incubadas a 35 °C por 24 horas. Verificaram que 100% das amostras de leite cru utilizadas para o processamento de leite tipo B apresentaram resíduos de antibióticos efetivos para *S. aureus* e *E. coli* e nas amostras após processamento de leite C, 80% apresentaram antibióticos que inibiram crescimento de *S. aureus*, porém não apresentaram efeitos contra *E. coli*. A pasteurização destruiu estes resíduos de antibióticos.

Morais *et al.* [63] pesquisaram a incidência de resíduos de antibióticos no leite bovino pasteurizado comercializado na cidade do Rio de Janeiro, com objetivo de propor a criação de um programa de monitoramento à Vigilância Sanitária Municipal, com base nesses dados. Durante o período de abril a agosto de 2006 foram analisadas 57 amostras de leite através de ensaios imunoenzimáticos, na forma de kits, para análise qualitativa dos β -lactâmicos, tetraciclinas e estreptomicina/diidroestreptomicina. Das 57 amostras analisadas de leite pasteurizado dos tipos B e C, 25 indicaram presença de tetraciclinas (44%), 2 de β -lactâmicos (3,5%), 4 de estreptomicina/diidroestreptomicina (7%) e 6 de tetraciclinas e β -lactâmicos (10,5%). Os resultados evidenciaram que os antimicrobianos continuam sendo utilizados de forma inadequada no tratamento do gado leiteiro.

Ainda segundo Fonseca *et al.* [64] através de um estudo preliminar para verificar a presença de resíduos de antibióticos em leite UAT, disponíveis no mercado brasileiro, utilizando o método rápido do iogurte, determinaram que das 100 (100%) amostras analisadas, 96 (96%) indicaram negativas, sugerindo ausência de resíduos de antibióticos, enquanto 4 (4%) mostraram-se positivas. Os resultados sugeriram a necessidade de contínuo

monitoramento deste parâmetro por parte da Vigilância Sanitária com a finalidade de oferecer um produto seguro, sem riscos para saúde do consumidor.

Com o objetivo de investigar a incidência de resíduos de antibióticos no leite, Borges *et al.* [65], realizaram um estudo em 533 amostras de leite pasteurizado padronizado em Goiás, no período de junho de 1997 a agosto de 1998. O método foi baseado na difusão de resíduos de antibióticos em ágar, tendo o *Bacillus subtilis* e o *Bacillus stearothermophilus* como microrganismos-testes. Os resíduos foram encontrados em 9,95% das amostras, 32,65% das 98 marcas comerciais mostraram-se positivas. Os resultados indicaram que, os procedimentos sanitários padronizados, recomendados pelo Serviço de Inspeção Federal, não foram seguidos.

Sousa *et al.* [66] investigaram a ocorrência qualitativa de resíduos de antibióticos em trinta amostras de leites pasteurizados tipo “C”, provenientes de trinta municípios do Estado do Ceará. Os resultados revelaram a presença de resíduos de antibióticos em vinte e três (76,67%) amostras de leite. O trabalho reforçou a necessidade de implementação de programas de monitoramento e controle eficiente de resíduos de antibióticos no leite.

Já Porto *et al.* [67] analisaram de abril de 1998 a março de 1999, 10.464 amostras de leite cru produzido na região sudeste do Rio Grande do Sul, recolhido através de coleta a granel em caminhões com dois ou três tanques isotérmicos e entregues em uma indústria de laticínios. As amostras dos tanques de cada caminhão foram homogeneizadas, de forma que cada amostra analisada correspondesse à carga de um caminhão, com média de 4.635 litros de leite. As amostras foram analisadas pelo Serviço de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura, da Pecuária e do Abastecimento, através do teste Snap (Idexx Laboratories) para detecção de resíduos de antibióticos β -lactâmicos. Do total de amostras analisadas, 121 (1,16%) apresentaram resultados positivos para resíduos de antibióticos β -lactâmicos. Foi demonstrada a ocorrência de resíduos de antibióticos β -lactâmicos no leite entregue às indústrias, indicando também a necessidade da realização permanente de testes em amostras de leite cru.

Nesta conjuntura, e considerando a necessidade de avaliar continuamente os níveis de resíduos de medicamentos veterinários, evitando possíveis danos à saúde da população, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA/MS), criou em 2002 o Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal – PAMvet, cujo objetivo é avaliar o potencial de exposição do consumidor a resíduos de medicamentos veterinários pela ingestão de alimentos de origem animal adquiridos no comércio. Este programa complementa as ações já desenvolvidas pelo Ministério da

Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) no âmbito da produção primária, pois possibilita avaliação do alimento tal como é apresentado ao consumidor.

I.6 Análises de compostos de interesse farmacêutico através de técnicas voltamétricas

A aplicação de métodos eletroanalíticos na análise de compostos farmacêuticos é conhecida desde 1925, quando se utilizava a polarografia de corrente contínua no desenvolvimento de metodologias de análise de produtos farmacêuticos. Os métodos permitem o monitoramento de drogas em diferentes estágios de produção, preparação, formulação e determinação de resíduos e metabólitos em matrizes biológicas. Essencialmente, a maioria dos compostos farmacêuticos podem ser investigados eletroquimicamente de forma direta através da redução ou oxidação de grupos funcionais ou insaturações da molécula, ou indiretamente através da conversão da sua estrutura molecular por reações químicas específicas de derivatização (condensação, adição e oxidações químicas) que promovem a geração de uma espécie eletroquimicamente ativa [68].

Entretanto, o grande avanço nesta área surgiu em 1980 com a aplicação de técnicas voltamétricas que utilizam procedimentos de acumulação/redissolução, a qual pode ser vista como uma efetiva extração eletroquímica, tal que o analito é pré-concentrado em níveis mais elevados do que aqueles existentes em solução. Esta etapa é acoplada a um sistema de detecção baseado na imposição de um sinal na forma de pulso diferencial, onda quadrada, onda senoidal ou varredura-linear, sendo utilizada amplamente em sistemas analíticos que requerem grande sensibilidade [69].

Portanto, aplicação analítica dos métodos voltamétricos no campo farmacêutico geralmente estende-se em vários níveis. Compreende a quantificação dos compostos relevantes na produção da droga como análise de precursores, produtos de reações paralelas e intermediários que podem ter efeitos farmacológicos indesejáveis. No estudo de degradação, é de grande importância o desenvolvimento de um método que seja seletivo, rápido e eficiente, capaz de detectar e quantificar os produtos potenciais da sua degradação com o tempo, luz, oxigênio, água e catálises diversas. Na determinação da droga em fluídos biológicos a grande vantagem da técnica voltamétrica tem sido a pequena influência de excipientes e corantes, presentes nas amostras.

Por fim, a aplicação de técnicas voltamétricas tem também propiciado a avaliação de resíduos não-absorvidos ou metabólitos em fluídos biológicos, o que normalmente exige etapas de pré-tratamento da amostra [70].

Neste contexto, os métodos analíticos exigem sensibilidade cada vez maior. O valor da instrumentação eletroquímica é usualmente uma pequena fração da instrumentação utilizada para a cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia gasosa e absorção atômica. Os reagentes químicos utilizados nas eletroanálises não são caros e, comumente, não são necessários solventes de alta pureza. Estes fatos são de particular importância em países em desenvolvimento como o Brasil. Métodos eletroanalíticos também permitem a sua utilização em pesquisas básicas ou avançadas, bem como na rotina de laboratórios.

Deste modo, foi nosso interesse investigar o desenvolvimento de metodologias analíticas para a determinação de antibióticos da família dos β -lactâmicos através de técnicas voltamétricas.

II.7 Métodos químicos

Embora mais rápidos que os ensaios microbiológicos, apresentam baixa especificidade.

Método iodométrico – O método compreende a titulação com o tiosulfato de sódio o excesso de iodo resultante da reação do iodo com o produto de degradação alcalina de antibióticos β -lactâmicos, o ácido penicilóico ou ácido cefalosporâmico. Primeiro publicado por Alicino *et al.* [71], e modificado para compostos semi-sintéticos em 1961, constitui método padrão da Pharmacopéia Britânica para a determinação da cefalexina, cefradine, cefalotina, cefaloridine e penicilina G.

Método da hidroxilamina – Ensaio colorimétrico no qual o anel β -lactâmico reage rapidamente com a hidroxilamina para dar o ácido hidroxâmico, que forma um complexo cor púrpura com íons ferro.

Métodos colorimétrico com ninhidrina e determinação colorimétrica de β -lactâmicos com solução de mercúrio II. Um método específico para a molécula intacta de penicilinas e cefalosporinas e) e baseia-se em medidas espectroscópicas com imidazol [72]. A molécula intacta reage com imidazol e cloreto de mercúrio (III) para formar o ácido cefalosporâmico, respectivamente. Este método permite determinações de cefalosporinas na ordem de 0,5 mg L⁻¹.

I.8 Ensaio microbiológico

Testes microbianos tradicionais de inibição para antibióticos em leite envolvem a incubação de um organismo susceptível na presença da amostra de leite. Quando não há presença de antibiótico, o organismo cresce e pode ser detectado visualmente quer por opacidade do meio de crescimento em ágar ou por uma mudança de cor devido à produção de ácido. Na presença de um antibiótico, ou qualquer outro inibidor, o organismo “falha” ao crescer e uma zona de inibição com ausência ou mudança de cor é observada [73].

Este método, o qual inclui ensaios fotométricos e em placa, fornece resultados quantitativos. Considerado método padrão pela Farmacopéia Britânica, é usado para a determinação de β -lactâmicos em leite bovino. O ensaio microbiológico é muito sensível, exibindo limites de detecção da ordem de 30 mg L^{-1} , entretanto apresenta baixa seletividade e elevado tempo de análise (12-16 horas).

I.9 Métodos cromatográficos para a determinação de cefalosporinas

Muitos métodos de determinação de cefalosporinas na forma pura, e formulações farmacêuticas ou em amostras biológicas são encontrados na literatura. A maioria é baseada na cromatográfica líquida de alta eficiência (CLAE). Esta técnica é intensivamente aplicada na determinação destas drogas em amostras biológicas [74] e em menor frequência em formulações farmacêuticas [75].

Outros métodos aplicados, suas vantagens e desvantagens são discutidos abaixo:

Técnicas cromatográficas têm servido como ferramenta indispensável para compreensão da química dos β -lactâmicos.

Cromatografia de partição em papel e cromatografia de camada delgada (TLC) tem sido largamente utilizada devido à sua melhor capacidade de separação física comparada com as mais modernas técnicas tais como cromatografia líquido-gás ou CLAE. O elevado tempo necessário para esta separação limita o uso destas técnicas para a análise de rotina.

Eletroforese de papel tem seu uso limitado em virtude da insignificante diferenciação de carga entre estas drogas, produtos de degradação e impurezas, produzindo dificuldades de detecção bioautográfica.

Em virtude de sua baixa volatilidade e elevada termoestabilidade, o emprego da técnica de cromatográfica líquido-gás (GLC) é limitado. Em recentes trabalhos encontrados na literatura têm sido indicado o uso da CLAE. A separação cromatográfica pode ser obtida

em tempo inferior a 5 minutos. A detecção é usualmente feita por espectroscopia UV ou eletroquímica.

Um grande número de técnicas físico-químicas são utilizadas rotineiramente para monitorar a pureza dos antibióticos β -lactâmicos. Absorção no UV, espectroscopia IV, RMN e difração por raios X, são exemplos de técnicas utilizadas na identificação de β -lactâmicos.

Fluorimetria é uma técnica altamente sensível comparável com ensaios microbiológicos. Os processos são razoavelmente específicos usualmente baseando-se na detecção de cromóforos resultantes da degradação de β -lactâmicos. Um método específico para β -aminobenzilcefalosporinas em plasmas e urina (cefaclor, cefalexina, cefradine, cefaloglicina, cefroxadine e cefadroxila) foi desenvolvido por Blanchin *et al.* [76], baseando-se na formação de um composto fluorescente a partir da reação de produtos da hidrólise ácida ou alcalina e derivatização com fluorescamina ou ortoftalaldeído.

I.10 Eletroanálise de cefalosporinas

Conforme mencionado anteriormente, a polarografia de pulso diferencial e voltametria adsorptiva com redissolução catódica têm sido a técnica voltamétrica mais utilizada na determinação de cefalosporinas. A presença de grupos redutíveis e a forte adsorção destas drogas em eletrodo de mercúrio tem favorecido a utilização destas técnicas. Os principais trabalhos que utilizam técnicas eletroanalíticas para a determinação de cefalosporinas em formulação farmacêutica ou em fluídos biológicos são apresentados a seguir.

Jones e coparticipantes [77] foram os primeiros a reportar a redução polarográfica de cefalosporinas C, cefalostina e cefaloridina em eletrodo gotenjante de mercúrio (DME), sem necessidade de derivatização prévia. A onda polarográfica de corrente contínua (DC) obtida da cefaloridina permitiu sua determinação na ordem de 10^{-5} mol L⁻¹, entretanto as cefalosporinas C e cefalotina foram restritas à análise qualitativa.

Através de estudos anteriores, Ochiai *et al.* [78] apresentaram evidências da eletroredução da dupla ligação do anel cefema.

Benner [79] elaborou um procedimento para determinação polarográfica de sete penicilinas e três cefalosporinas (cefalotin, cefaloridina e cefalexina) em um filtrado depois da ultracentrifugação de uma amostra de soro humano.

Ogorevc *et al.* [80] desenvolveram métodos para a determinação de quatro cefalosporinas (Cefalozolina, Cefoloxima, Cefuroxima e Ceftriaxima) através de voltametria

de redissolução catódica. O método foi aplicado na determinação destas drogas em urina humana, após diluição da amostra em eletrólito de suporte. O limite de detecção de $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi obtido para o Cefazolina com desvio padrão relativo de 2,8%, e limite de quantificação de $23 \mu\text{g mL}^{-1}$ em urina. As demais drogas apresentam resultados semelhantes e comparáveis aos obtidos pela cromatografia líquida de alta eficiência.

Li e Chen [81], propuseram a determinação de cefalexina através de seu produto de hidrólise obtido em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 minutos, que exibe um pico em $-0,8 \text{ V}$, atribuído ao produto gerado pela abertura do anel diidrotiazínico após formação do derivado dicetopiperazina pela amilóse intramolecular. O método foi utilizado para a determinação indireta da droga através da voltametria de redissolução catódica na concentração de $5,0 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$.

Hammam *et al.* [82] utilizaram o eletrodo de mercúrio para a determinação voltamétrica de traços de cefoperazona a granel, formulações, soro e plasma humano. Os resultados obtidos com o método foram bastante positivos em termos de sensibilidade, seletividade e reprodutibilidade. O procedimento foi baseado na redução da droga adsorvida na superfície do eletrodo de gota de mercúrio. Um limite de detecção de $4,5 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ e quantificação de $1,5 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ foram obtidos para a cefoperazona a granel. O procedimento voltamétrico proposto utilizando a técnica de onda quadrada no modo de redissolução catódica adsortiva foi aplicado com sucesso para a quantificação de traço de cefoperazona no soro e plasma humano. Os limites de detecção e quantificação obtidos para o fármaco no soro humano foram de $6,0 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ ($0,375 \text{ ng mL}^{-1}$) e $2,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ ($1,250 \text{ ng mL}^{-1}$), respectivamente. Os parâmetros farmacocinéticos da cefoperazona no plasma de voluntários internados foram estimados com sucesso.

Billova *et al.* [83] estabeleceram um método utilizando a voltametria de onda quadrada (VOQ) para a determinação da cefoperazona (CFPZ) em culturas bacterianas, urina e leite. CFPZ apresentou um sinal voltamétrico específico o qual mostrou-se afetado pelo pH e componentes da solução. A determinação da CFPZ em tampão BR pH 4,4, exibiu boa sensibilidade com um limite de detecção de $0,5 \text{ nmol L}^{-1}$. Em amostras mais complexas (meio bacteriano 2YT, pH 7,2) o de detecção foi de aproximadamente $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$. Os autores demonstraram que método foi apropriado e rápido para a determinação CFPZ em culturas de bactérias vivas sem a separação da biomassa. Foram encontradas grandes diferenças entre *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e sensível à meticilina *Staphylococcus aureus* (MSSA) em cultivo na presença do CFPZ, dependendo do tempo. Quando CFPZ é clivado pela penicilinase, um novo pico aparece em potenciais mais positivos. Este pico

umenta sua corrente tanto com a concentração crescente da enzima, como com o tempo de clivagem, enquanto o pico CFPZ original é simultaneamente reduzido. Foi determinada a concentração do CFPZ na droga Pathozone pelo método de adição padrão sendo alcançada boa concordância com o valor declarado e o obtido para a droga. Com um procedimento simples de pré-tratamento foi possível determinar CFPZ no leite e urina, sem a necessidade de pré-tratamento. Usando a VOQ foi possível detectar concentrações de 500 nmol L^{-1} para CFPZ em leite bovino e urina humana.

El-Desoky *et al.* [84] estudaram o comportamento eletroquímico do antibiótico cefazolina (CFZ) em tampão BR (pH 2-11) em eletrodo de mercúrio, por meio das técnicas voltamétricas de polarografia DC, voltametria cíclica, coulometria com potencial controlado e onda quadrada adsortiva. Um procedimento voltamétrico de onda quadrada adsortiva de redissolução catódica foi desenvolvido e validado para a determinação de traços da cefazolina na forma a granel, com limites de detecção e quantificação de $2,6 \times 10^{-10}$ e $8,6 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. O método foi aplicado com sucesso na determinação da cefazolina em preparações farmacêuticas, sem a necessidade de pré-tratamento envolvendo extração ou concentração da amostra.

Golcu *et al.* [85] investigaram o comportamento voltamétrico da cefixima através das técnicas voltamétricas de varredura cíclica linear, pulso diferencial e onda quadrada. O processo de oxidação da cefixima foi irreversível com transporte da espécie eletroativa ocorrendo através da difusão controlada, dependente do pH. O mecanismo de oxidação foi proposto e discutido. Os parâmetros voltamétricos para a determinação de cefixima foram otimizados. De acordo com a relação linear entre a corrente de pico e a concentração, métodos voltamétricos de pulso diferencial (DPV) e onda quadrada (VOQ) foram desenvolvidos para determinação da cefixima na forma de dosagem farmacêuticas e em fluídos biológicos. Para a determinação da cefixima foi proposto o uso de tampão acetato em pH 4.5, o qual permitiu a quantificação do fármaco em um intervalo de $6,0 \times 10^{-6}$ a $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em eletrólito de suporte e amostras de soro fortificadas; na faixa de $8,0 \times 10^{-6}$ a $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em amostras de urina; na faixa de $6,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em amostras de leite materno em ambas as técnicas. A repetibilidade, reprodutibilidade e precisão dos métodos desenvolvidos foram consideradas adequadas em todos os meios. Nenhuma interferência eletroativa dos excipientes e/ou substâncias endógenas foi encontrada nas formas de dosagem farmacêuticas ou amostras biológicas.

Ferreira *et al.* [86] desenvolveram um procedimento utilizando a voltametria de pulso diferencial para a determinação da ceftazidima utilizando eletrodo de mercúrio de gota

pendente através de seu pico de redução em -0,43 V, em tampão Britton Robinson pH 4,0. O potencial de acumúlo e tempo foram de -0,15 V e 60 s, respectivamente. Curvas de calibração lineares foram obtidas no intervalo de $1,0 \times 10^{-8}$ a $1,5 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. O limite de determinação calculado foi de $5,0 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹. O coeficiente de variação foi de 4% (n = 7) para solução de ceftazidima $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. O efeito sobre a resposta voltamétrica de vários componentes da urina, tais como: creatinina, ácido úrico, uréia e glicose foram avaliados, e demonstraram interferir no método. Ceftazidima ligada à albumina humana exibiu um pico em -0,48 V. Recuperações de $87 \pm 2\%$ da ceftazidima (n = 5) foram obtidas a partir da amostra de urina fortificada com $1,27 \mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando cartuchos de extração em fase sólida C18.

Aleksić *et al.* [87] verificaram que a redução da proxetil cefpodoxima (CP) é fortemente influenciada pela adsorção. Desta forma, as propriedades adsortivas da CP foram investigadas, a fim de alcançar um aumento de sensibilidade na sua determinação. O método voltamétrico validado foi aplicado na determinação de baixas concentrações de CP, em pH 3,5 e 9,0, nos quais os efeitos mais pronunciados de adsorção foram observados. A linearidade da curva de calibração foi observada na faixa de $1,0 \times 10^{-8}$ a $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ com limite de detecção (LD) de $6,3 \times 10^{-9}$ e $7,1 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹, e limite de quantificação (LQ) de $2,1 \times 10^{-8}$ e $2,3 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹, em pH 3,5 e 9,0, respectivamente. O método proposto foi testado na determinação de CP em amostras de urina fortificadas, permitindo a determinação de baixas concentrações de CP.

Yilmaz e Biryol [88] estudaram a eletrooxidação da cefotaxima utilizando eletrodos de carbono vítreo (GC), platina e de pasta de carbono (CP), especialmente ativados em diferentes soluções eletrolíticas e de apoio utilizando diferentes pHs. Os dados revelaram que a forma do voltamograma e o número das etapas de oxidação mudavam dependendo da natureza do eletrodo. Do ponto de vista analítico, o eletrodo ativado GC foi o mais favorável. Os resultados dos testes de recuperação e análise estatística mostram que o método voltamétrico poderia ser utilizado para a determinação de cefotaxima.

Estes estudos demonstram que a aplicação de técnicas voltamétricas na análise de cefalosporinas pode ser altamente vantajosa, uma vez que a interferência de componentes endógenos da matriz é significativamente minimizada, devido principalmente às condições drásticas de pH e temperatura aos quais o sistema é submetido.

I.11 Métodos para a determinação de ceftiofur

O uso crescente do antibiótico ceftiofur na medicina veterinária estimulou o desenvolvimento de diversos métodos para a sua detecção, seja na forma de matéria prima, em preparações farmacêuticas ou fluídos biológicos.

Beconi-Barker *et al.* [89] descreveram um novo método analítico para identificar e quantificar o ceftiofur e seus metabólitos, os quais tinham o potencial de ser microbiologicamente ativo em tecidos suínos. O método empregou a extração em fase sólida e a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD) em 266 nm e apresentou uma faixa de repostas lineares entre 0,05 a 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ com um limite de detecção de 0.03 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Três métodos espectrofotométricos simples foram propostos para a determinação de ceftiofur em drogas e em preparações farmacêuticas. Os métodos foram baseados na determinação indireta do fármaco após processo de oxidação com “verde rápido” (FGFCF)/ KMnO_4^- , e associação complexa com safranina (SFNO) e azul de metileno (MB). As determinações espectrofotométricas foram realizadas em 625 (FGFCF), 530 (SFNO) e 655 nm (MB). Os métodos foram aplicados com sucesso, na quantificação do CF em preparações na forma de comprimidos, sendo os resultados comparados estatisticamente com um método referência, aplicando o teste t de Student e teste F. Nenhuma interferência foi observada a partir de estudos envolvendo excipientes comuns. A precisão do método foi verificada através da realização de estudos de recuperação via método de adição padrão [90].

Outro método foi proposto por Keever *et al.* [91], no qual foi utilizada a cromatografia líquida com detector de massas acoplada a um sistema de ionização por electrospray (LC-ES - MS) para a quantificação de ceftiofur no leite, tendo como referência o nível de tolerância para a droga de 50 ppb definido pela Food and Drug Administration EUA (FDA). A separação cromatográfica foi realizada no modo gradiente, o qual era composto por acetonitrila acrescida de ácido heptafluorobutírico. O ácido propiônico foi adicionado após eluição do fármaco em coluna cromatográfica, para minimizar a supressão do sinal electrospray, aumentando assim a resposta para o ceftiofur por um fator de 10. O método desenvolvimento permitiu detectar ceftiofur em nível de 10 ppb e quantificar o antibiótico na faixa de 25-200 ppb (coeficiente de correlação linear de 0,993). Neste método o preparo da amostra exigiu várias etapas que envolveram, por exemplo, a filtração em coluna, o que tornou o método um tanto mais demorado.

Moats e Romanowski [92] propuseram um método multiresíduos para a identificação e quantificação de seis (06) antibióticos β -lactâmicos, dentre eles o ceftiofur, os quais são

aprovados para o uso em animais destinados a produção de alimentos nos Estados Unidos. Os resíduos foram extraídos com acetonitrila e cloreto de tetraetilamônio. O extrato foi concentrado e filtrado. Em seguida foi eluído em coluna CLAE em fase móvel contendo KH_2PO_4 e acetonitrila no modo gradiente. As frações correspondentes aos analitos de interesse foram coletadas e testadas para a presença dos antibióticos, utilizando kits rápidos, geralmente baseados na inibição do crescimento microbiano no leite. A identidade das β -lactamas foram confirmadas através de tratamento e replicadas com β -lactamase.

Empregando a técnica CLAE no modo isocrático Souza *et al.* [93], criaram um método para determinação de ceftiofur sódico em pó estéril e formulações injetáveis. A separação cromatográfica foi monitorada através de detecção no UV/Vis a 292 nm. A validação do método ocorreu segundo os itens: linearidade, precisão, exatidão intra e inter-dia, especificidade, recuperação, robustez e limites de quantificação e detecção, obtendo-se bons resultados. A curva de calibração foi linear no intervalo de 20,0 - 120,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e o coeficiente de correlação foi de 0,9999. Demonstraram também que o ceftiofur é degradado em condições ácidas, alcalinas, oxidantes e fotolíticas. Segundo os autores, devido à estabilidade do método é possível utilizá-lo em análises de rotina em drogas na forma de pó estéril e formulações injetáveis.

Jacobson *et al.* [94] empregaram cromatografia líquida com detecção por arranjo de fotodiodos (DAD) na determinação de ceftiofur. O método baseou-se na análise direta da amostra após etapas de clivagem das proteínas e derivatização do fármaco para desfuroilceftiofur. Empregando a cromatografia líquida de alta eficiência, os autores encontraram uma resposta linear para concentrações de ceftiofur entre 0,4 a 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Um limite de detecção de 0,15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi também relatado. O método foi aplicado na determinação do ceftiofur em amostras de plasma bovino.

Um ensaio imunocromatográfico [95] foi desenvolvido para a detecção de sete cefalosporinas no leite. Os anticorpos policlonais com grupos específicos para o anel cefema foram produzidos em coelhos, após a imunização com cefalexina. O método permitiu a detecção semi-quantitativa de cefemas em tempos menores que 5 minutos, com elevada sensibilidade para a cefalexina e cefadroxil (ambos 0,5 ng mL^{-1}). Ao mesmo tempo, ceftiofur, cefapirina, cefazolina, cefalotina e cefotaxime foram detectados em níveis menores que 100 ng mL^{-1} em amostras de leite processadas e fortificadas. O método foi comparado com um ensaio imunoenzimático, utilizando-se 40 amostras de leite, de forma que as amostras com resultados positivos para os fármacos foram utilizadas na validação do método proposto, utilizando a CLAE. O percentual de concordância entre os métodos foi de 100%. Conclusão,

o método mostrou-se rápido e preciso para a detecção de multi-resíduos de derivados cefema em amostras de leite.

Conforme observado, tradicionalmente a cromatografia líquida é a técnica mais utilizada para a determinação do ceftiofur. De uma maneira geral a cromatografia líquida é um método relativamente rápido, no entanto, na maioria das vezes, são necessárias várias etapas de preparação da amostra até que ela possa ser analisada, evitando, assim, os interferentes durante a análise e, principalmente, a contaminação da coluna cromatográfica. Esta etapa de preparação da amostra podem ser também freqüentemente longas e complexas, o que faz com que o tempo de análise aumente muito, assim como os custos. Além do mais, ela não é uma técnica qualitativamente apta para identificar as espécies presentes na amostra. Estas técnicas acopladas às espectroscópicas são muito precisas e sensíveis, mas, não são satisfatoriamente simples para utilização em análises de rotina, pois elas requerem sofisticados instrumentos e reagentes caros, os quais não estão disponíveis na grande maioria dos laboratórios de controle de qualidade do país.

Um procedimento simples, de baixo custo e de fácil preparação deve, portanto, ser o procedimento de escolha para aplicação em laboratórios de controle de qualidade. Neste sentido, durante consulta a literatura observou-se que não existiam trabalhos relatados envolvendo a utilização de métodos eletroanalíticos na determinação de ceftiofur em leite bovino.

I.12 Hidrólise de cefalosporinas

Atualmente o grande interesse nas reações de hidrólise de cefalosporinas é proveniente da sua semelhança com a reação de acilação envolvida no mecanismo de ação antimicrobiana. Deste modo, nos estudos de reatividade do anel β -lactâmico através da hidrólise de cefalosporinas avalia-se a atividade antibiótica [96].

A capacidade de antibióticos β -lactâmicos em induzir uma resposta imunológica depende largamente da capacidade destas moléculas, ou seus produtos de degradação, ou metabólitos formados *in vivo* reagirem covalentemente com macromoléculas orgânicas, proteínas endógenas, carboidratos de alto massa molar ou lipídios, formando antígenos complexos. A amilose de cefalosporinas é também de interesse, já que o processo alérgico primário é provavelmente devido à formação de uma proteína conjugada resultante da reação de grupos β -amino de lisinas residuais em proteínas com a β -lactama [97].

Apesar da semelhança estrutural entre as penicilinas e cefalosporinas, diferentes mecanismos são observados na clivagem do anel β -lactâmico. Quando o anel β -lactâmico das penicilinas é aberto através de hidrólise alcalina branda ou enzimaticamente com penicilinasas (Figura 3), o principal produto formado é o peniciloato, o qual é bem caracterizado e relativamente estável [98].

Através da hidrólise alcalina de uma série de 33 cefalosporinas Coene *et al.* [99], mostraram que a abertura do anel β -lactâmico é acoplada a expulsão do grupo no carbono 3. O mesmo mecanismo é atribuído por outros autores [100, 101].

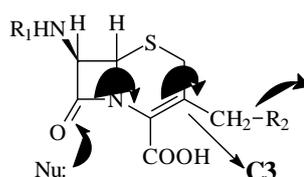


Figura 3 - Ataque nucleófilo ao anel β -lactâmico com subsequente eliminação do grupo em C3 [102]

Considerando que a reatividade de cefalosporinas β -lactâmicas são altamente influenciadas pela natureza de grupos substituintes nas posições β -lactâmico, que por sua vez afetam a atividade antibacteriana, enorme interesse tem sido despertado tanto na síntese de novas cefalosporinas com diferentes substituintes, quanto no estudo de degradação destes antibióticos.

I.13 Hidrólise do ceftiofur

O estudo de estabilidade do ceftiofur em solução aquosa investigada por Sunkara *et al.* [103], mostraram que a degradação do ceftiofur em soluções aquosas em vários valores de pH (1,0; 3,5; 7,4 e 10,0) e temperaturas de 0, 8, 25, 37 e 60°C, apresentaram como produto de degradação o desfuroilceftiofur (Figura 4). A 60 °C, a velocidade de degradação foi significativamente aumentada em pH 7,4, quando comparado com pH 1,0; 3,0; 5,0 e água destilada. Em ambas as temperaturas de 60°C e 90°C, a degradação em tampão pH 10,0 foi rápida, com níveis detectáveis de ceftiofur presente no final da incubação de 10 minutos. As constantes de velocidade de degradação de ceftiofur foram $0,79 \pm 0,21$, $0,61 \pm 0,03$, $0,44 \pm 0,05$, $1,27 \pm 0,04$ e $0,39 \pm 0,01$ dia⁻¹ no pH 1,0; 3,0; 5,0; 7,4, e na água destilada, respectivamente. A formação de desfuroilceftiofur foi alta (65%) em pH 10. A velocidade de degradação

aumenta em todas as soluções aquosas com o aumento da temperatura de incubação. Em pH 7,4 as constantes de velocidade de degradação foram de $0,06 \pm 0,01$, $0,06 \pm 0,01$, $0,65 \pm 0,17$ e $1,27 \pm 0,05$ dia⁻¹ em 0, 8, 25, 37 e 67°C, respectivamente.

A formação de desfuroilceftiofur foi maior em pH alcalino comparado com o pH ácido. A degradação de ceftiofur foi acelerada em pH 7,4 e foi mais rápida no pH 10,0. Os resultados destes estudos foram consistentes com o rápido desaparecimento do ceftiofur em pH fisiológico.

Koshy e coparticipantes [104], determinaram que o CF é muito suscetível a hidrólise ácida, alcalina e enzimática, produzindo um grande número de produtos de degradação instáveis. Neste trabalho, é descrito a preparação e identificação dos produtos de hidrólise que são formados sob condições alcalinas controladas. O produto primário da hidrólise é o desfuroilceftiofur, o qual é o mais abundante metabólito em sangue bovino. O desfuroilceftiofur foi cuidadosamente oxidado com H₂O₂ para obtenção do dímero dissulfeto, um metabólito do ceftiofur sódico presente em urina de rato e gado. Sob condições ácidas, o desfuroilceftiofur foi convertido a correspondente tiolaton. A preparação do desacetil cefotaxima, o qual é um oxigenado análogo do desfuroilceftiofur, é também descrito. O ácido tiofuróilco, formado pela menos comum quebra no lado alquil da ligação tioéster, foi também isolado.

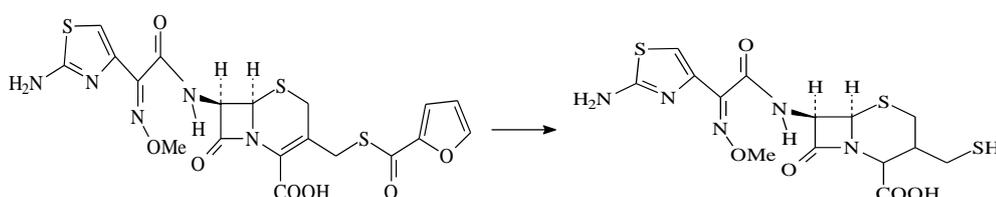


Figura 4 - Formação do desfuroilceftiofur a partir da degradação de ceftiofur em meio aquoso

I.14 Cefepima

I.14.1 Características gerais

Algumas das mais recentes cefalosporinas estão sendo categorizadas como "quarta geração", pois abrangem um espectro ampliado de atividade contra bactérias, tanto Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*, bem como a estabilidade a hidrólise por β -lactamases codificadas por plasmídeos e resistência em relação à β -lactamases

cromossômicamente codificadas do grupo 1 Buch [105], o qual é formado por cefalosporinases que não sofrem inibição pelo ácido clavulânico [106].

Cefepima (Figura 1), ácido [2-aminotiazol-4-il]-2(Z)-[metoxi-iminoacetamido]- 3-[metil-1-pirrolidino] metil-cef3-em4-carboxílico é a primeira cefalosporina de quarta geração [107], apresenta um largo espectro antimicrobiano, com atividade contra *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus cloacae*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococos spp* [108]. Devido ao seu espectro de atividade apropriado, o fármaco é útil no tratamento de infecções hospitalares graves [109]. Permitindo também ser utilizada no tratamento de infecções que são resistentes a cefalosporinas de gerações anteriores, tais como: septicemias, infecções do aparelho respiratório, urinário, intra-abdominal e cutâneas [110]. As propriedades da cefepima que determinam estas vantagens no espectro de atividade incluem uma estrutura molecular zwitteriônica a qual permite a rápida penetração através da membrana externa das bactérias Gram-negativas, a estabilidade e baixa afinidade pelas β -lactamases no espaço periplásmico e a alta afinidade para as proteínas ligadoras de penicilina [111]. Mediante o uso da técnica de eletroforese capilar em zona livre, o seu valor de pKa foi de 3,36 [112].

Cefepima atinge uma ampla distribuição na maioria dos tecidos e fluídos corporais [113]. O volume no estado estacionário de distribuição é de cerca de 18 litros, independentes da dose administrada. Cefepima é excretada no leite humano e urina [114], de forma que, pelo menos 85% é excretada inalterada na urina humana.

