UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CÂMPUS DE ARARAQUARA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DE PREPARAÇÕES INJETÁVEIS DE AMPICILINA SÓDICA

ELIANE GANDOLPHO TÓTOLI

ORIENTADORA: Prof[a]. Dr[a]. Hérida Regina Nunes Salgado

ARARAQUARA-SP

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CÂMPUS DE ARARAQUARA

ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DE PREPARAÇÕES INJETÁVEIS DE AMPICILINA SÓDICA

ELIANE GANDOLPHO TÓTOLI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADORA: Prof[a]. Dr[a]. Hérida Regina Nunes Salgado

ARARAQUARA-SP

2013

Ficha Catalográfica
Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Tótoli, Eliane Gandolpho
T717a Análise químico-farmacêutica de preparações injetáveis de ampicilina sódica / Eliane Gandolpho Tótoli. – Araraquara, 2013
1557 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas
Orientador: Hérida Regina Nunes Salgado

1. Ampicilina sódica. 2. Métodos analíticos. 3. Controle de qualidade. 4. CLAE. 5. Ensaio microbiológico. 6. Espectrofotometria no infravermelho médio. 7. Validação. I. Salgado, Hérida Regina Nunes, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

Eliane Gandolpho Tótoli

ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DE PREPARAÇÕES INJETÁVEIS DE AMPICILINA SÓDICA

Esta dissertação foi julgada e aprovada para obtenção de grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista.

Araraquara, 18 de fevereiro de 2013.

Prof[a]. Dr[a]. Hérida Regina Nunes Salgado (FCFar-UNESP)
Presidente/orientadora

Prof. Dr. Marlus Chorilli (FCFar-UNESP)

Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira (UFRGS)

ARARAQUARA-SP
2013

Dedico este trabalho à minha amada família,
por sempre apoiar todas as minhas decisões e
dar o incentivo necessário para que eu
consiga alcançar as minhas metas.

AGRADECIMENTOS

É com enorme prazer e carinho que agradeço, sinceramente, a todos que contribuíram direta ou indiretamente com a elaboração deste trabalho:

Primeiramente, agradeço a Deus, por me dar coragem, perseverança e capacidade para a realização deste trabalho.

Agradeço aos meus queridos pais, Luiz e Luiza, por tornarem minha caminhada até aqui possível. Sem sua confiança, companheirismo e desprendimento esta conquista não seria possível. Por isso, serei eternamente grata.

Ao meu querido irmão, Márcio, agradeço a amizade, o carinho e o incentivo de sempre.

Ao meu amado marido, Ricardo, tenho muito a agradecer por todo o incentivo, palavras de conforto, companheirismo, amizade e paciência. Você tornou esta jornada muito mais fácil e a cada dia aprendo mais com você!

À minha amada avó, Nair, pela dedicação, carinho e incentivo.

À minha querida orientadora, Prof[a]. Dr[a]. Hérida Regina Nunes Salgado, por ter me concedido a oportunidade de, anos atrás, começar um estágio de iniciação científica em seu laboratório, o que me fez descobrir minha paixão pela pesquisa. Também a agradeço por ter me dado a oportunidade de fazer parte de um projeto tão especial, além da amizade, confiança, incentivo, paciência e dedicação. A você minha grande admiração e gratidão!

À Prof[a]. Dr[a]. Andréia de Haro Moreno agradeço pelo incentivo à minha carreira, ajuda e amizade. Você é um exemplo a ser seguido!

Em alguns momentos, a elaboração de uma dissertação é um trabalho solitário. Outras vezes, é feita de companheirismo e troca de conhecimentos, angústias e alegrias. No meu caminho tive o prazer de conhecer e adotar como parte da minha família meus queridos colegas do laboratório: Tahisa, Lucas, Ana Carolina, Flávia Fiorentino, Flávia Carnavalli, Lucélia, Josilene, Andressa, Camila, Edith Cristina, Jéssica, Bruna, Lenita e Rudy. Obrigada por tornarem meus dias mais alegres!

Faço um agradecimento especial à Tahisa e ao Lucas, que estiveram sempre ao meu lado durante a realização deste trabalho, me ajudando, apoiando, trocando conhecimentos e alegrias! Obrigada por tudo!

Agradeço à Maria de Fátima Rodrigues, pela amizade de tantos anos e por toda dedicação e exemplo de profissionalismo! Obrigada por cuidar tão bem de todos nós no laboratório! Sem você, com certeza, tudo seria muito mais difícil!

Agradeço também a todos os estagiários que me ajudaram (e muito!) durante a fase prática deste trabalho. Meu agradecimento especial à Maíra, à Roberta, ao Thales e ao Jan Frommelt. Espero também ter contribuído com a formação de vocês! Muito obrigada por toda a ajuda e amizade!

À Prof[a]. Dr[a]. Maria Virgínia Costa Scarpa, por abrir as portas de seu laboratório, contribuindo com o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof[a]. Dr[a]. Thalita Formariz e Prof. Dr. Rudy Bonfilio por terem participado do meu exame de qualificação, colaborando com correções e sugestões para tornar este trabalho melhor.

Ao Prof. Dr. Marlus Chorilli e Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira por terem participado da minha defesa, contribuindo com sugestões pertinentes para tornar este trabalho melhor.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, pela contribuição em minha formação científica.

A todos os professores do Centro Universitário de Araraquara (UNIARA), pela formação sólida e de qualidade.

Ao Laboratório Farmacêutico União Química pela gentil doação da ampicilina sódica substância química de referência e amostras de Uni Ampicilin®.

Ao CNPq e ao PADC-FCF-UNESP, agradeço pelo apoio financeiro concedido.

À FAPESP, agradeço à bolsa concedida.

RESUMO

A ampicilina sódica é um antimicrobiano β-lactâmico, semi-sintético, de uso parenteral, pertencente ao grupo das penicilinas. Trata-se da primeira penicilina semi-sintética a apresentar atividade contra bacilos Gram-negativos, abrindo o campo de penicilinas de amplo espectro. Existem vários trabalhos na literatura que descrevem métodos analíticos para análise da ampicilina em formas farmacêuticas. A maior parte deles envolve a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com fases móveis constituídas por soluções-tampão, as quais podem danificar as colunas cromatográficas, ou métodos que envolvem o gasto de grandes quantidades de solventes orgânicos. No entanto, a tendência é que as indústrias busquem minimizar e/ou eliminar o uso de solventes orgânicos de seus processos com o objetivo de reduzir os impactos de suas atividades sobre o meio ambiente. Desta forma, este trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento de novos métodos analíticos para análise de ampicilina sódica na forma farmacêutica de pó liofilizado para solução injetável, que apresentem menor impacto sobre o meio ambiente e que sejam mais práticos, mais seguros para os operadores e mais econômicos que as metodologias analíticas já descritas para a ampicilina. A ampicilina sódica foi analisada qualitativamente quanto à umidade e solubilidade. Também foi realizada análise por espectrofotometria no infravermelho e desenvolvido método por cromatografia em camada delgada (CCD) indicativo de estabilidade. Quanto à análise quantitativa, foi validado método por CLAE com detecção ultravioleta (UV) a 210 nm, fase móvel composta por etanol e água (40:60, v/v) e faixa de concentração de 70,0 a 120,0 µg/mL, exatidão de 99,54%, teor de 96,83% e tempo de retenção médio de 3,1 minutos; ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico, na faixa de concentração de 2,0 a 8,0 µg/mL, utilizando *Staphylococcus aureus* ATCC 26923, com exatidão de 100,79% e teor de 98,05%; e espectroscopia na região do infravermelho, na faixa de concentração de 1,0 a3,0 mg/150 mg, exatidão de 100,28% e teor de 97,07%. A validação dos métodos foi conduzida de acordo com os guias do ICH e com a legislação brasileira. Os métodos desenvolvidos não apresentaram diferença estatística para nível de significância de 5%, demonstrando ser equivalentes para a quantificação da ampicilina sódica em amostras de pó liofilizado para solução injetável.

Palavras-chave: ampicilina sódica, métodos analíticos, controle de qualidade, CLAE, ensaio microbiológico, espectrofotometria no infravermelho médio, validação.

ABSTRACT

Ampicillin sodium is a semi-synthetic β-lactam antibiotic for parenteral use, belonging to the penicillin group. It was the first semi-synthetic penicillin to show any action against Gram-negative bacilli, opening a field of broad spectrum penicillins. There are several published studies in literature that describe analytical methods for ampicillin in pharmaceutical dosage forms. Most of them are related to high performance liquid chromatography (HPLC) using mobile phases constituted by buffer solutions, which may damage the chromatographic columns over time, or methods that involve, mostly, the use of large amounts of organic solvents. However, the tendency is that industries seek to minimize or eliminate the use of organic solvents in their processes in order to reduce the impacts of their activities on the environment. In this way, this study aimed to develop new analytical methods for the analysis of ampicillin sodium in lyophilized powder for injectable solution, which have the lowest impact on the environment as possible and that be more convenient, safer for operators and more economical than the analytical methodologies already described for ampicillin. Ampicillin sodium was analyzed qualitatively as the moisture content and solubility characteristics. Furthermore, it was performed an analysis by infrared spectroscopy and was developed a stability indicative method by thin layer chromatography (TLC). Regarding the quantitative analysis, it was validated HPLC methodology with UV detection at 210 nm, mobile phase composed by ethanol and water (40:60 v /v), the concentration range from 70.0 to 120.0 µg/mL, accuracy of 99.54%, content of 96.83% and average retention time of 3.1 minutes; microbiological assay by turbidimetric method, in the concentration range from 2.0 to 8.0 µg/mL, using Staphylococcus aureus ATCC 26923, with accuracy of 100.79% and 98.05% of content; and infrared spectroscopy, in the concentration range from 1.0 to 3.0 mg/150 mg, 100.28% of accuracy and content of 97,07%. Validation of the methods was conducted according to ICH guidelines and Brazilian legislation. The developed methods showed no statistical difference for a significance level of 5%, proving to be equivalent to the quantification of ampicillin sodium in samples of lyophilized powder for injectable solution.