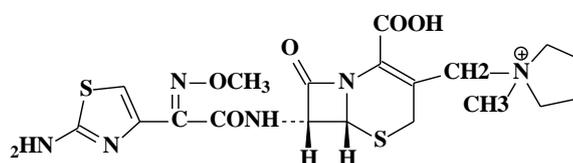


Figura 5 - Fórmula estrutural da cefepima

CEF é utilizada principalmente para o tratamento de infecções respiratórias moderadas a graves, como pneumonia, infecções do trato urinário, pele, infecções de tecidos moles, infecções intra-abdominais complicadas [115]. Há relatos que, tanto em situações eletivas e não eletivas, o uso profilático do antibiótico antes de cesarianas reduziu significativamente a incidência de morbidades infecciosas de pós-parto [116]. Quando utilizada acima dos níveis terapêuticos, estas drogas podem causar uma grande variedade de efeitos adversos e sua análise rápida pode ter um impacto significativo no tratamento e recuperação dos pacientes.

I.14.2 Toxicidade

Estudos têm demonstrado que a cefepima é uma droga potencialmente neurotóxica, e que pode originar uma encefalopatia grave, com características clínicas e de eletroencefalografia (EEG) peculiares. Pacientes com insuficiência renal parecem ser mais vulneráveis [117].

Existe um efeito significativo em termos de dano renal de meia-vida de eliminação e depuração da cefepima. Recomenda-se uma dose de 1g a cada 24 horas para pacientes com taxa de filtração glomerular (TFG) menor que 10 mL min^{-1} . Em estudos com camundongos ICR machos (idade máxima entre seis e sete semanas), doses de até 1000 mg kg^{-1} por via intravenosa não induziram convulsões em camundongos e ratos conscientes normais; entretanto, produziu convulsões em animais experimentais com insuficiência renal extensa. Em pacientes idosos, a função renal diminuiu sendo necessário ajuste da dose da cefepima quando a depuração de creatinina estivesse abaixo de 50 mL min^{-1} [118].

I.15 Leite humano

O leite materno é reconhecido como o alimento mais adequado para recém-nascidos, servindo como referência para estabelecer os requerimentos nutricionais nessa faixa etária. A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda amamentação exclusiva por 4 a 6 meses e complementada até 2 anos ou mais. [119-121]. A amamentação forma uma base biológica e emocional tanto para a saúde da mãe quanto da criança [122].

O crescimento saudável é alcançado com uma alimentação adequada. Razão pela qual, na fase inicial da vida, o leite humano é indiscutivelmente o alimento que reúne as características nutricionais ideais, com balanceamento adequado de nutrientes, além de desenvolver inúmeras vantagens imunológicas e psicológicas, importantes na diminuição da morbidade e mortalidade infantil. A amamentação é, então, importante para a criança, para a mãe, para a família e para a sociedade em geral [123]. A luz dos conhecimentos científicos atuais, o leite humano é considerado, de forma consensual, como o único alimento capaz de atender, de maneira adequada, todas as peculiaridades fisiológicas do metabolismo dos lactentes nos primeiros 06 meses de vida [124]. A adequação e os benefícios do leite humano

estendem-se também para as crianças prematuras, de baixo peso e àquelas que necessitam de internação em unidades de cuidados neonatais [125,126].

O alimento leite humano está presente desde o surgimento da raça humana, porém é ainda incompletamente conhecido nas suas várias especificidades, o que o mantém como objeto de pesquisa [127].

A composição do leite humano, especialmente quanto à presença de micronutrientes, é muito variada e pode ser influenciada por diversos fatores, tais como: a individualidade genética, a nutrição materna e o período de lactação (Tabela 1). Ocorrem, também, variações entre grupos étnicos e entre mulheres. Para uma mesma mulher, são registradas variações no decorrer da lactação, ao longo do dia e durante uma mesma mamada, havendo diferenças entre o leite da frente e o último a sair (anterior e posterior) com alterações na concentração dos macro e dos micro-nutrientes [128].

De forma geral, o leite materno é fisicamente um conjunto de emulsão diluída, dispersão coloidal e solução rica em compostos orgânicos e inorgânicos [129]. Constituído de 3 a 5% de lipídios, dentre os quais 98% são de triacilgliceróis, 1% de fosfolipídios e 0,5% de esteróis. Os lipídios apresentam-se na forma de glóbulos de cerca de 4 μm de diâmetro em emulsão do tipo óleo em água, que é estabilizada por uma membrana contendo fosfolipídios e proteínas. Cerca de 50% do valor calórico total do leite humano é proveniente da gordura, que é fonte de colesterol, ácidos graxos essenciais e vitaminas lipossolúveis. O conteúdo de ácidos graxos insaturados no leite humano é maior que no de leite de vaca [130]. Porém, apesar de todas essas vantagens, alguns estudos revelam reduzidas taxas de amamentação materna em nosso meio e em outros países. Dentre os fatores relacionados com a suspensão do aleitamento materno, pode ser importante a exposição dos lactentes à medicação materna [131,132].

I.16 Características da contaminação do leite humano por antibióticos

Deve-se evitar o uso de alguns medicamentos na lactação, pois alguns deles podem ser transmitidos para o bebê através do leite em quantidades suficientes para causar efeitos prejudiciais à criança. Como não se conhece muito sobre os efeitos de medicamentos veiculados no leite da mãe, é necessário um cuidado maior pelo médico ao prescrever qualquer medicamento a uma nutriz [133]. Atualmente, muitos profissionais de saúde optam simplesmente por indicar o desmame, podendo levar a efeitos muitas vezes nefastos, seja para a mãe, seja para o bebê. Na dúvida, podem prevalecer decisões injustificáveis [134].

A nutriz pode usar medicamentos por diversas razões e sob várias formas. A presença e a concentração do medicamento no leite humano dependem principalmente de três fatores. São eles: os ligados à mãe (metabolismo da droga, forma de prescrição, interação com outros medicamentos); os ligados à droga em si (características bioquímicas, vida média, biodisponibilidade, forma de prescrição, excreção, etc); e aqueles ligados ao recém-nascido (imaturidade de alguns sistemas dificultando a metabolização e excreção da droga) [131].

Ao nascer o intestino do recém-nascido é estéril. A colonização precoce com múltiplas bactérias da mãe e o desenvolvimento de lactobacilos e bifidobactérias, essenciais para competirem com aquelas, constituem fatores essenciais para uma flora intestinal saudável. Esta colonização cólica no adulto saudável, atingirá alguns bilhões de bactérias [135].

Bebês e crianças podem apresentar susceptibilidade única para os efeitos tóxicos dos produtos químicos, já que nesta fase, eles estão submetidos a um rápido desenvolvimento e crescimento de tecidos. Estas exposições que ocorrem no início da vida podem predispor os bebês e crianças a um maior risco de toxicidade crônica do que exposições que venham a ocorrer mais tarde na vida.

Portanto, as abordagens tradicionais para as avaliações de riscos toxicológicos nem sempre estão adequadamente protegendo os bebês e crianças [136].

I.17 Métodos para a determinação de cefepima

Análise de drogas é realizada durante as várias fases de desenvolvimento farmacêutico, tais como a formulação e estudos de estabilidade, controle de qualidade (QC) e toxicológica ou durante testes farmacológicos em animais e no homem [137]. Nos hospitais, a análise de drogas é realizada em amostras de pacientes em apoio aos ensaios clínicos, ou seja, estudos de biodisponibilidade e farmacocinética e no monitoramento de drogas terapêuticas e o abuso de drogas [138]. Todas estas investigações requerem métodos analíticos confiáveis e validados, a fim de determinar as drogas em matrizes complexas, tais como formulações e fluídos biológicos [139]. Tal como no plasma, os medicamentos podem ligar-se as proteínas do leite. No entanto, ao contrário do plasma, o leite é consumido; portanto, é essencial determinar o conteúdo total do fármaco a fim de estabelecer se o leite está contaminado [140].

Atualmente, diversos métodos analíticos para a quantificação da cefepima foram desenvolvidos, devido ao uso extensivo da droga na rotina médica. Os métodos analíticos mais utilizados para determinar a cefepima em formulações e materiais biológicos de origem

humana são a cromatografia líquida com microdiálise on-line [141], cromatografia líquida de alta eficiência [142] e espectrofotometria [143, 144].

Lopés *et al.* [145] desenvolveram método cromatográfico para a determinação simultânea da cefepima, vancomicina e imipenem em plasma humano de pacientes com queimaduras extensas.

Valassis *et al.* [146] utilizaram método cromatográfico para determinar os níveis de cefepima no plasma e fluido vítreo. Cefepima e o padrão interno de cefadroxil foram separados em coluna C18. A detecção ultravioleta foi efetuada em 270 nm. Os tempos de retenção foram de 4,80 minutos para cefepima e 7,70 minutos para cefadroxil. O método permitiu que fossem obtidos limites de quantificação de $2,52 \mu\text{g mL}^{-1}$ e detecção de $0,83 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Barbailya *et al.* [147] desenvolveram um método simples e rápido utilizando um sistema CLAE-UV/Vis, para quantificar cefepima em plasma e urina humana. O método envolveu a precipitação das proteínas presentes no plasma empregando acetonitrila e ácido tricloroacético, seguido por uma etapa de extração utilizando acetonitrila em diclorometano. Após a centrifugação, a fase orgânica foi descartada, e a solução aquosa foi injetada em sistema cromatográfico contendo coluna de fase reversa, os picos foram detectados em 280 nm. O método envolveu a diluição da amostra de urina em tampão acetato de sódio (pH 4,25) e a injeção direta em sistema de cromatografia líquida de alta pressão. Os dados de validação do método indicaram que o mesmo foi específico, preciso e reprodutível. O método foi aplicado também na determinação dos níveis de ligação do fármaco às proteínas do soro humano e em estudo farmacocinético em ratos. Os resultados do estudo de ligação às proteínas indicaram que a cefepima apresentou uma taxa de 16,3% de ligações às proteínas séricas humanas. No estudo farmacocinético em ratos, o nível máximo do fármaco no plasma ($38,7 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi alcançado após 2,33 horas da administração de uma dose subcutânea de 100 mg kg^{-1} . Os níveis no plasma, em seguida, diminuíram com um tempo de semi-vida de cerca de 0,56 horas. Os valores médios para o volume de distribuição em estado estacionário e a depuração total do corpo foram de $0,46 \text{ L kg}^{-1}$ e $11,9 \text{ mL min}^{-1}$ por kg, respectivamente. De 0 a 24 horas a excreção da cefepima intacta na urina representaram 88,6% da dose.

Bugnon *et al.* [148] descreveram um método de determinação da cefepima em amostras de plasma de sangue humano por injeção direta, utilizando a técnica de cromatografia líquida em fase reversa. O plasma foi desproteinizado por precipitação com acetonitrila, seguida da extração com adição de cloreto de metileno, e após repouso durante 10 minutos foi centrifugado a 15.000 rpm dentro de um intervalo de 10 minutos. Cefepima foi

separada em coluna C18, valendo-se de um sistema CLAE com detecção de arranjo de fotodiodos. A fase móvel (1 mL min^{-1}) era composta por: 92% de tampão borato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, ajustado para o pH 6,8 (20°C) com NaOH, e de 8% de metanol. Cefepima foi quantificada através do cálculo da área para o pico com sinal de absorção em 260 nm. As curvas de calibração exibiram linearidade em toda a faixa estudada ($0,5$ a 200 mg L^{-1}). O valor de LD calculado apresentou um valor de $0,34 \text{ mg L}^{-1}$. A precisão foi avaliada através de experimentos de precisão intermediária com DPR entre 2,7 e 10,3%, dependendo da concentração.

Cherti *et al.* [149] desenvolveram um método CLAE para a análise da cefepima em plasma e urina humanos, e em fluido de diálise. A detecção foi realizada em 280 nm. O procedimento do ensaio para determinação da cefepima em plasma envolveu a adição de um padrão interno (cefpiroma), seguido por tratamento das amostras com ácido tricloroacético, acetonitrila e diclorometano. Para quantificar a cefepima na urina diluída (1 : 20 v/v) e no fluido de diálise, as amostras foram combinadas com o padrão interno (cefpiroma) e analisadas usando uma técnica chamada de comutação de colunas, que inclui todos os métodos nos quais a direção do fluxo da fase móvel é alterado por meio de uma válvula rotatória, onde o efluente de uma coluna é desviado para uma outra coluna após um certo intervalo de tempo. A coluna cromatográfica utilizada era Nucleosil C18. As respostas do detector foram lineares para os padrões da curva de calibração na faixa de $0,5$ a 100 mg mL^{-1} . O limite de quantificação ficou em $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ nas três matrizes. As médias de recuperação foram de 84%. A precisão, expressa como DPR, apresentou valores na faixa de 1,5 - 9,0%. A precisão variou de 93 a 105%. Este método foi utilizado para acompanhar ao longo do tempo a concentração da cefepima no plasma, urina e amostras de saída de dialisato, após um período de infusão de 10 minutos de 2g deste medicamento em pacientes com insuficiência renal aguda submetidos à hemodiafiltração.

Breilh *et al.* [150] determinaram cefepima e cefpiroma em amostras de soro humano. O ensaio constituiu-se na quantificação dos antibióticos na forma não ligada em proteínas que possuíam uma massa molecular de 10 000 ou mais, através da ultrafiltração, seguida por cromatografia em coluna Supelcosil ABZ+ e detecção UV em comprimento de onda de 263 nm. O ensaio foi linear e validado no intervalo de concentração de $0,50$ a $200 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, para ambos os fármacos, extraídos de $200 \text{ } \mu\text{L}$ de soro. Segundo os autores, no futuro o ensaio poderá servir como apoio ao monitoramento de drogas terapêuticas (cefepima e cefpiroma) em pacientes neutropênicos em correlação com parâmetros microbiológicos como MIC

(concentração inibitória mínima que inibe 90% da população bacteriana inicial) e eficácia clínica.

O levantamento da literatura realizado revelou que existem dois métodos eletroquímicos para determinação da cefepima, ambos desenvolvidos por Palacios *et al.* [151,152]. Estes trabalhos estão relacionados com a determinação da cefepima em amostras de urina humana e fluido cerebrospinal, utilizando a voltametria adsortiva e, a determinação em soro através da polarografia de pulso diferencial. No entanto, nada foi publicado sobre determinação eletroquímica da cefepima utilizando eletrodo sólido de amálgama de prata em amostras de leite humano.

Há, portanto, uma grande demanda por métodos rápidos, simples para análise de antibióticos e outros resíduos no leite humano e as técnicas eletroanalíticas têm grande potencial para atender essa demanda. A instrumentação eletroanalítica é portátil e compacta, os resultados podem ser obtidos em questão de minutos, não havendo a necessidade muitas vezes de um tratamento preliminar da amostra e assegurando a seletividade e sensibilidade comparável aos métodos de CLAE. Além disso, os métodos eletroanalíticos contribuem com a “Química Verde”, pois podem reduzir ou eliminar o uso de solventes ou produtos químicos indesejáveis.

I.18 Eletrodos de trabalho

Os eletrodos de trabalho são aqueles nos quais o processo redox de interesse (oxidação e/ou redução) ocorre e uma ampla variedade de materiais pode ser empregada para a sua construção. No intervalo de potenciais positivos, os mais utilizados são os eletrodos sólidos construídos com metais nobres e com carbono nas suas diferentes formas. Na região negativa de potenciais os eletrodos de mercúrio são os mais empregados, tanto em solução aquosa quanto em meio aprótico [153].

O material do eletrodo de trabalho influencia fortemente o desempenho do procedimento voltamétrico. Levando em conta esta característica o eletrodo deve promover uma alta relação sinal-ruído e uma resposta reprodutível. Sua seleção depende do comportamento redox do analito de interesse e da corrente de fundo na região do potencial requerido para as medidas. Outras considerações incluem: intervalo de potencial; condutividade elétrica; reprodutibilidade da superfície; propriedades mecânicas; custo; disponibilidade e toxicidade [154].

Materiais como mercúrio, platina, carbono vítreo, grafite pirolítico, pasta de carbono e ouro estão entre os mais utilizados na confecção do eletrodo de trabalho, o qual pode ser de vários tamanhos ou formas, estacionários ou rotatórios. A sua escolha dependerá também do critério de estabilidade e de seletividade frente à espécie que se deseja determinar [51]. O mercúrio está entre os materiais eletródicos mais amplamente utilizados na eletroquímica [155].

Pode-se ainda destacar os eletrodos sólidos de amálgama sólido, que podem ser obtidos utilizando cobre (CuSAE) ou prata (AgSAE), os quais apresentam as mesmas propriedades dos eletrodos de mercúrio, mas com a vantagem de minimização na geração de resíduos tóxicos. Além disto, os AgSAE apresentam um amplo intervalo de potencial, elevada razão sinal-ruído, estabilidade mecânica e resistência a processos de passivação da superfície eletródica [156].

I.19 Eletrodos sólidos de amálgama

Desde o desenvolvimento da polarografia por Heyrovský, por volta de 1920, a utilização de eletrodos de mercúrio tornou-se uma ferramenta valiosa para a determinação analítica e estudo eletroquímico do comportamento de compostos orgânicos e inorgânicos em diferentes amostras [157]. No entanto, a toxicidade do metal limita o uso de eletrodos de mercúrio na prática analítica, impedindo aplicações extra-laboratoriais [158].

Diversos efeitos tóxicos são atribuídos à exposição ao mercúrio ou à sua inalação, tais como prejuízo da função renal, alterações na flora intestinal, disfunções cardíacas, bronquiolites e pneumonites, além de severas alterações no sistema nervoso central, caracterizadas por tremores, parestesias, alterações do equilíbrio, cefaléias, distúrbios da condução nervosa, da memória, da concentração e da coordenação motora [159].

A busca por novos sensores eletroquímicos para análise e estudo de biomoléculas representa uma parte inseparável do desenvolvimento de métodos bioeletroquímicos e instrumentações. Recentemente, novos tipos de eletrodos de amálgama de metais sólidos (MeSAEs) foram desenvolvidos para aplicações em técnicas voltamétricas [160-161]. Eletrodos sólidos de amálgama de prata (AgSAE), introduzidos por Mikkelsen e Schroder e independentemente por Yosypchuk e Novotny, representam um intermediário entre o eletrodo de mercúrio e os eletrodos sólidos usuais, porém unindo as vantagens de ambos [162]. Como exemplo destas propriedades similares, temos: a grande janela de potencial catódico e a sensibilidade relativamente alta [163].

Neste contexto, o AgSAE pode ser considerado como uma superfície eletródica apropriada, pois são praticamente não tóxicos, facilmente preparados, mecânicamente estáveis e mostram grande durabilidade, e além disso, permitem que o pré-tratamento da superfície seja rápido, simples e eletroquimicamente regenerável [164]. Enfim, a sua utilização pode ser considerada com um procedimento analítico ambientalmente amigável, já que o resíduo de mercúrio gerado durante a marcha analítica é mínimo [165].

O uso de eletrodos sólidos de amálgama, *solid amalgam electrodes* (SAE), na eletroquímica e eletroanalítica tiveram um crescimento intenso a partir de 2000, graças aos trabalhos desenvolvidos por dois grupos independentes de pesquisa, na República Tcheca e Noruega. Em geral, os SAE podem ser representados pela sigla MeSAE, onde Me é o metal, que pode ser prata, cobre, ouro, platina ou irídio [166].

I.20 Validação

A validação de métodos é um aspecto vital da garantia da qualidade analítica. É um processo dinâmico e constante que começa nas fases de seleção, desenvolvimento e aperfeiçoamento do método e da qualificação de instrumentos, materiais, e pessoal e continua na fase de experimentos e transferência do método. Um processo de validação bem definido e documentado fornece evidência objetiva de que o sistema e o método são adequados ao uso pretendido [167].

Para que o método apresente confiabilidade, alguns parâmetros devem ser avaliados ou mesmo otimizados, entre eles a especificidade/seletividade, linearidade, precisão, sensibilidade (limite de detecção), limite de quantificação e exatidão. De um modo geral, há três maneiras comuns para realizar-se a validação: o método (teste) de recuperação, a análise de amostra certificada e a determinação analítica por um segundo método. A etapa mais simples para a validação de uma metodologia consiste na aplicação dos testes de recuperação, que envolve a fortificação de amostra controle com o analito de interesse, também chamada testemunha, em concentrações conhecidas, denominadas níveis de fortificação. Essa amostra é então submetida ao método a ser validado e calcula-se então a recuperação, que consiste na relação percentual entre a concentração determinada e o nível de fortificação, parâmetro este que identifica a exatidão do método.

O intervalo de recuperação aceito nestas análises varia em função de vários critérios, sendo que Thier e Zeumer [168] propõem que a recuperação deve estar compreendida no intervalo de 70 a 120%. Através da realização destes testes de recuperação em várias

repetições, determina-se a precisão (repetitividade) que pode ser expressa pelo coeficiente de variação (CV) ou o desvio padrão relativo (DPR), que no caso de análises químicas em geral, deve ser inferior a 20%. No entanto, valores de recuperação maiores do que 120% e menores que 70% sugerem que as análises são influenciadas pelo chamado efeito matriz, fenômeno comumente encontrado em análises que empregam matrizes complexas (combustíveis, fluidos biológicos, etc.).

I.21 Método da adição de padrão

Este método é utilizado quando é difícil ou impossível preparar um branco da matriz isenta da substância de interesse [169]. Desta forma, a amostra é adicionada à célula polarográfica juntamente com o eletrólito de suporte e a corrente referente à espécie de interesse (analito) é registrada. A seguir, adiciona-se sobre a solução da amostra uma alíquota de alguns microlitros da solução padrão do analito, de tal modo que a variação do volume total seja desprezível. Usualmente adicionam-se pelo menos três alíquotas da solução padrão, registrando-se a corrente após cada adição.

Com os valores obtidos das correntes da amostra e dos padrões, constrói-se uma curva corrente *vs.* concentração como está mostrado na Figura 5. A corrente da amostra (i_p ou i_d , dependendo da técnica usada), é colocada no eixo “y” para o valor 0 (zero) do eixo “x”. Os próximos valores da corrente total de amostra mais padrões, para cada adição padrão, são colocados no eixo “y” e as respectivas concentrações no eixo “x”. O gráfico resultante deve apresentar uma reta. Esta reta é extrapolada até cortar o eixo da concentração (eixo “x”) no lado negativo das coordenadas.

O módulo do valor negativo obtido é o valor da concentração do analito da amostra na solução da célula polarográfica/voltamétrica. Sabendo-se o volume total da solução na célula e o volume da amostra original adicionado a ela, calcula-se então a concentração do analito na solução da amostra original.

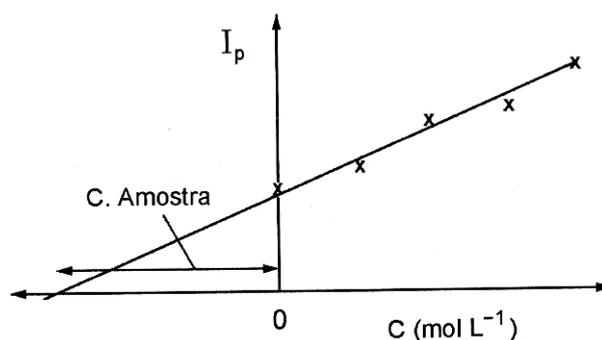


Figura 6 - Curva de adição de padrão utilizada em polarografia/voltametria

Para testes de repetitividade, limites de detecção, exatidão, reprodutibilidade, etc, as adições de padrão e o preparo de formulações com frequência são necessários. Para componentes menores (exemplo, impurezas em produtos ou impurezas em águas e solos) adição de padrão deve ser feita de maneira que o volume adicionado seja desprezível (geralmente menor que 1% do volume de amostra) de modo a simplificar os cálculos em uma rotina diária. Os padrões utilizados devem ser preferencialmente com teores certificados e com suas respectivas incertezas, embora isto nem sempre seja possível em todas as ocasiões (exemplo, para impurezas em produtos industriais) [170].

O método de adição padrão é trabalhoso, mas é especialmente importante quando a amostra é muito complexa, quando as interações com a matriz são significativas e quando houver dificuldade de encontrar um padrão interno adequado ou uma matriz isenta da substância de interesse [171].

I.22 Objetivos

I.22.1 Objetivo geral

Utilizar da voltametria de onda quadrada como ferramenta para o desenvolvimento de metodologias eletroanalíticas na determinação de resíduos dos antibióticos β -lactâmicos cefitiofur fazendo uso do eletrodo de mercúrio, em amostras de alimentos (leite bovino UAT e em pó) produzidos e comercializados no Estado de Mato Grosso do Sul – MS, e cefepima em amostras de leite humano, utilizando eletrodo sólido de amálgama de prata.

I.22.2 Objetivos específicos

1. Otimizar os parâmetros experimentais e voltamétricos, onde se obtém uma melhor resposta voltamétrica, tanto de intensidade de corrente de pico quanto em perfil voltamétrico, para o desenvolvimento de procedimentos analíticos para determinação dos antibióticos β -lactâmicos em eletrólito de suporte;
2. Construir curvas analíticas e calcular os limites de detecção, de quantificação e eficiência dos procedimentos;
3. Aplicar os procedimentos otimizados em amostras de leite UAT, produzidos e comercializados em larga escala no Estado de Mato Grosso do Sul, visando determinar o antibiótico ceftiofur;
4. Aplicar os procedimentos otimizados em amostras de leite UAT e em pó, visando à determinação indireta do antibiótico ceftiofur, através de seu produto de hidrólise alcalina;
5. Confeccionar eletrodos sólidos de amálgama de prata (AgSAE) e posteriormente aplicar na quantificação do antibiótico β -lactâmico cefepima, em amostras de leite humano empregando voltametria de onda quadrada.

PARTE EXPERIMENTAL

II.1 Reagentes

O padrão de antibiótico β -lactâmico utilizado nos experimentos foi ceftiofur sódico obtido da Rhodia-Mérieux Veterinária Ltda. Os reagentes de grau analítico ácido acético (Merck), ácido bórico (Merck), ácido fosfórico (Merck), hidróxido de sódio (Merck) e hidróxido de sódio (Merck) todos de grau de pureza analítico, foram utilizados em soluções de eletrólito de suporte.

Utilizou-se o reagente ácido octanosulfônico de grau HPLC (Merck), como reagente formador do par iônico para cromatografia líquida.

A fase móvel utilizada era composta por dois eluentes: (A) solução aquosa de di-hidrogenofosfato de potássio (10 mmol L^{-1}) (Merck) pH 7,0, ajustado com ácido fosfórico concentrado (Merck) e (B) metanol (Merck).

2.2.1 Soluções e solventes e amostras

Soluções estoque do CF e CEF ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) foram preparadas a partir da dissolução (10 mL) de quantidades apropriadas em água ultrapura, estocadas e mantidas sob refrigeração em frasco âmbar até a sua utilização. Soluções diluídas do CF na concentração desejada (entre $1,0 \times 10^{-4}$ e $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) foram preparadas imediatamente antes das análises por diluição de alíquotas da solução estoque ou por adição de alíquotas da solução estoque diretamente na célula eletroquímica contendo o eletrólito de suporte. As soluções estoque apresentaram estabilidade durante todo tempo de estocagem (7 dias de acompanhamento).

A solução estoque de cefepima (Bristol-Myers-Squibb., Bra) $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada através da dissolução em 10 mL de água ultrapura e mantida à 0°C .

Sistema tampão utilizado foi o Britton-Robinson (BR) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, no intervalo de pH de 2,0 a 12,0, obtido da seguinte forma: Tampão Britton-Robinson (BR): mistura de ácido acético $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (Merck), ácido bórico $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (Merck) e ácido ortofosfórico $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (Merck). O ajuste do pH desejado foi com hidróxido de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (Merck) ou ácido clorídrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (Vetec).

A vidraria utilizada no decorrer dos experimentos, inclusive a célula eletroquímica foram lavadas com água e detergente Extran (Merck) e posterior lavagem com água ultrapura seguida de lavagem com solução de ácido nítrico e novamente com água ultrapura.

II.2 Experimentos cromatográficos

Soluções estoques do padrão do antibiótico CF foram preparadas na concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ a partir da dissolução (10 mL) de quantidade apropriada do soluto em acetonitrila (grau HPLC, Merck), estocadas em frascos de vidro âmbar e mantidas sob refrigeração até a sua utilização.

Soluções diluídas nas concentrações desejadas foram preparadas imediatamente antes das análises por diluição em acetonitrila, de alíquotas da solução estoque em balão volumétrico de 10 mL.

As soluções de solução de ácido octanosulfônico (Merck), grau de pureza analítica, foram preparadas em acetonitrila (grau HPLC, Merck) (eluente A). Já o eluente B foi preparado pela diluição da solução de ácido octanosulfônico pH 2,52, em um mistura de 300 mL de acetonitrila e 150 mL de metanol.

Acetonitrila, metanol (grau HPLC, Merck) e água ultrapura (MilliQ, Millipore EUA) foram usados como solventes de fase móvel para separação do antibiótico em análise, com o equipamento CLAE (Varian Company, USA).

Soluções estoques do padrão de cefepima foram preparadas na concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ a partir da dissolução (10 mL) de quantidades apropriadas do soluto em água purificada por um sistema Milli-Q (Millipore, Inc.), estocadas em frascos de vidro e mantidas sob refrigeração até a sua utilização. Soluções diluídas nas concentrações desejadas foram preparadas imediatamente antes das análises por diluição de alíquotas da solução estoque em água ultrapura em balão volumétrico de 10 mL.

A fase móvel utilizada era composta por dois eluentes: (A) solução aquosa de di-hidrogenofosfato de potássio (10 mmol L^{-1}) (Merck) pH 7,0, ajustado com ácido fosfórico concentrado (Merck) e (B) metanol (Merck). Todos os reagentes utilizados foram de pureza analítica (PA).

II.3 Amostras de leite

Amostras de leite Longa Vida UAT de apenas uma marca (marca A) foram adquiridas em diversos estabelecimentos comerciais localizados no município de Campo Grande – MS e armazenados sob refrigeração à 4 °C. Estas amostras de leite foram submetidas a análise utilizando imunoenensaio (Kit Snap, marcas registradas da IDEXX Laboratories Inc.).

Soluções do padrão de ceftiofur foram intencionalmente adicionadas nas amostras para produzir a concentração desejada.

Amostras de leite humano foram obtidas de voluntária saudável e mantidas a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ em frascos estéreis. Soluções dos padrões do fármaco de interesse foram intencionalmente adicionadas nas amostras para obter a concentração desejada.

II.4 Equipamentos

Todas as medidas voltamétricas foram realizadas através de um potenciostato/galvanostato PGSTAT30, marca EcoChemie, acoplado a um Stand para eletrodos da marca Metrohn, modelo 663 VA com célula para três eletrodos (o de trabalho constituído por gota de mercúrio de área $0,52\text{ mm}^2$, de referência Ag/AgCl, KCl $3,0\text{ mol L}^{-1}$ e auxiliar constituído de carbono vítreo). O equipamento foi interfaceado a um microcomputador PC com sistema operacional Windows XP e gerenciado pelo software GPES (General Purpose Electrochemical System), versão 4.9.

No estudo da cefepima as medidas voltamétricas foram realizadas através de um potenciostato/galvanostato PGSTAT30, marca Eco Chemie, acoplado a um sistema de célula eletroquímica composta por três eletrodos: o de trabalho constituído por amálgama de mercúrio e prata com área geométrica de $0,5\text{ -}1\text{ cm}^2$, de referência Ag/AgCl, KCl $3,0\text{ mol L}^{-1}$ e auxiliar constituído de um fio de platina (Heraeus Vectra - 99,5%, São Paulo) de $6,0\text{ cm}$ de comprimento em espiral.

As adições de volumes na célula voltamétrica e as diluições das soluções foram realizadas com o auxílio de micropipetas com volume variável $10\text{-}1000\text{ }\mu\text{L}$ da marca Oxford (USA).

As medidas de pH foram realizadas em um pHmetro da marca Sigma, modelo D-37520 com eletrodo de vidro combinado, previamente calibrado.

Um sistema ProStar fase líquida (Varian, Inc.) equipado com bomba ternária ProStar 210 acoplado ao detector UV-Vis 325 ProStar (Varian Inc., Melbourne, Austrália) foi utilizado. A injeção da amostra foi feita através válvula injetora Rheodyne (Varian, Inc., Cotati CA, E.U.A.) com um loop de capacidade para $20\text{ }\mu\text{L}$ de amostra.

A separação cromatográfica do antibiótico analisado foi realizada, utilizando-se coluna analítica de fase reversa composta pela fase estacionárias RP-C18 ($250 \times 4,4\text{ mm i.d.}$, $5,0\text{ }\mu\text{m}$, Varian Company, USA). A temperatura da coluna foi mantida constante em $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Antes de cada injeção a fase móvel era desgaseificada e filtrada a vácuo através de membranas

filtrantes 0,45 μm nylon (Alltech Inc. Associados, Bélgica). A detecção do analito foi realizada em 270 nm. Os dados foram adquiridos com sistema ProStar software Varian. Uma centrífuga marca InoLab (Bra) modelo RS 232 foi utilizada.

As medidas espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro UV-visível Varian modelo Cary 50, equipado com sistema de circulação de água (modelo PCB 1500) para uso com suporte de células termostatizado (Varian, USA), interfaceado em um programa WinUV Software. Todos os experimentos foram conduzidos em cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico.

II.5 Experimentos voltamétricos

II.5.1 Estudo das condições experimentais e obtenção da curva analítica

As medidas eletroquímicas foram efetuadas em uma célula contendo 10 mL de solução (tampão BR). Esta solução foi desoxigenada com nitrogênio puro por um tempo de 10 minutos seguidos pela realização da medida do branco, mediante varredura de potencial em um intervalo pré-estabelecido. Após este período, alíquotas dos padrões do ceftiofur e/ou amostras foram adicionadas na célula, registrando os voltamogramas, de acordo com o mesmo procedimento acima citado. Os tempos para desaeração foram de: padrões (60 s para 1ª leitura, 10 s para as 2ª e 3ª leituras), amostras (100 s para a 1ª leitura e 20 s para as 2ª e 3ª leituras).

II.5.2 - Polarografia de pulso diferencial

As medidas polarográficas de pulso diferencial foram realizadas utilizando-se um tempo de gotejamento de 0,8 segundos, amplitude de pulso de 50 mV, velocidade de varredura de 5,0 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$, intervalo de pulso de 1,0 ms e gota de tamanho médio.

II.5.3 Voltametria de redissolução catódica

Os estudos iniciais de determinação de concentração de ceftiofur por voltametria de redissolução catódica foram realizados utilizando-se as seguintes condições experimentais: potencial de depósito de - 0,25 V, tempo de depósito 50 segundos, amplitude de pulso de 50 mV, incremento de potencial de 2,5 mV e tempo de modulação 0,07 segundos.

A determinação de concentração do fármaco em amostra de leite UAT comercial foi realizada pelo método da adição de padrão, adicionando-se inicialmente uma alíquota da amostra fortificada e posteriormente, sucessivas adições de solução padrão na forma pura.

II.6 Determinação direta de ceftiofur em amostra de leite UAT

Alíquotas de 500 μL de leite UAT foram diluídas com igual volume de solução acetonitrila-água (50 : 50, v/v), e utilizada como agente precipitante de proteínas. Após, a mistura foi submetida à agitação em vórtex durante 10 – 15 s, a seguir o material protéico precipitado foi separado por centrifugação durante cerca de 30 minutos a 4.000 rpm. A camada sobrenadante límpida foi utilizada nos estudos subseqüentes. Todas as amostras foram protegidas da luz, em frascos âmbar coberto com papel alumínio e armazenadas a -20°C até serem analisadas.

A solução resultante foi, em seguida, submetida à análise eletroanalítica e a quantificação de ceftiofur nas amostras de leite UAT, realizada pelo método da adição de padrão.

II.7 Determinação indireta de ceftiofur em amostra de leite UAT e leite em pó

Inicialmente alíquotas de 10,0 mL de leite UAT e leite em pó reconstituído em água ultrapura nas proporções descritas pelo fabricante no rótulo da amostra, foram intencionalmente fortificadas com concentrações conhecidas do antibiótico. Fez-se a hidrólise alcalina do fármaco, presente na amostra, em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 10,0. A amostra foi, então, mantida em banho-maria modelo NT 245 (Nova Técnica, Brasil) a $60^\circ\text{C} \pm 0,2^\circ\text{C}$ sob agitação, por 60 minutos.

Foram utilizados um ultra-som Odontobrás, modelo ultrasonic cleaner 1440 DA, para a dissolução da amostra de leite em pó, e um agitador magnético Jeio Tech, modelo HP-3000.

A solução resultante foi, em seguida, submetida à análise eletroanalítica e a quantificação de ceftiofur nas amostras de leite, realizada pelo método da adição de padrão.

II.8 Experimentos cromatográficos

II.8.1 Estudo das condições experimentais e obtenção da curva analítica

Para as análises realizadas por CLAE-UV/Vis (Varian Company, USA) utilizou-se como base método anteriormente publicado [172].

O experimento cromatográfico foi realizado no modo isocrático inicialmente com 90% de solução de ácido octanosulfônico (par iônico) em acetonitrila pH 2,52 (eluente A) e 10% de solução preparada pela diluição da solução de ácido octanosulfônico pH 2,52 em uma mistura de 300 mL de acetonitrila e 150 mL de metanol (eluente B), por 8,0 minutos. O conteúdo relativo do eluente B foi deste modo aumentado linearmente até atingir 100% do eluente B, acima de 17,0 minutos. O sistema permaneceu nesta condição por mais 3,0 minutos e retornou a 90% de eluente A, após mais 2 minutos. A coluna foi acondicionada com a fase móvel, por 10 minutos antes da injeção e a temperatura mantida a 20 - 25°C. A detecção ultravioleta (UV) foi realizada em 270 nm.

II.8.2 Determinação de ceftiofur em amostras de leite bovino por CLAE-UV/Vis.

Um volume de 20 mL de leite UAT fortificado, com concentração adequadas de padrão CF, foi centrifugada a 1500 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e um volume de 2,0 mL foi transferido para um tubo de polipropileno de 15 mL. Na sequência, um volume de 7,0 mL de acetonitrila foi adicionado e a mistura foi vigorosamente agitada por 2,0 minutos. A seguir, a mistura foi centrifugada a 1500 rpm por mais 10,0 minutos e o sobrenadante foi concentrado até um volume de 2,0 mL a uma temperatura de 45 - 50°C sob fluxo de gás nitrogênio.

Após atingir o volume de 2,0 mL, a amostra foi transferida para cartucho de extração em fase sólida C18 (Discovery, DSC-18LT, 1,00 g 6,00 mL tube, Supelco, USA), previamente condicionado com 10 mL de metanol (grau-HPLC, Merck), seguido de 5,0 mL de água. A amostra foi percolada com um fluxo de 2,0 mL min⁻¹ no cartucho C18 condicionado e, em seguida, lavada com aproximadamente, 20 mL de água e seco por sucção por 1 minuto, para remoção de resíduos polares e/ou substâncias menos retidas potencialmente interferentes.

O analito retido foi eluído com 2,0 mL de acetona e depois deixado a 45 - 50°C sob fluxo de nitrogênio em capela, para evaporação até secura. Depois de seco, o resíduo foi reconstituído em 1000 µL de água e filtrado através de filtro 0,45 µm de Fluoreto de Polivinilideno (PVDF). A injeção foi realizada em loop de 20 µL com fluxo da fase móvel de 1,0 mL min⁻¹.

A quantificação do antibiótico na amostra foi realizada pelo método do padrão externo, usando dados da curva analítica.

II.9 Experimentos espectrofotométricos

II.9.1 Estudo de degradação do ceftiofur em meio alcalino

Os dados do estudo de hidrólise alcalina para o padrão de ceftiofur foram obtidos usando-se solução $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, previamente preparada pela dissolução do padrão em água ultrapura. A seguir, uma alíquota de 1000 μL foi adicionada a balão volumétrico de 10 mL e completado o volume com solução tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 10,0, sendo imediatamente transferida para cubeta de quartzo e, em seguida, para o compartimento de amostras previamente termostaticado a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\pm 0,10 \text{ }^\circ\text{C}$). A seguir, foi realizada a varredura na faixa de 190-1100 nm e, na sequência, as varreduras seguintes foram realizadas em tempos de reação de 0, 15, 30 e 60 minutos.

As análises espectrofotométricas foram realizadas monitorando-se o máximo de absorvância em comprimentos de onda de 228,9 nm, 257,0, nm e 290,9 nm.

II.10 Preparo e ativação do eletrodo de amálgama de prata

Nos experimentos foi empregada como eletrodo de trabalho a amálgama de Ag confeccionado de forma semelhante ao descrito na literatura [172, 175]. Desta forma, os eletrodos sólidos de amálgama de prata (AgSAE) foram preparados utilizando nano pó de prata (tamanho de partícula: 150 nm, pureza: 99,9%, Sigma-Aldrich), compactado no interior de um fino capilar de vidro Pyrex, cujo diâmetro interno era de cerca de 0,5 cm. O contato elétrico foi realizado através de um fio de platina inserido no pó de prata. O material compactado foi então amalgamado através da imersão em mercúrio líquido o tempo necessário para que o amálgama de Ag fosse obtido. O processo de amalgamação foi finalizado quando toda a coluna contendo o pó do metal foi molhada pelo mercúrio. Após retirar o tubo, o mesmo foi deixado em descanso por cerca de 12 horas para alcançar completamente o estado de amálgama sólido. Na etapa seguinte, o disco sólido amalgamado resultante foi polido manualmente com uma lixa d'água (0,01 mm de diâmetro).

A ativação da superfície do eletrodo de trabalho é uma etapa importante realizada preliminarmente, cujo objetivo é habilitar a superfície do eletrodo às reações que envolvem transferência de carga.

Após a etapa de polimento a superfície foi eletroquimicamente ativada usando $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, aplicando-se um potencial de $-2,2 \text{ V}$ durante 600 s , sob fluxo constante de nitrogênio seguido de repetidas varreduras na faixa de 0 a $-2,2 \text{ V}$ até estabilização do potencial.

Tal procedimento era repetido antes do início dos trabalhos, e após cada pausa superior a 60 minutos, ou quando ocorria a deterioração do desempenho do eletrodo. A finalidade era a remoção eletroquímica de óxidos, reagentes ou produtos adsorvidos sobre a superfície do eletrodo. Além disso, a resistência à transferência de carga tornava-se menor e mais adequada para fins analíticos, após o processo de ativação eletroquímica [174].

Antecedendo a cada varredura de potencial em eletrólito de suporte tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, a superfície era regenerada por aplicação de $-2,2 \text{ V}$ durante 30 s .

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

III.1 Comportamento eletroquímico do ceftiofur utilizando as técnicas voltamétricas de onda quadrada (VOQ) e pulso diferencial (VPD)

A etapa inicial do estudo consistiu em realizar testes em diferentes técnicas voltamétricas, dentre elas a voltametria de onda quadrada (VOQ) e voltametria de pulso diferencial (VPD), para estabelecer qual técnica seria utilizada no decorrer do desenvolvimento das metodologias eletroanalíticas. Na Figura 9 são apresentados os voltamogramas de onda quadrada e pulso diferencial obtidos. Ao analisar a figura, observa-se que a varredura na faixa de potencial negativo apresentou dois picos bem definidos (pico 1C e 2C), sendo o primeiro em potencial de -0,60 V e o segundo em -0,91 V (VOQ), já no modo de pulso diferencial aparecem em -0,44 e -0,82 V, respectivamente. A intensidade do sinal na voltametria de onda quadrada apresentou correntes de pico (i_p) superiores (oito vezes) aos valores observados na técnica de DPV. Como pode ser observado também, o sinal analítico obtido na VOQ exibiu uma boa definição com excelente resolução, conseqüentemente, esta técnica foi escolhida para o desenvolvimento das metodologias.

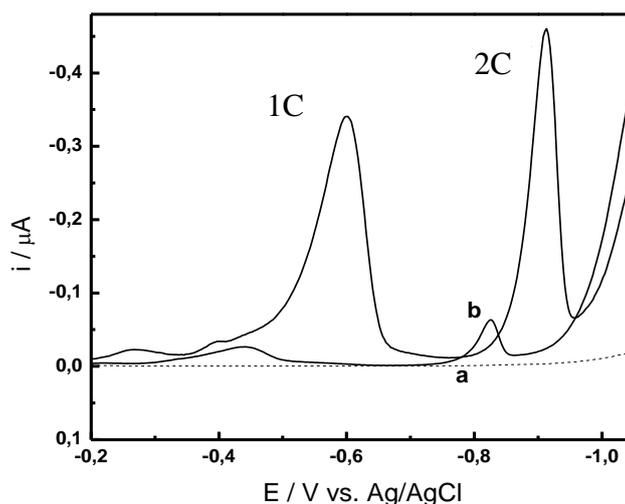


Figura 7 - Voltamogramas obtidos através da redução de uma solução de CF $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR pH 2,5, utilizando as técnicas de VOQ (curva c) e VPD (curva b). Condições para VOQ: $f = 60 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 25 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$; para VPD: tempo de modulação = 0,07 s, intervalo de tempo = 0,4 s, $E_{sw} = 25$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$

Um passo importante no desenvolvimento de uma metodologia eletroanalítica é a otimização dos parâmetros que normalmente influenciam na resposta voltamétrica. Para isto,

foi realizado um estudo do pH do meio e parâmetros da voltametria de onda quadrada, tais como frequência (f), amplitude de pulso (E_{sw}) incremento de varredura (ΔE_s), dentre outros, buscando, desta forma, o melhor sinal analítico.

III.2 Influência da concentração do eletrólito de suporte tampão Britton-Robinson

O tampão Britton-Robinson (BR) foi escolhido como eletrólito de suporte para a realização dos estudos, devido à existência de inúmeros trabalhos na literatura, nos quais é utilizado a técnica de escolha e este tampão como eletrólito para a determinação de β -lactâmicos.

Em sistemas eletroquímicos o eletrólito suporte é um eletrólito que, adicionado em altas concentrações (cerca de cem vezes maior que a da espécie eletroativa), pode conferir à solução e à interface (do tipo metal-solução) em estudo uma série de propriedades. Tais propriedades, em geral são resultantes da manutenção da força iônica alta e constante da solução, o que, simplifica a análise dos sistemas eletroquímicos [175].

Desta forma, avaliou-se a influência da concentração do tampão Britton-Robinson no processo de redução do CF $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR pH 2,5 e 4,0, nas concentrações de 0,04, 0,07 e 0,10 mol L^{-1} .

Os efeitos desta variação nas correntes de pico em função do potencial são representados nas Figuras 10 e 11. Conforme observado, a variação da concentração do eletrólito não promoveu um aumento significativo nas correntes dos picos 1C e 2C em pH 2,5 e 4,0. Contudo, a concentração 0,04 mol L^{-1} foi a concentração utilizada no desenvolvimento da metodologia para determinação de ceftiofur. O motivo da escolha reside no fato de que tratam-se de reagentes qualidade suprapuro, portanto, de alto custo e esta variável foi levada em conta no desenvolvimento desta metodologia.

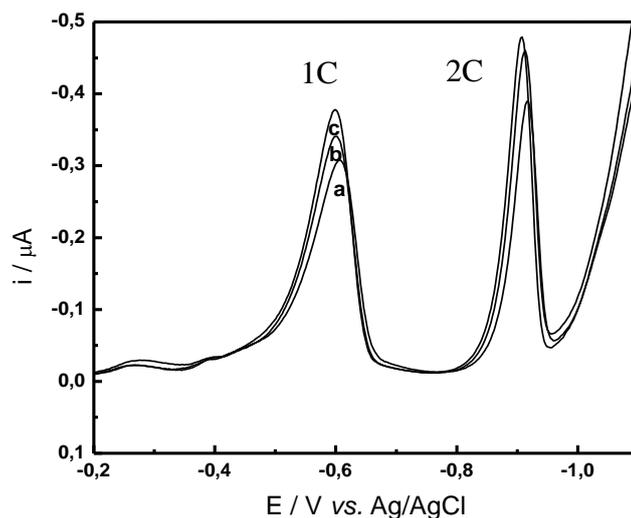


Figura 8 - Influência da variação da concentração do tampão Britton-Robinson sobre as correntes de pico de uma solução de CF $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ pH 2,5: curva (a) – tampão BR 0,07 mol L⁻¹; curva (b) – tampão BR 0,04 mol L⁻¹ e curva (c) – tampão BR 0,10 mol L⁻¹

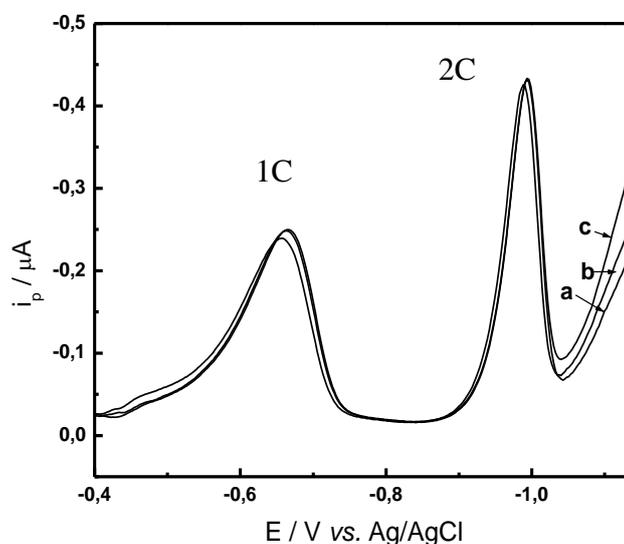


Figura 9 - Influência da variação da concentração do tampão Britton-Robinson sobre as correntes de pico de uma solução do CF $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ pH 4,0: curva (a) – tampão BR 0,07 mol L⁻¹; curva (b) – tampão BR 0,10 mol L⁻¹ e curva (c) – tampão BR 0,04 mol L⁻¹

III.3 Efeito do pH

A redução eletroquímica do ceftiofur foi inicialmente avaliada, variando-se o pH do eletrólito de suporte composto por tampão Britton-Robinson 0,04 mol L⁻¹, no intervalo de 2,0 a 8,0, através da voltametria de onda quadrada em eletrodo de mercúrio.

A redução do fármaco no pH 2,5 é caracterizada pela ocorrência de dois picos bem definidos, conforme demonstrado na Figura 12. Observa-se um voltamograma de onda

quadrada em pH 2,5 mostra os picos 1C e 2C, os quais apresentam potenciais de pico em, aproximadamente, -0,565 e -0,874 V vs. Ag/AgCl, respectivamente.

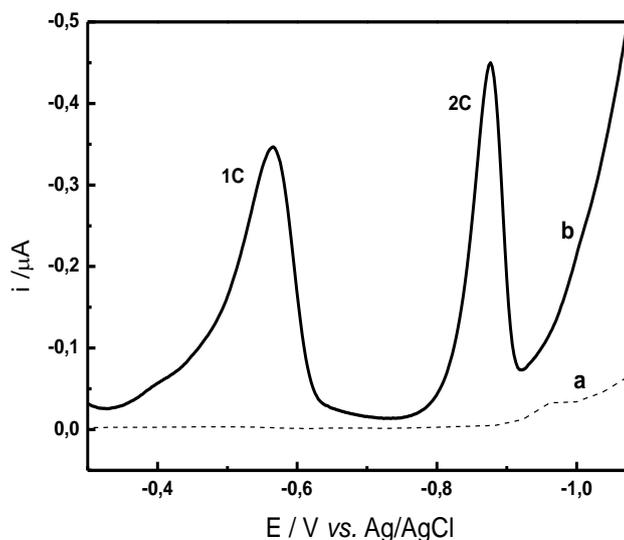


Figura 10 - Voltamogramas de onda quadrada para uma solução do CF $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,5: curva (a) – eletrólito suporte; curva (b) – ceftiofur $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$

Um comportamento similar pode ser observado em pH 4,0, como mostra a Figura 13. Observa-se que a intensidade da corrente de pico aumenta e os potenciais deslocam-se para valores mais negativos com o aumento do pH, indicando que a transferência eletrônica é dependente do pH do meio [176].

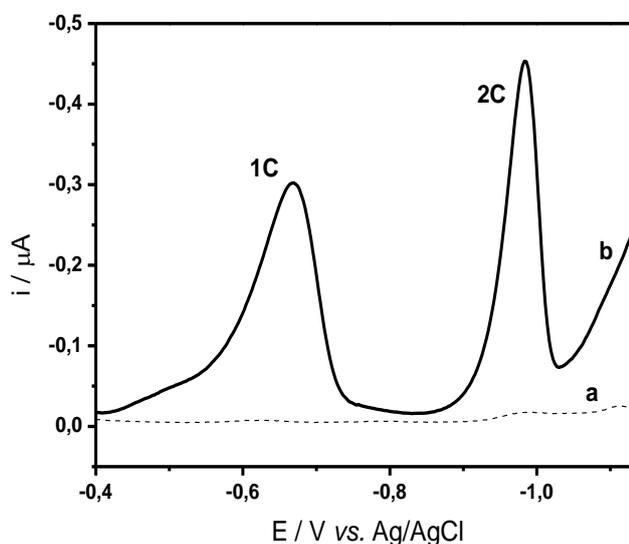


Figura 11 - Voltamogramas de onda quadrada para uma solução do CF $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0: curva (a) – eletrólito suporte; curva (b) – ceftiofur $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, após pré-concentração de 50 s e -0,25 V

O pico 1C apresentou em toda faixa de estudo de pH correntes de pico (i_{pc}) ligeiramente inferiores aos do pico 2C e largura de pico ($W_{1/2}$) maior.

A natureza e o pH do eletrólito de suporte estão entre os fatores mais importantes que influenciam fortemente a estabilidade dos analitos e seus processos catódicos e adsorção. A dependência da corrente de pico sobre o pH para as soluções tampão utilizadas é apresentada na Figura 14.

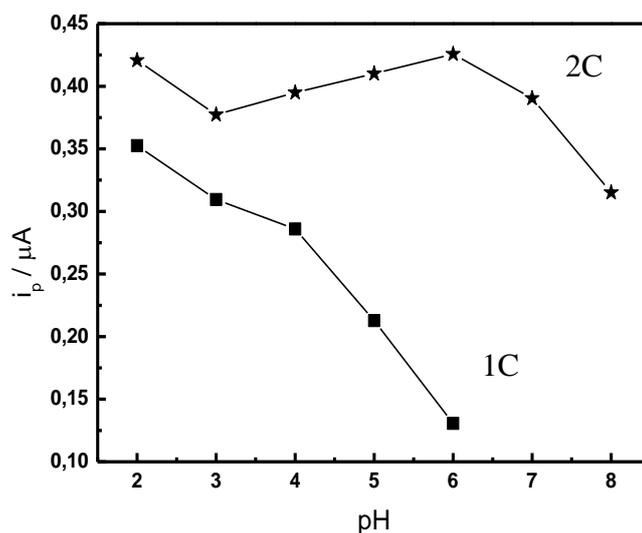


Figura 12 - Influência do pH na resposta da corrente de pico para redução eletroquímica de $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ do CF sobre a superfície do HMDE em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. Condições: $f = 60 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 2,5 \text{ mV}$ e $E_{sw} = 25 \text{ mV}$

Analisando-se esses resultados, observou-se que a corrente para o pico 2C (i_{p2C}) sofre um ligeiro decréscimo no valor de pH 3,0, voltando a aumentar até o pH 6,0, já em valores de pH superiores a 6,0 exibe nova queda até o pH 8,0, desaparecendo a seguir. O valor de corrente para o pico 1C (i_{p1C}) diminui gradualmente em valores de pH acima de 2,0 até atingir o pH 6,0, a partir do qual o pico desaparece.

A queda acentuada da corrente do pico 2C com a variação do pH observada, entre o intervalo de pH 2,0 a 6,0, pode ser um indicativo de que reações de protonação estejam ocorrendo para o processo de redução do CF [177]

O estudo de pH também possibilitou registrar o aparecimento de um novo pico (3C) (Figura 15), produto do início de um processo de hidrólise do ceftiofur em pH 5,0.

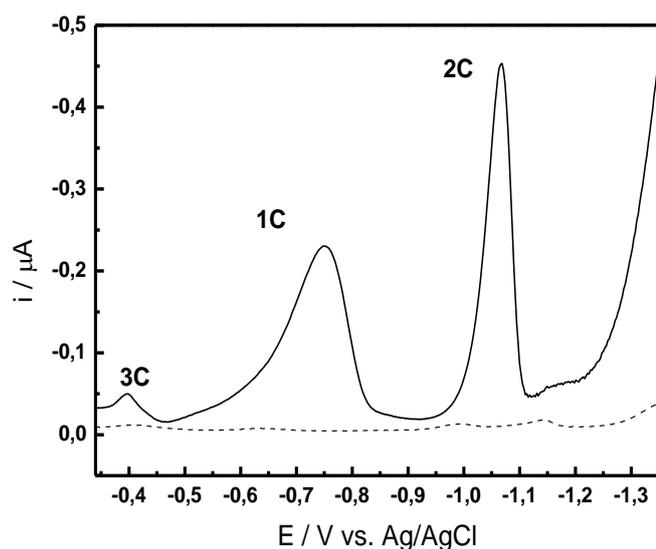


Figura 13 - Voltamogramas de onda quadrada para o CF em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, em pH 5,0. Condições: $f = 60 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 2,5 \text{ mV}$ e $E_{sw} = 25 \text{ mV}$

O fato das correntes de pico variarem marcadamente em função do aumento do pH pode ser atribuído à existência de diferentes espécies iônicas (equilíbrio ácido-base) presentes em solução ou da alteração do grau de adsorção do analito sobre o eletrodo. No entanto, considerando que a intensidade de corrente é máxima, ao redor de pH 2,5 esta condição foi adotada para propósitos analíticos quantitativos.

Conforme citado anteriormente e como pode ser visto na Figura 16, o E_{p1C} e E_{p2C} deslocam-se para valores mais negativos com o aumento do pH do meio, este comportamento é típico de processos onde ocorre prévia protonação da espécie. O início deste forte deslocamento mais pronunciado para pico 1C, indica o pH onde a protonação torna-se o fator limitante da velocidade global da reação eletrodica.

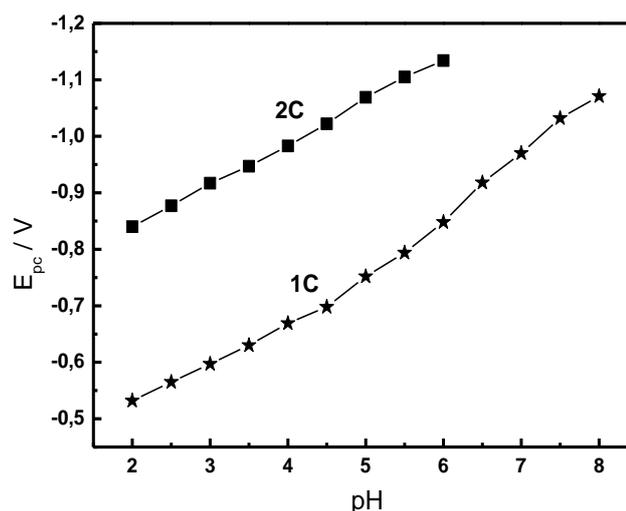


Figura 14 - Relação entre potencial do pico 1C e 2 C em função da variação do pH do meio de 2,0 a 8,0. Condições: solução do CF $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$

Este comportamento foi confirmado utilizando-se a inclinação da relação linear entre o potencial de pico e o pH, dada por:

$$E_{p1C} = -0,323 - 0,0907\text{pH} \quad (1)$$

que, relacionando-se 90,7 mV com a equação de Nernst (60 mV de inclinação para a transferência de n prótons e n elétrons, com $n = 1,2,3\dots$), mostra a possibilidade de envolvimento do mesmo número de prótons e elétrons na redução eletroquímica [178]. A Figura 16 apresenta também as relações entre potencial de pico 1C com a variação do pH do eletrólito suporte, com coeficiente de correlação $R = 0,994$.

O potencial do pico 2C também mostra uma dependência com a variação no pH, indicando a participação de prótons nesta etapa. $65,1 \text{ mV}/\Delta\text{pH}$

$$E_{p2C} = -0,723 - 0,0651\text{pH} \quad (2)$$

A presença do grupo metóxiimino na molécula do CF é muito importante para o seu comportamento químico e eletroquímico. Em estudos anteriormente realizados relativos ao comportamento eletroquímico do cefetamet, também uma cefalosporina de terceira geração resultou em um esquema mecanístico de redução para o grupo o-metiloxima deste anbitiotico. Ficou demonstrado que sua redução ocorre em duas etapas, correspondendo à redução para imina e amina, respectivamente. Estes dois processos envolvendo dois elétrons são causados pelas diferenças na posição e velocidade no estabelecimento do equilíbrio ácido-base resultando na protonação do grupo oxima e imino [179].

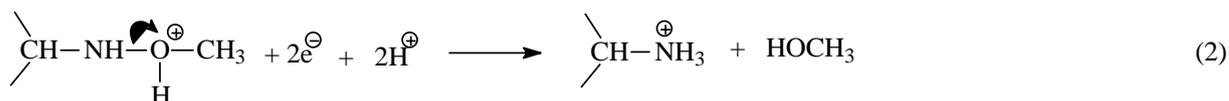
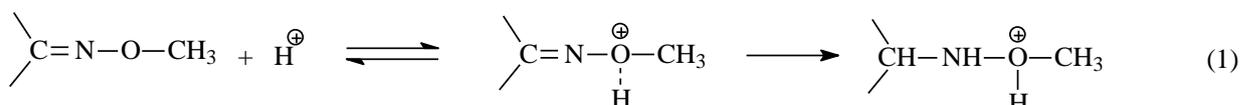
A redução do grupo metoxiimino na molécula do CF ocorre em dois passos: o grupo N-OCH₃ é protonado e a seguir a ligação N-O é quebrada, produzindo uma imina.

Contudo, os dados obtidos confirmaram também o mecanismo de reação proposto por Hall *et al.* [180], para a redução da dupla ligação do anel cefema são válidos para as cefalosporinas.

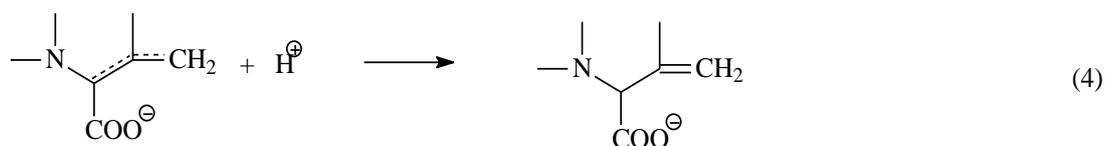
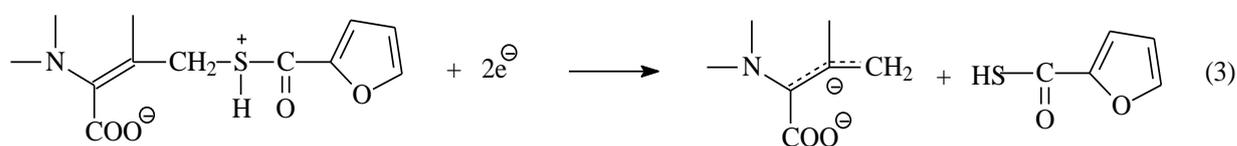
Com base nos resultados obtidos no estudo de redução do ceftiofur em eletrodo de mercúrio e informações da literatura para compostos de estrutura similar [181-183] é possível apresentar o seguinte esquema de redução para o ceftiofur:

Meio ácido

Esquema 1 - Primeira etapa de redução



Esquema 2 - Segunda etapa de redução



III.4 Avaliação dos parâmetros voltamétricos para determinação de ceftiofur por VOQ

Os parâmetros da VOQ são: a frequência de aplicação dos pulsos (f), a amplitude de pulsos (E_{sw}) e o incremento de varredura (ΔE_s). Esses parâmetros podem influenciar diretamente nas respostas voltamétrica do sistema avaliado. Ou seja, por meio da otimização destes parâmetros, é possível obter um melhor sinal analítico e melhor perfil voltamétrico do sistema em estudo.

Além dos parâmetros da técnica, foram otimizados o potencial e o tempo de deposição, uma vez que, constatou-se nos testes preliminares a necessidade de se pré-acumular o analito na superfície do eletrodo de mercúrio.

III.4.1 Efeito do tempo de deposição

O tempo de deposição do CF sobre a gota de mercúrio foi avaliado em uma solução $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,5, variando-se o tempo de acúmulo de 0 a 210 s com um potencial de pré-acúmulo fixado em $-0,25 \text{ V}$.

Na Figura 17 são apresentados os voltamogramas de onda quadrada para tempos de deposição de 0 a 210s.

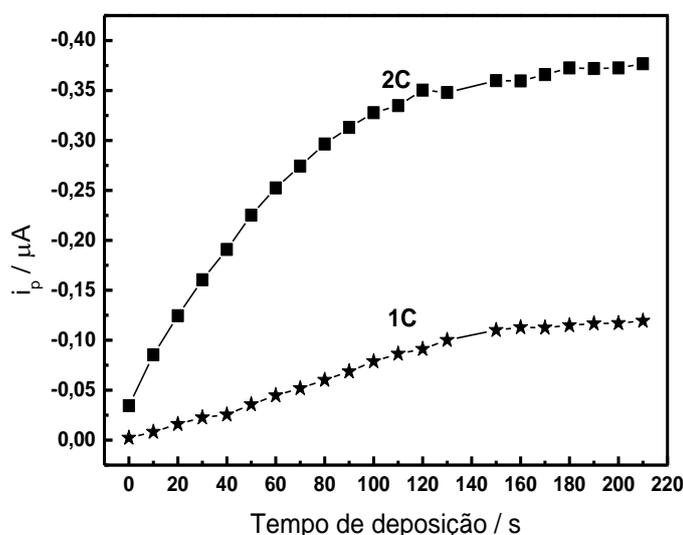


Figura 15 - Efeito do tempo de deposição sobre a corrente de pico do CF em pH 2,5

Sabe-se que o tempo necessário para alcançar o equilíbrio da adsorção de um composto em soluções diferentes é distinto. Para empregar a pré-concentração adsortiva como uma ferramenta analítica devemos saber a condição limite já que tempos curtos diminuem a sensibilidade e tempos demasiadamente longos conduzem a sinais voltamétricos fora da região de proporcionalidade entre a corrente e a concentração e tornam a aplicação da técnica de adição padrão impossível, devido à saturação (sítios disponíveis) em certas concentrações. Para evitar isso, duas curvas representando a dependência das correntes de pico adsortiva (1C e 2C) com o tempo de acúmulo foram construídas para o composto.

Ao analisar a Figura 17, pode-se observar que há uma pequena resposta voltamétrica para ambos os picos, quando não é aplicado tempo para deposição do antibiótico na superfície do eletrodo de mercúrio ($t = 0$), ou seja, para fins analíticos é imprescindível que ocorra uma etapa de pré-deposição do analito. Quando aplicou-se $t_{\text{dep}} = 50$ segundos, a i_{pC} aumentou acentuadamente tendendo, a seguir, para valores estáveis (platô), indicando que há uma mudança no processo eletródico de adsorção controlada para difusão controlada [184]. Geralmente, a corrente de pico aumenta com o tempo de deposição, porém as dependências não lineares obtidas sugerem também a saturação da superfície do eletrodo [185]. A variação do tempo de deposição não produziu mudanças significativas no valor do potencial de pico.

Por esta razão, todos os experimentos seguintes foram realizados utilizando o tempo de deposição de 50 s.

III.4.2 Efeito do potencial de deposição

Na Figura 18 é apresentado o efeito do potencial de deposição, no intervalo entre -0,10 a -0,8 V, fixando o tempo de deposição em 50 s.

Pode-se observar que a corrente do pico 1C atinge a sua maior intensidade para potenciais de deposição próximos a -0,30V, enquanto o pico 2 C em potenciais próximos a -0,50V. As correntes diminuem quando o potencial tornava-se mais negativo, indicando uma extensão menor da adsorção em potenciais menores [186]. Desta forma, buscando estabelecer um valor de potencial de deposição que fosse favorável para ambos os processos de redução foi escolhido o potencial de -0,30 V em todas as medidas subsequentes.

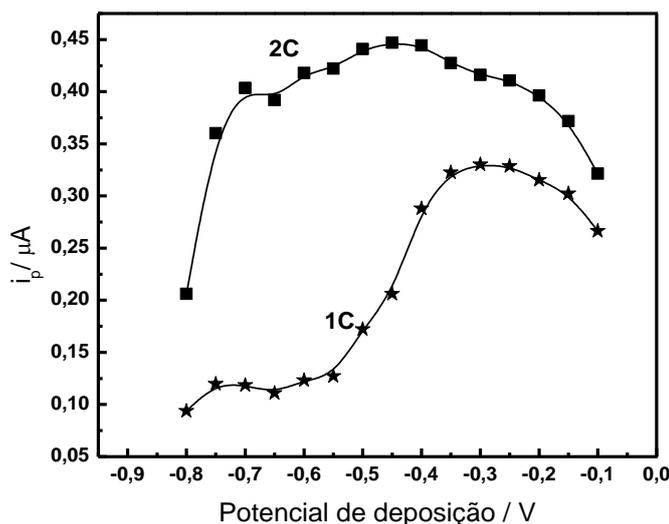


Figura 16 - Efeito do potencial de deposição na corrente de pico de redução do CF nas condições estabelecidas anteriormente

III.4.3 Efeito da frequência de aplicação dos pulsos

A frequência de aplicação de pulsos de potencial é um parâmetro importante na VOQ, isto porque, mantendo-se constante a concentração, é a frequência que determina a intensidade dos sinais e, conseqüentemente, a sensibilidade do método. As análises possibilitam, ainda, uma observação do tipo de processo e do número de elétrons envolvidos na transferência eletrônica. Quando é realizada a variação da frequência em uma dada análise, faz-se uma variação na velocidade com que a varredura de potencial é realizada e isto influencia intensamente os resultados finais.

A Figura 19 mostra os valores de corrente de redução obtidos para frequências no intervalo de 30 a 210 Hz. Na Figura 20 observa-se que, com o aumento do valor de frequência, ocorre um aumento proporcional de intensidade de corrente e também um pequeno deslocamento dos potenciais de pico (1C e 2C) para regiões mais negativas. Portanto, as correntes de pico são funções lineares da frequência. De acordo com as teorias aceitas para a VOQ, este comportamento corresponde a um processo totalmente irreversível controlado por adsorção das espécies sobre a superfície do eletrodo [187].

A observação dos voltamogramas obtidos sugeriram que, a frequência de 90 Hz promove uma boa sensibilidade, sem prejudicar o sinal, deste modo, foi adotada para o prosseguimento dos estudos, pois, frequências maiores provocaram o alargamento dos picos ($W_{1/2}$) e deslocamento da linha de base.