Keywords: ampicillin sodium, analytical methods, quality control, HPLC, microbiological assay, mid-infrared spectroscopy, validation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 20
2. OBJETIVOS 22
2.1. Objetivos gerais 22
2.2. Objetivos específicos 22
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 23
3.1. Antimicrobianos β-lactâmicos 23
3.2. Penicilinas 24
3.2.1. História 24
3.2.2. Estrutura química e classificação das penicilinas 25
3.2.3. Mecanismo de ação 28
3.2.4. Mecanismos de resistência 28
3.2.5. Ampicilina e ampicilina sódica 29
3.2.6. Farmacocinética 30
3.2.7. Espectro de ação e uso clínico 31
3.2.8. Reações adversas 32
3.3. Garantia da qualidade 32
3.4. Validação de métodos analíticos 34
3.5. Geração de resíduos e preservação ambiental 38
4. DESCRIÇÃO 40
4.1. Descrição geral 40
4.2. Substância química de referência (SQR) 41
4.3. Amostra da forma farmacêutica do pó liofilizado para solução injetável 41
5. ANÁLISE QUALITATIVA 42
5.1. Características físicas 42
5.1.1. Material e método 42
5.1.2. Resultados e discussão 42
5.2. Determinação da umidade 42
5.2.1. Considerações gerais 42
5.2.2. Material e método 42
5.2.3. Resultados e discussão 43

5.3. Determinação da solubilidade 44
5.3.1. Considerações gerais 44
5.3.2. Material e método 44
5.3.3. Resultados e discussão 45
5.4. Cromatografia em Camada Delgada (CCD) indicativa de estabilidade 46
5.4.1. Considerações gerais 46
5.4.2. Material e método 47
5.4.3. Resultados e discussão 48
5.5. Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho 55
5.5.1. Considerações gerais 55
5.5.2. Material e método 56
5.5.3. Resultados e discussão 56
6. ANÁLISE QUANTITATIVA 60
6.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) 60
6.1.1. Considerações gerais 60
6.1.2. Material.... 80
6.1.3. Preparo das fases móveis 80
6.1.4. Método..... 81
6.1.5. Resultados 88
6.1.6. Discussão.. 98
6.2. Ensaio microbiológico – Turbidimétrico 102
6.2.1. Considerações gerais 102
6.2.2. Ensaios preliminares para estabelecimento dos parâmetros analíticos 103
6.2.3. Material.... 105
6.2.4. Método..... 106
6.2.5. Resultados 110
6.2.6. Discussão.. 115
6.3. Espectrofotometria na região do infravermelho 117
6.3.1. Considerações gerais 117
6.3.2. Material.... 122
6.3.3. Método..... 123
6.3.4. Resultados 126
6.3.5. Discussão. 130

7. ANÁLISE COMPARATIVA DOS MÉTODOS PROPOSTOS 133
8. DISCUSSÃO GERAL 136
9. CONCLUSÕES 138
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 140

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Grupos de antimicrobianos β-lactâmicos..... 23

Figura 2 Estrutura química do ácido 6-aminopenicilânico (6-APA)..... 26

Figura 3 Estrutura básica das penicilinas. A: anel tiazolidínico. B: anel β-lactâmico. R: cadeia lateral..... 26

Figura 4 Estrutura química da ampicilina (CAS 69-53-4)..... 29

Figura 5 Estrutura química da ampicilina sódica (CAS 69-52-3)..... 30

Figura 6 Cromatograma de solução de ampicilina sódica obtido através do Sistema 3, revelado com vapores de iodo..... 49

Figura 7 Cromatograma de solução de ampicilina sódica obtido através do Sistema 4, revelado com vapores de iodo (a) e em câmara de luz UV - 364 nm (b)..... 49

Figura 8 Cromatogramas obtidos por CCD da degradação de ampicilina sódica em pó liofilizado para solução injetável após 30 minutos..... 53

Figura 9 Cromatogramas obtidos por CCD da degradação de ampicilina sódica em pó liofilizado para solução injetável após 180 minutos..... 53

Figura 10 Cromatogramas obtidos por CCD da degradação de ampicilina sódica em pó liofilizado para solução injetável após 24 horas..... 54

Figura 11 Cromatogramas obtidos por CCD da degradação de ampicilina sódica em pó liofilizado para solução injetável após 48 horas..... 54

Figura 12 Sobreposição dos espectros de absorção na região do infravermelho de ampicilina sódica SQR e ampicilina sódica pó para solução injetável..... 57

Figura 13 Espectro de absorção por infravermelho da ampicilina sódica SQR com as suas principais bandas de absorção marcadas..... 58

Figura 14 Espectro na região do infravermelho de ampicilina sódica apresentado pela JP (2011)..... 59

Figura 15 Espectro na região do infravermelho de ampicilina sódica apresentado pela BP (2010)..... 59

Figura 16 Medidas relacionadas à determinação dos fatores de cauda (FC) e assimetria do pico cromatográfico (A_S), calculados pelas Equações 2 e 3..... 88

Figura 17 Cromatograma de ampicilina sódica SQR (90 µg/mL) obtido pelo método cromatográfico proposto..... 89

Figura 18 Sobreposição de cromatogramas de ampicilina sódica SQR e em pó para solução injetável, nas mesmas concentrações (90 µg/mL)..... 90

Figura 19 Curva analítica de ampicilina sódica SQR obtida pelo método cromatográfico. Fase móvel: etanol : água (40:60, v/v)..... 92

Figura 20 Cromatograma da amostra de ampicilina sódica em pó para solução injetável (90 µg/mL) submetida à degradação em meio ácido (HCl 0,001 *M*) após 48 horas a 60 ºC..... 96

Figura 21 Cromatograma da amostra de ampicilina sódica em pó para solução injetável (90 µg/mL) submetida à degradação em meio básico (NaOH 0,001 *M*) após 48 horas a 60 ºC..... 96

Figura 22 Cromatograma da amostra de ampicilina sódica em pó para solução injetável (90 µg/mL) submetida à degradação na luz ultravioleta após 24 e 48 horas..... 97

Figura 23 Cromatograma da amostra de ampicilina sódica em pó para solução injetável (90 µg/mL) submetida à degradação em meio neutro (água) após 24 e 48 horas a 60 ºC..... 97

Figura 24 Representação gráfica das curvas analíticas de soluções de ampicilina sódica SQR e amostra, em concentrações de 2,0; 4,0 e 8,0 µg/mL, obtidas pelo método turbidimétrico..... 112

Figura 25 Espectro de absorção por infravermelho da ampicilina sódica SQR com a delimitação da região espectral compreendida na análise quantitativa..... 122

Figura 26 Representação gráfica da curva analítica de ampicilina sódica pelo método espectrofotométrico na região do infravermelho..... 128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Estrutura química das principais categorias de penicilinas em uso clínico..... 27

Tabela 2 Testes exigidos para cada categoria de métodos analíticos..... 35

Tabela 3 Teor de umidade da ampicilina sódica pó para solução injetável determinado em analisador de umidade por infravermelho..... 43

Tabela 4 Termos descritivos de solubilidade e seus significados (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010)..... 44

Tabela 5 Solubilidade da ampicilina sódica pó para solução injetável em diferentes solventes a 25 ºC..... 45

Tabela 6 Análise por CCD da degradação acelerada de ampicilina sódica em pó liofilizado para preparações injetáveis..... 51

Tabela 7 Comparação das bandas de absorção apresentadas pela ampicilina sódica SQR na região do infravermelho com dados apresentados na literatura..... 58

Tabela 8 Métodos de análise descritos na literatura para a determinação de ampicilina utilizando CLAE..... 62

Tabela 9 Parâmetros cromatográficos testados durante ensaios preliminares para desenvolvimento de método por CLAE para quantificação de ampicilina sódica em pó para injetável..... 81

Tabela 10 Parâmetros estabelecidos para a determinação de ampicilina sódica pelo método de CLAE..... 82

Tabela 11 Preparo das soluções para o teste de recuperação do método cromatográfico para ampicilina sódica..... 85

Tabela 12 Valores das áreas referentes ao pico de ampicilina sódica SRQ para a construção da curva analítica de CLAE..... 91

Tabela 13 Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva analítica de ampicilina sódica SQR, utilizando o método por CLAE..... 92

Tabela 14 Determinação da precisão interdias e entre-analistas do método para ampicilina sódica por CLAE..... 93

Tabela 15 Determinação da exatidão do método analítico para análise de ampicilina sódica por CLAE..... 93

Tabela 16 Parâmetros da avaliação da robustez do método analítico para análise de ampicilina sódica por CLAE..... 94

Tabela 17 Resultados obtidos no estudo de degradação forçada da amostra de ampicilina sódica em pó para solução injetável para avaliação da seletividade do método de CLAE..... 95

Tabela 18 Análise de conformidade do sistema cromatográfico desenvolvido para análise de ampicilina sódica por CLAE..... 98

Tabela 19 Parâmetros testados durante o desenvolvimento do ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico..... 104

Tabela 20 Parâmetros estabelecidos para a determinação de ampicilina sódica em pó para solução injetável pelo método turbidimétrico..... 105

Tabela 21 Preparo das soluções para o teste de recuperação do método turbidimétrico..... 109

Tabela 22 Valores de absorvância determinados para a construção da curva analítica de ampicilina sódica pelo método turbidimétrico..... 111

Tabela 23 Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção das curvas analíticas de ampicilina sódica, utilizando o método turbidimétrico..... 112

Tabela 24 Valores determinados da potência de ampicilina sódica em pó liofilizado para solução injetável na avaliação da precisão interdias do método turbidimétrico..... 113

Tabela 25 Resultados obtidos no teste de recuperação do método turbidimétrico para determinação de ampicilina sódica em pó liofilizado para solução injetável..... 114

Tabela 26 Valores obtidos na avaliação da robustez do métodoturbidimétrico para análise de ampicilina sódica em pó para solução injetável..... 114