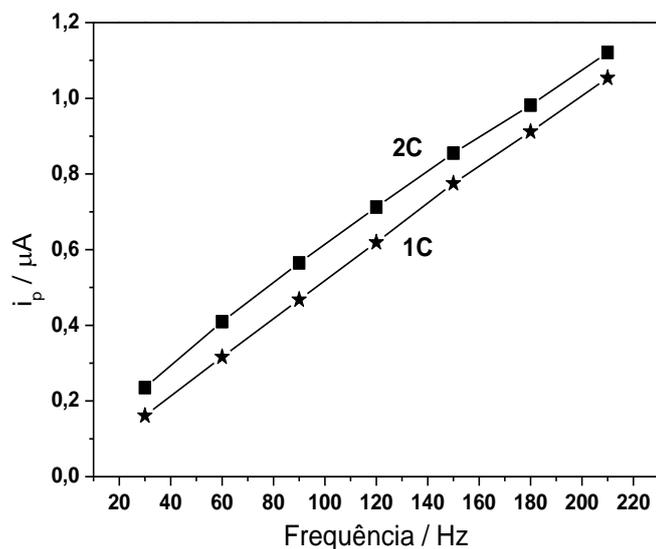


Figura 17 - Avaliação da aplicação da frequência de pulsos de onda quadrada na corrente de pico de redução do CF

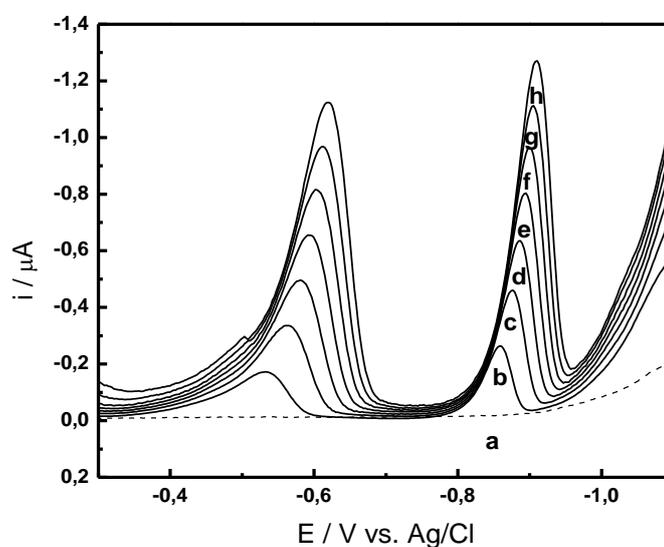


Figura 18 - Voltamogramas obtidos através da variação da frequência de aplicação de pulsos nas correntes de picos do CF, onde: (a) BR pH 2,5, (b) 30 Hz, (c) 60 Hz, (d) 90 Hz, (e) 120 Hz, (f) 150 Hz, (g) 180 Hz e (h) 210 Hz

Segundo a teoria proposta por Osteryoung [188], para sistemas totalmente irreversíveis, com processos controlados pela difusão das espécies, e com reagentes e/ou produtos adsorvidos, a intensidade da corrente varia linearmente com a frequência de pulso de potenciais.

III.4.4 Efeito da amplitude dos pulsos

Em seguida, a influência da amplitude de aplicação dos pulsos de potencial (E_{sw}) foi avaliada sobre a intensidade da i_{p1C} e i_{p2C} . Para sistemas redox totalmente irreversíveis, a sensibilidade analítica na voltametria de onda quadrada também sofre grande influência da variação da amplitude da onda, isto porque a largura de meia onda se mantém constante para amplitudes maiores que 20 mV [187]. A Figura 21 mostra o efeito da variação deste parâmetro para valores entre 10 e 150 mV.

Ao variar a amplitude no intervalo de 10 e 150 mV, observa-se um aumento na intensidade dos sinais das correntes de pico até 60 mV, valores de amplitudes maiores não afetaram de forma significativa a sensibilidade (Figura 22), e assim optou-se por utilizar uma amplitude de 50 mV nos experimentos subsequentes com o ceftiofur. Este comportamento está de acordo com a teoria da VOQ, desenvolvida para sistemas totalmente irreversíveis com a espécie adsorvida na superfície do eletrodo, que assegura que para amplitudes acima de 50 mV a corrente de pico é constante. Outro comportamento característico, apresentado para sistemas irreversíveis é o deslocamento do potencial de pico observado com o aumento da amplitude.

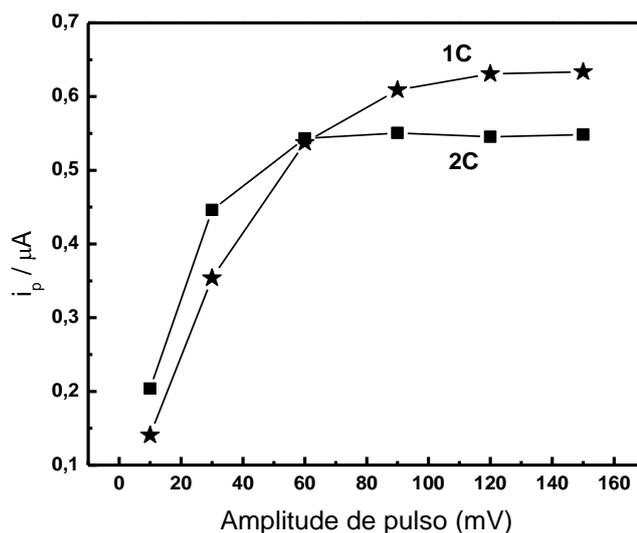


Figura 19 - Influência da amplitude de pulso na corrente de pico de redução do CF, para uma solução do CF $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,5

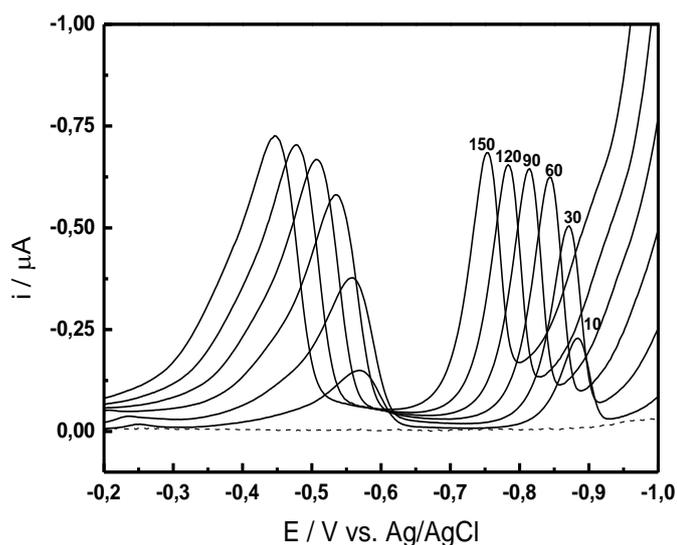


Figura 20 - Voltamogramas do CF em pH 2,5 para diferentes valores de amplitude de pulso (10 a 150 mV) em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 2,5. $f = 90$ Hz; $t_{\text{dep}} = 50$ s; $E_{\text{dep}} = -0,30$ V

III.4.5 Influência do incremento de varredura

A velocidade na voltametria de onda quadrada é igual ao produto da frequência pelo incremento de varredura. Desta forma, um incremento de varredura maior pode proporcionar um aumento na intensidade do sinal obtido, melhorando assim a sensibilidade da técnica. Porém, com incrementos excessivamente altos podem ocorrer alargamentos dos picos, comprometendo a resolução dos voltamogramas.

A Figura 23 exhibe o efeito da variação do incremento de varredura entre 2 a 10 mV sobre corrente de pico de redução do CF e a Figura 24 apresenta a resolução dos voltamogramas (sinal obtido) para essa variação. É possível verificar que, incrementos de pulsos maiores do que 8,0 mV promovem o deslocamento dos picos para potenciais mais negativos e o aumento da largura dos picos, prejudicando consideravelmente a resolução, o que está relacionado com perda na seletividade. Desta forma, optou-se por trabalhar com valor de incremento de varredura de 4,0 mV, já que, este proporcionou a melhor relação entre ganho de corrente/sinal obtido. As condições otimizadas são apresentadas na Tabela 3.

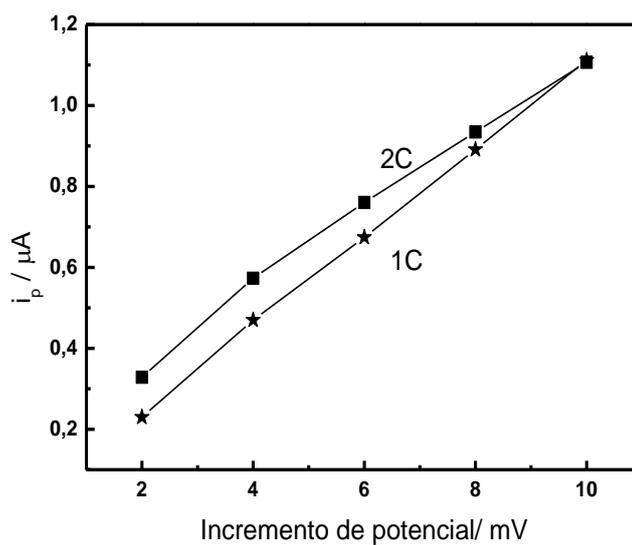


Figura 21 - Avaliação do incremento de potencial na corrente de pico do CF $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,5. $f = 90 \text{ Hz}$; $a = 30 \text{ mV}$; $t_{\text{dep}} = 50 \text{ s}$; $E_{\text{dep}} = -0,30 \text{ V}$

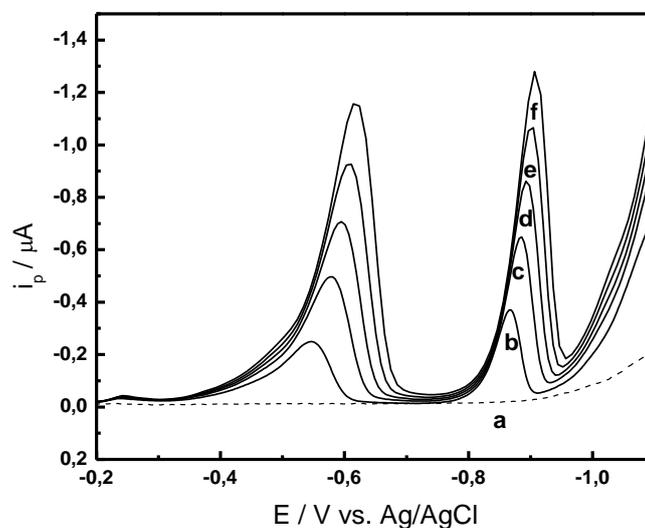


Figura 22 - Voltamogramas representativos da variação do incremento de varredura sobre corrente de pico de redução do CF, onde: (a) branco; (b) 2 mV; (c) 4 mV; (d) 6 mV; (f) 8 mV; (g) 10 mV; $f = 90 \text{ Hz}$; $E_{\text{sw}} = 30 \text{ mV}$; $t_{\text{dep}} = 50 \text{ s}$; $E_{\text{dep}} = -0,30 \text{ V}$

Tabela 3 - Parâmetros otimizados

Parâmetros	Valores
Tempo de acúmulo	50s
Potencial de deposição	- 0,30 V
Frequência de aplicação dos pulsos	90 Hz
Amplitude dos pulsos	50 mV
Incremento de varredura	4 mV

III.5 Determinação da curva analítica do ceftiofur

Após a otimização das condições experimentais, estudos foram realizados em diferentes concentrações do CF, monitorando-se o sinal de redução eletroquímica para o pico 2C. A Figura 25 e 26 apresentam os voltamogramas de onda quadrada e curva analítica representativos, obtidos no intervalo de concentração de 52,4 to 524 ng mL⁻¹ em tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 2,5. Observou-se que a intensidade de corrente de pico aumenta proporcionalmente com o aumento da concentração e que não ocorre deslocamento significativo nos potenciais, como comprova a Figura 25.

A equação média para três experimentos é representada por: $i_{p2C} (\mu A) = (-1,05 \times 10^{-7} \pm 1,70 \times 10^{-8}) + (-0,64 \pm 4,10 \times 10^{-3})C$ ($C = \text{ng mL}^{-1}$), with $r = 0,997$ and $n = 10$. Já os parâmetros obtidos para a curva analítica são demonstrados na Tabela 4. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados usando a relação $3DP/b$ e $10DP/b$ de LD e LQ, respectivamente, onde DP representa o desvio padrão da média aritmética de dez medidas do branco, obtidas no mesmo potencial de redução do pico 2C e b é a inclinação da curva analítica.

A alta sensibilidade do método também foi acompanhada de repetibilidade adequada. O desempenho analítico foi avaliado a partir de 10 medidas sucessivas do sinal eletroquímico de uma solução padrão de CF $5,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e na presença do leite UAT. A precisão e o desvio padrão relativo (DPR) foram de 0,55% e 1,74%, respectivamente.

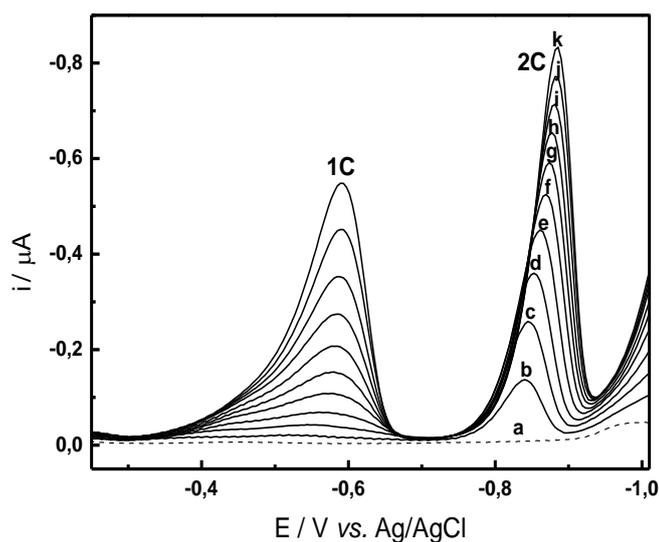


Figura 23 - Voltamogramas representativos das curvas obtidas, onde: (a) branco; (b) $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹; (c) $2,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹; (d) $3,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹; (e) $4,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹; (f) $5,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹; (g) $6,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹; (h) $7,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, (i) $8,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ (j) $9,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e (k) $10,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹

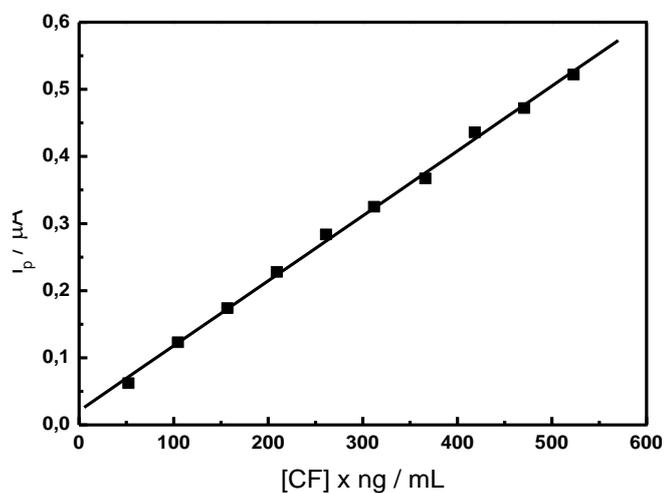


Figura 24 - Curva analítica do padrão CF (pico 2C) em tampão BR: $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,5

Tabela 4 - Parâmetros obtidos da curva analítica do fármaco CF

Parâmetros	Valores
Intervalo de concentração (ng mL ⁻¹)	52,4 – 524,0
Intercepto (A)	-1,05 x 10 ⁻⁷
Desvio Padrão (A)	1,127 x 10 ⁻⁹
Inclinação (ALmol ⁻¹)	-0.64
Coefficiente de Correlação	0,997
LD (ng mL ⁻¹)	1,86
LQ (ng mL ⁻¹)	6,20

Apesar da boa linearidade e resolução obtidas no estudo, para o pico 2C, o mesmo não foi observado para o pico 1C, o qual apresentou valores de correntes significativos apenas acima da faixa de concentração de interesse, motivo pelo qual não foi utilizado no prosseguimento dos estudos.

A comparação dos limites de detecção e quantificação (LD e LQ) obtidos com o método eletroanalítico desenvolvido, com valores da literatura, utilizando outras técnicas analíticas, confirmaram a boa sensibilidade do método. Constatou-se que os valores obtidos são inferiores e/ou próximos aos obtidos por CLAE e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em "tandem" com ionização por "electrospray" (LC-ESI/MS/MS) (Tabela 5).

Tabela 5 - Limites de detecção e quantificação

Método	LD (ng mL ⁻¹)	LQ (ng mL ⁻¹)
Proposto	274	9,16
Ref. [74]	7,0	9,0
Ref. [91]	10	25

III.6 Estudo de interferentes

Certos componentes do leite, tal como a caseína, lactose, gorduras, vitaminas, etc, mesmo em baixas concentrações podem ter a capacidade de interferir ou impossibilitar a determinação do fármaco em amostras de leite. Por esta razão, os estudos iniciais revelaram que a determinação direta do fármaco em amostras de leite UAT, não seria possível.

A remoção do material protéico do meio, assim, tornou-se essencial para a determinação do antibiótico nas amostras de leite. Diversos procedimentos de extração e clean-up foram testados com objetivo de eliminar potenciais interferentes presentes nas matrizes estudadas. Os melhores resultados foram obtidos utilizando um procedimento de pré-tratamento simples e rápido, o qual é de fato, uma ligeira modificação do método desenvolvido para a determinação de ceftiofur em leite por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em "tandem" com ionização por "electrospray" (LC-ESI/MS/MS). Ao adicionar uma pequena quantidade de solução 50% acetonitrila/água (v / v) à amostra de leite e submetendo-a a uma etapa de centrifugação, a maioria das substâncias potencialmente interferentes (principalmente proteínas) foram simplesmente removidas por precipitação.

Utilizando o método proposto, nenhum outro pré-tratamento foi necessário, ou passos adicionais de precipitação e diluição.

III.7 Características físico-químicas das amostras de leite UAT

A composição geralmente complexa de matrizes como leite inviabiliza a quantificação direta da maioria dos analitos por grande parte das técnicas analíticas. Desta forma, previamente a etapa de aplicação do método desenvolvido realizou-se um estudo, com o objetivo de avaliar as características físico-químicas do leite UAT (marca A), utilizado neste estudo, bem como se os produtos adquiridos estavam de acordo com os padrões de qualidade determinados pelas legislações vigentes: Instrução Normativa n° 370 de 04.09.1997, Decreto n° 30.691 de 29.03.1952 e Resolução RDC n° 360 de 23.12.2003.

As amostras de leite UAT integral foram coletadas nos meses de abril de 2008 a dezembro de 2011, em supermercados de pequeno e grande porte localizados no Estado de Mato Grosso do Sul. A data de validade do leite UAT é determinada pela indústria, mas de maneira geral é de 120 dias. Desta forma, todas as amostras analisadas estavam dentro do prazo de validade e com no máximo 60 dias de fabricação.

As características físico-químicas estudadas compreenderam a determinação da acidez em ácido láctico, gordura, estabilidade ao etanol 68%, características sensoriais, pesquisa de amido, pesquisa de etanol, pesquisa de cloreto, índice crioscópico, carboidratos redutores em lactose, extrato seco desengordurado (ESD), densidade a 15 °C (g/cm^3) e do IC (índice crioscópico), conforme metodologia da Instrução Normativa nº 68 de 12.12.2006 e IAL (2005).

Os resultados obtidos demonstraram que todas as amostras estavam de acordo com a legislação.

III.8 Ocorrência de resíduos de antibióticos β -lactâmicos em leite UAT e pasteurizado tipo C produzido e comercializado no estado de Mato Grosso do Sul

Com o objetivo de investigar a presença de resíduos de antibióticos β -lactâmicos e tetraciclina no leite UAT e tipo C, realizou-se também um estudo em 40 amostras de leite produzidas em usinas de beneficiamento e comercializado na cidade de Campo Grande no Estado de Mato Grosso do Sul, no período de junho de agosto de 2009 a julho de 2010. As amostras eram compostas por 16 marcas comerciais beneficiadas, principalmente por médias e grandes indústrias laticinistas.

Para detectar os resíduos de antibióticos β -lactâmicos, adotou-se a técnica do kit snap β -lactâmicos, este um imunoenensaio do tipo Elisa e para tetraciclina empregou-se o kit snap tetraciclina, também um imunoenensaio. A Tabela 6 representa a ocorrência de resíduos de antimicrobianos em amostras de leite comercializado no Estado. Os dados revelam que, das 40 amostras analisadas, 2 apresentaram resíduos de antimicrobianos, representando 5,0% do total de amostras analisadas.

Tabela 6 - Frequência de resíduos de β -lactâmicos e tetraciclina em amostras de leite UAT integral e padronizado e leite pasteurizado tipo B e C produzidos no Estado de Mato Grosso do Sul, no período de agosto de 2009 a julho de 2010

Resíduos de β -lactâmicos e tetraciclina	nº de amostras	%
Ausência	38	95,0%
Presença	02	5,0%
Total	40	100%

Com relação às marcas comerciais, das 16 marcas submetidas ao exame, 12,5% apresentaram, em uma ou mais amostras, presença de antimicrobianos. (Tabela 7).

A ocorrência encontrada, provavelmente, se deve à antibióticoterapia amplamente utilizada, principalmente no tratamento das mastites.

Tabela 7 - Frequência de resíduos de β -lactâmicos e tetraciclinas em amostras de leite UAT integral e padronizado e leite pasteurizado tipo B e C produzidos no Estado de Mato Grosso do Sul segundo as marcas comerciais, no período de agosto de 2009 a julho de 2010

Resíduos de β -lactâmicos e tetraciclinas	n° de marcas comerciais	%
Ausência	14	87,5%
Presença	02	12,5%
Total	16	100%

III.9 Determinação do CF em amostras de leite UAT utilizando o método eletroquímico

A metodologia desenvolvida foi aplicada para a determinação do CF em amostras de leite UAT, utilizando o método de adição de padrão. A técnica de adição de padrão é muito aplicada nos métodos eletroquímicos para contrabalancear o efeito de matriz. Desta forma, o objetivo principal, é realizar as medidas em condições muito próximas das condições das amostras, onde, as interferências que afetam as correntes de pico da amostra, afetam também do mesmo modo as correntes de pico referente ao analito mais às alíquotas da solução sucessivamente adicionadas sobre a amostra.

Voltamogramas e curva analítica representativos de uma amostra de leite UAT fortificada com $104,71 \text{ ng mL}^{-1}$, após sucessivas adições de padrão ceftiofur são apresentados nas Figuras 27 e 28. Como observado na amostra, os potenciais de pico (E_p) de redução do antibiótico deslocaram-se para regiões mais negativas em relação ao eletrólito de suporte puro. Este comportamento era esperado, uma vez que, essas respostas refletem a interferência dos componentes do leite, ainda presentes na amostra. Contudo, a interferência apresentada não afetou a sensibilidade analítica, e o procedimento proposto pôde ser empregado com sucesso na avaliação de recuperação pelo método de adição de padrão.

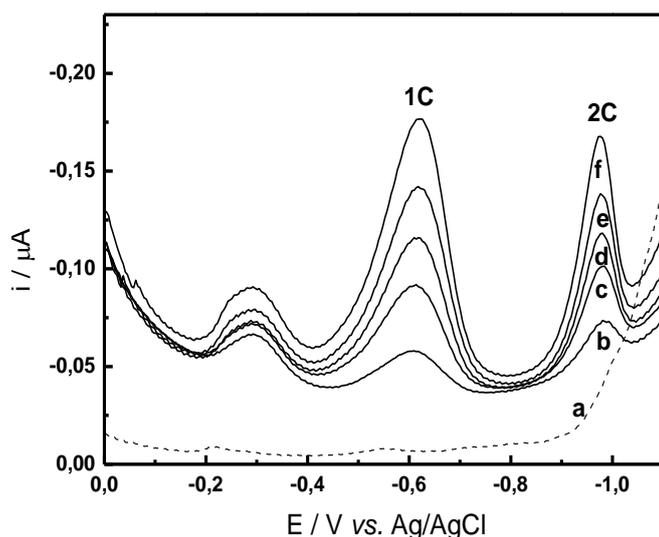


Figura 25 - Voltamogramas obtidos para o CF na amostra A, nas condições: BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, pH 2,5 e demais condições otimizadas, onde: (a) branco tampão BR pH 2,50 $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, (b) amostra de leite UAT após extração, (c) $2,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, (d) $4,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, (e) $6,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e (f) $8,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$

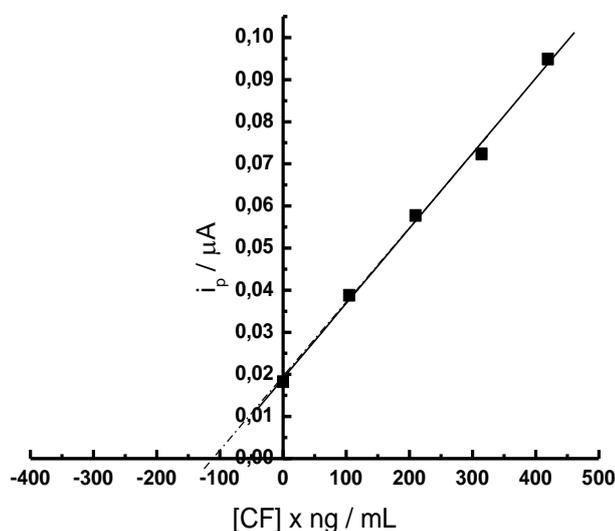


Figura 26 - Curva de adição de padrão, obtidos para o CF na amostra A, nas condições: BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, pH 2,5 e demais condições otimizadas

Os resultados obtidos para quantificação do CF presentes nestas matrizes pelo método de adição padrão são apresentados na Tabela 8, e cujos valores revelam que as recuperações obtidas no processo extração em amostras de leite UAT são aceitáveis. A partir dos valores de desvio padrão relativos (DPR) avaliados para as medidas aplicadas na adição padrão, foi possível estimar a precisão do método proposto. Estes resultados são satisfatórios, de modo que o método pode ser utilizado na quantificação deste composto em matrizes complexas como o leite bovino.

Tabela 8 - Determinação do CF utilizando o método proposto comparado com o CLAE

Método	Adicionado (mol L ⁻¹)	Encontrado ^a (mol L ⁻¹)	Recuperação (%)	DPR (%)	F ^b	t ^b
Eletroquímico	104,71	105,79	101,03	3,75	6,33	7,36
	209,42	214,23	101,96	2,13	8,51	25,13
	418,85	407,98	97,41	1,51	2,28	15,79
HPLC	104,71	93,05	88,80	0,90	-	-
	209,42	170,31	81,30	1,84	-	-
	418,85	331,36	78,01	2,78	-	-

^a Média para quatro determinações; Desvio padrão relativo, F = Teste F com nível de confiança de 95% (F_{crítico} = 9,28), t = Teste t Student com nível de confiança de 95% (t_{crítico} = 2,447)

^b Comparação entre os métodos de VOQ e HPLC.

III.10 Determinação do CF em amostras de leite UAT utilizando o método CLAE

Com a finalidade de obter resultados comparativos que permitissem testar a viabilidade da utilização do método eletroanalítico proposto neste trabalho, paralelamente foi realizado estudo comparativo utilizando um método referência para determinação do ceftiofur utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência.

A Figura 29 apresenta o cromatograma obtido após eluição no modo isocrático e detecção em 270 nm para solução padrão 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ do antibiótico, em coluna de fase reversa C18 (250 x 4,0 mm, 5,0 μm). A análise deste cromatograma permitiu observar que o fármaco exibe um pico cromatográfico com tempo de retenção (t_r) de aproximadamente 39,0 minutos.

A partir dos valores de área obtidos dos cromatogramas gerados através da injeção de soluções padrão do CF, curvas de calibração analíticas foram construídas (Figura 30). Uma relação linear foi obtida na faixa de concentração de 52,3 a 523,0 ng mL⁻¹ com equação de regressão de área. = 157,71 - 16,29 C_{CF} (ng mL⁻¹), r = 0,999.

A partir dos parâmetros apresentados na Tabela 9 calculou-se o limite de detecção (LD) usando a relação matemática: (3DP/b) e limite de quantificação (LQ) (10DP/b). Em que, DP representa o desvio padrão da curva obtida para o pico do CF no tempo de retenção de ≈ 39,0 minutos e b, a inclinação da curva de calibração. O LD encontra-se representado na Tabela 9, cujo valor indica que a técnica possuía detectibilidade suficiente para o propósito pretendido.

Tabela 9 - Parâmetros analíticos obtidos da curva analítica

Intervalo linear ng mL ⁻¹	Intercepto (Área)	<i>b</i> (Área ng mL ⁻¹)	<i>r</i>	LD (ng mL ⁻¹)	LQ (ng mL ⁻¹)
52,3 - 523,0	- 157,71	16,30	0,999	27,5	91,7

r = coeficiente de correlação linear; *b* = Coeficiente angular; LD = limite de detecção; LQ = limite de quantificação.

Assim, o método foi aplicado para na determinação do antibiótico CF em amostras de leite bovino UAT, a partir do uso do método de padrão externo. Os resultados obtidos para os testes de eficiência de extração, assim como, os valores de DPR encontram-se listados na Tabela 10. Comparando estes resultados com os obtidos pelo método eletroanalítico, observa-se que a técnica cromatográfica apresentou um LD superior.

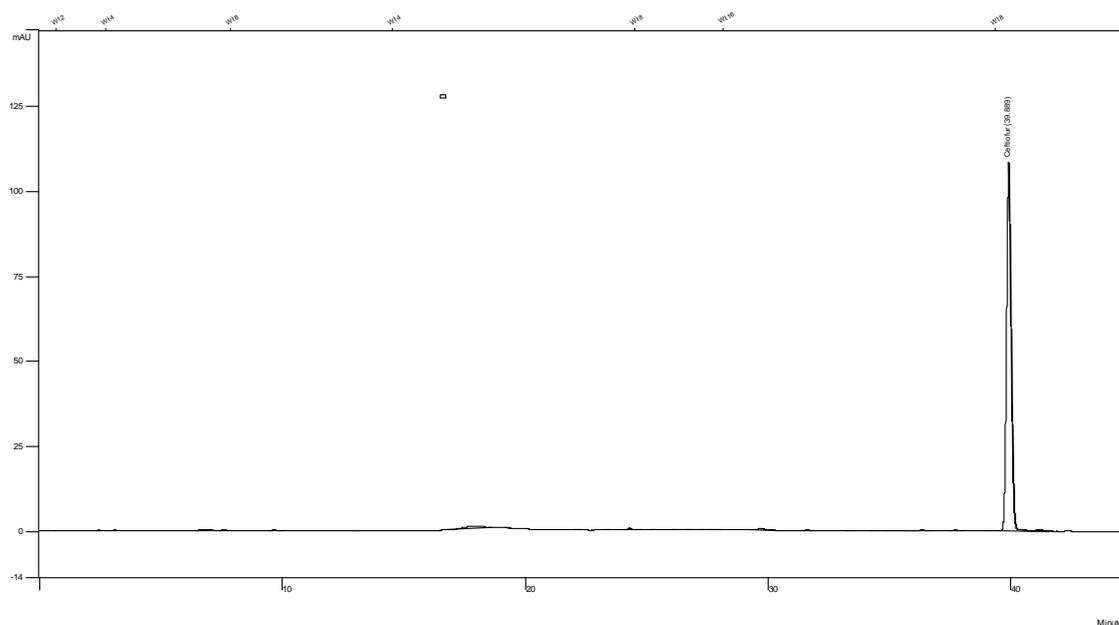


Figura 27 - Perfil cromatográfico para uma solução $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ do antibiótico CF. Condições: Fase móvel: acetonitrila : água na forma gradiente vazão de 1,0 mL min⁻¹

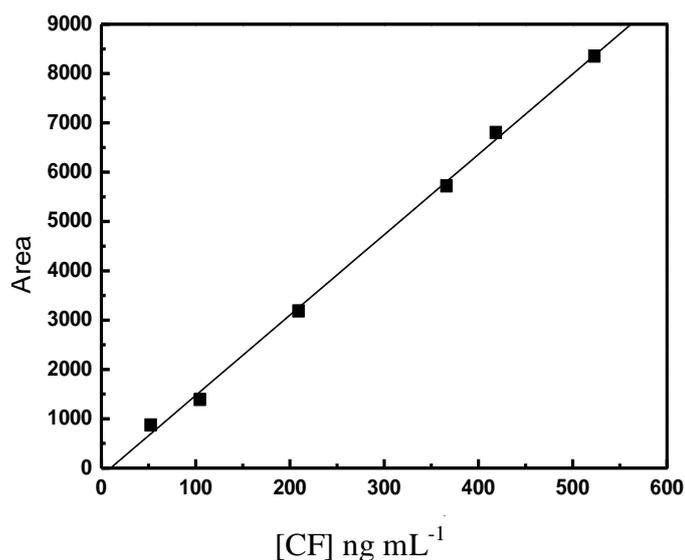


Figura 28 - Curva analítica obtida para a detecção do antibiótico em diferentes concentrações com detecção em 270 nm

A Figura 31 mostra os cromatogramas obtidos para solução padrão 418,40 ng mL⁻¹ do antibiótico CF e uma amostra fortificada com 418,40 ng mL⁻¹ do fármaco, após processo de extração (seção 2.3.4.2) e submetidas à análise empregando as condições cromatográficas anteriormente descritas. Como pode ser verificada, a presença de picos e perturbações na linha-base durante os primeiros 30,0 minutos de análise revelam que, nesta condição os componentes mais polares presentes na amostra não foram totalmente eliminados. Entretanto, este efeito não comprometeu a detecção do ceftiofur, cuja eluição em tempo de retenção de \approx 39,0 minutos, permitiu identificar e quantificar o fármaco com precisão e exatidão aceitáveis (Tabela 11).

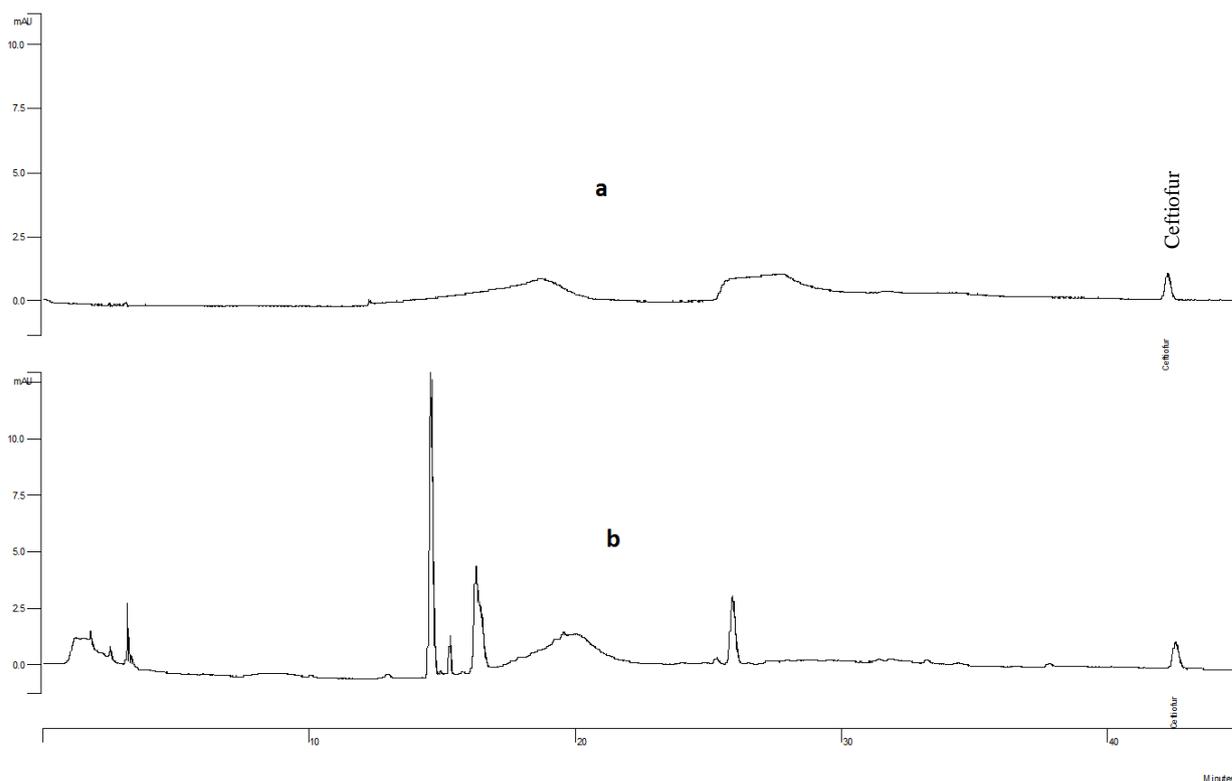


Figura 29 - Cromatogramas registrados para análise de amostras de leite bovino UAT (amostra A). (a) Solução padrão $418,40 \text{ ng mL}^{-1}$ do antibiótico CF e (b) Amostra A contendo $418,40 \text{ ng mL}^{-1}$ do antibiótico CF, após ser submetida à extração como mencionado no procedimento seção 2.3.4.2

Para verificar se a metodologia proposta era compatível com o método cromatográfico, aplicou-se o teste estatístico F, para constatar se as variâncias não difeririam significativamente com o valor obtido por cromatografia, conforme demonstrado anteriormente na Tabela 8. Como o valor crítico tabelado para F é igual a 9,283 para um nível de significância de 5,0% e três graus de liberdade e o valor obtido experimentalmente foi menor, conclui-se que não há evidências de diferenças estatisticamente significativas entre os valores comparados.

Porém o valor experimental ($t_{\text{calculado}}$) excedeu o valor teórico, já que o teste estatístico exibiu diferença significativa na comparação dos dados obtidos com os métodos eletroanalíticos e cromatográficos. A diferença nestes testes estatísticos pode ser atribuída aos valores de recuperação ligeiramente inferiores obtidos por meio das análises cromatográficas, o que pode ter sido gerado como consequência do pré-tratamento na etapa de extração em fase sólida realizado na matriz. Como implicação, não é possível comparar o método proposto com o método de referência por meio do teste t de Student.

Este estudo encontra-se publicado no volume 41 (2) do mês de fevereiro de 2011 no periódico Journal of Applied Electrochemistry (ver Anexo A).

Tabela 10 - Resultados de recuperação obtidos para quantificação do antibiótico ceftiofur em amostras de leite bovino

Valor Adicionado (ng mL ⁻¹)	Valor Encontrado ^[a] (ng mL ⁻¹)	Recuperação (%)	DPR (%)
104,71	93,05	88,80	0,90
209,42	170,31	81,30	1,84
418,85	331,6	78,01	2,78

^[a] média de 4 determinações; DPR desvio padrão relativo.

III.11 Estudo da hidrólise do ceftiofur

Apesar dos excelentes resultados obtidos no método desenvolvido anteriormente, para a determinação do ceftiofur em leite bovino, baseados em informações disponíveis na literatura, investigou-se, a seguir, a possibilidade de utilização dos produtos de degradação alcalina do ceftiofur como uma alternativa para a determinação indireta do antibiótico em amostras de leite bovino, uma vez que o próprio meio alcalino poderia propiciar também a hidrólise de componentes presentes no leite, os quais foram interferentes no método.

Os estudos de hidrólise de ceftiofur $5,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ foram realizados na faixa de pH de 2,0 a 11,0, utilizando diferentes temperaturas para acelerar o processo de degradação; o produto foi analisado através do registro de voltamogramas de onda quadrada após cada etapa de aquecimento; sendo neste caso resfriado à temperatura ambiente no momento da leitura.

Em pH 2,5, o ceftiofur apresenta dois picos, situados em -0,565 e -0,874 V (rotulados de 1C e 2C, respectivamente). Em pH 5,0, contudo, um terceiro pico foi detectado em -0,70 V (pico 3C) (Figura 32), correspondendo à redução eletroquímica do produto de hidrólise do ceftiofur. Os experimentos seguintes foram realizados nas situações em que a hidrólise do ceftiofur demonstrou dependência da temperatura e do tempo.

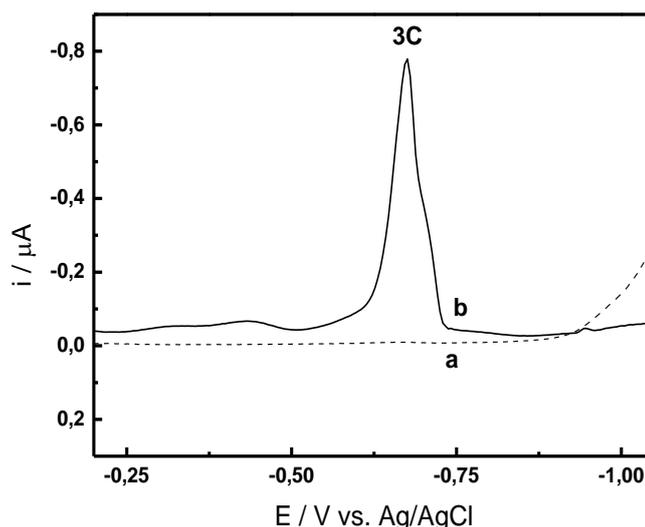


Figura 30 - Voltamograma de onda quadrada de solução de ceftiofur $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ em pH 10,0. Curva – (a) Tampão Britton-Robinson $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, curva (b) – Solução de ceftiofur $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ após 60 minutos de hidrólise

III.11.1 Estudo do pH, tempo e temperatura de hidrólise do ceftiofur

O estudo da hidrólise do ceftiofur foi realizado inicialmente com o objetivo de determinar o melhor pH de hidrólise para o antibiótico, sendo o experimento realizado à temperatura de $25,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e $50,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ com o tempo de hidrólise mantido em 60 minutos. Conforme demonstrado na Figura 33, o processo de hidrólise torna-se significativo do pH 9,0 em diante para ambas temperaturas, com um máximo de corrente alcançados em pH 10,0.

Em $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$, o máximo de corrente de pico (i_{p3C}) para o processo de hidrólise foi observado em pH 10,0. Já a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, o produto responsável por este pico não se forma em quantidade apreciável abaixo de pH 11,0. Um deslocamento do potencial de pico de redução foi observado para regiões mais negativas em todo o intervalo de pH estudado, comportamento este já atribuído a reações de pré-protonação. Considerando que, a intensidade de corrente estão próximas ao máximo de intensidade para ambos os picos, ao redor de pH 10,0, esta condição foi adotada para propósitos analíticos quantitativos.

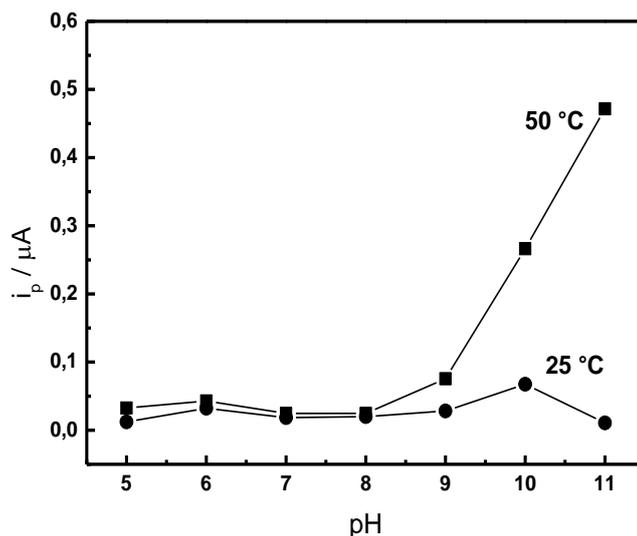


Figura 31 - Influência do pH do eletrólito de suporte

O efeito da temperatura sobre a i_{p3c} foi investigada em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 10,0. A solução foi submetida ao processo de hidrólise por 60 minutos nas temperaturas de 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C . Os resultados obtidos de i_{p3c} na faixa de temperatura estudada são mostrados na Figura 34. Os valores de correntes demonstram nítido aumento no intervalo de 20 a 50°C , atingindo um máximo de corrente em 60°C , razão pela qual esta temperatura foi escolhida para a hidrólise do antibiótico.

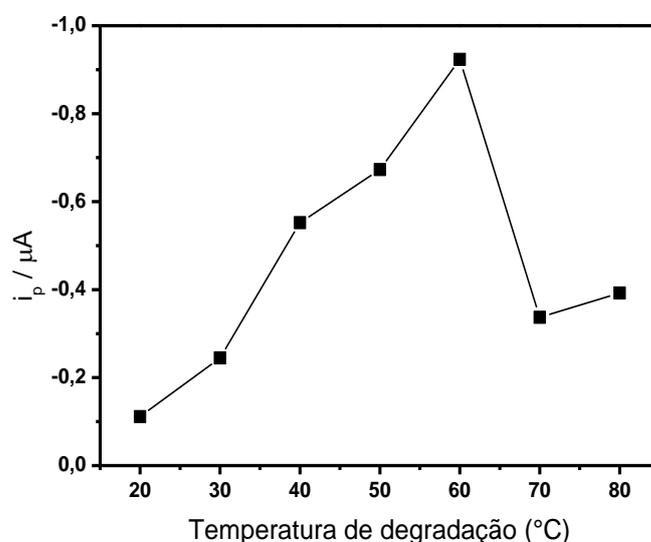


Figura 32 - Influência da temperatura de hidrólise sobre a i_{p3c} , obtidas a partir de voltamogramas de onda quadrada de ceftiofur $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, pré-aquecido por 20,30, 40, 50,60 70 e 80°C , em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 10,0

Já a influência do tempo de hidrólise sobre i_{p3C} foi investigada num intervalo de tempo de 0 à 120 minutos a 60°C, utilizando soluções de ceftiofur $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR pH 10,0. Os dados obtidos confirmam que a corrente do produto de degradação do fármaco aumenta sob condições de tempo longos de aquecimento, sendo que o máximo de corrente de pico foi obtido em 60 minutos (Figura 35). Valores de tempo maiores promovem a queda na corrente de pico, sugerindo que o processo de degradação do antibiótico deve seguir outras rotas. O tempo de 60 minutos foi escolhido para fins analíticos.

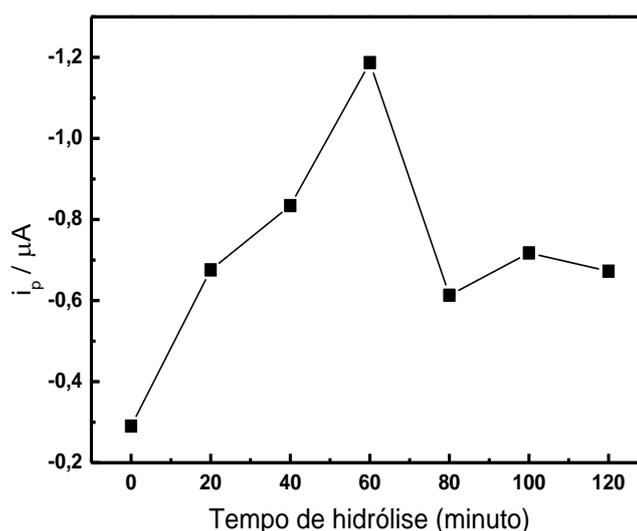


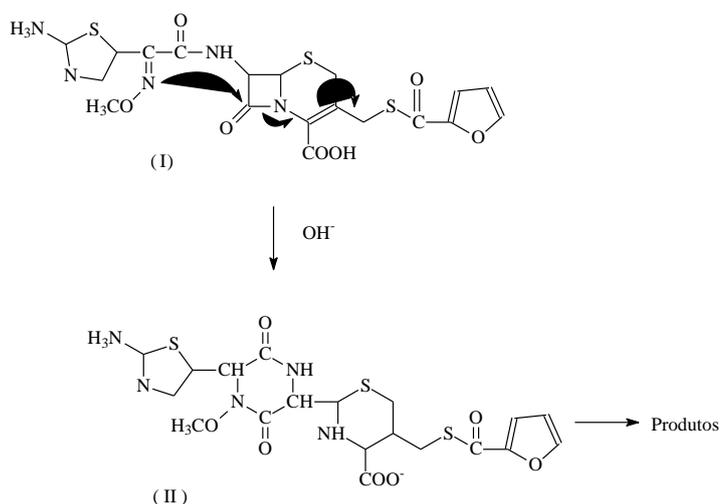
Figura 33 - Influência do tempo de hidrólise sobre a i_{p3C} , obtidas a partir de voltamogramas de onda quadrada de ceftiofur $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, pré-aquecido a 60°C, em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 10,0

Com o objetivo de alcançar maiores evidências do processo de hidrólise do ceftiofur foi realizado também, estudos em espectroscopia UV/Vis. Os espectros de ceftiofur $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ registrados durante o experimento, são apresentados na Figura 36. Soluções de ceftiofur apresentaram três máximos de absorção em 228,9 nm, 257,0, nm e 290,9 nm. As duas bandas com máximo de absorção em $\lambda = 257,0 \text{ nm}$ e 228,8 nm são atribuídas aos grupos $\text{O}=\text{C}-\text{N}-\text{C}=\text{C}-$ e $-\text{C}=\text{C}-\text{COO}-$, respectivamente [188].

O pico II em 257,0 nm desaparece como resultado da quebra da ligação C-N no quarto membro do anel amino. Este comportamento é similar para a degradação de todas as cefalosporinas [189]. Contudo, um novo pico é observado no espectro de absorção UV em 290,9 nm (pico III), assim que o fármaco entra em contato como o meio (tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 10,0), o qual diminuiu seu máximo de absorção com o tempo de hidrólise e com o aumento de temperatura. Também foi possível observar o mesmo espectro a temperatura

ambiente para uma solução $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ do CF em pH 10,0, indicando um processo de hidrólise espontânea do fármaco.

Conforme descrito em trabalhos anteriores, o pico III (290,9 nm) pode ser atribuído ao derivado piperazina-2,5-diona (Composto II; esquema 3) o qual é o principal produto de degradação em cefalosporinas contendo grupos α -amino, durante a hidrólise em meio neutro ou alcalino. O mecanismo de formação é atribuído a uma aminólise intramolecular envolvendo o ataque do grupo =N-OCH₃ à cadeia lateral do C₇ a função carbonila [190].



Esquema 3 - Mecanismo de degradação de cefalosporinas contendo grupos α -amino

Foi possível também observar o desaparecimento dos picos de absorção em 228,9 nm e 257,0 nm após 15 minutos de hidrólise. Já o pico com máximo em 290,9 nm apresenta uma significativa queda em seu máximo de absorção, desaparecendo ao final de 60 minutos de hidrólise, presumivelmente como resultado da hidrólise do fármaco.

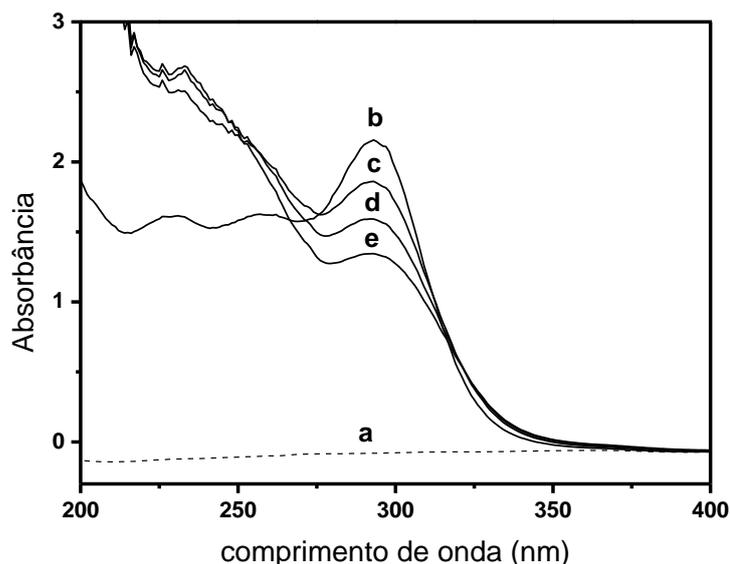


Figura 34 - Espectro UV/Vis do CF $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, em tampão BR. Curva – (a) tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 10,0, curva – (b) CF $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, curva – (c) CF $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ após 15 minutos de hidrólise, curva – (d) CF $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ após 30 minutos de hidrólise, curva - (e) CF $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ após 60 minutos de hidrólise

III.12 Otimização dos parâmetros instrumentais

Dos parâmetros instrumentais que podem influenciar significativamente na resposta voltamétrica destacam-se a frequência de aplicação dos pulsos de potencial (f), o incremento de varredura de potencial (ΔE_s) e a amplitude de aplicação dos pulsos de potencial (E_{sw}). Assim, visando melhorar a resposta voltamétrica relativa ao sinal de redução do produto de hidrólise, estes parâmetros foram avaliados nos seguintes intervalos: f de 30 a 270 Hz, E_{sw} de 10 a 120 mV e ΔE_s de 2 a 10 mV, após análise eletroanalítica de solução $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 10,00. Em todos os casos, a escolha da melhor condição de trabalho em termos da apreciação destes parâmetros foi realizada levando-se em consideração àquele que representasse melhora significativa na intensidade do sinal analítico sem comprometer a resolução voltamétrica. Neste caso, uma maneira bastante eficiente é a análise da largura do pico a meia altura ($W_{1/2}$).

Além dos parâmetros da técnica, foram otimizados o potencial e o tempo de deposição, uma vez que, constatou-se nos testes preliminares a necessidade de se pré-accumular o analito na superfície do eletrodo de mercúrio.

III.12.1 Efeito do tempo de deposição

A influência do tempo de acúmulo sobre a i_{p3C} foi avaliada em soluções de concentração $5,0 \times 10^{-7}$ e $5,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹, em tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 10,0 o potencial de acúmulo de +0,05 V, num intervalo de 0 a 410 segundos. Os respectivos valores de corrente em função do tempo de acúmulo estão representados nas curvas (a) e (b) da Figura 37. A análise dos resultados demonstram que na concentração de $5,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹, a corrente cresce de forma linear até 360 s, apresentando valores decrescentes em tempos superiores, caracterizando a saturação da superfície do eletrodo. Já na concentração de $5,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ o pico aumenta de forma não-linear com tempo de depósito até 360 s. Para evitar tal dificuldade, o tempo de 60 s foi escolhido para fins analíticos.

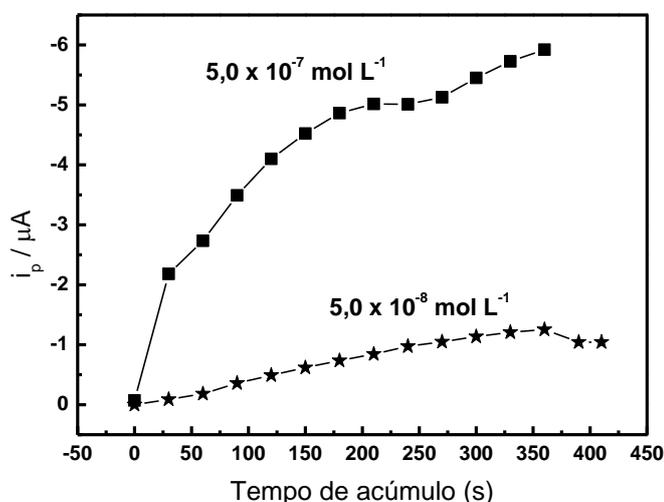


Figura 35 - Influência do tempo de acúmulo sobre a corrente de pico, obtida a partir de voltamogramas de onda quadrada de ceftiofur $5,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e $5,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹, pré-aquecido por 60 minutos a temperatura de 60°C, em tampão BR 0,04 mol L⁻¹, pH10,0, $E_{dep} = +0,05$ V

III.12.2 Efeito do potencial de deposição

O efeito do potencial de deposição (E_{dep}) sobre a corrente de pico 3C foi averiguada no intervalo de + 0,30 V a - 0,35 V. Os valores de correntes obtidos para a solução $5,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ de ceftiofur em pH 10,0 e tempo de acúmulo 60 segundos, são mostrados na Figura 38. A análise dos resultados demonstrou que a afinidade do acúmulo do produto de hidrólise do ceftiofur na superfície do eletrodo é dependente da carga, e no intervalo de - 0,15 V a +

0,20 V a intensidade da corrente (i_{p3C}) apresenta o seu valor máximo. Razão pela qual o potencial de deposição foi fixado em + 0,10 V para os estudos posteriores.

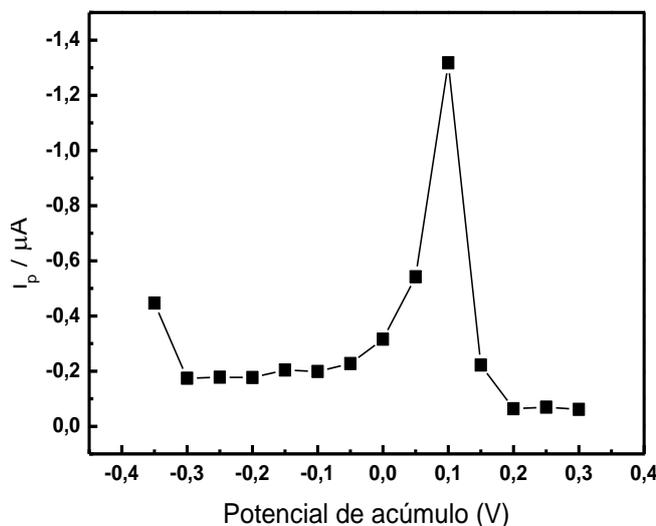


Figura 36 - Influência do potencial de acúmulo sobre a corrente de pico, obtida a partir de voltamogramas de onda quadrada de ceftiofur $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, pré-aquecido por 60 minutos à temperatura de 60°C , em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, pH 10,0 e $t_{\text{dep}} = 60\text{s}$

III.12.3 Efeito da frequência de aplicação dos pulsos

O primeiro parâmetro instrumental investigado foi a frequência de aplicação dos pulsos de potenciais (f), pois como mencionado antes, este parâmetro além de proporcionar uma melhora na resposta voltamétrica, possibilita ainda, obter informações importantes a respeito do tipo de processo envolvido durante a transferência eletrônica. Portanto, para este estudo, variou-se a f no intervalo e 30 a 270 Hz, mantendo-se constantes os demais parâmetros, ou seja, ΔE_s 4 mV e E_{sw} 30 mV. Conforme se observa na Figura 39, a i_{p3C} é significativamente influenciada pelo aumento da f em toda a faixa de estudo, contudo, a $W_{1/2}$ é bastante prejudicada pela maximização da f , sendo este efeito mais pronunciado em valores acima de 150 Hz. Contudo, mesmo sendo observada uma evolução bastante significativa no perfil voltamétrico do produto de degradação, com o aumento da f , o valor de 120 Hz foi escolhido como sendo ideal para os estudos futuros, por atender as expectativas em termos de resolução voltamétrica, avaliado em termos da largura do pico a meia altura ($W_{1/2}$) e detectibilidade. Uma dependência linear é observada entre a i_{p3C} e a f em todo o intervalo (30 a 270 Hz), o que, de acordo com a literatura, é característico de um processo eletroquímico controlado por adsorção. A linearidade entre a i_{p3C} e a f obedeceu a seguinte relação

matemática: $i_{p3C} (\mu\text{A}) = 0,028 + 0,002 \times f (\text{Hz})$, com coeficiente de correlação linear de 0,999.

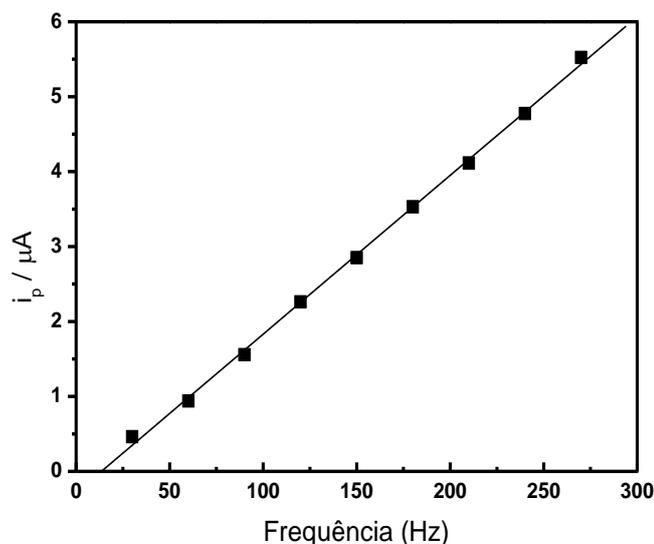


Figura 37 - Influência da variação da f sobre os valores de i_{p3C} para redução eletroquímica de $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ do CF em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. Condições: $E_{sw} = 30 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$

III.12.4 Efeito da amplitude dos pulsos

Em seguida, a influência da amplitude de aplicação dos pulsos de potencial (E_{sw}) sobre a intensidade da i_{p3C} foi avaliada, mantendo-se, $f = 120 \text{ Hz}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$. A Figura 40 apresenta o efeito da variação da E_{sw} no intervalo de 10 a 120 mV para redução eletroquímica de solução $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ sob a mesma condição citada anteriormente. Como pode ser observado, a i_{p3C} aumenta com o acréscimo da E_{sw} de 10 até 30 mV, a partir do qual não promove mudança significativa nos valores de corrente. Entretanto, para valores de E_{sw} acima de 90 mV, o sinal voltamétrico é bastante comprometido pela perda de resolução, avaliada pelo significativo alargamento da $W_{1/2}$ e queda na corrente. Desta forma, o valor de 30 mV foi escolhido para prosseguir com os estudos.

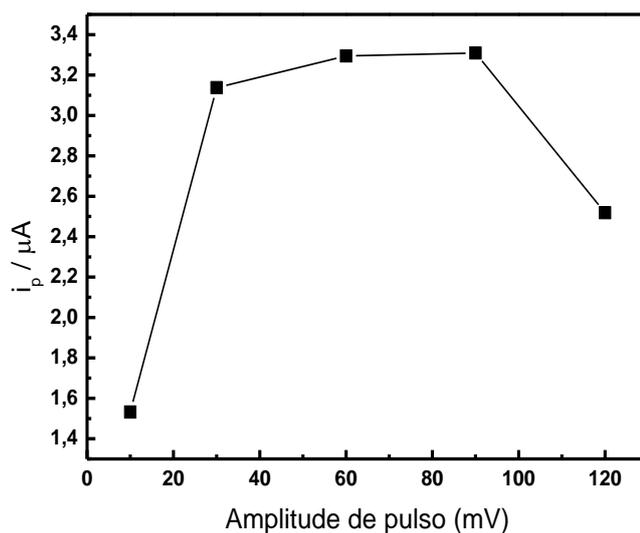


Figura 38 - Influência da variação da E_{sw} sobre os valores de i_{p3C} para solução $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ do CF em BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. Condições: $f = 120 \text{ Hz}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$

III.12.5 Influência do incremento de varredura

Finalmente, foi realizada a otimização do incremento de varredura de potencial (ΔE_s) empregando-se $f = 120 \text{ Hz}$ e $E_{sw} = 30 \text{ mV}$, previamente otimizados. Analisando o comportamento da i_{p3C} (Figura 41) após variação do ΔE_s de 2 a 10 mV, verifica-se um aumento significativo em todo intervalo estudado. Porém, em valores de ΔE_s acima de 6 mV, o perfil voltamétrico foi marcadamente prejudicado pelo aumento da $W_{1/2}$ e, desta forma, o valor de ΔE_s de 4 mV foi adotado como sendo ótimo para estudos visando propósitos analíticos (Tabela 3).

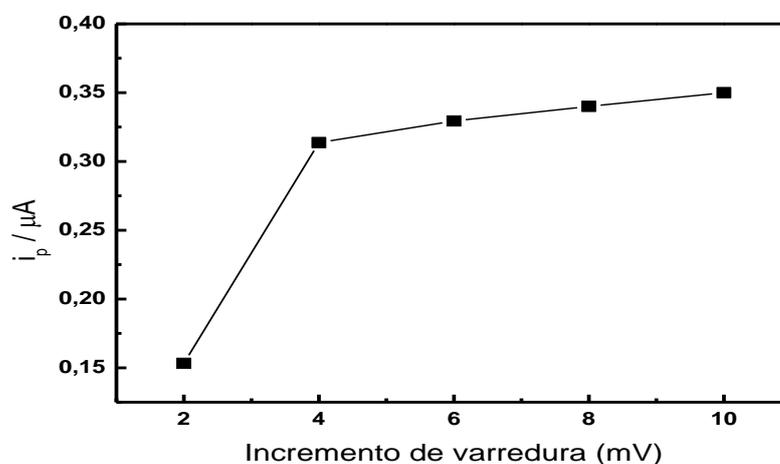


Figura 39 - Influência da variação do incremento de varredura sobre os valores de i_{p3C} para solução $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ do CF em de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 10,0. Condições: $f = 120 \text{ Hz}$ e $E_{sw} = 30 \text{ mV}$

Tabela 10 - Parâmetros otimizados

Parâmetros	Valores
Tempo de acúmulo	60s
Potencial de deposição	+ 0,10 V
Frequência de aplicação dos pulsos	120 Hz
Amplitude dos pulsos	30 mV
Incremento de varredura	4 mV

III.13 Determinação da curva analítica

Considerando o tempo de aquecimento de 60 minutos a 60 °C para a hidrólise do ceftiofur, três curvas de calibração foram construídas na faixa de concentração de 6,19 a 15,5 x 10⁻⁸ mol L⁻¹. As Figuras 42 e 43 apresentam os voltamogramas de onda quadrada e curva analítica representativos do estudo, as quais foram construídas a partir dos valores médios (n = 3) de corrente de pico [$i_{p3C} (\mu A) = -6,46 \times 10^{-7} (\pm 4,80 \times 10^{-8}) + 23,30C (\pm 0,40) (C \text{ mol L}^{-1})$, r = 0,998] (n = 10) em tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 10,0 (Tabela 11). A corrente de pico (i_{p3C}) aumentou linearmente em toda a faixa investigada. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados utilizando as relações 3SD/b e 10SD/b, respectivamente, onde SD é o desvio padrão da média de dez medidas do branco no potencial para a redução do produto de hidrólise do ceftiofur e b é a inclinação da curva analítica. O LD e o LQ foram de 3,73 x 10⁻¹⁰ e 1,24 x 10⁻⁹ mol L⁻¹, respectivamente.

A reprodutibilidade do método foi determinada efetuando-se sucessivas medidas de sete soluções 6,0 x 10⁻⁷ mol L⁻¹, do ceftiofur em tampão BR pH 10,0, previamente aquecidas a 60 °C por 60 minutos na presença e na ausência da amostra de leite. Os desvios padrões relativos de 1,30% e 6,0%, respectivamente, foram obtidos com a pré-concentração de 90 segundos.

Portanto baseado nestes valores é possível constatar que a metodologia em VOQ é capaz de determinar o produto de hidrólise do CF em amostras de leite que contenham o referido antibiótico.

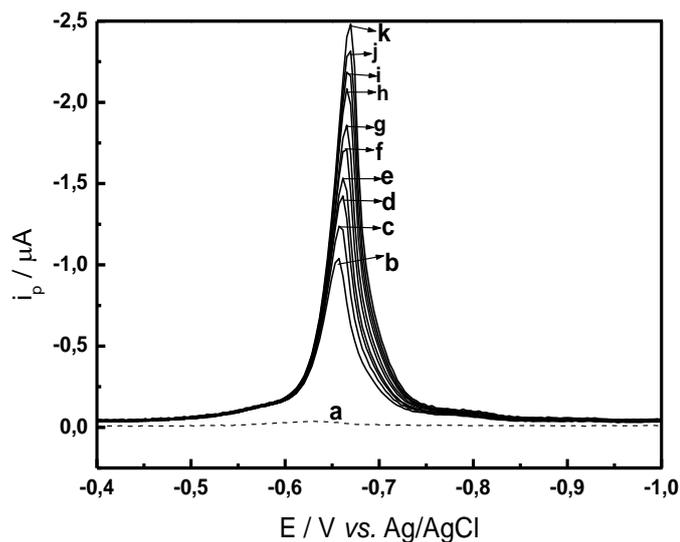


Figura 40 - Voltamogramas obtidos da curva analítica da Figura 43, onde: (a) branco; (b) $6,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$; (c) $7,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$; (d) $8,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$; (e) $9,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$; (f) $10,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$; (g) $11,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$; (h) $12,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, (i) $13,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ (j) $14,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e (k) $15,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$

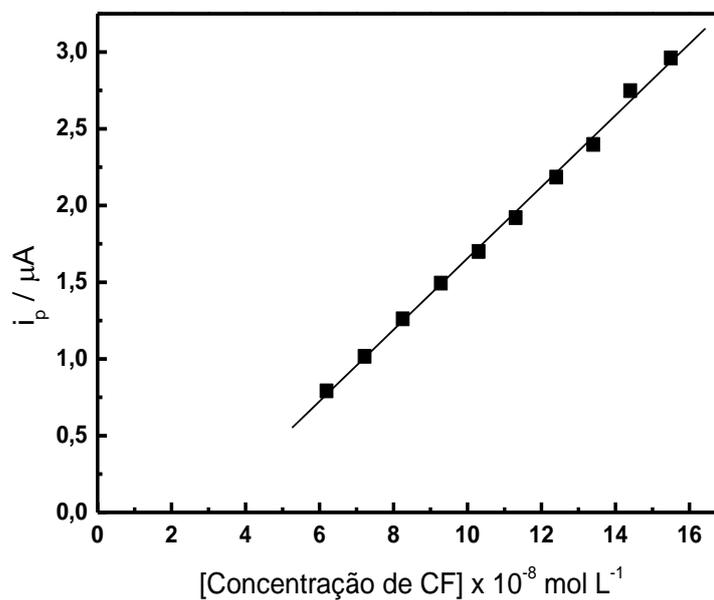


Figura 41 - Curva analítica do padrão CF em tampão BR: $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 10,0

Tabela 11 - Parâmetros obtidos da curva analítica do fármaco CF

Parâmetros	Valores
Intervalo de concentração (mol L ⁻¹)	6,19 x 10 ⁻⁸ – 15,5 x 10 ⁻⁸
LD (mol L ⁻¹)	3,73 x 10 ⁻¹⁰
LQ (mol L ⁻¹)	1,24 x 10 ⁻⁹
Coefficiente de Correlação (r)	0,9980
Inclinação (µA mol ⁻¹ L)	23,30
Intercepto (A)	-6,46 x 10 ⁻⁷
S _a	0,40
Aplicações	Leite fluído e em pó

S_a = Devio padrão da inclinação.

III.14 Produto de hidrólise

Os resultados obtidos até o momento não permitiram a identificação do produto de hidrólise do fármaco, sob qual o método é baseado. No entanto, a compreensão das mudanças estruturais que o ceftiofur pode sofrer sob condições fisiológicas é valiosa, já que é um processo complexo. O composto é prontamente hidrolisado para desfuroilceftiofur e posteriormente convertido em produtos mais complexos, tais como o dímero desfuroilceftiofur correspondente a tiolactona, além de várias outras formas [104].

III.15 Aplicação da metodologia desenvolvida para a determinação do produto de hidrólise do CF em amostras de leite UAT e em pó

Componentes do leite diferem entre as espécies, mas pode conter quantidades significativas de gordura saturada, proteína e cálcio, bem como a vitamina C, todos os quais podem interferir na detecção electroquímica do ceftiofur. A fim de evitar um efeito de matriz, o método da adição de padrão foi utilizado, permitindo a determinação indireta do ceftiofur em amostras de leite sem pré-tratamento ou extração.