Tabela 27 Métodos de análise descritos na literatura para a determinação de ampicilina utilizando UV-vis..... 119

Tabela 28 Preparo das pastilhas para o teste de recuperação do método de espectrometria por infravermelho para ampicilina sódica..... 125

Tabela 29 Valores das absorvâncias referentes à ampicilina sódica SRQ para a construção da curva analítica através do método de espectrofotometria na região do infravermelho..... 127

Tabela 30 Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva analítica de ampicilina sódica SQR, utilizando o método de espectrofotometria na região do infravermelho..... 128

Tabela 31 Determinação da precisão interdias e entre analistas do método de espectrofotometria na região do infravermelho..... 129

Tabela 32 Determinação da exatidão do método analítico para análise de ampicilina sódica por espectrofotometria na região do infravermelho..... 129

Tabela 33 Parâmetros da avaliação da robustez do método analítico para análise de ampicilina sódica por espectrofotometria na região do infravermelho..... 130

Tabela 34 Valores obtidos na determinação do teor de ampicilina sódica em pó liofilizado para solução injetável utilizando os métodos propostos..... 133

Tabela 35 Análise de variância dos resultados obtidos para o doseamento de ampicilina sódica em pó liofilizado para solução injetável pelos métodos propostos..... 133

Tabela 36 Principais características dos métodos propostos..... 135

LISTA DE ABREVIATURAS

6-APA: ácido 6-aminopenicilânico

AMP: ampicilina sódica

ANOVA: análise de variância

AOAC: *Association of Official Analytical Chemists*

As: fator de assimetria

ATCC: *American Type Culture Collection*

BHI: *Brain-Heart Infusion*

BPF: Boas Práticas de Fabricação

CAS: *Chemical Abstract Service*

CCD: cromatografia em camada delgada

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

DEG: produto de degradação

DPR: desvio padrão relativo

e.p.m.: erro padrão da média

FC: fator de cauda

F_{cal}: valor de F calculado

F_{tab}: valor de F tabelado

GL: graus de liberdade

IAL: Instituto Adolfo Lutz

ISO: *International Standard Organization*

IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry*

k: fator de capacidade

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

N: número de pratos

OMS: Organização Mundial da Saúde

PLP: proteínas de ligação da penicilina

QM: quadrados médios

r: coeficiente de correlação

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

Rf: fator de retenção

SGA: Sistema de Gestão Ambiental

SQ: soma dos quadrados

SQR: substância química de referência

t_R: tempo de retenção

UV: ultravioleta

1. INTRODUÇÃO

A qualidade dos medicamentos sempre foi uma preocupação da Organização Mundial da Saúde (OMS), pois sem a garantia de que os medicamentos que a população irá receber atendam aos padrões de qualidade, segurança e eficácia necessários, qualquer serviço de saúde é evidentemente afetado (WHO, 2007). Desta forma, os medicamentos vêm sendo cada vez mais objetos de preocupação e de inúmeras pesquisas realizadas mundialmente, principalmente com relação ao controle de qualidade.

Nas últimas décadas, quando o item "segurança" passou a ter igual ou maior importância que o item "eficácia terapêutica", maior importância passou a ser dada também à qualidade dos métodos analíticos usados no controle de qualidade dos medicamentos comercializados. O desenvolvimento de métodos analíticos eficazes e confiáveis se tornou fundamental e, consequentemente, a necessidade de se comprovar a qualidade das análises químicas está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Neste contexto, a etapa de validação de métodos analíticos é indispensável, pois apresenta impacto direto sobre a qualidade dos dados analíticos gerados (LA ROCA et al., 2007).

Ao lado da preocupação com a qualidade dos dados analíticos, também há a preocupação com os impactos que as atividades das indústrias podem causar sobre o meio ambiente. Existe a tendência de que estas empresas adotem uma postura de redução, prevenção ou eliminação dos resíduos de processo. Para isso, existem algumas medidas que podem ser tomadas, entre elas, a substituição de técnicas analíticas que empreguem solventes orgânicos por outras que não os utilizem ou que minimizem seu uso (NOLASCO, TAVARES, BENDASSOLLI, 2006).

A ampicilina é uma penicilina semi-sintética, introduzida no mercado em 1961, pertencente à classe das aminopenicilinas (MILLER, 2002; ROLINSON, GEDDES, 2007). Trata-se da primeira penicilina semi-sintética a apresentar atividade contra bactérias Gram-negativas, abrindo o campo para penicilinas de amplo espectro (CIONE, LIBERALE, SILVA, 2010).

Este fármaco é indicado para o tratamento de infecções otorrinolaringológicas, com participação de estreptococos e *Haemophilus* sp., tais como as otites média e aguda, e sinusite (SUÁREZ, GUDIOL, 2009). A ampicilina também se mostrou válida para as exacerbações da bronquite crônica causadas por *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* (ROLINSON, GEDDES, 2007). Além disso, é indicada para infecções urinárias, endocardite

e meningite, quando causadas por estreptococos. Da mesma forma, é utilizada para infecções por *Listeria monocytogenes*, cepas sensíveis de estreptococos do Grupo B, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Salmonella* (não *typhi*) (REMINGTON, 2006; SUÁREZ, GUDIOL, 2009; KATZUNG, 2010). A ampicilina sódica possui a mesma ação e uso que a ampicilina, considerando que se trata da forma em que é empregada para administração intramuscular e intravenosa (REMINGTON, 2006).

Avaliando a importância das penicilinas em geral e, em especial, da ampicilina sódica, o objetivo principal deste trabalho foi o desenvolvimento de novos métodos analíticos para a análise deste fármaco na forma farmacêutica de pó liofilizado para solução injetável, levando em consideração a minimização do uso de solventes orgânicos e a busca de métodos mais econômicos, práticos e seguros para os operadores que aqueles já descritos para a ampicilina. Para o método cromatográfico, também foi considerada a restrição do uso de soluções-tampão na constituição da fase móvel, as quais podem danificar as colunas cromatográficas, bem como o uso de etanol ao invés dos solventes mais comumente utilizados, tais como metanol e acetonitrila, por ser mais econômico e seguro para os operadores. Este trabalho ainda contribui para a garantia da segurança e eficácia terapêutica deste medicamento comercializado no mercado.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O presente trabalho tem como objetivos gerais o desenvolvimento e validação de métodos analíticos alternativos para o controle de qualidade de ampicilina sódica em pó liofilizado para preparações injetáveis.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar análises qualitativas da amostra de ampicilina sódica em pó liofilizado para solução injetável através da análise das características físicas, teor de umidade e solubilidade.
- Desenvolver método que permita a identificação de ampicilina sódica em pó liofilizado para solução injetável, por espectrofotometria na região do infravermelho.
- Desenvolver método que permita a identificação de ampicilina sódica em pó liofilizado para solução injetável e que seja indicativo de estabilidade deste fármaco, mediante a utilização de cromatografia em camada delgada (CCD).
- Desenvolver e validar método de análise de ampicilina sódica em pó liofilizado para solução injetável por meio de cromatografia líquida de alta eficiência.
- Desenvolver e validar método de análise de ampicilina sódica em pó liofilizado para solução injetável por meio de ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico.
- Desenvolver e validar método de análise de ampicilina sódica em pó liofilizado para solução injetável por meio de método espectrofotométrico na região do infravermelho médio.
- Comparar estatisticamente os métodos propostos.

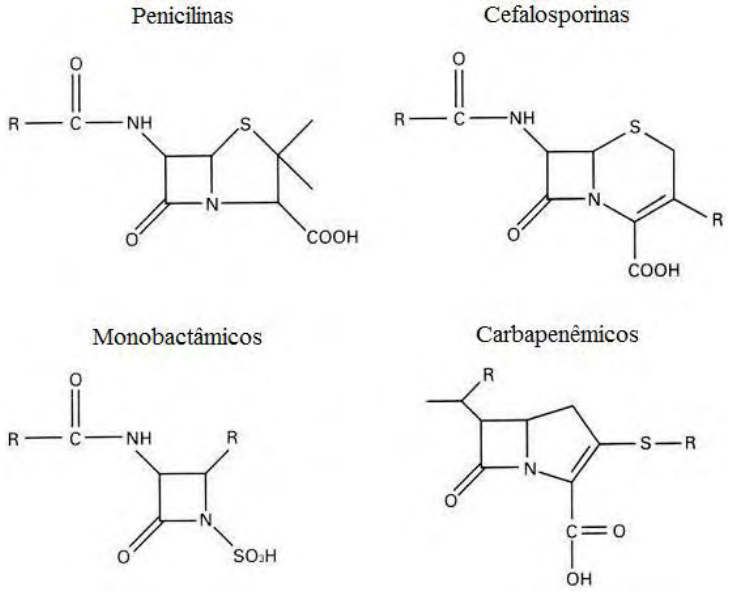
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Antimicrobianos β-lactâmicos

Os antimicrobianos β-lactâmicos, há mais de 50 anos, vêm demonstrando sua eficiência terapêutica e baixa toxicidade. Em conjunto, constituem a mais ampla família de agentes antimicrobianos, sendo amplamente usados na prática clínica (SILVA, 2006; SUÁREZ, GUDIOL, 2009).

Os β-lactâmicos são quimicamente caracterizados pela presença de um anel β-lactâmico. No entanto, para que estas substâncias sejam ativas, é necessário que este anel esteja unido a outros radicais, geralmente outro anel, formando um esqueleto básico conhecido como "núcleo β-lactâmico". A associação de diferentes cadeias lineares com este núcleo formado por dois anéis resulta em compostos com propriedades modificadas, os quais compõem os diferentes grupos de antimicrobianos β-lactâmicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos (Figura 1). Ainda existe o grupo de inibidores das β-lactamases, que também possuem estrutura β-lactâmica (SUÁREZ, GUDIOL, 2009).

Figura 1- Grupos de antimicrobianos β-lactâmicos. R: cadeia lateral.



Fonte: WILLIAMS, 1999.

Entre as penicilinas, existem substâncias altamente ativas contra cocos Gram-positivos sensíveis; outras resistentes às β-lactamases, as quais são ativas contra o *Staphylococcus*

aureus; algumas com espectro aumentado para micro-organismos Gram-negativos e ainda as de espectro ampliado, com atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* (BRUNTON, CHABNER, KNOLLMAN, 2012).

As cefalosporinas exibem estrutura química, mecanismo de ação e toxicidade semelhantes às penicilinas. No entanto, apresentam maior estabilidade a muitas β-lactamases bacterianas e, desta forma, possuem habitualmente o espectro de atividade mais amplo (KATZUNG, 2010).

Na década de 1980, devido à necessidade de se ampliar o espectro dos antimicrobianos em decorrência do aparecimento de cepas multirresistentes, foram desenvolvidos os antimicrobianos carbapenêmicos e os monobactâmicos (ARIAS et al., 1998; RANG et al., 2007). Estes antimicrobianos têm a capacidade de enfrentar micro-organismos produtores de β-lactamases resistentes à penicilina (RANG et al., 2007). Os carbapenêmicos possuem o espectro antimicrobiano mais amplo entre todos os antimicrobianos (BRUNTON, CHABNER, KNOLLMAN, 2012). Já os monobactâmicos apresentam um espectro de ação não usual, sendo efetivos apenas contra bastonetes aeróbicos Gram-negativos, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*, para os quais demonstram grande e específica atividade (SILVA, 2006; RANG et al., 2007; ZEITLER et al., 2012).

Os inibidores de β-lactamases são utilizados para aumentar o espectro das penicilinas contra micro-organismos produtores de β-lactamases (MATSUURA et al., 1980; SILVA, 2006). São moléculas com grande afinidade frente a estas substâncias, às quais se unem irreversivelmente, evitando a inativação do antimicrobiano β-lactâmico (SUÁREZ, GUDIOL, 2009).

3.2. Penicilinas

3.2.1. História

Alexander Fleming, em 1928, ao estudar variantes de estafilococos no laboratório, percebeu que em uma placa de cultura na qual estavam sendo cultivados estes micro-organismos, havia a contaminação de um fungo. Observou também que em torno da colônia deste fungo, o crescimento bacteriano havia sido inibido (FLEMING, 1929; MILLER, 2002; RANG et al., 2007; BRUNTON, CHABNER, KNOLLMAN, 2012).

Em uma análise morfológica, o fungo contaminante foi identificado como do gênero *Penicillium* (FLEMING, 1929). Inicialmente foi designado por *Penicillium rubro* e mais tarde

por *Penicillium notatum* (PEREIRA, PITA, 2005). Desta forma, Fleming deu o nome de *penicilina* à substância antibacteriana produzida por este fungo (BRUNTON, CHABNER, KNOLLMAN, 2012).

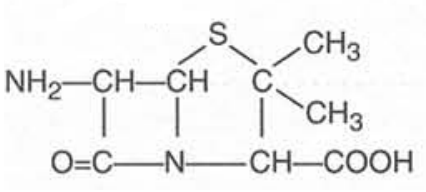
Em 1940, a penicilina foi extraída e teve seus efeitos antimicrobianos analisados em animais, por Howard Florey, Boris Chain e outros colaboradores. Foi observado que esta substância era dotada de poderosas propriedades quimioterápicas e que não era tóxica nas concentrações utilizadas (RANG et al., 2007). O primeiro teste clínico deste isolado em seres humanos foi realizado em 1941. Os ensaios clínicos em seres humanos continuaram nos Estados Unidos e, no decurso da Segunda Guerra Mundial, esta substância foi utilizada em massa no exército americano com resultados altamente positivos. Em 1945, Alexander Fleming, Howard Florey e Boris Chain receberam o Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia pela descoberta e aplicação da penicilina (PEREIRA, PITA, 2005). A penicilina foi disponibilizada para o mercado a partir da segunda metade da década de 1940 (MILLER, 2002; PEREIRA, PITA, 2005). O produtor em escala industrial desta substância é o *Penicillium chrysogenum* (VAN DEN BERG, 2011).

Apesar de seu impacto revolucionário, a penicilina nunca foi efetiva contra todas as bactérias e o desenvolvimento de cepas resistentes passou a ser um problema contínuo (MILLER, 2002). Entre os anos 1957 e 1959, a descoberta do núcleo penicilânico, chamado ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), essencial para a atividade das penicilinas, e o desenvolvimento de uma eficiente metodologia para sua obtenção por via enzimática, tornou possível o desenvolvimento das penicilinas semi-sintéticas, as quais se tornaram um dos mais importantes grupos de antimicrobianos da prática clínica (ROLINSON, GEDDES, 2007). Desta forma, modificações químicas na estrutura química da penicilina natural possibilitou a produção de novas substâncias da família da penicilina, com eficácia e espectro de ação melhorados (MILLER, 2002).

3.2.2. Estrutura química e classificação das penicilinas

O 6-APA (Figura 2) é o núcleo formador das penicilinas. Ele próprio constitui o principal requisito estrutural para a atividade biológica deste grupo de antimicrobianos. Qualquer alteração química nesta porção da molécula leva à perda significativa da atividade antimicrobiana (CIONE, LIBERALE, SILVA, 2010; KATZUNG, 2010; BRUNTON, CHABNER, KNOLLMAN, 2012).

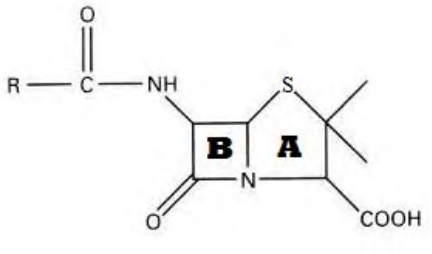
Figura 2- Estrutura química do ácido 6-aminopenicilânico (6-APA).



Fonte: BRUNTON, CHABNER, KNOLLMAN, 2012.

A estrutura básica das penicilinas (Figura 3) é consistida por um anel tiazolidínico ligado a um anel β-lactâmico, que transporta um grupo amino secundário. Pode haver ligação de substituintes ao grupo amino (MILLER, 2002; CIONE, LIBERALE, SILVA, 2010; KATZUNG, 2010; BRUNTON, CHABNER, KNOLLMAN, 2012).

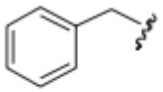
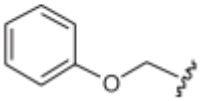
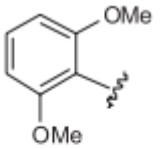
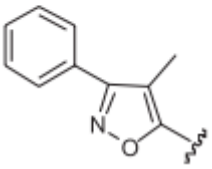
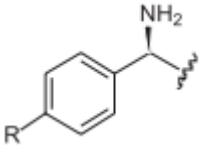
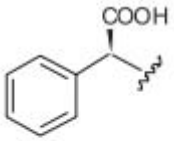
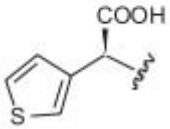
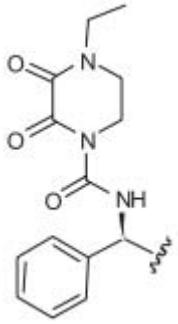
Figura 3- Estrutura básica das penicilinas. A: anel tiazolidínico. B: anel β-lactâmico. R: cadeia lateral.



Fonte: adaptado de WILLIAMS, 1999.

Ao se adicionar diferentes cadeias laterais à molécula do 6-APA, obtêm-se várias famílias de penicilinas, com novas propriedades físico-químicas, farmacológicas e antibacterianas (MILLER, 2002; KATZUNG, 2010). A Tabela 1 apresenta a estrutura das principais categorias de penicilinas em uso clínico.

Tabela 1- Estrutura química das principais categorias de penicilinas em uso clínico

Categoria[1]	**Antibacteriano**	**Cadeia lateral (R)**[2]
Baixo espectro de ação, sensível a β-lactamases	Penicilina G (benzilpenicilina)	
	Penicilina V	
Baixo espectro de ação, resistente a β-lactamases	Meticilina	
	Oxacilina	
Amplo espectro de ação, sensível a β-lactamases	Ampicilina[3] (R = H) Amoxicilina[3] (R = OH)	
Amplo espectro de ação, anti *Pseudomonas*, sensível a β-lactamases	Carbenicilina	
	Ticarcilina	
Espectro de ação estendido	Piperacilina	

[1] Fonte: GUIMARÃES, MOMESSO, PUPO, 2010.
[2] Equivalente a R na Figura 3
[3] Também são conhecidas como aminopenicilinas

3.2.3. Mecanismo de ação

Todos os antimicrobianos β-lactâmicos são agentes bactericidas que produzem seu efeito através da inibição da síntese da parede bacteriana (MILLER, 2002; RANG et al., 2007; SUÁREZ, GUDIOL, 2009; KATZUNG, 2010; BRUNTON, CHABNER, KNOLLMAN, 2012). As bactérias biossintetizam, para sua proteção, membranas plasmáticas, paredes celulares e cápsulas. Esta proteção é imprescindível para o crescimento e desenvolvimento destes micro-organismos, porque o interior bacteriano é hiperosmolar em relação ao meio extracelular, portanto, sem a parede celular a bactéria não se manteria íntegra (SILVA, 2006).

A parede celular é composta por peptideoglicano, um complexo polímero de ligação cruzada, formado por polissacarídios e polipeptídios. Os polissacarídios contêm aminoaçúcares alternados, *N*-acetilglicosamina e ácido *N*-acetilmurâmico. O açúcar de *N*-acetilmurâmico possui um peptídeo de 5 aminoácidos ligado em si, o qual termina em D-alanil-D-alanina. As proteínas de ligação da penicilina (PLP) catalisam a reação de transpeptidação que remove a alanina terminal para formar uma ligação cruzada com um peptídeo adjacente, resultando em uma parede celular rígida. Os antimicrobianos β-lactâmicos são análogos estruturais do substrato D-Ala-D-Ala natural e ligam-se covalentemente às PLP no sítio ativo, inibindo assim a reação de transpeptidação, bloqueando a síntese de peptidioglicano e levando a célula à morte (KATZUNG, 2010).