As amostras de leite fluído e leite em pó foram fortificadas com o padrão em três níveis de concentrações e submetidas ao processo de hidrólise, de modo a evitar interferências. Amostras branco de leite fluído e leite em pó foram fortificadas com o ceftiofur nas concentrações de 6,0 x 10⁻⁸, 8,0 x 10⁻⁸, e 10 x 10⁻⁸ mol L⁻¹. Triplicatas das amostras

fortificadas foram submetidas à hidrólise e as concentrações do produto de hidrólise de ceftiofur foram determinadas (Tabela 12). A Figura 44 apresenta os voltamogramas representativos para uma amostra de leite fluido fortificada com uma concentração final de $8,4 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ de ceftiofur, após adições sucessivas de soluções padrão do antibiótico. A Figura 44 demonstra que não ocorre à redução de compostos presentes na amostra de leite na região de potencial do pico de interesse (E_{p3C}). O sinal voltamétrico de onda quadrada aumenta após adições sucessivas de solução padrão, como mostrado na Figura 45 (linhas b-f), revelando a ausência de efeitos de matriz. Estes resultados demonstram que o método proposto pode ser aplicado com sucesso para a determinação de ceftiofur em leite fluido e em pó de uma maneira rápida e simples, sem qualquer pré-tratamento da amostra.

Este estudo encontra-se publicado no volume 98 (2) do mês de julho de 2011 no periódico *Microchemical Journal* (ver Anexo B).

Tabela 12 - Resultados obtidos para a recuperação do produto de hidrólise do ceftiofur em mostras de leite fluído e em pó utilizando o método proposto

Amostra	Valor Adicionado (mol L^{-1})	Valor encontrado ^a (mol L^{-1})	Recuperação (%)	DPR (% , n = 3)
Leite em pó	$6,30 \times 10^{-8}$	$6,28 \times 10^{-8}$	98,28	3,31
	$8,40 \times 10^{-8}$	$8,47 \times 10^{-8}$	100,3	3,23
	$10,1 \times 10^{-8}$	$10,3 \times 10^{-8}$	100,6	0,11
Leite fluído	$6,00 \times 10^{-8}$	$6,05 \times 10^{-8}$	100,8	2,8
	$8,17 \times 10^{-8}$	$8,05 \times 10^{-8}$	98,53	1,04
	$10,1 \times 10^{-8}$	$10,2 \times 10^{-8}$	100,6	4,90

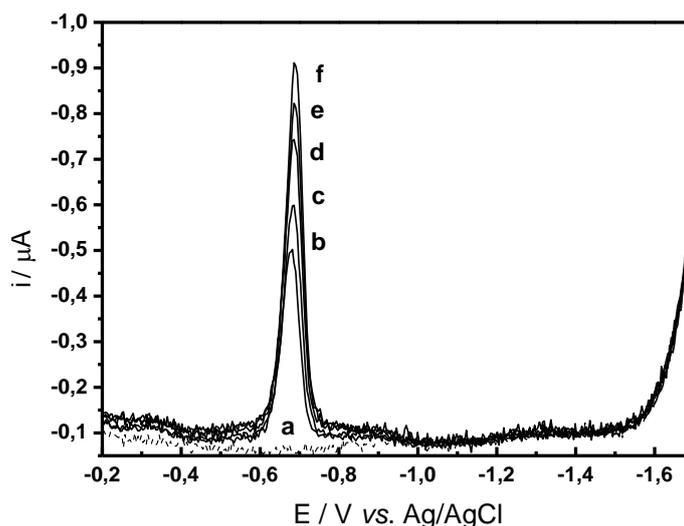


Figura 42 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a determinação de ceftiofur usando a condição otimizada. (a) Amostra branco de leite fluido, (b) Amostra de leite fluido fortificada com $8,40 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ de produto de hidrólise do padrão ceftiofur, (c-f) Sucessivas adições de produto de hidrólise do padrão ceftiofur; concentrações finais na célula: $1,5$, $3,0$, $4,5$, e $6,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. Parâmetros: $t_{\text{dep}} = 60 \text{ s}$, $E_{\text{dep}} = + 0,10 \text{ V}$; $f = 90 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 4,0 \text{ mV}$, $E_{\text{sw}} = 30 \text{ mV}$

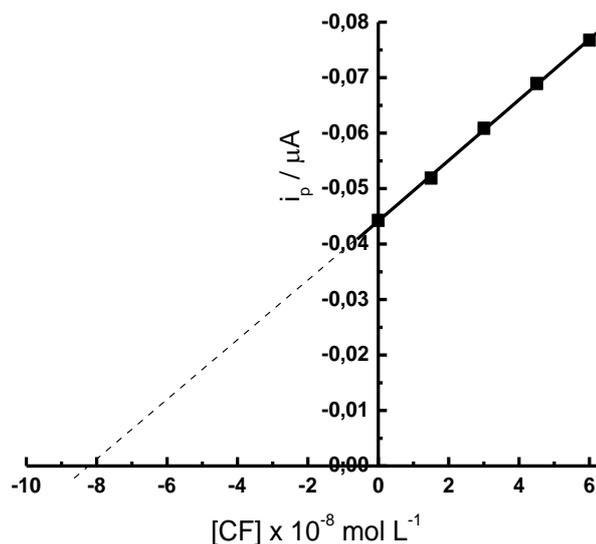


Figura 43 - Curva analítica obtida para a determinação de ceftiofur usando a condição otimizada

III.16 Estudo do comportamento voltamétrico da CEF, por VOQ

A Figura 3 apresenta os voltamogramas de onda quadrada representativos para solução de cefepima $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,5. A resposta de onda quadrada do antibiótico em AgSAE mostrou a presença de dois picos bem definidos, no

sentido da varredura em potencial negativo, o primeiro em $E_p = -0,28$ V (pico 1C) e segundo (pico 2C) em $E_p = -0,45$ V (pico 2C) *vs.* Ag/AgCl. A resposta é semelhante à observada em trabalhos anteriores, publicados utilizando o eletrodo de mercúrio [134], porém os picos de redução (picos 1C e 2C) apresentaram deslocamentos para potenciais mais positivos, quando estudados nos elétrodos sólidos de amálgama de prata (AgSAE).

De acordo com a literatura, a redução eletroquímica da cefepima em meio ácido, envolve o grupo metoximino, o qual apresenta redução apenas na forma protonada com saturação da dupla ligação C=N (pico 1C) concomitante à clivagem na ligação N-O e subsequente formação de amina e álcool [191, 192]. Já o segundo pico envolve o grupo no C₇ e a dupla ligação (C=C) do anel dihidrotiazínico, cuja redução é favorecida pela presença do substituínte piridínio (captor de elétrons) no C₃ (pico 2C) [193]. Devido ao interesse analítico, focou-se os estudos principalmente sobre o pico de redução 2C.

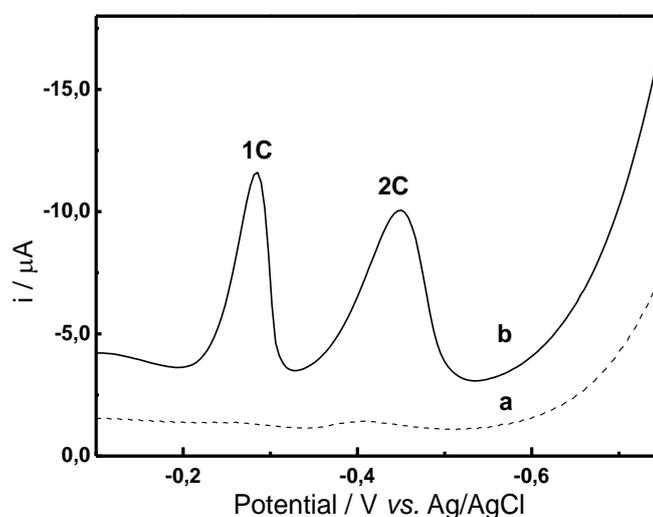


Figura 44 - Voltamograma de onda quadrada para cefepima sobre AgSAE em meio tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,5: curva (a) – eletrólito suporte; curva (b) – cefitiofur $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$

III.16.1 Eletrólito de suporte tampão Britton-Robinson

A natureza e a acidez do eletrólito de suporte são alguns dos fatores mais importantes que influenciam fortemente a estabilidade da substância ao analisarmos sua redução catódica e processos de adsorção [194]. Entre os vários tampões investigados (Britton-Robinson, acetato e fosfato) o melhor sinal voltamétrico em termos de sensibilidade (altura do pico) e a resolução (forma do pico) foram produzidos utilizando o tampão Britton-Robinson.

III.16.2 Influência do pH

A dependência do pH sobre a corrente de pico (i_{p2C}) em solução tampão BR é mostrado na Figura 4 (curva a). Uma queda acentuada da corrente do pico 2C com a variação do pH pode ser observada entre o intervalo de pH 2,0 a 5,0 desaparecendo em valores de pH superiores. Este comportamento confirma a presença de reações químicas envolvendo a participação de prótons no processo de redução [195]. Uma vez que o pH é uma variável que tende a influenciar fortemente na resolução dos voltamogramas, os melhores resultados com relação à resolução e repetibilidade da corrente de pico foram obtidos com tampão Britton-Robinson ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$) pH 2,5, esta condição foi adotada para propósitos analíticos quantitativos.

Da mesma forma, a influência do pH sobre o potencial de pico (E_{p2C}) pode ser visto na Figura 2 (curva b). A resolução e a corrente de pico foram fortemente dependente do pH. Já o potencial de pico (2C) é deslocado para valores mais negativos com o aumento do pH, indicando que a protonação da parte reativa da molécula está envolvida no mecanismo geral de reação no eletrodo[196].

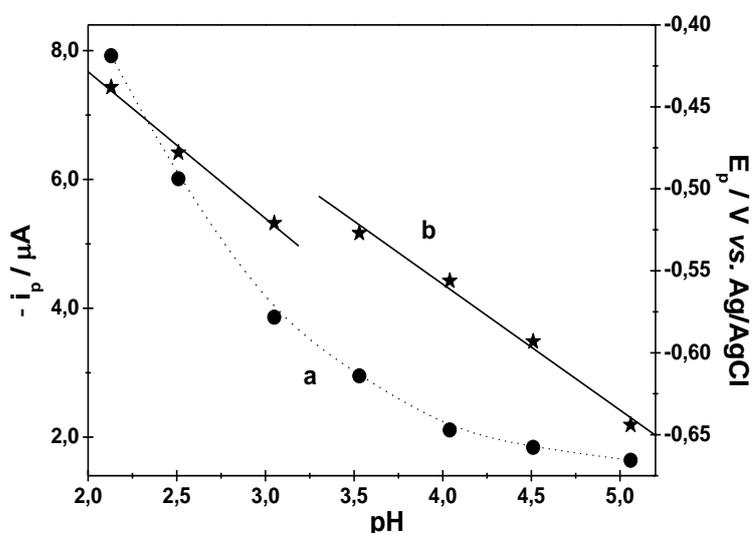


Figura 45 - Influência do pH sobre a corrente de pico (a) e potencial de pico (b) para redução eletroquímica de $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de cefepima, sobre a superfície AgSAE, em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. Condições: $f = 60 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$ e $E_{sw} = 25 \text{ mV}$

Devido ao pK_a (3,36) da CEF os E_{p2C} exibiram duas regiões com relações lineares com o pH, que podem ser expressas pelas seguintes equações: E_{p2C} (V) = -0,25 - 0,089 × pH ($r = 0,997$) para $2,0 \leq \text{pH} \leq 3,0$ e E_p (V) = -0,25 - 0,077 pH ($r = 0,995$) para $3,5 \leq \text{pH} \leq 5,0$, indicando que a redução da cefepima envolve uma forma protonada no intervalo de pH investigado.

III.16.3 Efeito do tempo de deposição

Influência do potencial de deposição e tempo são sempre fatores importantes para sensibilidade e o limite de detecção do método [197]. O efeito do tempo de deposição (de 0 a 120 s) sobre a intensidade da corrente de pico (i_{p2C}) (Figura 5) foi investigada através da técnica voltamétrica de onda quadrada para redução eletroquímica da cefepima $5,0 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} . É possível verificar que a intensidade da corrente de pico diminuiu sensivelmente a partir de 20 segundos, indicando um processo de saturação da superfície do eletrodo. Desta forma, o tempo de 20 segundos foi seleccionado como a melhor condição de trabalho para a metodologia proposta.

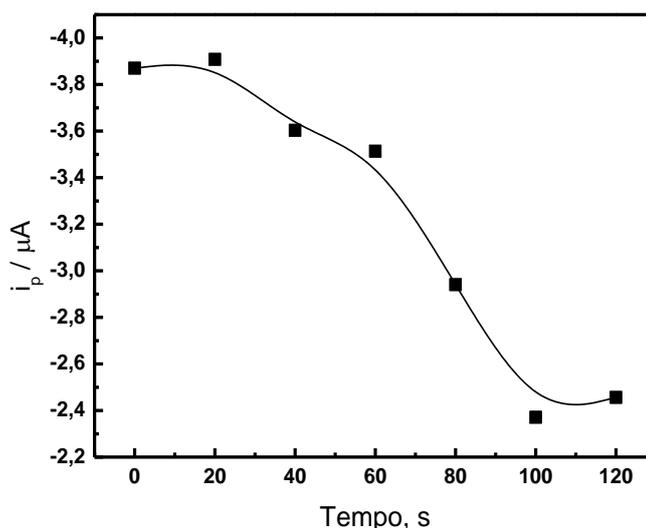


Figura 46 - Influência da variação do tempo de acúmulo sobre os valores de i_{p2C} para redução eletroquímica de $5,0 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} de CEF sobre a superfície do AgSAE em meio de tampão BR $0,04$ mol L^{-1} . Condições: $E_{sw} = 25$ mV, $\Delta E_s = 4$ mV

III.16.4 Efeito do potencial de deposição

Após estabelecido o tempo de deposição, avaliou-se o efeito do potencial de deposição na redução da CEF. As condições utilizadas foram às mesmas do estudo anterior. O intervalo do potencial de deposição foi avaliado ao longo de -0,45 a -0,00 V (Figura 6). As respostas foram altamente influenciadas pelo potencial de deposição. A corrente de pico foi máxima quando o potencial de adsorção situava-se entre 0,00 e -0,15 V *vs.* Ag/AgCl. Portanto, o potencial de deposição ótimo foi fixado em -0,05 V *vs.* Ag/AgCl, para todas as outras medições experimentais.

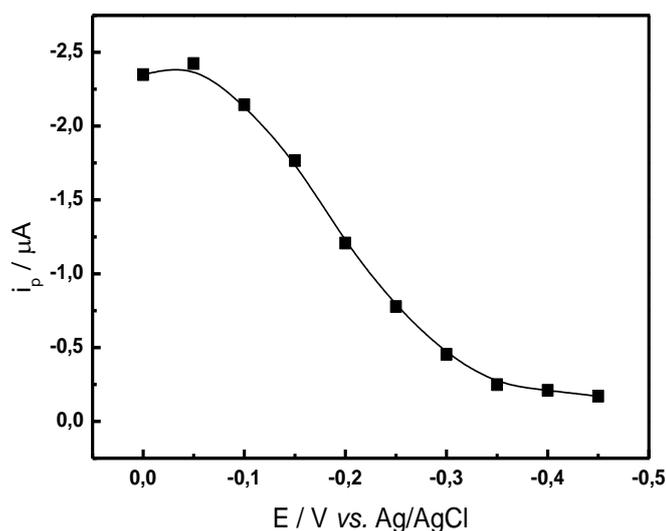


Figura 47 - Influência da variação do potencial de deposição sobre os valores de i_{p2C} para redução eletroquímica de $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de CEF sobre a superfície do AgSAE em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. Condições: $E_{sw} = 25 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$

III.16.5 Efeito da frequência de aplicação dos pulsos

A variação na frequência de aplicação dos pulsos de potencial, geralmente exerce um efeito significativo sobre a resposta da VOQ (Figura 7). Com base neste aspecto, os efeitos da frequência sobre o processo de redução da cefepima no AgSAE foram avaliados para valores de f entre 10 a 160 Hz. Observou-se que o aumento nos valores de f foi acompanhado por um aumento também na i_{p2C} .

Em frequências maiores do que 150 Hz, as correntes de pico apresentaram quedas nos seus valores. Deste modo, em frequências maiores, ou seja, em altas velocidades de varredura, as espécies eletroativas não conseguem chegar à superfície eletródica, provocando uma queda na corrente de pico, uma vez que menos espécies estão sofrendo o processo de redução na superfície do eletrodo.

Além disso, não foi observada relação linear entre o i_{p2C} e os valores de frequência de aplicação de pulso, mostrando que o processo de redução da cefepima não envolve adsorção significativa de reagentes e/ou produtos. Ao mesmo tempo, o potencial de pico (E_{p2C}) exibiu um deslocamento para valores mais positivos (entorno de 25 mV), com o aumento da frequência. Portanto, o valor de 60 Hz foi escolhido como uma frequência ideal para a subsequência dos experimentos.

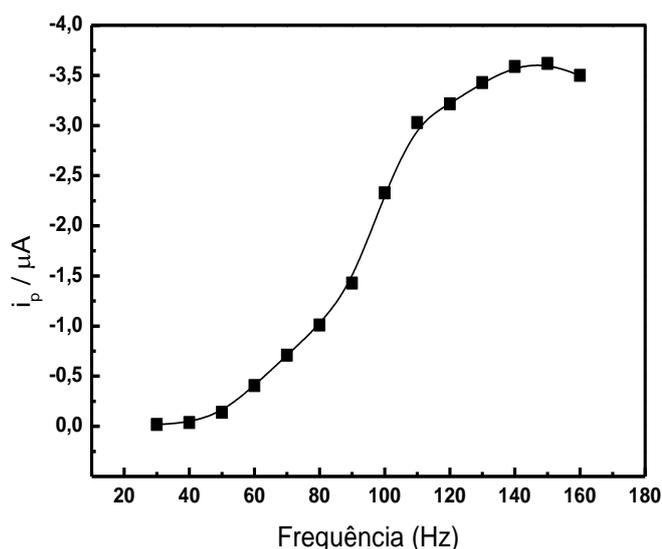


Figura 48 - Influência da variação da f sobre os valores de i_{p2C} para redução eletroquímica de $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de CEF sobre a superfície do AgSAE em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. Condições: $E_{sw} = 25 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$

III.16.6 Efeito da amplitude dos pulsos

A variação da amplitude de pulsos de potencial aplicado também pode ser utilizada para avaliar o tipo de processo redox envolvido. Em sistemas totalmente irreversíveis, ocorre deslocamento do potencial de pico com o aumento da amplitude, e, para processos reversíveis ou quase reversíveis, o potencial de pico praticamente não sofre deslocamento. As correntes de pico são dependentes da amplitude de pulsos. Outro ponto importante é que a amplitude de pulsos está diretamente relacionada com a largura da onda voltamétrica. Assim, altos valores de amplitude de pulsos provocam mudanças na largura do pico (largura de meia-altura $E_{p/2}$), diminuindo a seletividade das análises [198].

A variação da amplitude de pulsos foi realizada no intervalo de 10 mV a 100 mV, para CEF $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, mantendo-se constante a frequência de aplicação de pulso em 60 Hz e o incremento de varredura em 2 mV. A Figura 8 apresenta a influência da amplitude de pulso

sob as correntes de pico. Analisando-se os resultados, observou-se que as correntes de pico (i_p) aumentaram com o acréscimo da amplitude do pulso, no entanto a amplitude do pulso de 30 mV foi escolhida, já que em valores maiores ocorrem distorções no pico, resultado em uma definição pobre.

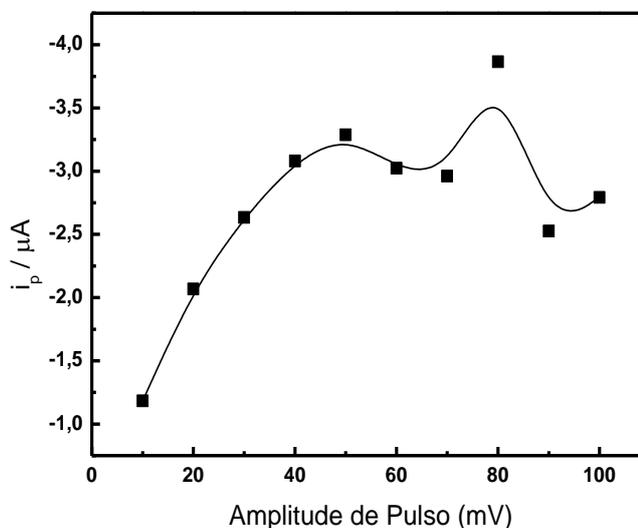


Figura 49 - Influência da variação da amplitude de pulso sobre os valores de i_{p2C} para redução eletroquímica de $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de CEF sobre a superfície do AgSAE em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. Condições: $f = 60 \text{ Hz}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$

III.16.7 Influência do incremento de varredura

O estudo do incremento de varredura de potencial (ΔE_s) estabelece a forma pela qual o potencial é aplicado, e é considerado como sendo a diferença de altura entre um degrau de potencial e o degrau seguinte, em uma rampa de potenciais na forma de escada, aplicada ao eletrodo de trabalho. Na VOQ, a velocidade de varredura é definida em função da frequência dos pulsos de potenciais e do incremento de varredura de potencial ($v = f \Delta E_s$) [199]. Incremento de varredura maior pode aumentar o sinal obtido e melhorar a sensibilidade do método. No entanto, pode ocasionar alargamento dos picos, e a resolução dos voltamogramas pode ser comprometida, acarretando perda de sensibilidade do método.

O incremento de varredura foi avaliado no intervalo de 2 mV a 12 mV, para CEF $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, mantendo-se constante a frequência de aplicação de pulso em 60 Hz e a amplitude de pulso em 50 mV. Analisando-se os resultados, notou-se que o aumento do incremento de potencial promoveu significativos acréscimos nos valores de corrente de pico 2C, porém de modo não linear, como apontado na Figura 9. Incrementos de pulsos maiores do que 8,0 mV prejudicam consideravelmente a forma do pico de redução da CEF, apesar das

maiores correntes obtidas acima deste valor, a escolha do valor de 5,0 mV para o incremento proporcionou a melhor relação ganho de corrente/sinal obtido.

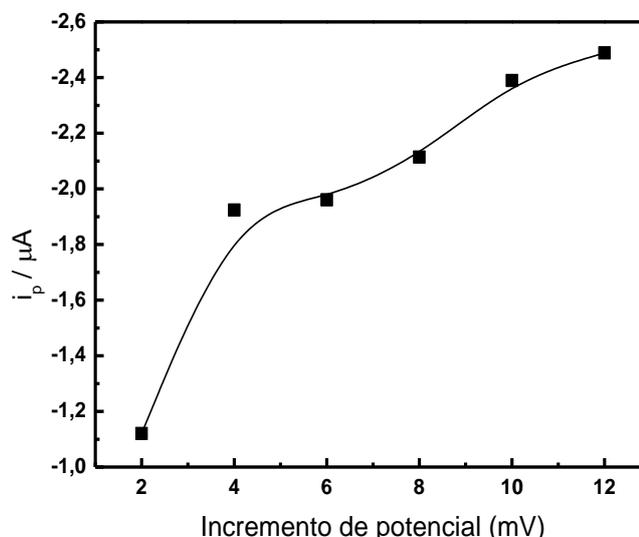


Figura 50 - Influência da variação do incremento de potencial sobre os valores de i_{p2C} para redução eletroquímica de $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de CEF sobre a superfície do AgSAE em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. Condições: $f = 60 \text{ Hz}$ e $E_{sw} = 30 \text{ mV}$

Em paralelo, buscando encontrar a melhor condição de repetibilidade entre as medidas eletroquímicas, foram realizados vários testes para limpeza da superfície eletródica, tais como: aplicação de $-2,2 \text{ V}$ na solução de análise, nos intervalos entre as leituras de um mesmo experimento, em diferentes tempos (15 s, 30 s, 45 s e 60 s); retirada e lavagem do eletrodo de trabalho com um jato d'água ultrapura entre uma medida e outra e a desoxigenação com N_2 . Observou-se também, que, após 10 minutos de desoxigenação com N_2 , nos intervalos entre experimentos, todas as substâncias potencialmente adsorvidas na superfície do eletrodo eram removidas, promovendo uma completa limpeza da superfície eletródica, o que proporcionou uma ótima repetibilidade. Então, esse foi o procedimento adotado para limpeza e renovação da superfície eletródica, após cada medida eletroquímica, durante todo o desenvolvimento do presente trabalho.

A validação do procedimento analítico de determinação da droga foi efetuada. Todas as determinações foram realizadas, no mínimo, em triplicata. A identificação da droga foi conseguida por comparação dos potenciais de pico com soluções padrões, e pelo método de adição de padrão.

Vários parâmetros instrumentais, especialmente aqueles que afetam diretamente a resposta voltamétrica, foram otimizados incluindo os tempos de equilíbrio e agitação da

solução. A corrente de pico (2C) mostrou-se significativamente afetada, quando o tempo de repouso era superior a 30 s, deste modo, o tempo de 25 s foi suficiente para a formação de uma concentração uniforme do reagente sobre a superfície do AgSAE. Após a análise dos parâmetros do método eletroanalítico, ficaram definidas como condições otimizadas: Tampão Britton Robinson 0,04 mol L⁻¹ (pH 2,5), tempo de deposição (t_{dep}) = 20 s, (E_{dep}) = -0,05 V, frequência (f) = 60 Hz, incremento de varredura (ΔE_s) = 5,0 mV, amplitude de pulso (E_{sw}) = 30 mV e tempo de agitação de 10 s (Tabela 13).

Tabela 13 - Parâmetros otimizados

Parâmetros	Valores
Tempo de acúmulo	20s
Potencial de deposição	- 0,05 V
Frequência de aplicação dos pulsos	60 Hz
Amplitude dos pulsos	30 mV
Incremento de varredura	6 mV

III.16.8 Determinação da curva analítica da cefepima

Usando os parâmetros operacionais otimizados previamente, três curvas de calibração foram construídas utilizando concentrações da cefepima na faixa de $3,0 \times 10^{-7}$ a $2,1 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ em tampão Britton Robinson 0,04 mol L⁻¹ pH 2,5. Conforme demonstra a Figura 10B, representativa das curvas de calibração, a corrente de pico aumentou linearmente ao longo de todo intervalo de concentração investigado, de acordo com a equação $i_{p2C} (\mu A) = (-1,90 + 4,82 \times 10^{-6} \times C$ ($C = \text{mol L}^{-1}$), com $r = 0,997$ e $n = 7$ (Tabela 2).

Também através da Figura 10A, observou-se que, para o pico 2C (pico de interesse analítico), o aumento da concentração não influenciou o potencial de pico, permanecendo praticamente o mesmo em todas as concentrações adicionadas. A varredura deu-se em uma janela de potencial de -0,15 V até -0,80 V, na qual não foi possível visualizar o aparecimento do pico 1C, visto que ele exibiu uma sensibilidade menor, com resposta de corrente bem menos sensível a concentrações menores.

Para o pico 2, obteve-se uma linearidade, com uma inclinação de $0,2056 \text{ AL mol}^{-1}$ e o coeficiente de correlação de $0,9923$. A partir desses resultados, foi possível calcular o limite de detecção e de quantificação. Assim, os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados utilizando o tratamento estatístico $3SD/b$ e $10SD/b$, respectivamente, onde DP é o desvio padrão da média dos sinais de dez medidas do branco, no potencial de pico 2C para CEF, e b é a inclinação da curva analítica [200]. LD e LQ foram de $8,51 \times 10^{-9}$ e $2,84 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente.

Os valores de LD e de LQ foram avaliados como bastante satisfatórios e são similares aos obtidos em outras técnicas clássicas. Portanto, para os estudos seguintes, foram considerados apenas como referência os resultados obtidos para as curvas analíticas referentes ao pico 2C.

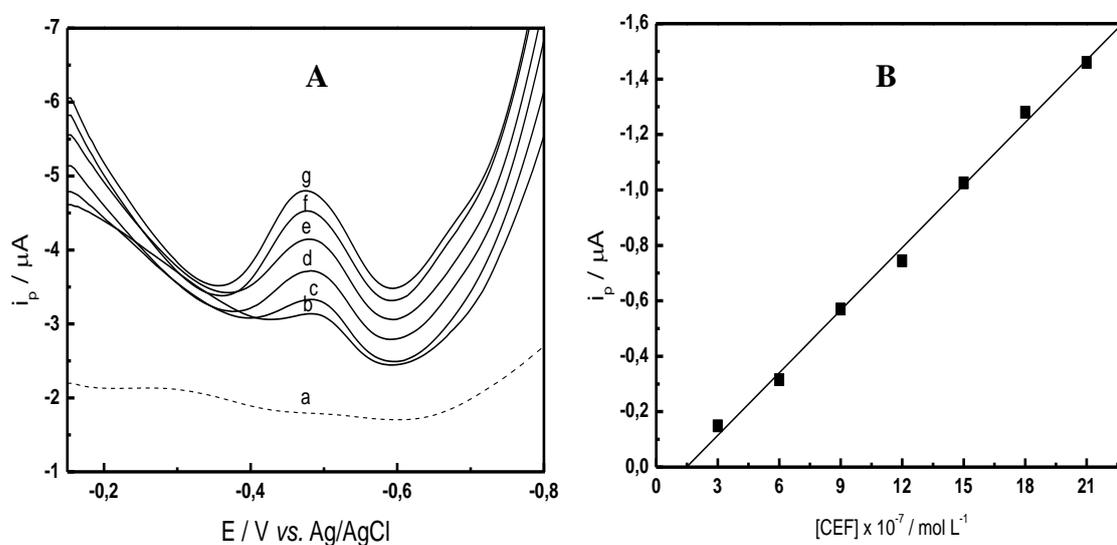


Figura 51 - (A) Voltamogramas de onda quadrada registrados sobre a superfície do AgSAE em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,5 para: (a) branco, (b) $3,0 \times 10^{-7}$, (c) $6,0 \times 10^{-7}$, (d) $9,0 \times 10^{-7}$, (e) $12,0 \times 10^{-7}$, (f) $15,0 \times 10^{-7}$, (g) $18,0 \times 10^{-7}$, (h) $21,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de CEF. (B) Dependência da i_{p2C} em função do aumento da concentração de CEF. Condições: $f = 60 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ e $E_{sw} = 30 \text{ mV}$

A sensibilidade voltamétrica foi satisfatória e acompanhada por boa repetibilidade. Avaliação do desempenho analítico do método foi baseada em 10 replicatas dos sinais electroquímicos da cefepima em solução $6,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ pura e na presença da amostra de leite. A precisão e o desvio padrão relativo foram de $0,83\%$ e $2,80\%$, respectivamente.

Tabela 14 - Parâmetros obtidos da curva analítica

Parâmetros	Valores
Intervalo de concentração (mol L ⁻¹)	3,0 x 10 ⁻⁷ – 2,1 x 10 ⁻⁶
LD (mol L ⁻¹)	8,51 x 10 ⁻⁹
LQ (mol L ⁻¹)	2,84 x 10 ⁻⁸
Coefficiente de Correlação (r)	0,997
Inclinação (µA mol ⁻¹ L)	4,82 x 10 ⁻⁶
Intercepto (A)	-1,90
Aplicação	Leite humano

III.17 Determinação do CEF em amostras de leite humano utilizando o método eletroquímico

A composição do leite difere entre as várias espécies, mas pode conter quantidades significativas de caseína saturada, lípidos, carboidratos, cálcio, bem como a vitamina C, os quais podem interferir na detecção eletroquímica da cefepima. A fim de evitar um efeito de matriz, o método da adição de padrão foi aplicado, permitindo a determinação da cefepima em amostras de leite humano sem extração previa. As amostras branco de leite foram fortificadas com padrão cefepima nas concentrações de 3,06 x 10⁻⁷ e 6,06 x 10⁻⁷ mol L⁻¹.

A seguir, foram submetidas aos procedimentos descritos na Secção 2.3.3 e as concentrações da cefepima foram determinadas (Tabela 3). A Figura 11 mostra os voltamogramas e curva analítica representativa para uma amostra de leite fortificada com uma concentração final de cefepima de 3,06 x 10⁻⁷ mol L⁻¹, com as adições sucessivas de padrão do fármaco. A Figura 11A revela que nenhuma redução de compostos presentes na amostra de leite, ocorre na região de potencial do pico estudado (2C). O sinal voltamétrico de onda quadrada aumenta após as adições de solução padrão, como mostrado na Figura 11A (linhas b-g). As respostas obtidas mostraram que houve um deslocamento significativo no potencial de pico (E_{p2C}), para região de potencial mais negativo, devido provavelmente, a uma tendência à adsorção de interferentes. Contudo, devido à baixa sensibilidade a presença destes interferentes não houve o comprometimento na aplicação do procedimento em amostras de leite humano, indicando, assim, robustez para a presente metodologia.

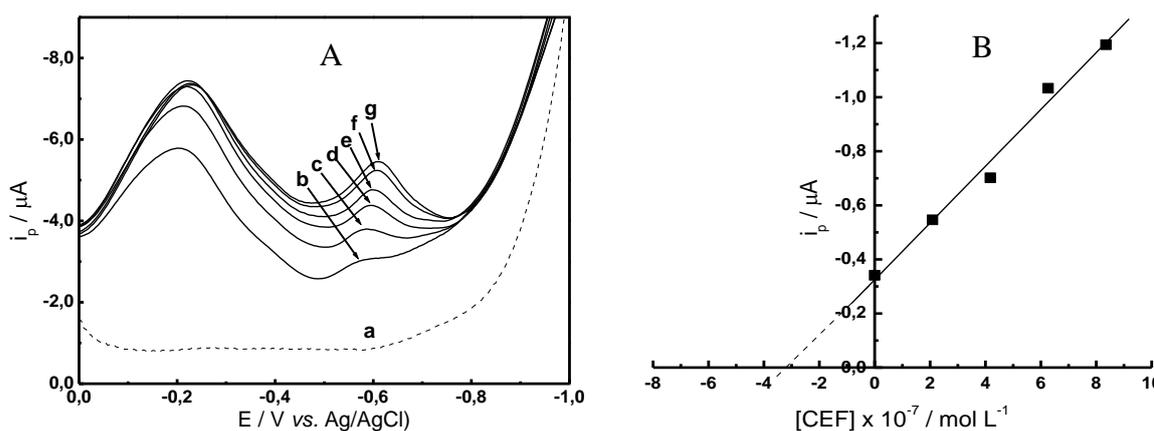


Figura 52 - (A) Voltamogramas de onda quadrada registrados sobre a superfície do AgSAE em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,5. (a) Tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,5, (b) Amostra de leite humano, (c-g) adições sucessivas de $20 \mu\text{L}$ de solução padrão $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de CEF. (B) Curva de adição do padrão. Condições: $f = 60 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ e $E_{sw} = 30\text{mV}$

A percentagem de recuperação obtida para cefepima com base na média de quatro replicatas em dois níveis de concentrações de $3,04 \times 10^{-7}$ e $6,06 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ foram de 98,0 e 100,50%, respectivamente (Tabela 3). Estes resultados demonstram que o método proposto pode ser utilizado com sucesso para a determinação de cefepima no leite humano de uma maneira rápida e simples, sem qualquer pré-tratamento da amostra.

III.18 Determinação de CEF em amostras de leite humano utilizando o método CLAE

Para a realização dos estudos cromatográficos, amostras de leite humano foram forficadas com padrão do antibiótico cefepima em níveis de concentração de $3,03$ e $6,07 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Tais amostras foram então utilizadas para a verificação do método eletroanalítico proposto.