3.2.4. Mecanismos de resistência

Existem alguns mecanismos principais pelos quais as bactérias podem desenvolver resistência aos β-lactâmicos. São eles:

a) Inativação enzimática pelas β-lactamases biossintetizadas pelas bactérias, a qual consiste no mecanismo de resistência mais importante. As β-lactamases são produzidas principalmente por estafilococos e bactérias Gram-negativas. Estas enzimas hidrolisam o anel β-lactâmico, destruindo a ação antibiótica, pois os derivados do ácido peniciloico obtidos são inativados (MILLER, 2002; SILVA, 2006).
b) Redução da permeabilidade da parede celular bacteriana às penicilinas e mudanças na bomba de efluxo. Alguns antimicrobianos menos lipofílicos necessitam de canais de porina para atingirem o espaço periplasmático das bactérias Gram-negativas, onde ficam localizadas as PLP. No entanto, algumas bactérias se tornam

resistentes por perda ou alterações destes canais. Além disso, certos micro-organismos, como *P. aeruginosa*, apresentam um sistema de bombeamento de antimicrobianos muito eficaz, o que lhes confere resistência intrínseca a muitos antimicrobianos (SILVA, 2006; SUÁREZ, GUDIOL, 2009).

c) Alterações conformacionais nas PLP, as quais podem ser decorrentes de mutações, hiperexpressão ou modificação da afinidade destas proteínas, bloqueando assim a atividade antibiótica. Trata-se do principal mecanismo de resistência das bactérias Gram-positivas, tais como *S. pneumoniae*, *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *Enterococcus faecium* (SUÁREZ, GUDIOL, 2009).

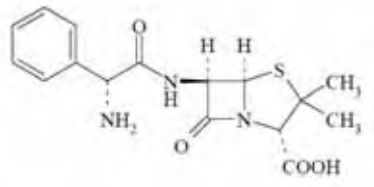
d) Aparecimento do fenômeno da tolerância. Neste caso, algumas bactérias se tornam tolerantes à penicilina, através da alteração da afinidade pela penicilina das enzimas-chave. Por exemplo, o MRSA adquiriu uma PLP com afinidade muito baixa pelos antimicrobianos β-lactâmicos (SILVA, 2006).

3.2.5. Ampicilina e ampicilina sódica

A ampicilina é uma penicilina semi-sintética, introduzida em 1961, pertencente à classe das aminopenicilinas, a qual ainda abrange a amoxicilina e a bacampicilina (MILLER, 2002; ROLINSON, GEDDES, 2007). Trata-se da primeira penicilina semi-sintética a apresentar atividade contra bactérias Gram-negativas, abrindo o campo para penicilinas de amplo espectro de ação (CIONE, LIBERALE, SILVA, 2010). No entanto, ela é inativada pelas β-lactamases (SILVA, 2006; GUIMARÃES, MOMESSO, PUPO, 2010).

A ampicilina, que é o protótipo da classe das aminopenicilinas, foi produzida a partir da adição de diferentes cadeias laterais ao núcleo da penicilina (RANG et al., 2007; ROLINSON, GEDDES, 2007). A estrutura química da ampicilina está apresentada na Figura 4.

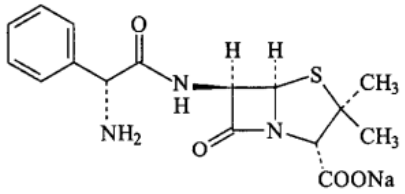
Figura 4- Estrutura química da ampicilina (CAS 69-53-4).



Fonte: FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010.

Trata-se da única aminopenicilina disponível tanto em formulações para uso parenteral quanto oral (MILLER, 2002). Este antimicrobiano é comercializado nas formas anidra, triidratada e sódica, assim como na forma ligada à benzatina (CIONE, LIBERALE, SILVA, 2010). As formas anidra e triidratada da ampicilina são empregadas em formulações para uso oral, sendo encontradas nas formas farmacêuticas de cápsula, pó para suspensão oral e comprimido. A ampicilina triidratada também pode ser encontrada na forma de pó para suspensão injetável. A ampicilina sódica (Figura 5) é empregada em formulações para uso intramuscular e intravenoso, sendo encontrada na forma farmacêutica de pó liofilizado para solução injetável (REMINGTON, 2006; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). A ampicilina benzatina é utilizada em formulações parenterais em conjunto com a ampicilina sódica, constituindo forma farmacêutica de liberação prolongada (OPTACILIN, 2013).

Figura 5- Estrutura química da ampicilina sódica (CAS 69-52-3).



Fonte: FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010.

3.2.6. Farmacocinética

A ampicilina pode ser administrada pelas vias oral, intramuscular e intravenosa. Quando administrada pela via oral (formas anidra e triidratada), a ampicilina apresenta-se estável em meio ácido, mas, apesar disso, não apresenta boa absorção ao nível gastrintestinal (SILVA, 2006; ROLINSON, GEDDES, 2007). Uma dose oral de 0,5 g atinge concentração sérica máxima de 2,5 a 5,0 µg/mL em 2 horas. O alimento, no trato gastrintestinal, reduz a absorção do antimicrobiano (SILVA, 2006).

A injeção intramuscular de 0,5 ou 1,0 g de ampicilina sódica atinge concentração sérica máxima de 7,0 ou 10,0 µg/mL, respectivamente, no intervalo de 1 hora (BRUNTON, CHABNER, KNOLLMAN, 2012). Já a injeção intravenosa de 1,0 g deste antimicrobiano atinge a concentração sérica máxima de 40 a 50 µg/mL, no mesmo intervalo (SUÁREZ, GUDIOL, 2009).

A ampicilina benzatina, devido à sua característica de liberação prolongada, apresenta absorção lenta, o que mantém altas concentrações sangüíneas do fármaco por tempo prolongado (OPTACILIN, 2013).

A ampicilina, de maneira geral, se liga às proteínas plasmáticas, aproximadamente, na taxa de 20%. Além disso, se mantém na forma ativa até ser eliminada por via renal, através da secreção tubular (SILVA, 2006; SUÁREZ, GUDIOL, 2009). Após a administração parenteral, uma taxa de 90% da ampicilina pode ser determinada na urina e, após administração oral, uma taxa de 40% (SILVA, 2006).

3.2.7. Espectro de ação e uso clínico

De acordo com estudos *in vitro*, a ampicilina é ativa contra a maioria das bactérias Gram-positivas, com exceção dos estafilococos produtores de β-lactamases (SILVA, 2006). Por ser uma penicilina de espectro ampliado, também é ativa contra micro-organismos Gram-negativos, devido à sua maior capacidade de penetrar na membrana externa dos mesmos (SILVA, 2006; RANG et al., 2007; KATZUNG, 2010; BRUNTON, CHABNER, KNOLLMAN, 2012).

A ampicilina é indicada para o tratamento de infecções otorrinolaringológicas, com participação de estreptococos e *Haemophilus* sp., tais como as otites média e aguda, e sinusite (SUÁREZ, GUDIOL, 2009). Da mesma forma, o antimicrobiano provou ser válido para as exacerbações da bronquite crônica causadas por *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* (ROLINSON, GEDDES, 2007). Também é indicada para infecções urinárias, endocardite e meningite, quando causadas por estreptococos, assim como para infecções por *Listeria monocytogenes* (SUÁREZ, GUDIOL, 2009).

Este fármaco é o de escolha para o tratamento de infecções causadas por cepas sensíveis de estreptococos do Grupo B, *Enterococcus faecalis* (associado com gentamicina), *Escherichia coli* (com ou sem gentamicina), *Proteus mirabilis* e *Salmonella* (não *typhi*) (REMINGTON, 2006; KATZUNG, 2010).

A literatura mostra que a ampicilina é uma alternativa contra *Klebsiella pneumoniae* (com sulbactam), *Proteus* indol-positivo (com sulbactam), *Salmonella typhi*, *Shigella*, *Gardnerella vaginalis* ou *Nocardia*. Algumas destas bactérias adquirem rapidamente resistência através da produção de penicilases, então esse fármaco é administrado, muitas vezes, associado com o sulbactam (REMINGTON, 2006).

A ampicilina também é utilizada de maneira profilática, antes de procedimentos cirúrgicos gastrintestinais e geniturinários. Da mesma forma, é usada profilaticamente contra a doença perinatal associada aos estreptococos do Grupo B (MILLER, 2002).

3.2.8. Reações adversas

As penicilinas apresentam, normalmente, baixa toxicidade, sendo uma das classes mais seguras de antimicrobianos (MILLER, 2002). Geralmente, os efeitos colaterais associados à ampicilina são brandos, tais como exantemas e diarreia. No entanto, as reações adversas graves estão relacionadas à hipersensibilidade. Neste caso, os determinantes antigênicos responsáveis consistem em produtos de degradação das penicilinas, tais como o ácido peniciloico e produtos da hidrólise alcalina (KATZUNG, 2010). Em casos muito raros, pode haver a ocorrência de colite pseudomembranosa por *Clostridium difficile*, a qual é uma doença rara e grave (SILVA, 2006).

3.3. Garantia da qualidade

A qualidade dos medicamentos sempre foi uma preocupação da Organização Mundial da Saúde, pois sem a garantia de que estes medicamentos sejam relevantes para as necessidades prioritárias da saúde e que atendam aos padrões de qualidade, segurança e eficácia, qualquer serviço de saúde é evidentemente comprometido. Desta maneira, é essencial que haja um esforço coletivo para assegurar que os pacientes recebam medicamentos eficazes e de qualidade aceitável (WHO, 2007).

A qualidade de um produto pode ser definida como a sua condição de adequação ao uso, sob o ponto de vista do consumidor. Neste contexto, “adequação ao uso” abrange as características de qualidade que o consumidor espera encontrar no produto. No caso de medicamentos, as características benéficas que os consumidores esperam encontrar são a eficácia terapêutica e segurança, ao lado de características menos essenciais, tais como a beleza do produto e propriedades organolépticas agradáveis (PINTO, KANEKO, PINTO, 2010).

Segundo a Resolução - RDC n^{o}17, de 16 de abril de 2010, a qualidade dos medicamentos é de responsabilidade do fabricante, que deve assegurar que tais produtos estejam adequados ao uso pretendido, cumpram com os requisitos estabelecidos em seu registro e não coloquem os pacientes em risco por não apresentarem segurança, qualidade ou

eficácia adequadas. Para que o objetivo de qualidade seja atingido de forma confiável, é indispensável que haja a participação e o compromisso de todos os funcionários da empresa, além da necessidade de um sistema da Garantia da Qualidade bem estruturado, que incorpore as Boas Práticas de Fabricação (BPF) (BRASIL, 2010).

Diante do cenário competitivo do setor produtivo brasileiro, destaca-se a adoção e implantação, por parte das empresas, de Programas de Qualidade. Neste contexto, destaca-se a certificação da série *International Standard Organization* (ISO) 9000. Esta série abrange um conjunto de requisitos básicos para a estruturação de um Sistema de Gestão da Qualidade em uma empresa (XAVIER, 1995). Este modelo sofre reformulações periódicas, adequando-se às novas tendências técnicas e de mercado (PINTO, KANEKO, PINTO, 2010).

"Garantia da Qualidade" é um conceito abrangente, que cobre todas as questões que, individual ou coletivamente, influenciam a qualidade de um produto. Desta forma, envolve a totalidade das providências tomadas com o objetivo de garantir que os medicamentos estejam dentro dos padrões de qualidade exigidos, podendo ser utilizados para os fins propostos (WHO, 2007; BRASIL, 2010).

Boas Práticas de Fabricação é a parte da Garantia da Qualidade que tem como objetivo assegurar que os produtos sejam rigorosamente produzidos e controlados, com padrões de qualidade apropriados para o uso pretendido e requerido pelo registro. O seu cumprimento faz com que os riscos inerentes a qualquer produção farmacêutica, tais como a contaminação cruzada, contaminação por partículas, troca ou mistura do produto, sejam minimizados (BRASIL, 2010).

Por sua vez, o "Controle de Qualidade", que também constitui importante elemento da Garantia da Qualidade, é o conjunto de medidas que tem como meta garantir, a qualquer momento, a produção de lotes de medicamentos e demais produtos que satisfaçam às normas de identidade, atividade, teor, pureza, eficácia e inocuidade (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). É função do controle de qualidade verificar se o produto está em conformidade com as especificações (ICH, 2000).

Desta forma, o controle de qualidade é uma etapa essencial no processo de fabricação de medicamentos. Por este motivo, é fundamental o desenvolvimento de métodos eficazes e rápidos, voltados para o controle de qualidade dos medicamentos que são disponibilizados para a população (PARISOTTO et al., 2005).

3.4. Validação de métodos analíticos

É de grande importância o desenvolvimento de métodos analíticos eficazes para o controle de qualidade dos medicamentos comercializados. Desta maneira, a necessidade de se demonstrar a qualidade das análises químicas utilizadas pela indústria farmacêutica durante e depois da fabricação destes medicamentos se torna fundamental, visto que dados analíticos não confiáveis podem gerar grandes problemas, entre eles, prejuízos financeiros irrecuperáveis (LA ROCA et al., 2007). Com isso, a etapa de validação de métodos analíticos é indispensável, pois apresenta impacto direto sobre a qualidade dos dados gerados.

A validação de métodos analíticos tem como objetivo demonstrar que o método é adequado para a finalidade pretendida (FDA, 2000; ICH, 2005; USP 33, 2010; INMETRO, 2011). Desta maneira, através de resultados experimentais, deve garantir que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003).

A validação deve ser o resultado de um processo bem organizado, bem planejado e sistematicamente executado, o qual inclui o desenvolvimento do método analítico, estudos de pré-validação e, finalmente, a validação propriamente dita (BLIESNER, 2006).

Para a validação de metodologias analíticas não descritas em farmacopeias ou formulários oficiais, algumas características analíticas típicas devem ser consideradas, tais como: especificidade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção (sensibilidade), limite de quantificação, exatidão e robustez. Estes parâmetros podem ser exigidos ou não, de acordo com as características da análise (FDA, 2000; BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 33, 2010; INMETRO, 2011). A conformidade do sistema é outro parâmetro utilizado para a validação de métodos cromatográficos (FDA, 1994; ICH, 2005; USP 33, 2010).

Os métodos analíticos podem ser classificados em quatro categorias, segundo sua finalidade (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 33, 2010):

- **Categoria I** – Testes quantitativos para a determinação da substância ativa em produtos farmacêuticos ou matérias primas.
- **Categoria II** – Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias primas.
- **Categoria III** – Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo).
- **Categoria IV** – Testes de identificação.

Para cada categoria de métodos analíticos é exigido um conjunto de testes, conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2- Testes exigidos para cada categoria de métodos analíticos

Parâmetro		Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
			Quantitativo	Ensaio limite		
Especificidade		Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade		Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo		Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Repetibilidade	Sim	Sim	Não	Não	Não
	Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção		Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação		Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão		Sim	Sim	*	*	Não
Robustez		Sim	Sim	Sim	Não	Não

* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico
** se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da precisão intermediária
Fonte: BRASIL, 2003.

A seguir está apresentada a descrição dos principais parâmetros de validação:

- **Especificidade:** é a capacidade de uma metodologia analítica em avaliar de forma inequívoca o analito na presença de componentes que normalmente podem estar presentes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ICH, 2005). Alguns órgãos internacionais, tais como a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) e a *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC), preferem o termo **"seletividade"** para esta definição, reservando o termo "especificidade" para procedimentos completamente seletivos (USP 33, 2010).
- **Linearidade:** trata-se da capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de uma determinada faixa de aplicação (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

- **Intervalo:** é a faixa compreendida entre os limites de quantificação superior e inferior, para a qual tenham sido demonstrados níveis adequados de precisão, exatidão e linearidade (BRASIL, 2003; ICH, 2005, USP 33, 2010).
- **Precisão:** é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (BRASIL, 2003). As três formas mais comuns de expressar a precisão são: por meio da repetitividade, da precisão intermediária e da reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio padrão relativo (FDA, 1994; BRASIL, 2003; ICH, 2005, USP 33, 2010).
    - **Repetitividade (precisão intradia):** refere-se ao uso de procedimentos analíticos num curto período de tempo com os mesmos analistas e os mesmos equipamentos (BRASIL, 2003).
    - **Precisão intermediária (precisão interdias):** refere-se à avaliação da precisão sobre a mesma amostra, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas variando uma ou mais condições específicas, as quais podem ser: diferentes analistas, diferentes equipamentos ou diferentes dias (INMETRO, 2011).
    - **Reprodutibilidade (precisão interlaboratorial):** trata-se da concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, comumente aplicados à padronização da metodologia analítica (BRASIL, 2003).
- **Limite de detecção:** é a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob as condições analíticas estabelecidas (BRASIL, 2003; USP 33, 2010).
- **Limite de quantificação:** é a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão adequadas, sob as condições analíticas estabelecidas (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 33, 2010).
- **Exatidão:** A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados por ele obtidos comparados ao valor verdadeiro (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 33, 2010). Existem várias formas de se calcular a exatidão, dependendo do objetivo da análise:
    - **Análise de fármacos:** a exatidão pode ser avaliada aplicando-se a metodologia analítica proposta na análise de uma substância de pureza conhecida (padrão de referência) ou ainda comparando-se os resultados obtidos com aqueles

resultantes de um segundo método bem caracterizado, cuja exatidão tenha sido estabelecida (BRASIL, 2003; USP 33, 2010).

- **Análise de formas farmacêuticas:** a exatidão pode ser estudada através de placebo contaminado, em que quantidade conhecida de fármaco é adicionada a uma mistura contendo os adjuvantes do medicamento, ou pelo método de adição de padrão, no qual se adiciona quantidades conhecidas do analito (padrão de referência) ao medicamento (BRASIL, 2003, USP 33, 2010). Ainda é possível comparar os resultados obtidos com um segundo procedimento bem caracterizado (USP 33, 2010).
- **Análise de impurezas:** a exatidão deve ser obtida pelo método de adição de padrão, no qual se adiciona quantidades conhecidas de impurezas e/ou produtos de degradação ao medicamento ou ao fármaco. Pode-se também comparar os resultados obtidos com um segundo método bem caracterizado (BRASIL, 2003; USP 33, 2010).

- **Robustez:** é a medida da capacidade que um método analítico tem de permanecer inalterado frente a pequenas e deliberadas variações nos parâmetros analíticos (USP 33, 2010).
- **Conformidade do sistema:** o ICH (2005) estabelece como parte do processo de validação de sistemas cromatográficos o teste de conformidade do sistema. Trata-se de uma etapa essencial, pois assegura que os parâmetros cromatográficos selecionados para a análise estejam aptos a fornecer resultados com precisão e exatidão aceitáveis e confiáveis (PASCHOAL et al., 2008). Com este propósito, alguns parâmetros devem ser analisados a partir do pico cromatográfico, tais como o tempo de retenção (t_R), o número de pratos (N) e os fatores de cauda (FC), de assimetria (A_S) e de capacidade (k).
  - **Tempo de retenção (t_R):** representa o tempo gasto desde a injeção no sistema cromatográfico até a saída do ponto máximo do pico referente ao analito (PASCHOAL et al., 2008).
  - **Número de pratos (N):** é uma medida da eficiência da coluna cromatográfica (SNYDER, KIRKLAND, DOLAN, 2010). É recomendado que o número de pratos seja > 2000 (FDA, 1994).

- **Fatores de cauda (FC) e de assimetria (A_S):** medem a simetria e as distorções frontais ou posteriores (caudas) de um pico cromatográfico. É recomendado que os valores calculados sejam ≤ 2,0 (FDA, 1994).
- **Fator de capacidade (k):** mede a localização do pico de interesse em relação ao tempo de retenção do composto não-retido. É recomendado que este valor seja > 2,0 (FDA, 1994).