Foram obtidas pequenas diferenças entre as recuperações médias envolvendo o método eletroanalítico e o cromatográfico. As recuperações médias encontradas no método cromatográfico para os níveis de concentração de $3,03$ e $6,07 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ foram de 92,40 e 97,20%, respectivamente, indicando que o processo de extração do antibiótico, pode ter contribuído para os valores de recuperações ligeiramente menores, quando comparados com o método proposto (Tabela 15). A Figura 12 ilustra os perfis cromatográficos para uma amostra de leite humano fortificada com $3,03 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de CEF após procedimento de extração (seção 2.3.4) (Figura 12, cromatograma A) e solução padrão $3,03 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de CEF (Figura 12, cromatograma B).

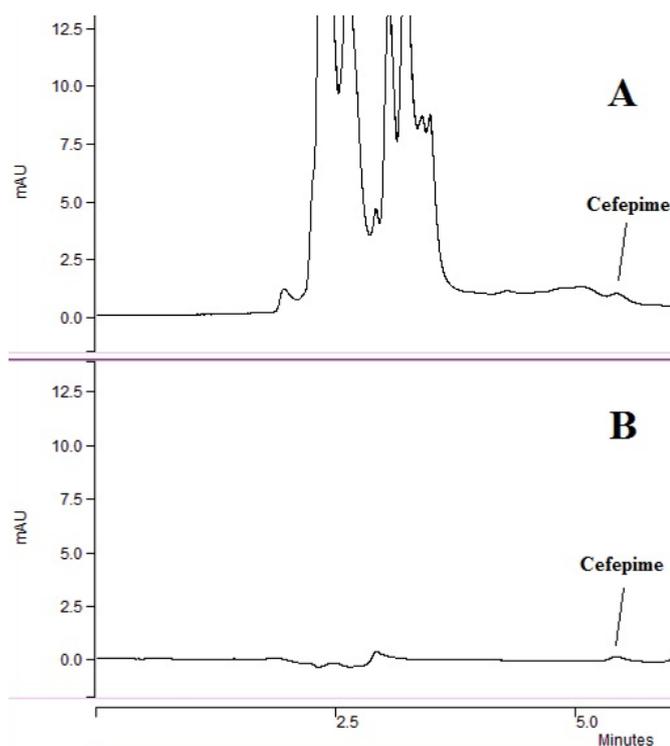


Figura 53 - (A) Cromatograma obtido para separação em coluna C-18 de amostra de leite humano fortificada contendo $3,03 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de CEF após extração (seção 2.3.4) e (B) solução padrão $3,03 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de CEF eluídas em fase móvel contendo 10 mmol de K_2HPO_4 /metanol. Condições: Gradiente 80 - 20% de K_2HPO_4 em 12 min, vazão = $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e $\lambda = 254 \text{ nm}$.

Os resultados obtidos em ambos os métodos foram comparados utilizando-se o teste t de Student e o teste F (Tabela 15). Os valores experimentais não ultrapassaram os valores teóricos, indicando uma boa concordância entre os dois métodos, relativamente às suas precisões.

Assim, o método foi aplicado para a determinação do antibiótico CF em amostras de leite humano, a partir do uso do método de padrão externo. Os resultados obtidos para os testes de eficiência de extração, assim como, os valores de DPR encontram-se listados na Tabela 3. Comparando estes resultados com os obtidos pelo método eletroanalítico, observa-se que a técnica cromatográfica apresentou LD mais elevado.

Este estudo encontra-se aceito para publicação na revista *Journal of Electroanalytical Chemistry* (ver Anexo C).

Tabela 15 - Resultados para as determinações de cefepima em leite humano por voltametria de onda quadrada e CLAE

Método	Valor Adicionado (mol L ⁻¹)	Valor Encontrado ^[a] (mol L ⁻¹)	Recuperação (%)	DPR (%)	t ^[b]	F ^[c]
Eletroanalítico	3,06 x 10 ⁻⁷	3,00 x 10 ⁻⁷	98,00	2,93	1,62	6,37
	6,06 x 10 ⁻⁷	6,09 x 10 ⁻⁷	100,5	3,76	0,28	0,94
CLAE	3,03 x 10 ⁻⁷	2,80 x 10 ⁻⁷	92,40	5,94	-	-
	6,07 x 10 ⁻⁷	5,90 x 10 ⁻⁷	97,20	0,13	-	-

^[a] Média de quatro determinações; DPR: desvio padrão relativo; ^[b] Nível de confiança de 95% (t_{crítico} = 3,18; ^[c] Nível de confiança de 95% (F_{crítico} = 9,28).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- No estudo voltamétrico realizado, verificou-se que os potenciais de pico (1C e 2C) deslocam-se para valores mais negativos com o aumento do pH do meio, sendo este comportamento típico de processo onde ocorre prévia protonação da espécie. Este comportamento foi confirmado utilizando-se a relação linear da inclinação da reta entre o potencial de pico e o pH, mostrando a possibilidade de envolvimento do mesmo número de prótons e elétrons na redução eletroquímica, confirmando dados da literatura.
- A análise do comportamento da corrente de pico em função da variação da amplitude dos pulsos de potenciais mostra um aumento linear até a amplitude de 40 mV, após este valor o aumento não é mais linear, tendendo a se tornar constante com o aumento da amplitude, evidenciando um patamar. Este comportamento está de acordo com a teoria da VOQ, desenvolvida para sistemas totalmente irreversíveis com a espécie adsorvida na superfície do eletrodo, que afirma que para amplitudes acima de 50 mV a corrente de pico é constante.
- A metodologia desenvolvida por VOQ propiciou a possibilidade de determinar o ceftiofur em amostras de leite UAT, através da construção de curvas de calibração lineares na faixa de concentração de $1,0 \times 10^{-7}$ a $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Os valores obtidos nas determinações do ceftiofur, com relação aos valores adicionados, nas amostras de leite UAT (amostras A) (95,87% a 105,46%), apresentaram significativa precisão e exatidão, com coeficientes de correlação médios de 0,9979.
- Quando comparada com um método cromatográfico para um nível de significância de 5,0% para três graus de liberdade e o valor obtido foi menor que este valor, conclui-se que não há evidências de diferenças estatisticamente significativas entre os métodos.
- A determinação indireta do ceftiofur, através de seu produto de hidrólise em amostras de leite, apresentou no intervalo de concentração de $6,19 \times 10^{-8}$ a $15,50 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹, curvas de calibração lineares, com coeficientes de correlação médios acima de 0,9980. O método exibiu seletividade aceitável, e provou ser mais simples e rápido do que os métodos cromatográficos para determinação deste antibiótico, combinando sensibilidade e precisão. O desempenho satisfatório também foi demonstrado pelas percentagens de recuperação adequadas e a concordância entre os resultados de concentração obtidos para amostras fortificadas e os valores encontrados. Além disso, o uso do método da adição de padrão permitiu a elevada diluição da amostra, minimizando os efeitos de matriz, tornando o

método uma alternativa para a rotina de controle de qualidade em amostras de leite, potencialmente contaminadas com ceftiofur;

- A técnica foi pouco influenciada por substâncias presentes no leite, tais como: carboidratos (basicamente lactose), gorduras, proteínas (principalmente caseína), minerais e vitaminas, etc;
- Os métodos analíticos desenvolvidos empregando as técnicas eletroquímicas mostraram-se competitivos em relação a outros métodos e podem ser aplicados na determinação de antibióticos β -lactâmicos em leite bovino, uma vez que, o tempo de análise e o uso de um menor volume de reagentes de alto custo torna-as ainda mais atraentes, principalmente ponderando sobre a complexidade de matrizes como o leite líquido e em pó.
- A metodologia desenvolvida para a determinação da cefepima em amostras de leite humano utilizando o eletrodo AgSAE, apresentou valores baixos de limites de detecção, LD ($8,51 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$) e de quantificação, LQ ($2,48 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$), bem como taxas de recuperação satisfatórias, com valores entre 98,0 a 100,5%, repetibilidade e precisão intermediária com DPR menores que 5,0%, mostrando que, o procedimento desenvolvido, apresenta sensibilidade, recuperação e precisão aceitáveis;
- A metodologia eletroanalítica proposta foi aplicada para a determinação do fármaco em amostras de leite humano, sem a necessidade de pré-tratamento ou etapas demoradas de extração do fármaco;
- A comparação entre os dados analíticos obtidos para a determinação do antibiótico cefepima utilizando o método eletroanalítico e o CLAE UV/vis, conduziu a resultados muito coerentes, indicando que o procedimento eletroanalítico proposto é uma ferramenta importante para detectar os resíduos de cefepima em pequenas concentrações;
- Finalmente, este trabalho demonstrou que o AgSAE pode ser considerado uma poderosa ferramenta para a “Química Verde”, pois permitiu a eliminação ou substituição de solventes por outros ambientalmente mais aceitáveis e o uso de matérias-primas renováveis. Além disso, o uso do método da adição de padrão utilizado permitiu a diluição elevada da amostra, minimizando os efeitos da matriz.

REFERÊNCIAS

- [1] Haraguchi T. Antibióticos: Classificação Geral. Rev Bras Med. 2000;v.57(10):48-560.
- [2] Grumach AS, Ferraroni NR. O Papel da penicilina na medicina moderna. J Bras Doenças Sex Transm. 2006;18(1):7-13.
- [3] Fiol FS Filho TR, Groppo FC. Resistência bacteriana. Rev Bras de Med. 2000 out-10;57(10):48-56.
- [4] Souza MV, Reis C, Pimenta FC. Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus Aureus* aos antimicrobianos. Rev Patol Trop. 2005 Jan-06;34(1):27-36.
- [5] Gales AC, Pignatari AC, Jones RN, Baretta M, Sader HS. Avaliação da atividade *in vitro* dos novos antimicrobianos da classe das fluoroquinolonas, cefalosporinas e carbapenens contra 569 amostras clínicas de bactérias gram-negativas. Rev Ass Med Brasil. 1997;43(2):137-44.
- [6] Rodrigues PRC, Kosachenco BG, Maia JZ, Pulz RS, Mello JRB. O uso das cefalosporinas na clínica de pequenos animais: breve revisão. Vet em Foco. 2007 jan;4(2):143-158.
- [7] As Micotoxinas. Rev. Food Ing Bra. 2009;(7):32-40.
- [8] Ivaska A, Norström F. Determination of some cephalosporins by differential pulse polarography and linear scan voltammetry. Anal Chem Acta. 1983;146:87-95. DOI: [http://dx.doi.org.ez51.periodicos.capes.gov.br/10.1016/S0003-2670\(00\)80595-4](http://dx.doi.org.ez51.periodicos.capes.gov.br/10.1016/S0003-2670(00)80595-4).
- [9] Junior MAS, Ferreira ES, Conceição GC. Betalactamases de espectro ampliado (ESBL): um importante mecanismo de resistência bacteriana e sua detecção no laboratório clínico. News Lab. 2004;63:152-174.
- [10] Minelli L; Nonino AB, Neme LC. Antibióticoterapia dermatológica em Adultos. Rev Bras Med. 2000 out; 57(10):1142-1146.
- [11] Puig P, Borrull F, Calull M, Benavente F, Sanz-Nebot V, Barbosa J, Aguilar C. Improving the sensitivity of the determination of ceftiofur by capillary electrophoresis in environmental water samples: In-line solid phase extraction and sample stacking techniques. Anal Chim Acta. 2007 March-28; 587(20):208–215. DOI:10.1016/j.aca.2007.01.043.
- [12] Fanhani HR, Beltrão L. Uso inadequado das cefalosporinas e a atuação da comissão de controle de infecção hospitalar. Rev. Saúde e Biol. 2011 set-18;6(3):70-82.

[13] Noia, AS, Secoli SR. Cefalosporinas e suas interações medicamentosas: Abordagem para a equipe de enfermagem. *Prática Hospitalar*. 2007 nov;54:115-117.

[14] Ozkan SA, Erk N, Uslu B, Yılmaz N, Biryol İ. Study on electrooxidation of cefadroxil monohydrate and its determination by differential pulse voltammetry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2000 Aug-15;23:263–273. DOI [http://dx.doi.org/10.1016/S0731-7085\(00\)00294-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0731-7085(00)00294-6).

[15] Wilson, CO, Gisvold, O. Textbook of organic medicinal and pharm. 8th ed. Philadelphia: Lippincott Chem. 1982.

[16] Ogorevc B, Hudnik V, Gomiscek S. Polarographic analysis of some cephalosporin antibiotics. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 1988 Jan;330(1):59-64. DOI: 10.1007/BF00494537.

[17] Fogg AG, Fayad NM, Burgess C, Mcglynn A. Differential pulse polarographic determination of cephalosporins and their degradation products. *Anal. Chim. Acta.* 1979 Jul-1;108(1):205-211. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)93056-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670(01)93056-9).

[18] Hall, DA. Polarography of cephalosporin C derivatives I: 3-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-ylthiomethyl)-7-[2-(3-sydnone)-acetamido]-3-cephem-4-carboxylic acid, sodium salt. *J. Pharm. Sci.* 1973 jan-24;62(6):980–983. DOI: 10.1002/jps.2600620626.

[19] de Baere S, Pille F, Croubels S, Ceelen L, De Backer P. High-performance liquid chromatographic-UV detection analysis of ceftiofur and its active metabolite desfuroylceftiofur in horse plasma and synovial fluid after regional intravenous perfusion and systemic intravenous injection of ceftiofur sodium. *Anal Chim Acta.* 2004 Jun-4;512(1):75-84. DOI: <http://dx.doi.org.ez51.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.aca.2004.02.017>.

[20] Errecalde CA, Prieto G, Lüders CF, Garcia H. Farmacocinética y biodisponibilidade de ceftiofur sódico em caprinos. *Ver Col Cienc Pec.* 2006;19(30):306-311.

[21] Terry J. Gilbertson," Ryan D. Roof, John L. Nappier, Matthew J. Zaya, Russel H. Robins, Dorothy J. Stuart, Leo F. Krzeminski, and Prem S. Jaglan. Disposition of ceftiofur sodium in swine following intramuscular treatment. *J. Agric. Food Chem.* 1995 Jan;43:229-234. DOI: 10.1021/jf00049a041.

[22] European Medicines Agency Veterinary Medicines and Inspections (England), Committee for Medicinal Products for Veterinary Use: Ceftiofur/Extension to ovine and extrapolation to all mammalian species. London: European Medicines Agency Veterinary Medicines and Inspections; 2006. 3p.

[23] Jaglan PS, Roof RD, Yein FS, Arnold TSA, Gilbertson TJ. Concentration of ceftiofur metabolites in the plasma and lungs of horses following intramuscular treatment. *J. vet. Pharmacol Therap.* 1994 feb;17(1):24–30.

[24] Souza, MJ, Desenvolvimento de metodologia para a análise de ceftiofur sódio e estudo da estabilidade [tese]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2008.

[25] Crespilho AM, Martins MIM, de Souza FF, Lopes MD, Papa FO. Abordagem terapêutica do paciente neonato canino e felino: 2. Aspectos relacionados à terapia intensiva, antiparasitários e antibióticos. *Rev Bras Reprod Anim.* 2007 out/dez;31(4):425-432.

[26] Aaron CS, Yu RL, Jaglan PS, Roof RD, Hamilton C, Sorg R, Gudi R, Thilagar A. Comparative mutagenicity testing of ceftiofur sodium: III. Ceftiofur sodium is not an in vivo clastogen. 1995 Nov;345(1-2):49-56. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0165-1218\(95\)90069-1](http://dx.doi.org/10.1016/0165-1218(95)90069-1).

[27] González FHD. Composição bioquímica do leite e hormônios de lactação. In: González FHD, Dürr JW, Fontaneli RS. *Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras.* Porta Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2001. 5-22.

[28] Barros GMS, Jesus NM, Silva, MH. Pesquisa de resíduos de antibióticos em leite pasteurizado tipo c, comercializado na cidade de salvador. *Rev. Bras. Saúde Prod.* 2001. [acesso em 2011 nov 20];2(3):69-73. Disponível em: <http://revistas.ufba.br/index.php/rbspa/article/viewArticle/611>.

[29] da Silva PHF. Leite: aspectos de composição e propriedades. *Química nova na escola.* 1997 Nov;(6).

[30] Marques MD, Pedrosa C, Pierucci APT R, Esteves AC. Propriedades biológicas das proteínas do soro do leite bovino benéficas à saúde humana. *Ceres: Nut & Saú.* 2009;4(2):87-94.

[31] Sgarbieri VC. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. *Rev. Nutr.* 2004 out/dez;17(4):397-409.

[32] Brasil. Ministério Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo a, do leite tipo b, do leite tipo c, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil.* 2002 set. 20; Seção 1, página 13.

[33] Ribas NP, Hartmann W, Monardes HG, Andrade UVC. Sólidos totais do leite em amostras de tanque nos Estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo. *R. Bras. Zootec.* 2004 33(6):2343-2350.

[34] Leonardi AL, Guidolin-Brazaca S, Arthur V. Disponibilidade de cálcio em leite bovino tratado por raios gama. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 2011 jan/mar;31(1):31-40.

- [35] Júnior ODR, Vidal-Martins AMC, Salotti BM, Bürger KP, Cardozo MV, Cortez ALL. Estudo das características microbiológicas do leite uat ao longo de seu processamento. *Arq. Inst. Biol.* 2006 jan/mar;73(1):27-32.
- [36] Domareski JL, Bandiera NS, Sato RT, Aragon-Alegro LC, Santana EHW. Avaliação físico-química e microbiológica do leite UHT comercializado em três países do Mercosul (Brasil, Argentina e Paraguai). 2010;60(3):261-269.
- [37] Silva MVM, Sarmiento AMC, Franca AP. Resíduos de antibióticos no leite e seus efeitos na saúde pública: uma preocupação constante [cd-rom]. in: *anais do 35º Congresso brasileiro de medicina veterinária*; Gramado. Gramado:SBMV ; 2008.
- [38] Embrapa Gado de Leite. Leite: sobe a produção e cai o número de produtores [internet]. Juiz de Fora; 2008 [acesso em 2012 abr 21]. Disponível em: <http://www.cnp.gl.embrapa.br/nova/sala/noticias/jornaldoleite.php?id=374>.
- [39] Júnior SCS, Moraes DAEF, de Faria RA, de Oliveira SMP, Santos DO, Neto PCO. Análise econômica da produção anual de leite bovino em uma fazenda comercial no município de Baraúna, RN. *Acta Vet Bras.* 2008;2(4):131-139.
- [40] Fortes LRLS, Fonseca L. Balança comercial do setor lácteo. Panorama do leite on line [internet]. Juiz de Fora; 2008 [acesso em 2012 abril 2012]. Disponível em <http://www.cnp.gl.embrapa.br/panorama/produtos15.html>.
- [41] Martins JLS, Martins IS. Inibidores bacterianos no leite tipo "B" comercializado no município de São Paulo, SP (Brasil). *Rev Saúde Públ.* 1985;19:421-430.
- [42] Tong L, Li P, Wang Y, Zhu K. Analysis of veterinary antibiotic residues in swine wastewater and environmental water samples using optimized SPE-LC/MS/MS. 2009 Feb; 74(8):1090–1097. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.10.051>.
- [43] Costa AS. Avaliação da presença de resíduos de antimicrobianos em leite e bebida láctea UHT por teste de inibição microbiana comercial [dissertação]. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio; 2009.
- [44] Benedette MF, Silva D, Rocha FPC, Santos DAN, Costa EAD. Mastite bovina. *Rev Cie Ele Med Vet.* 2008; (11). Disponível em: <http://www.revista.inf.br/veterinaria11/revisao/edic-vi-n11-RL64.pdf>.
- [45] Zafalon LF, Filho AN, Oliveira JV, Resende FD. Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: custo-benefício da antibióticoterapia de vacas em lactação. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2007;59(3):577-585.
- [46] Langoni HL, Domingues PF, da Silva AV, Mendonça AO, Cauduro RO. Tratamento da mastite bovina com cefapirina sódica em vacas em plena lactação [internet]. Botucatu. acesso

em 2010 nov 19]. Disponível :
http://www.mastiteonline.com.br/download/trabalhos_tecnicos/tratamento_mastite.pdf.

[47] Trevisan LFA, Pereira AV, de Melo MA, Albuquerque ACL, Pereira MSV, Rodrigues OG, de Lima EQ, Pereira JV. Resistência microbiana aos fármacos no tratamento de mastites: alternativas. *Agro Téc.* 2009;30(1):51–56.

[48] Zafalon LF, Arcaro JRP; Filho AN, Ferreira LM, Castelani L, Benvenuto F. Investigação de perfis de resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados na ordenha de vacas em lactação. *Rev Ins Adolfo Lutz.* 2008 out-11;67(2):118-125.

[49] Tetzner TAD, Benedetti E, Guimarães EC, Peres RFG. Prevalência de resíduos de antibióticos em amostras de leite cru na região do Triângulo Mineiro, MG. *Hig aliment.* 2005;19(130):69-72.

[50] Coldebella A, Machado PF, Demétrio CGB, Júnior PJR, Corassin CH, Meyer PM, Cassoli LD. Contagem de células somáticas e produção de leite em vacas holandesas de alta produção. *Pesq. Agropec. Bras.* 2003 dez;38(12):1451-1457.

[51] H. Langoni¹, W.N. de Araújo², A.V. da Silva³, L.C. de Souza. Tratamento da mastite bovina com amoxicilina e enrofloxacin bem como com a sua associação. *Arq. Inst. Biol.* 2000 jul/dez;67(2):177-180.

[52] Pilon L, Duarte KMR. Técnicas para detectar resíduos de antibiótico em leite bovino [internet]. 2010 [Acesso em: 2011 abr 8]; 4(42). Disponível em: http://www.pubvet.com.br/artigos_det.asp?artigo=873.

[53] Zafalon LF, Filho AN. Relação custo-benefício do tratamento da mastite subclínica causada por *S. aureus*. In: Mesquita AJ, Durr JW, Coelho KO. *Perspectivas e avanços da qualidade do leite no Brasil*. Goiânia: Talento; 2006. p.209-26.

[54] Brancher CC, Fagundes CM. Adaptação do método da redutase para detectar antibióticos no leite. *Rev. Bras. de Agrociência.* 1998 Mai-Ago;2(2):80-84.

[55] Chung HH, Lee JB, Chung YH, Lee KG. Analysis of sulfonamide and quinolone antibiotic residues in Korean milk using microbial assays and high performance liquid chromatography. *Food Chemistry.* 2009 Mar-1;113(1):297–301.

[56] Kantiani L, Farré M, Barcelo D. Analytical methodologies for the detection of β -lactam antibiotics in milk and feed samples. *Trends Analyt Chem.* 2009 Jun;28(6):729–44. DOI:10.1016/j.trac.2009.04.005.

[57] Stolker AAM, Brinkman UAT. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals—a review. *J Chromatogr A.* 2005 Mar;1067(1-2):15–53. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2005.02.037>.

- [58] Folly MM, Machado SCA. Antibiotics residues determination, using microbial inhibition, proteinbinding and immunoassays methods, in pasteurized milk commercialized in the northern region of Rio de Janeiro state, Brazil. *Ciênc Rural*. 2001 Jan/Feb;31(1):95-98. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782001000100015>.
- [59] Almeida LP, Vieira RL, Rossi DA, Carneiro MLM. Resíduos de antibióticos em leite de propriedades rurais da região de Uberlândia-MG. *Biosci. J.* 2003 Sep-Dec; 10(3):83-87.
- [60] Araújo MMP. Validação de métodos imunoenzimáticos para determinação de resíduos de antimicrobianos no leite [tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2010.
- [61] Veloso ACA, Teixeira N, Ferreira MPVLVO, Ferreira MA. Detecção de adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. *Quím. Nova*. 2002 Jul;25(4):609-615. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422002000400016>.
- [62] Biacchi NC, Cardoso AO, Jorge, Ueno M. Detecção de resíduos antibióticos em leite bovino na região do Vale do Paraíba. *Rev. biociên.* 2004 jan/jun;10(1-2):47-49.
- [63] Moraes CMQJ, Durães TS, Nóbrega AW, Jacob SC. Presença de resíduos de antibióticos em leite bovino pasteurizado. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2010 Mai;30(1):33-35. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612009005000002>.
- [64] Fonseca GP, Cruz AG, Faria JAF, Silva R, Moura MRL, Carvalho LMJ. Antibiotic residues in Brazilian UHT milk: a screening study. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2009 abr-jun;29(2):451-453.
- [65] Borges GT, Santana ÂP, de Mesquita AJ, Mesquita SQP, da Silva LAF, Nunes VQ. Ocorrência de resíduos de antibióticos em leite pasteurizado integral e padronizado produzido e comercializado no estado de Goiás. *Ciênc Anim Bras* [internet]. 2006 [acesso em 2012 jan 20];1(1):59-63. Disponível em: <http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/236/3373>
- [66] de Sousa FC, Oliveira ENA, Santos DC, da Silva EFM. Ocorrência de resíduos de antibióticos em leites Pasteurizados comercializados no estado do Ceará –Brasil. *Rev Verde*. 2010 outubro/dezembro;5(4):10-14.
- [67] Porto CR, Anselmo MS, Timm CD, Gonzalez HL, Oliveira DS, Alexis MA, Roos T, Moraes CM. Ocorrência de resíduos de antibióticos beta-lactâmicos no leite cru entregue à indústria na região sudeste do rio grande do sul. *Rev do Inst Lat Cândido Tostes*. 2002; 57(327):313-316.
- [68] Smith MR, Vos JG. Analytical voltammetry – comprehensive analytical chemistry. Elsevier. 1.ed. New York; 1992.

[69] Hart JP. *Electroanalysis of biologically important compounds*. Ellis Horwood Ltd, West Sussex; 1990.

[70] Hernandez L, Zapardiel A, Lopez JAP. Measurement of nanomolar levels of psychoactive drugs in urine by adsorptive Stripping voltammetry. *Talanta*. 1988 Apr; 35(4):287–292.

[71] Alicino JF. Iodometric method for assay of penicillin preparations. *Ind Eng Anal Edn*. 1946 oct;18(10):619–620. DOI: 10.1021/i560158a011

[72] Bundgaard H, Ilver KJ. A new spectrophotometric method for the determination of penicillins. *Pharm. Pharmacol*. 197 oct;24(790):790–794. DOI: 10.1111/j.2042-7158.1972.tb08884.x

[73] Kantiani L, Farre´ M, Barcelo D. Analytical methodologies for the detection of b-lactam antibiotics in milk and feed samples. *Trends in Analytical Chemistry*. 2009 jun;28(6):729–744. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2009.04.005>.

[74] Sorensen LK, Snor LK. Determination of cephalosporins in raw bovine milk by high-performance liquid chromatography *J. Chrom. A*, 2000 jun-6; 882(1-2):145-151. DOI:[http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)01317-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(99)01317-5).

[75] Marzo A, Bo LD. Chromatography as an analytical tool for selected antibiotic classes: a reappraisal addressed to pharmacokinetic applications. *J. Chrom. A*. 1998 jul-3;812(1-2):17–34. [http://dx.doi.org.ez51.periodicos.capes.gov.br/10.1016/S0021-9673\(98\)00282-9](http://dx.doi.org.ez51.periodicos.capes.gov.br/10.1016/S0021-9673(98)00282-9).

[76] Blanchin MD, Fabre H, Mandrou B. Determination of aminoglycosides in pharmaceutical formulations — II. High-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal*. 1989;11(12):1711–1718. DOI:[http://dx.doi.org/10.1016/0731-7085\(89\)80185-2](http://dx.doi.org/10.1016/0731-7085(89)80185-2).

[77] Jones IF, Page JE, Rhodes CT. The polarography of cephalosporin C derivatives. *J. Pharm. Pharmac*, 1968 dec;20(1):45s-47s. DOI: 10.1111/j.2042-7158.1968.tb09860.x.

[78] Ochiai M, Aki O, Morimoto A, Okada K, ASAHI. Reduction of cephalosporanic acids with chromium(II) salts: Synthesis of 3-methylenecepham derivatives. *Tetraedron*. 1975;23(2):115-122. DOI:[http://dx.doi.org/10.1016/0040-4020\(75\)85004-6](http://dx.doi.org/10.1016/0040-4020(75)85004-6).

[79] Benner EJ. Renal damage associated with prolonged administration of ampicillin, cephalosporins, and cephalothin agents and chemotherapy. *Antimic. Agents. Chemth*. Bethesda; 1970. p.417-420.

[80] Ogorevc B, Krasna A, Hudnik V, Gomiscek S. Adsorptive stripping voltammetry of selected cephalosporin antibiotics and their direct determination in urine. *S Mikrochem Acta*. 1991;103(3-4):131-144. DOI: 10.1007/BF01309019.

[81] Li Q, Chen S. Studies on electrochemical behaviour of cephalexin. *Anal Chim Acta*. 1993 oct-5;282(1):145-152. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2670\(93\)80363-P](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2670(93)80363-P).

[82] Hammama E, El-Attar MA, Beltagi AM. Voltammetric studies on the antibiotic drug cefoperazone quantification and pharmacokinetic studies. 2006 oct-11;42(4):523–527. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2006.05.002>.

[83] Billova S, Kizek R, Jelen F, Novotna P. Square-wave voltammetric determination of cefoperazone in a bacterial culture, pharmaceutical drug, milk, and urine. *Anal Bioanal Chem*. 2003;377(2):362–369. DOI 10.1007/s00216-003-2109-5.

[84] El-Desoky HS, Ghoneim EM, Ghoneim MM. Voltammetric behavior and assay of the antibiotic drug cefazolin sodium in bulk form and pharmaceutical formulation at a mercury electrode. *J Pharm Biomed Anal*. 2005 Oct;39(5):1051–1056. DOI:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2005.05.020>.

[85] Golcu A, Doganb B, Ozkan SA. Anodic voltammetric behavior and determination of cefixime in pharmaceutical dosage forms and biological fluids. *Talanta*. 2005 Oct-15; 67(4):703–712. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2005.03.020>.

[86] Ferreira VS, M. Zanoni VB, Fogg AG. Cathodic Stripping Voltammetric Determination of Ceftazidime in Urine at a Hanging Mercury Drop Electrode. *Microchem J*. 1997 Sep; 57(1):115–122. DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/mchj.1997.1516>.

[87] Aleksic M, Ilic M, Vera Kapetanovi'c. Adsorptive properties of cefpodoxime proxetil as a tool for a new method of its determination in urine. *J Pharm Biomed Anal*. 2004 nov-19;36(4):899–903. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2004.08.035>.

[88] Yılmaz N, Biryol I. Anodic voltammetry of cefotaxime. *J Pharm Biomed Anal*. 1988 Sep-30;17(8):1335–1344. DOI:[http://dx.doi.org/10.1016/S0731-7085\(98\)00040-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0731-7085(98)00040-5).

[89] Beconi-Barker MG, Roof RD, Millerioux L, Kausche FM, Vidmar TJ, Smith EB, Callahan JK, Hubbard VL, Smith GA, Gilbertson TJ. Determination of ceftiofur and its desfuroylceftiofur-related metabolites in swine tissues by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B*. 1995 nov-17;673(2):231–244. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0378-4347\(95\)00258-1](http://dx.doi.org/10.1016/0378-4347(95)00258-1).

[90] Kishore M, Surendrababu K, Kalyani ChSRG, Janardhan M. Spectrophotometric determination of Ceftiofur in pharmaceutical formulations by FGFCF, SFNO and MB. *J. Pharm. Sci. & Res*. 1995 nov-17;2(9):534-538.

- [91] Keever J, Voyksnera RD, Tyczkowska KL. Quantitative determination of ceftiofur in milk by liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 1998 Jan;794(1998):57–62. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00933-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00933-3).
- [92] Moats WA, Romanowski RD. Multiresidue determination of β -lactam antibiotics in milk and tissues with the aid of high-performance liquid chromatographic fractionation for clean up. *J Chromatogr A*. 1998 Jul-3;812(1-2):237–247. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00387-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00387-2).
- [93] Souza MJ, Nogueira DR, Silva LM, Arend MZ, Souza Filho PS, Bergold AM. Development and validation of an HPLC method for determination of ceftiofur sodium. *Chromatographia*. 2007 Apr;65(7-8):401–406. DOI:10.1365/s10337-006-0163-9.
- [94] Jacobson GA, Martinod S, Cunningham CP. Determination of ceftiofur in bovine plasma by HPLC-DAD. *J Pharm Biomed Anal*. 2006 Mar-18;40(5):1249–1252. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2005.09.010>.
- [95] Xie HL, Liu LQ, Xu CL. Development and validation of an immunochromatographic assay for rapid multi-residues detection of cepheims in milk. *Anal Chim Acta*. 2009 Feb-16;634(1):129-33. doi:10.1016/j.aca.2008.12.004.
- [96] Boyd DB, Herron DK, Lunn WHW, Spitzer WA. Electronic structures of cephalosporins and penicillins. 11. Parabolic relationships between antibacterial activity of cephalosporins and β -lactam reactivity predicted from molecular orbital calculations. *J. Am. Chem. Soc.* 1980 Mar;102(6):1812–1814. DOI: 10.1021/ja00526a009.
- [97] Page MI, Proctor, PJ. Mechanism of β -Lactam opening in cephalosporins. *J Am Chem Soc.* 1984 Jun. 106(13):3820-3825. DOI: 10.1021/ja00325a019.
- [98] Abraham EP, Newton GGF. The structure of cephalosporin C. *J Biochem.* 1961 May;79:377-93.
- [99] Coene B, Schanck A, Dereppe JM, Meerssche MV. Substituent effects on reactivity and spectral parameters of cephalosporins. *J Med Chem.* 1984 May; 27(5):694-700. DOI: 10.1021/jm00371a025.
- [100] Sabath LD, Jago M, Abraham EP. Cephalosporinase and penicillinase activities of a β -lactamase from *Pseudomonas pyocyanea*. *Biochem. J.* 1965 Sep;96(3):739–752.
- [101] Hamilton-Miller JMT, Newton GGF, Abraham EP. Products of aminolysis and enzymic hydrolysis of the cephalosporins. *J. Biochem.* 1970 Feb;116(3):371–384.
- [102] Buckwell SC, Page M, Longridge JL, Waley SG. Hydrolysis of 6-alkyl penicillins catalysed by β -lactamase I from *Bacillus cereus* and by hydroxide ion. *J Am Soc Perkin Trans II*. 1988;10:1809-1813. DOI: 10.1039/P29880001809.

[103] Sunkara G, Navarre CB, Kompella UB. Influence of pH and temperature on kinetics of ceftiofur degradation in aqueous solutions. *J Pharm and Pharmacology*. 1999 mar;51(3):249–255. DOI: 10.1211/0022357991772411.

[104] Koshy, K. T.; Cazars, A. R. Controlled hydrolysis of ceftiofur sodium, a broad-spectrum cephalosporin; isolation and identification of hydrolysis products. *J. Pharm. Scienc.* 1997 Mar;86(3):389-395. DOI: 10.1021/js950503g.

[105] Rybak M. The pharmacokinetic profile of a new generation of parenteral cephalosporin. *The American Journal of Medicine*. 1996 Jun-24;100(6):39s-44s. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9343\(96\)00106-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9343(96)00106-4).

[106] Dalmarco EM; Blatt SL, Córdova CMM. Identificação laboratorial de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) – Revisão. *RBAC*. 2006;38(3):171-177.

[107] Baririan N, Chanteux H, Viaene E, Servais H, Tulkens PM. Stability and compatibility study of cefepime in comparison with ceftazidime for potential administration by continuous infusion under conditions pertinent to ambulatory treatment of cystic fibrosis patients and to administration in intensive care units. *J Antimicrob Chemother*. 2003;51(3):651–658. DOI: 10.1093/jac/dkg134.

[108] Rule R, Lacchini R, Mordujovich P, Antonini A. Avaliação das variáveis cinéticas de cefepime e da produção de leite em cabras. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 2004;56(1):116-118. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352004000100018>.