A estatística é uma ferramenta essencial para avaliação dos resultados gerados no processo de validação. Ferramentas como a análise de variância (ANOVA), o teste *t* Student, entre outros, são muito utilizadas para dar fundamento científico-matemático aos resultados obtidos (LA ROCA et al., 2007).

Considerando que a qualidade do produto fabricado é uma das principais razões da existência de várias empresas, a validação é a ferramenta ideal para garantir a confiabilidade da instalação de um equipamento novo, de um processo produtivo e, especialmente, de uma metodologia analítica, contribuindo de maneira significativa para a busca da qualidade total (VALENTINI, SOMMER, MATIOLI, 2007).

3.5. Geração de resíduos e preservação ambiental

Grande atenção à preservação do meio ambiente ganhou força desde os anos 1970 e hoje tem grande repercussão na sociedade. Deste modo, o gerenciamento dos resíduos gerados pelas indústrias químicas e farmacêuticas é fundamental. Segundo a Lei da Política Nacional do Meio Ambiente (Lei 6938, de 31 de agosto de 1981), o poluidor é responsável por recuperar ou indenizar os danos ambientais ou a terceiros causados por ele, independente da existência de culpa. Assim, quem gera os resíduos torna-se responsável por eles (BRASIL, 1981). A Resolução n^o 430, de 13 de maio de 2011 complementa esta ideia quando diz que os responsáveis pelas fontes poluidoras dos recursos hídricos devem controlar e monitorar seus efluentes, devendo realizar um automonitoramento periódico (BRASIL, 2011). Neste contexto, a ISO 14000:2004, que é uma norma internacional que define como se estabelece um Sistema de Gestão Ambiental (SGA), vem sendo empregada por diversas empresas (SANSEVERINO, 2000).

As indústrias podem adotar a postura de redução, prevenção ou eliminação dos resíduos de processo. Quando a empresa adota esta conduta, diminuindo a poluição através da minimização dos resíduos gerados por ela, ela opta por evitar ou minimizar a geração de

resíduos ao invés de tratar o efluente gerado, o que pode ser uma opção economicamente vantajosa (SANSEVERINO, 2000).

Para minimizar a geração de resíduos pelas indústrias, existem algumas medidas que podem ser tomadas, entre elas, a substituição de técnicas analíticas que empreguem solventes orgânicos por outras que não os utilizem. Também se pode buscar a substituição de matérias primas ou insumos por outros de menor toxicidade (NOLASCO, TAVARES, BENDASSOLLI, 2006). Além disso, processos industriais, como por exemplo, de síntese de compostos, podem ser substituídos por processos de síntese mais limpos (SANSEVERINO, 2000).

A exigente opinião pública e a tendência ao consumo sustentável encontram-se cada vez mais em evidência e isto colabora para que cada dia mais as empresas se preocupem em reduzir os impactos da poluição que produzem, adotando ações ambientais (BORINELLI et al., 2010). Com isso, a tendência é que os danos ao meio ambiente causados por estas empresas fiquem cada vez mais escassos e haja a preservação dos recursos naturais.

4. DESCRIÇÃO

4.1. Descrição geral

Nome genérico: Ampicilina sódica (CAS 69-52-3)

Nome químico: (2*S*,5*R*,6*R*)-6-[[(2*R*)-2-amino-2- fenilacetil]amino]-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabiciclo[3.2.0]heptano-2- carboxilato de sódio

Fórmula química: $C_{16}H_{18}NaN_3O_4S$

Massa molecular: 371,39 g/mol

Propriedades físico-químicas: Apresenta-se como pó cristalino, branco ou quase branco e higroscópico. É muito solúvel em água, solúvel em acetona, pouco solúvel em clorofórmio e praticamente insolúvel em éter, óleos graxos e na parafina líquida. Deve ser conservada em recipiente estéril, considerando que se destina à produção de formas farmacêuticas estéreis, em recipientes hermeticamente fechados, a temperatura inferior a 30^{o}C (FARMACOPEIA PORTUGUESA, 2005; THE MERCK INDEX, 2006; BP, 2010; EP, 2010; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; USP 33, 2010; JP, 2011).

Categoria: Antimicrobiano

Classe: Penicilina

pH: De 8,0 a 10,0, em solução aquosa do fármaco a 1%.

Comercialização no Brasil: A ampicilina sódica é comercializada no Brasil como pó para solução injetável. O medicamento de referência é a Amplacilina®, fabricada pela Eurofarma. Como medicamento genérico, é comercializada pelos laboratórios AB Farmo, Cellofarm, Medley, Ranbaxy e Teuto. Também é comercializada como medicamento similar, pelos laboratórios farmacêuticos União Química (Uni Ampicilin®), Ariston (Cilinon®) e Novafarma (Amplatil®) (BRASIL, 2012).

Diluente: Água estéril para injeção

4.2. Substância química de referência (SQR)

A substância química de referência (SQR) utilizada neste trabalho foi a ampicilina sódica, gentilmente doada pelo Laboratório Farmacêutico União Química, identificada pelo lote 3416090200, com teor declarado de 97,23% e com padronização válida até 07/06/2012.

4.3. Amostra da forma farmacêutica do pó liofilizado para solução injetável

Para este trabalho, foram utilizadas amostras de ampicilina sódica pó para solução injetável Uni Ampicilin®, 1000 mg, gentilmente fornecidas pelo Laboratório Farmacêutico União Química, lote 107314, válidas até 09/2012. Não possuem excipientes.

5. ANÁLISE QUALITATIVA

5.1. Características físicas

5.1.1. Material e método

A amostra de ampicilina sódica pó liofilizado para preparação injetável, descrita no item 4.3, foi avaliada em relação ao aspecto e cor.

5.1.2. Resultados e discussão

A amostra de pó liofilizado para preparação injetável de ampicilina sódica apresentou-se sob a forma de pó de coloração branca, levemente amarelada. Estas características condizem com as características preconizadas pela literatura e pelo fabricante (FARMACOPEIA PORTUGUESA, 2005; THE MERCK INDEX, 2006; BP, 2010; EP, 2010; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; USP 33, 2010; JP, 2011).

5.2. Determinação da umidade

5.2.1. Considerações gerais

O ensaio de determinação de umidade, segundo a Farmacopeia Brasileira (2010), tem como objetivo a determinação da quantidade de substância volátil de qualquer natureza presente na amostra.

Segundo a Farmacopeia Brasileira (2010), “dessecação até peso constante” significa que a secagem deve continuar até que duas pesagens seguidas não difiram em mais de 0,5 mg por grama da substância em exame, sendo que a segunda pesagem deve ser realizada após uma hora de secagem adicional nas condições especificadas.

5.2.2. Material e método

A determinação de umidade da amostra de ampicilina sódica em pó para solução injetável (descrita no item 4.3) foi realizada de acordo com a técnica para determinação da perda por dessecação utilizando balança por infravermelho, preconizada pela Farmacopeia Brasileira (2010). Para a realização do ensaio, foi utilizado um analisador de umidade por

infravermelho, modelo IV-2000 (Gehaka, SP, Brasil). Trata-se de uma balança com aquecimento por radiação infravermelha, que permite avaliar a umidade da amostra. Tal método consiste em secar uma determinada quantidade de fármaco até atingir peso constante, em temperatura apropriada, durante o tempo necessário.

Neste ensaio, o conteúdo de um frasco de ampicilina sódica pó para solução injetável (cerca de 1000 mg) foi pesado e transferido quantitativamente para o equipamento, onde permaneceu por 1 hora a 105 ºC. A análise foi realizada em triplicata e em três dias diferentes.

Para confirmar o tempo que a amostra deve permanecer no analisador de umidade por infravermelho, foi realizado um teste gravimétrico, também de acordo com a Farmacopeia Brasileira (2010). Neste teste, o conteúdo de um frasco de ampicilina sódica em pó para solução injetável foi exatamente pesado em balança analítica modelo H10 (Mettler Toledo, Suíça), no interior de um pesa-filtro previamente dessecado nas mesmas condições da análise e tarado. Após a pesagem, o pesa-filtro foi levado à estufa modelo 702.780 (Quimis, SP, Brasil) a 105 ºC, para a dessecação da amostra. O procedimento foi realizado em triplicata e o peso do pesa-filtro contendo a amostra foi analisado de 30 em 30 minutos, até a constatação de peso constante. Após esse procedimento, a perda em peso foi calculada em porcentagem.

5.2.3. Resultados e discussão

Os resultados obtidos pela técnica de perda por dessecação utilizando o analisador de umidade por infravermelho estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3- Teor de umidade da ampicilina sódica pó para solução injetável determinado em analisador de umidade por infravermelho

Ensaio	**Umidade (%)[1] ± e.p.m.[2]**
1	2,80
2	2,87
3	2,93
Média	2,87 ± 0,038

[1] Cada valor é a média de três determinações realizadas no mesmo dia
[2] e.p.m.: erro padrão da média

Em relação ao teste gravimétrico, o teor médio de umidade calculado foi de 2,12%, que é inferior ao obtido com o método por analisador de umidade por infravermelho, portanto foi confirmado que o tempo de 1 hora é suficiente para o teste.

Não existe descrito na literatura um valor máximo para o teor de umidade de amostras de ampicilina sódica em pó liofilizado para solução injetável. No entanto, a determinação de umidade é de extrema importância, uma vez que altas taxas de umidade podem levar à deterioração do fármaco ou demonstrar sua má conservação, além de induzir a erros de pesagem que, consequentemente, poderão levar a erros de cálculo de teor ou potência.

5.3. Determinação da solubilidade

5.3.1. Considerações gerais

Quando a Farmacopeia Brasileira (2010) se refere a "partes", quer dizer que 1 g de um sólido é submetido à dissolução no número de mililitros do solvente estabelecido no número de partes, à temperatura de 25 ºC. As solubilidades aproximadas apresentadas neste estudo estão designadas por termos descritivos cujos significados estão relacionados na Tabela 4.