[109] T.P.L. Jr, D.H. Rhoneyb, V.H. Tam, P.S. McKinnond, G.L. Drusano. Pharmacodynamic profiling of cefepime in plasma and cerebrospinal fluid of hospitalized patients with external ventriculostomies *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*. 2006 Mar;54(6):223–230. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2005.09.007.

[110] Rule R, Lacchini R, Mordujovich P, Antonini A. Evaluation of cefepime kinetic variables and milk production volume in goats. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 2004;56(1):116-118. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352004000100018>.

[111] de Medeiros EAS. Tratamento de pneumonia em pacientes hospitalizados—resultado de um estudo clínico multicêntrico utilizando uma cefalosporina de quarta geração (cefepima). *Rev Ass Med Brasil*. 1999 Mar;45(1):2-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-42301999000100002>.

[112] Evagelou V, Tsantili-Kakoulidou A, Koupparis M. Determination of the dissociation constants of the cephalosporins cefepime and ceftiofur using UV spectrometry and pH potentiometry. *J Pharm Biomed Anal*. 2003 Apr 10;31:1119-1128. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0731-7085\(02\)00653-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0731-7085(02)00653-2).

[113] Sader HS, Rossi IM, Zoccoli FU, Montelli AC, Sampaio JLM, Segura AJA, Magalhães M, Nowakowski A, Mendes CMF. Evaluation of the in vitro activity of cefepime compared to other broad-spectrum cephalosporins against clinical isolates from eighteen Brazilian hospitals by using the Etest Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 1997 Jun;28(2):87-92. DOI:[http://dx.doi.org/10.1016/S0732-8893\(97\)00015-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0732-8893(97)00015-1).

[114] J.A. Bragatti, Cent. Nerv. Syst. Cefepime-Induced Neurotoxicity. Agents Med. Chem. 2008 Dec;8(4):229-233.

[115] Endimiani A, Perez F, Bonomo RA. Cefepime: a reappraisal in an era of increasing antimicrobial resistance. Rev Anti Infect Ther. 2008 December ;6(6):805–824. DOI:10.1586/14787210.6.6.805.

[116] Ozyuncu O, Nemutlu E, Katlan D, Kir S, Beksac MS. Maternal and fetal blood levels of moxifloxacin, levofloxacin, cefepime and cefoperazone .Int J Antimicrob Agents. 2010 Apr-24;36(2):175–178. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.03.011>.

[117] Bragatti JA, Rossato R, Ziolkowski S, Kliemann FAD. Encefalopatia induzida por cefepime. Arq Neuropsiquiatr. 2005 Mar;63(1):87-92. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-282X2005000100016>.

[118] Coelho FMS, Bernstein M, Yokota PKO, Coelho RME, Wachemberg M, Sampaio LPB, Caboclo LO. Encefalopatia induzida por cefepime em paciente sem insuficiência renal. Einstein. 2010;8(3 Pt 1):358-60. DOI: <http://www.doaj.org/doaj?>.

[119] Bortolozo EAFQ, Tiboni EB, Cândido LMB. Leite humano processado em bancos de leite para o recém-nascido de baixo peso: análise nutricional e proposta de um novo complemento1. Rev Panam Salud Publica. 2004 Sep;16(3):199-205. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1020-49892004000900007>.

[120] Vieira GO, Silva LR, Vieira TO, Almeida JAG, Cabral VA. Hábitos alimentares de crianças menores de 1 ano amamentadas e não-amamentadas. J Pediatr. 2004;80(5):411-6. DOI:10.1590/S0021-75572004000600013.

[121] Oliveira MMT, Amorim VCSA. Aleitamento Materno: Promoção de saúde na infância. Odontol. clín.-cient. 2005 jan/abr;4(1):49-56.

[122] Sales AN, Vieira GO, Moura MSQ, Almeida SPTMA, Vieira TO. Mastite puerperal: estudo de fatores predisponentes. Rev Bras Ginecol Obstet. 2000;22(10):627-632.

[123] Marques RFSV, Lopez FA, Braga JAP. O crescimento de crianças alimentadas com leite materno exclusivo nos primeiros 6 meses de vida. J Pediatr. 2004;80(2):99-105.

[124] Parada CMGL, Carvalhaes MABL, Jamas MT. Práticas de alimentação complementar em crianças no primeiro ano de vida. Rev Latino-am Enfermagem. 2007 março-abril;15(2).

[125] Vannuchia MTO, Monteiro CA, Réac MF, Andrade SM, Matsuo T. Iniciativa hospital amigo da criança e aleitamento materno em unidade de neonatologia. *Rev de Saúde Pública*. 2004;38(3):422-8.

[126] Ribeiro KDS, Melo ILP, Pristo AZO, Dimenstein R. Efeito do processamento do leite humano sobre os níveis de retinol. *J Pediatr*. 2005;1(1):61-4.

[127] Vinagre RD, Diniz EMA, Vaz FAC. Leite humano: um pouco de sua história. *Pediatria*. 2001;23(4):340-5.

[128] Morgano MA, Souza LA, Neto JM, Rondó PHC. Composição mineral do leite materno de bancos de leite. 2005 out-dez. *Ciênc. Tecnol. Aliment*;25(4):819-824.

[129] Cavalcante JLP, Telles FJS, Peixoto MMLV, Rodrigues RCB. Uso da acidez titulável no controle de qualidade do leite humano ordenhado. *Ciênc. Tecnol. Aliment*. 2005 jan-mar; 25(1):103-108.

[130] da Silva RC, Escobedo JP, Gioielli LA, Quintal VS, Ibsen SM, Albuquerque EM. Composição centesimal do leite humano e caracterização das propriedades físico-químicas de sua gordura. *Quim. Nova*. 2007;30(7):1535-1538. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000700007>.

[131] Lamounier JA, Cabral CM, Oliveira BC, Oliveira AB, Oliveira AM, Silva APA. O uso de medicamentos em puérras interfere nas recomendações quanto ao aleitamento materno. *J Pediatr*. 2002;78(1):57-61.

[132] Chaves RG, Lamounier JA. Uso de medicamentos durante a lactação. *J Pediatr*. 2004;80(5 Supl):S189-S198.

[133] Oliveira AA, Castro SV, Lessa NMV. Aspectos do aleitamento materno aspects of breastfeeding. *Rev Dig de Nutrição*. 2(2):1-18.

[134] Almeida JLJ, Kubo F, Silva CAA, Issler H. Uso de antiinflamatórios não-hormonais durante a amamentação:quais podem ser utilizados? *Rev Paul Pediatría*. 2006;24(2):171-9.

[135] Neto MT. Aleitamento materno e infecção ou da importância do mesmo na sua prevenção. *Acta Pediatr Port*. 2006;1(37):23-6.

[136] Sonawane BR. Chemical contaminants in human milk: an overview. *Environmental health perspectives*. 1995 Sept;103(sup6):197-205.

[137] Belal F, El-Kerdawy MM, El-Ashry SM, El-Wasseef DR. Kinetic spectrophotometric determination of ampicillin and amoxicillin in dosage forms. *Il Farmaco*. 2000 Dec;55(11–12):680–686. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-827X\(00\)00080-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-827X(00)00080-X).

[138] Barbhैया RH, Knupp CA, Pfeffer M, Pittman KA. Lack of pharmacokinetic interaction between cefepime and amikacin in humans. *Ant Agents and Chem*. 1992 Jul;36(7):1382–1386.

[139] González JAO, Palacios FJJ, M. Mochón C, de la Rosa FJB. Simultaneous determination of cefepime and grepafloxacin in human urine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. J Pharm Biomed Anal*. 2004 Sep-21;36 (1):117–123. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2004.05.002>.

[140] Aerts MML, Hogenboom AC, Brinkman UAT. Analytical strategies for the screening their residues in edible of veterinary drugs .and products. *J Chromatogr B*. 1995 May-5;667(1):1-40. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0378-4347\(95\)00021-A](http://dx.doi.org/10.1016/0378-4347(95)00021-A).

[141] Changa L, Chou MH, Lin MF, Chenc CF, Tsai TH. Determination and pharmacokinetic study of unbound cefepime in rat bile by liquid chromatography with on-line microdialysis. *J Chromatogr A*. 2001 Apr-20;914(1-2):77–82. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)01207-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(00)01207-3).

[142] Elkhaili H, Linger L, Monteil H, Jehl F. High-performance liquid chromatographic assay for cefepime in serum. *J Chromatogr B*. 1997 March-7;690(1-2):181-188. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4347\(96\)00406-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4347(96)00406-9).

[143] Sankar DG, Latha PVM, Krishna MV. Spectrophotometric determination of cefepime . *Chem Asian J*. 2005 Jul-Sep;17(3):2049-2051.

[144] Rodenas V, Parra A, Villanova JG, Gomez MD. Simultaneous determination of cefepime and k-arginine in injections by second-derivative spectrophotometry. *J Pharm Biomed Anal*. (1995 Aug;13(9):1095-1099. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0731-7085\(95\)01507-H](http://dx.doi.org/10.1016/0731-7085(95)01507-H).

[145] Lopez KJV, DF Bertoluci, Vicente KM, Dell'Aquilla AM, Santos JSRC. Simultaneous determination of cefepime, vancomycin and imipenem in human plasma of burn patients by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B*. 2007 Dec-15;860(2):241–245. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.10.04>.

[146] Valassis IN, Parissi-Poulou M, Macheras P. Quantitative determination of cefepime in plasma and vitreous fluid by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B*. 22 January 1999. Volume 721, Issue 2. 249–255. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4347\(98\)00468-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4347(98)00468-X).

[147] Barbhuiya RH, Forgue ST, Shyu WC, Papp EA, Pittman KA. High-Pressure Liquid Chromatographic Analysis of BMY-28142 in Plasma and Urine. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1987 Jan. DOI: 10.1128/AAC.31.1.55.

[148] Bugnon D, Giannoni E, Majcherczyk P, Glauser MP, Moreillon P. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002;46(11):3654-3656. DOI: 10.1128/AAC.46.11.3654-3656.2002.

[149] Cherti N, Kinowski JM, Lefrant JY, Bressolle F. High-performance liquid chromatographic determination of cefepime in human plasma and in urine and dialysis fluid using a column-switching technique. *J Chromatogr B.* 2001 Apr-25;754(2):377-386. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)00630-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00630-7).

[150] Breilh D, Lavalley C, Fratta A, Ducint D, Cony-Makhoul P, Saux MC. Determination of cefepime and cefpirome in human serum by high-performance liquid chromatography using an ultrafiltration for antibiotics serum extraction. *J Chromatogr B.* 1999 Oct-29;734(1):121-127. DOI:[http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4347\(99\)00343-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4347(99)00343-6).

[151] Palacios FJJ, Mochón MC, Sánchez JCJ, Carranza JH. Adsorptive stripping voltammetric determination of cefepime at the mercury electrode in human urine and cerebrospinal fluid, and differential pulse polarographic determination in serum. *J Pharm Sci.* 2003 set;92(9):1854-1859. DOI:10.1002/jps.10438.

[152] Palacios FJJ, Mochón C, J. C. Sánchez J, López MAB, Pérez AG. Validation of an hplc method for determination of cefepime (a fourth-generation cephalosporin). Determination in human serum, cerebrospinal fluid. *Chromatographia.* 2005;62(7-8):355-361. DOI: 10.1365/s10337-005-0603-y.

[153] de Souza D, Melo LC, Correia NA, Lima-Neto P, Fatibello-Filho O, Mascaro LH. Utilização de eletrodos sólidos de amálgama para a determinação analítica de compostos orgânicos e inorgânicos. *Quim. Nova.* 2011;34(3):487-496. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422011000300022>.

[154] Bernardelli JKB. Preparo e caracterização de eletrodos compósitos a base de carbono, bismuto e poliuretano para determinação de metais [dissertação]. Curitiba. Universidade Tecnológica Federal do Paraná; 2009.

[155] Ribeiro JD. Estudo analítico e avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial da espécie *Pimenta dioica* Lindl [tese]. João Pessoa. Universidade Federal da Paraíba; 2009.

[156] Baś B, Baś S. Rapidly renewable silver amalgam annular band electrode for voltammetry and polarography. *Electrochem commun.* 2010 Jun;12(6):816-819. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.elecom.2010.03.041>.

[157] Novais M, Stradiotto NR, Caetano LG, de Souza D. Utilização de eletrodo sólido de amálgama de Prata (AgSAE) para detecção de sulfeto [internet]. Instituto de Química: Unesp. [acesso em 2011 nov 19]. Disponível em: www.google.com.br.

[158] Melo LC, Salazar-Bandab GR, Machado SAS, Lima-Neto P, de Souza D, Correia AN. Talanta. A simple and sensitive detection of diquat herbicide using a dental amalgam electrode A comparison using the chromatographic technique 2009 Oct; 79(5):1216–1222. DOI:<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2009.04.024>.

[159] de Souza D, Toledo RA, Suffredini HB, Mazo LH, Machado SAS. Characterization and use of copper solid amalgam electrode for electroanalytical determination of triazines-based herbicides. *Electroanalysis*. 2006 mar;18(6):605–612. DOI: 10.1002/elan.200503441.

[160] Claro FA, Ito FR, Bastos FM, Ribeiro ME. Mercúrio no amálgama odontológico: riscos Da exposição, toxicidade e métodos de controle -revisão da literatura. *Rev. biociênc.* 2003 Jan-Mar;9(1):47-54.

[161] Kapturski P, Bobrowski A. The silver amalgam film electrode in catalytic adsorptive stripping voltammetric determination of cobalt and nickel. *J Electroanal Chem.* 2008 Jun-1; 617(1):1–6. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2008.01.007>.

[162] Hason S, Vetterl V. Detection of synthetic oligonucleotides by alternating current voltammetry at solid amalgam surfaces. *Electrochim Acta.* 2006 Jul-15;51(24):5199–5205. <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2006.03.044>.

[163] Yosypchuk L, Novotny B. Cathodic stripping voltammetry of cysteine using silver and copper solid amalgam electrodes. *Talanta.* 2002 Apr-1;56(5):971–976. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0039-9140\(01\)00657-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0039-9140(01)00657-9).

[164] Selesovska-Fadrna R, Fojta M, Navratil T, Chylkov J. Brdicka-type processes of cysteine and cysteine-containing peptides on silver amalgam electrodes. *Anal Electrochim Acta.* 2007 Jan-23;582(2):344–352. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2006.08.064>.

[165] Jiraneka I, Peckova K, Kralova Z, Moreira JC, Bareka J. The use of silver solid amalgam electrode for voltammetric and amperometric determination of nitroquinolines. *Electrochim Acta.* 2009 Feb-28;54(7):1939–1947. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2008.08.022>.

[166] Dantas ANS, de Souza D, de Lima JES, Lima-Neto P, Correia AN. Voltammetric determination of ketoconazole using a polished silver solid amalgam electrode. *Electrochim Acta.* 2010 Dec-1;55(28):9083–9089. DOI:10.1016/j.electacta.2010.08.026.

[167] Barros CB. Validação de métodos analíticos. *Biol.* 2002 jul./dez;64(2):175-177.

[168] Thier HP, Zeumer H. Manual of pesticide residue analysis. New York:VCH;1987.

[169] Cerqueira MBR, Dias AN, Caldas SS, Santana FB, D'Oca MGM, Primel EG. Validação de método para determinação de ácidos orgânicos voláteis em efluentes de reatores anaeróbios empregando cromatografia líquida. *Quim. Nova.* 2011;34(1):156-159. DOI:<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422011000100029>.

[170] Oliveira FM: Guia do Usuário do Software "LABWIN-CQA". Labwin Ltda;2006.

[171] Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF, Melo LFC. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova.* 2004 Set/Out;27(5):771-780. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422004000500017>.

[172] Aleixo, L. M. Voltametria: Conceitos e Técnicas. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química.

[173] de Souza D, Galli A, Calegaro ML, Machado AS. Utilização da múltipla voltametria de onda quadrada na determinação eletroanalítica de compostos orgânicos e inorgânicos. *Quím Nova.* 2007 Mar/Apr; 30(2):458-463. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000200038>.

[174] de Souza D, Machado SAS, Avaca LA. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. *Quím. Nova.* 2003 Jan/Feb;26(1):81-89. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422003000100015>.

[175] Agostinho SML, Villamil RFV, Neto AA, Aranha H. O eletrólito suporte e suas múltiplas funções em processos de eletrodo. *Quim. Nova.* 2004 Out;27(5):813-817. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422004000500022>.

[176] Barbosa AMJ, Trindade MAG, Ferreira VS. Cathodic stripping voltammetry determination of ceftiofur antibiotic in formulations and bovine serum. *Anal. Letters.* 2006 set;39:1143-1158. DOI:10.1080/00032710600621995.

[177] Bard AJ, Faulkner LR. *Electrochemical methods fundamentals and applications.* 2^a ed New York: John Wiley & Sons; 2001. p.856.

[178] Cabral MF, de Souza D, Alves CR, Machado SAS. Estudo do comportamento eletroquímico do herbicida ametrina utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada. *Ecl. Quím.* 2003;28(2):41-47. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-46702003000200005>.

[179] Aleksic MM, Kapetanovic V, Atanackovic J, Jovic B, Zecevic M. Simultaneous determination of cefotaxime and desacetylcefotaxime in real urine sample using voltammetric and high-performance liquid chromatographic methods. *Talanta.* 2008 Oct-19;77(1):131-137. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.047>.

[180] Hall DA, Berry DM, Schneider CJ. The electrochemistry of cephalosporinC derivatives: Part II. Cephalothin, sodium salt. 1977 jul-11;80(1):155–170. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-0728\(77\)80111-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-0728(77)80111-3).

[181] Ochiai M, Aki O, Morimoto A, Okada K, Asahi J. Electrochemical reduction of cephalosporanic acids. *Tetrahedron Lett.* 23:p.2341, 1972. DOI: 10.1039/P19740000258.

[182] Ogorevc, B, Smyth MR, Hudnik V, Gomiscek S. Electroanalysis of cefazolin, ceftriaxone and cefotaxime. *Electrochemistry, Sensors and analysis.* 1986;403-409.

[183] El-Maali NA, Ali AMM, Ghandour MA. Electrochemical reduction and oxidation of two cephalosporin antibiotics: ceftriaxone (recephin) and cefoperazone. *Electroanalysis.* 1993 Aug;5(7):599-604. DOI: 10.1002/elan.1140050712.

[184] Li Q, Chen S. Studies on electrochemical behaviour of cephalixin. *Analytica Chimica Acta* 1993 Oct;282(1,5):145–152. DOI:[http://dx.doi.org/10.1016/0003-2670\(93\)80363-P](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2670(93)80363-P).

[185] Aleksic M, Milovanovic L, Kapetanovic V. Adsorptive stripping voltammetric determination of cefetamet in human urine. *J Pharm Biomed Anal.* 2003 Aug-8;32(4–5):957–966. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0731-7085\(03\)00197-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00197-3).

[186] El maali NA, Ali AMM, khodari M. Cathodic stripping voltammetric determination of the cephalosporin antibiotic ceftriaxone at the mercury electrode in aqueous and biological media. *Bioelectrochemistry and bioenergetics.* 1991;26:485-492.

[187] Pedrosa VA, Codognoto L, Avaca LA. Electroanalytical determination of 4-nitrophenol by square wave voltammetry on diamond electrodes. *J. Braz. Chem. Soc.* 2003;14(4):530-535. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532003000400007>.

[188] Li Q, Chen S. Studies on electrochemical behaviour of cephalixin. *Analytica Chimica Acta.* 19935 Oct-15;282(1):145-152. DOI: [http://dx.doi.org.ez51.periodicos.capes.gov.br/10.1016/0003-2670\(93\)80363-P](http://dx.doi.org.ez51.periodicos.capes.gov.br/10.1016/0003-2670(93)80363-P).

[189] Rodrigues LNC, M.V.B. Zanoni, A.G. Fogg. Indirect polarographic and cathodic stripping voltammetric determination of cefaclor as an alkaline degradation product. *J Pharm Biomed Anal.* 1992 Nov-2;21(3):497–505. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0731-7085\(99\)00174-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0731-7085(99)00174-0).

[190] Ivama VM, Rodrigues LNC, Guaratini CCI, Zanoni MVB. Spectrophotometric determination of cefaclor in pharmaceutical preparations. *Quím. Nova.* 1999 Mar/Apr;22(2):201-204. DOI:<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40421999000200011>

- [191] Özkana SA, Uslu B, Zuman P. Electrochemical reduction and oxidation of the antibiotic cefepime at a carbon electrode. *Anal Chim Acta*. 2002 Apr-22;457(2):265–274. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00022-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00022-3).
- [192] Uslu B, Ozkana SA, Zuman Pb. Contribution to the alkaline degradation of cefepime. *Microchem J*. 2004 Feb;76(1–2):61–63. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2003.10.011>.
- [193] Ferreira VS. Estudo do comportamento eletroquímico e determinação voltamétrica de ceftazidima e ácido cinâmico em fluídos biológicos [tese]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 1998.
- [194] Al-ghamdi AH, Al-shadokhy MAAA. Al-warthan, Electrochemical determination of Cephalothin antibiotic by adsorptive stripping voltammetric technique, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2004 Sep-3;35(5):1001–1009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2004.02.034>
- [195] Ferreira VS, Zanoni MVB, Furlan M, Fogg AG. Differential pulse polarographic determination of ceftazidime in urine samples with and without prior extraction, *Anal. Chim. Acta*, 1997 Sep-30;351:105-114. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670\(97\)00347-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670(97)00347-4).
- [196] Aleksić MM, Kapetanović V, Atanacković J, Jocić B, Zečević M. Simultaneous determination of cefotaxime and desacetylcefotaxime in real urine sample using voltammetric and high-performance liquid chromatographic methods, *Talanta*. 2008 Oct-19;77(1):131–137. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.047>.
- [197] Piech R, Bogusław B, Kubiak WW. The cyclic renewable mercury film silver based electrode for determination of molybdenum(VI) traces using adsorptive stripping voltammetry. *Talanta*. 2008 Jul-15;76(2):295–300. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2008.02.038>.
- [198] de Souza D, Machado SAS, Avaca LA. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. *Quím. Nova*. 2003 Jan/Feb;26(1):81-89. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422003000100015>.
- [199] Nuwer MJ, O’dea JJ, Osteryoung J. Analytical and kinetic investigations of totally irreversible electron transfer reactions by square-wave voltammetry. *Anal Chim Acta*. 1991 Oct-21;251(1-2):13-25. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2670\(91\)87110-S](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2670(91)87110-S).
- [200] Golcu A, Dogan B, Ozkan SA. Anodic voltammetric behavior and determination of cefixime in pharmaceutical dosage forms and biological fluids. *Talanta*. 2005 Oct-15;67(4):703–712. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2005.03.020>.

ANEXO A

1° artigo (Aceito para publicação na Revista Journal of Applied Electrochemistry)

J Appl Electrochem (2011) 41:249–255
 DOI 10.1007/s10800-010-0232-5

ORIGINAL PAPER

A simple method for electroanalytical determination of ceftiofur in UHT milk samples using square-wave voltammetry technique

Antonio Marcos Jacques Barbosa ·
 Tatiane Alfonso de Araújo ·
 Magno Aparecido Gonçalves Trindade ·
 Valdir Souza Ferreira

Received: 9 February 2010 / Accepted: 15 October 2010 / Published online: 4 November 2010
 © Springer Science+Business Media B.V. 2010

Abstract A simple electroanalytical method was developed to determine the antibiotic ceftiofur (CF) in milk. The method is based on the adsorptive accumulation of the drug on a hanging mercury-drop electrode (HMDE) and the accompanying initiation of a negative square wave, which yielded well-defined cathodic peaks at -0.60 V (1C) and -0.91 V (2C) vs. Ag/AgCl. Calibration graphs were constructed and statistical parameters were evaluated. At pH 2.5, the square-wave voltammetry method revealed linearity from 52.4 to 524 ng mL⁻¹ ($r = 0.997$), which is in accordance with the tolerance level of 100 ng mL⁻¹ for CF as a residue in bovine milk established by the Food and Drug Administration (FDA) and the European Union. The limits of detection and quantification were 1.86 and 6.20 ng mL⁻¹, respectively. The method was tested to determine CF in spiked milk samples using HPLC as reference method.

Keywords Ceftiofur · Lactams · Milk · Residue analysis · Voltammetry

1 Introduction

Antibiotics are widely used in dairy cattle management for the treatment of diseases and as dietary supplements. They may be administered orally as feed additives or directly by injection. The use of antibiotics may result in drug residues being present in milk, especially when they are not used

according to label directions. The presence of antibiotic residues in milk may cause allergic reactions in sensitive individuals, interfere with starter cultures for cheese and other dairy products, or indicate that the milk was obtained from an animal with a serious infection [1].

Ceftiofur (CF) (Fig. 1) is a widely used broad-spectrum third-generation cephalosporin antibiotic approved for the treatment of infections in cattle, swine, sheep, goats, turkeys, and chickens [2]. No withdrawal period is required after treatment. An acceptable daily intake (ADI) for residues has been calculated at 20 g kg⁻¹ of body weight. In the European Union, the antibiotic has been included in Annex I of Council Regulation 2377/90 and assigned a maximum residue limit (MRL) of 100 µg L⁻¹ in milk. This MRL, along with those established for other edible tissues, corresponds to an intake of approximately 87% of the ADI for a standard diet [3]. CF metabolism has been described in rats [4], dairy cattle [5], and swine [6]. The thioester bond in this compound is rapidly cleaved to give desfuroylceftiofur, which is further metabolized to a disulfide dimer and various desfuroylceftiofur-protein and amino acid conjugates. Free desfuroylceftiofur is an active metabolite in which the intact cephalosporin portion of the molecule is responsible for biological activity [7].

Chromatographic procedures have been described for determination of a single cephalosporin [8] or simultaneous determination of cephalosporins [9] in milk. Methods have been reported for determination of CF [9, 10] or conjugated residues of CF [3] in milk. Electroanalytical techniques have been used to determine other cephalosporins, such as cefpodoxime proxetil [11], ceftazidime [12], cephalothin [13], cefminox [14], cefetamet-Na [15], cephalixin [16], cefaclor [17], ceftriaxone [18], cefixime [19], and cefepime [20], providing sensitivity equivalent to that of HPLC techniques. Most cephalosporins are electroactive by virtue

A. M. J. Barbosa · T. A. de Araújo · M. A. G. Trindade (✉) ·
 V. S. Ferreira
 Department of Chemistry, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), C.P. 549, Campo Grande, MS 79074-460, Brazil
 e-mail: magnotr@gmail.com

ANEXO B

2° artigo (Aceito para publicação na Revista Microchemical Journal)

Microchemical Journal 98 (2011) 297–302



Contents lists available at ScienceDirect

Microchemical Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/microc

A new indirect method based on square-wave voltammetry for ceftiofur determination in bovine milk using an alkaline degradation product

Antonio Marcos Jacques Barbosa^{a,b}, Tatiane Alfonso de Araujo^a,
Magno Aparecido Gonçalves Trindade^c, Valdir Souza Ferreira^{a,*}

^a Department of Chemistry, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Av. Filinto Muller, 1555, Caixa Postal 549, Campo Grande, MS 79074-460, Brazil

^b Setor de Toxicologia, Laboratório Central de Saúde Pública de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS 79074-460, Brazil

^c School of Science and Technology, Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia Dourados-Itahum, Km 12, Dourados, MS 79804-970, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 January 2011

Received in revised form 17 February 2011

Accepted 18 February 2011

Available online 26 February 2011

Keywords:

Ceftiofur

Lactams

Milk sample

Hydrolysis

Electroanalysis

ABSTRACT

In this paper we present a new electroanalytical method for determination of ceftiofur based on the hydrolysis of this antibiotic in 0.04 mol L⁻¹ Britton–Robinson buffer at pH 10 and 60 °C for 60 min (reduction peak at -0.70 V). Conditions were optimized for complete hydrolysis and quantitative determination of ceftiofur in milk. The method can be successfully used for determination of the antibiotic directly from samples of fluid milk and powder milk spiked to concentrations of 6.0 × 10⁻⁸, 8.0 × 10⁻⁸, and 10 × 10⁻⁸ mol L⁻¹, respectively. Recovery test ranged from 98.28% to 100.83%. The limits of detection and quantification were 3.73 × 10⁻¹⁰ and 1.24 × 10⁻⁹ mol L⁻¹, respectively. The method has the advantage of eliminating interference from proteins present in the sample, thus obviating the need for exhaustive extraction, which often renders other procedures unfeasible in terms of time and reagent cost. In addition, waste generation was found to be lower than in other methods.

Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Milk productivity is an important contributor to economic dynamics globally. Genetic research, improved nutrition, and close monitoring of animal health are among the measures currently applied to improve the quality of milk production, where milk is a critical source of essential nutrients for children and adults in many societies [1].

From a technological standpoint, residues of antimicrobial agents in milk can lead to considerable losses in the production of fermented derivatives, for instance by inhibiting bacterial fermentation in cheese and yoghurt production [2]. Although consumers' tolerance to antibiotic residues in milk varies widely, the implementation and monitoring of quality assurance programs at every stage of milk handling and processing are now viewed as crucial [3]. Antibiotics present in milk can degrade during pasteurization, generating products with allergenic effects, a problem which cannot be determined by conventional methods. For these reasons, the maximum permitted levels of antibiotic residues in foodstuffs have been gradually lowered [4].

In Brazil, the presence of antibiotics was recently investigated by applying qualitative methods to 210 raw milk samples collected from four dairy production areas. Antibiotic residues were detected in 24 samples (11.4%), suggesting that, as in other countries, antibiotics are a significant chemical hazard in locally produced milk [5].

Ceftiofur is a widely used broad-spectrum third-generation cephalosporin antibiotic approved for treatment of infections in cattle, swine, sheep, goats, turkeys, and chickens. A four-membered ring structure makes β-lactam antibiotics (which include penicillins and cephalosporins) active against gram-positive and gram-negative bacteria by covalently binding to, and interrupting the functioning of, enzymes responsible for bacterial cell wall synthesis [6].

Many countries regulate the use of antibiotics in livestock for food production, establishing maximum residue limits (MRL) and monitoring their occurrence. In Brazil, the National Plan for Residue Control in Animal Origin Products (PNCR), set up by the Ministry of Agriculture, comprises Residue Control Programs for meat, honey, milk, and fish. Product assessment is carried out at private and government-run laboratories capable of applying validated analytical methods for residue identification and quantification [7].

Given their simplicity and low cost, microbial assays are routinely applied to milk samples, but can be lengthy (up to several hours) and lack selectivity and sensitivity to reliably identify or quantify residual antibiotics [4]. Sensitive, specific confirmatory tests are therefore still needed. Furthermore, bioanalytical methods require the minimizing of sample preparation procedures, and solid-phase extraction might compromise analyte stability and quantitativity. As a rule of thumb, the simplest preparation procedure is the preferred method [8].

Current methods for analyzing cephalosporins, especially ceftiofur, are based on liquid chromatography [9], electrospray mass spectrometry [10], spectrophotometry [11], or immunochromatography [12]. To our knowledge, no data have been published on voltammetric

* Corresponding author. Tel.: +55 67 33453596; fax: +55 67 33453552.

E-mail address: vsouza@ufms.br (V.S. Ferreira).

ANEXO C

3º artigo (Aceito para publicação na Revista Journal of Electroanalytical chemistry)

Journal of Electroanalytical Chemistry 681 (2012) 127–132



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Electroanalytical Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jelechem

Direct cefepime determination in human milk using solid mercury amalgam electrode manufactured with silver nanoparticles

Antonio Marcos Jacques Barbosa^{a,b}, Tatiane Alfonso de Araujo^a, Magno Aparecido Gonçalves Trindade^{c,*}, Valdir Souza Ferreira^{a,*}

^a Department of Chemistry, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Av. Filinto Muller, 1555, Caixa Postal 549, Campo Grande, MS 79074-460, Brazil

^b Setor de Toxicologia, Laboratório Central de Saúde Pública de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS 79074-460, Brazil

^c School of Science and Technology, Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia Dourados-Itahum, Km 12, Dourados, MS 79804-970, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 March 2012

Received in revised form 5 June 2012

Accepted 19 June 2012

Available online 27 June 2012

Keywords:

Cefepime
β-lactams
Human milk
Electroanalysis
Silver solid amalgam electrode

ABSTRACT

Solid silver mercury amalgam electrodes (AgSAEs) represent a suitable alternative to mercury electrodes due to their similar electrochemical properties and non-toxicity of the amalgam material. Based on this knowledge, we report the use of silver solid amalgam as working electrode to determine cefepime in human milk sample. Square-wave voltammogram registered for cefepime in Britton–Robinson buffer at pH 2.5, presented two well-defined reduction peaks, at -0.28 V (peak 1C) and -0.45 V (peak 2C). Under optimized condition, the calibration curves presented linear response from 3.0×10^{-7} to 2.1×10^{-6} mol L⁻¹ with limits of detection and quantification of 8.51×10^{-9} and 2.84×10^{-8} mol L⁻¹, respectively. The applicability of the method was verified using spiked human milk samples and testing recovery percentages, which were ranged from 98.00% to 100.5%. The obtained results were also compared with those provided with the HPLC technique.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

According Vyskocil and Barek, in a review paper [1], during the 1950s and 1960s, DC polarography (DCP) was one of the five most frequently used analytical techniques. However, with the progress of spectrometric and separation techniques – employed in the determination of a variety of organic compounds – DCP lost its importance. Resurgence of electroanalytical techniques was based on new possibilities in trace analysis from use of square-wave voltammetry (SWV) and differential pulse voltammetry (DPV) at hanging mercury drop electrode (HMDE) [1]. However, the toxicity of mercury limits the usage of the mercury electrodes in the analytical practice and excludes them from the out-of-laboratory applications [2].

The search for new simple electrochemical sensors for analysis and study of biomolecules represents an inseparable part of the development of bioelectrochemical methods and instrumentation. Recently, new types of metal solid amalgam electrodes (MeSAEs) for common voltammetric applications were suggested [3–6]. Silver solid amalgam electrodes (AgSAEs), introduced by Mikkelsen and Schroder and independently by Yosypchuk and Novotny, represent an intermediate between the mercury electrode and usual solid electrodes; it combines advantages of both [7]. In this context, the p-MeSAE is closely connected to electrodes based on

amalgamated metals (Ag, Au, Pt, Ir, Cu). MeSAE can be easily polished using emery paper followed by wet alumina. They contain a relatively high content of metal (in the case of AgSAE it is 20% of Ag or even more) and they can be easily prepared by thorough mixing of corresponding aliquots of mercury and metal powder [8]. In this contribution, we show the scope and limitations of AgSAE on the example of voltammetric determination of cefepime antibiotic that belongs to the family of cephalosporins.

Cephalosporins are among the safest and the most effective broad-spectrum bactericidal antimicrobial agents and therefore, they are the most frequently prescribed class of antibiotics [9]. These are classified into four generations [10,11] based on their resistance towards β-lactamase degradation.

Cefepime, [2-aminothiazol-4-yl]-2(Z)-[methoxy-iminoacetamido]-3-[methyl-1-pyrrolidino] methyl-ceph3-em4-carboxylic acid is a new injectable fourth-generation β-lactam cephalosporin with a positively charged quaternised *N* methyl-pyrrolidine substitution at the 3 position of the cephem nucleus [12]. The drug is considered a broad spectrum and shows an excellent activity against *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus spp.* [13], reaching a wide distribution into most body tissues and fluids and is excreted in human milk and urine [14,15], which at least 85% is excreted unchanged in human urine. This drug is mainly used for the treatment of lower respiratory infections, febrile neutropenic events, urinary tract infections skin soft tissue infections,

* Corresponding authors. Tel.: +55 67 3410 2081; fax: +55 67 3410 2072.

E-mail addresses: magnotr@gmail.com (M.A.G. Trindade), valdir.ferreira@ufms.br (V.S. Ferreira).