Tabela 4- Termos descritivos de solubilidade e seus significados

Termo descritivo	Solvente
Muito solúvel	Menos de 1 parte
Facilmente solúvel	De 1 a 10 partes
Solúvel	De 10 a 30 partes
Ligeiramente solúvel	De 30 a 100 partes
Pouco solúvel	De 100 a 1000 partes
Muito pouco solúvel	De 1000 a 10000 partes
Insolúvel	Mais de 10000 partes

Fonte: FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010.

5.3.2. Material e método

Foram transferidas massas de 100 mg de ampicilina sódica em pó liofilizado para solução injetável (descrita no item 4.3) para tubos de ensaio, acrescentando alíquotas crescentes de cada solvente, até completa dissolução, sob constante agitação. O ensaio foi

realizado a 25 ºC e a solubilidade indicada como descrito na Farmacopeia Brasileira (2010), de acordo com a Tabela 4. Os solventes utilizados, todos de grau analítico, foram: acetato de etila, acetonitrila, ácido acético 0,1 *M*, ácido clorídrico 0,1 *M*, água, butanol, clorofórmio, diclorometano, etanol, éter etílico, hidróxido de sódio 0,1 *M* e metanol.

5.3.3. Resultados e discussão

A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos no teste de solubilidade para ampicilina sódica pó para solução injetável em diferentes solventes, de acordo com os critérios preconizados na Tabela 4.

Tabela 5- Solubilidade da ampicilina sódica pó para solução injetável em diferentes solventes a 25 ºC

Solventes	**Termo descritivo**
Acetato de etila	Insolúvel
Acetonitrila	Insolúvel
Ácido acético 0,1 *M*	Facilmente solúvel
Ácido clorídrico 0,1 *M*	Facilmente solúvel
Água	Facilmente solúvel
Butanol	Insolúvel
Clorofórmio	Muito pouco solúvel
Diclorometano	Insolúvel
Etanol	Muito pouco solúvel
Éter etílico	Muito pouco solúvel
Hidróxido de sódio 0,1 *M*	Facilmente solúvel
Metanol	Solúvel

A amostra se encontra dentro das especificações farmacopeicas de solubilidade descritas para este fármaco (FARMACOPEIA PORTUGUESA, 2005; THE MERCK INDEX, 2006; BP, 2010; EP, 2010; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; USP 33, 2010; JP, 2011). A solubilidade de uma substância em dado solvente, à temperatura constante, é um parâmetro característico deste produto, podendo servir para fins de identificação e avaliação do grau de pureza de fármacos (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Desta forma, o ensaio de solubilidade foi realizado com a finalidade de obter a caracterização da amostra qualitativamente através de sua polaridade e, ao mesmo tempo, utilizar este ensaio como preditivo na determinação do melhor sistema solvente para o desenvolvimento de teste qualitativo, por Cromatografia em Camada Delgada, e quantitativo, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

5.4. Cromatografia em Camada Delgada (CCD) indicativa de estabilidade

5.4.1. Considerações gerais

A cromatografia em camada delgada consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana, ou seja, a separação se dá pela diferença de afinidade dos componentes de uma mistura pela fase estacionária. Desta forma, é uma técnica de adsorção líquido-sólido (COLLINS, BRAGA, BONATO, 1997; DEGANI, CASS, VIEIRA, 1998).

A literatura descreve alguns métodos para identificação de ampicilina sódica em pó para solução injetável. A Farmacopeia Brasileira (2010) preconiza a utilização de fase móvel constituída por uma mistura de acetona e acetato de amônio a 15,4% (90:10, v/v), ajustada para pH 5,0. A detecção das manchas é realizada através de nebulização das placas secas com solução hidroalcoólica de ninidrina a 0,3% (p/v) com aquecimento a 90 ºC por 15 minutos. Além disso, as soluções de trabalho devem ser preparadas em solução de bicarbonato de sódio.

A Farmacopeia Portuguesa (2005) e a Farmacopeia Britânica (BP, 2010) preconizam a mesma técnica, sugerindo como fase móvel uma mistura de acetona e solução de acetato de amônio a 15,4% (10:90, v/v), ajustada para pH 5,0 com ácido acético glacial. A revelação das manchas deve ser realizada através da exposição das placas secas a vapores de iodo. Assim como preconizado pela Farmacopeia Brasileira (2010), as soluções de trabalho também devem ser preparadas em solução de bicarbonato de sódio.

Desta forma, o presente trabalho buscou o desenvolvimento de nova técnica por CCD, mais prática e simples, para identificação da ampicilina sódica em pó liofilizado para solução injetável, com a utilização de solventes menos tóxicos e mais econômicos, que também seja capaz de detectar a presença de produtos de degradação.

5.4.2. Material e método

5.4.2.1. Desenvolvimento da CCD

As placas utilizadas foram TLC Sílica gel 60 F_{254} (Merck, Alemanha), com as dimensões de 10,0 x 5,0 cm, previamente ativadas em estufa a 105 ºC por 30 minutos. Para o preparo das soluções da substância de referência e da amostra de ampicilina sódica em pó para preparações injetáveis, foram pesadas massas equivalentes a 0,025 g da substância de referência (descrita no item 4.2) e da amostra (descrita no item 4.3), em seguida estas massas foram transferidas para balões volumétricos de 5 mL e seus volumes foram completados com água purificada, obtendo-se soluções com concentrações de 5 mg/mL (p/v). As pesagens foram realizadas em balança analítica modelo H51 (Mettler Toledo, Suíça).

Foram testadas 6 fases móveis:

Sistema 1: etanol : água purificada (40:60, v/v)

Sistema 2: etanol : água purificada (60:40, v/v)

Sistema 3: etanol : água purificada (80:20, v/v)

Sistema 4: etanol : água purificada (90:10, v/v)

Sistema 5: etanol : água purificada (95:5, v/v)

Sistema 6: etanol (100%)

Na execução do ensaio, a fase móvel foi transferida para cuba e foi esperado até sua saturação, por um período de aproximadamente 45 minutos. As soluções, preparadas no dia da análise, foram aplicadas em quantidade de 10 µL diretamente na placa, com auxílio de microsseringa de vidro (Hamilton, Nevada, EUA). Depois, a placa foi colocada na cuba para eluição dos compostos. Quando a fase móvel atingiu o percurso de 8 cm, a placa foi retirada da cuba de vidro, para secagem, e depois foi realizada a revelação das manchas. Esta revelação foi procedida de duas maneiras diferentes: na primeira, a placa foi submetida a vapores de iodo (Synth, SP, Brasil) até o aparecimento das manchas; na segunda, a placa foi observada em câmara de luz UV (365 nm). Depois disso, as manchas foram observadas quanto à forma, posição, tamanho e cor. Também foram determinados os fatores de retenção (R_f) referentes às manchas correspondentes ao padrão e à amostra.

5.4.2.2. Degradação acelerada

Soluções de amostra de ampicilina sódica (5,0 mg/mL) foram submetidas à degradação acelerada por condições ácida, básica, neutra, oxidativa e fotolítica, com objetivo de avaliar se o sistema cromatográfico escolhido é capaz de detectar a degradação da ampicilina sódica na forma farmacêutica de pó para solução injetável e revelar a presença de possíveis produtos de degradação.

A solução amostra foi preparada em HCl 0,001 *M* e NaOH 0,001 *M* para as hidrólises ácida e básica, respectivamente. As amostras foram aquecidas a 60 ºC. A degradação neutra foi realizada através da exposição de solução aquosa da amostra à temperatura de 60 ºC, em banho-maria. Para a degradação oxidativa, a solução amostra foi preparada em solução de peróxido de hidrogênio a 3% (p/v) e depois foi submetida à temperatura de 60 ºC. A fotodegradação foi induzida através da exposição de uma solução aquosa da amostra à luz ultravioleta, utilizando uma câmara espelhada internamente (100 x 16 x 16 cm), com lâmpada UVC (254 nm) 20 W.

Todas as amostras foram submetidas à análise por CCD com a fase móvel constituída por etanol : água purificada (90:10, v/v) nos tempos de 30 e 180 minutos, 24 e 48 horas. As placas utilizadas foram TLC Sílica gel 60 F_{254} (Merck, Alemanha), com as dimensões de 10,0 x 10,0 cm, previamente ativadas em estufa a 105 ºC por 30 minutos. A revelação das manchas foi realizada das duas maneiras descritas no item 5.4.2.1.

5.4.3. Resultados e discussão

5.4.3.1. Desenvolvimento da CCD

A maioria dos sistemas solventes testados foi adequada para identificar a ampicilina sódica, pois todos foram capazes de separar a amostra. No Sistema 1, constituído por etanol : água purificada (40:60, v/v), o valor de R_f calculado foi, em média 0,92. No sistema 2, constituído por etanol : água purificada (60:40, v/v), o valor de R_f foi de 0,89. No entanto, a eluição da fase móvel nestes dois sistemas foi lenta, levando pouco mais de 1 hora.

Os dois melhores sistemas testados foram o Sistema 3 (etanol : água purificada, 80:20, v/v) e o Sistema 4 (etanol : água purificada, 90:10, v/v). O Sistema 3 (Figura 6) apresentou valor de R_f mais baixo em comparação aos anteriores, em média 0,84. No entanto, o melhor

foi o de número 4, cujos cromatogramas estão apresentados na Figura 7, apresentando valor de R_f de 0,73.

Figura 6- Cromatograma de solução de ampicilina sódica obtido através do Sistema 3, revelado com vapores de iodo. Fase estacionária: TLC Sílica gel 60 F_{254}. Fase móvel: etanol : água purificada (80:20 v/v). P: Padrão de ampicilina sódica (5 mg/mL). A: Amostra de ampicilina sódica pó para solução injetável (5 mg/mL).

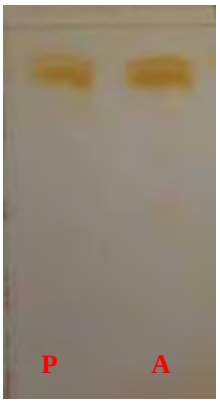
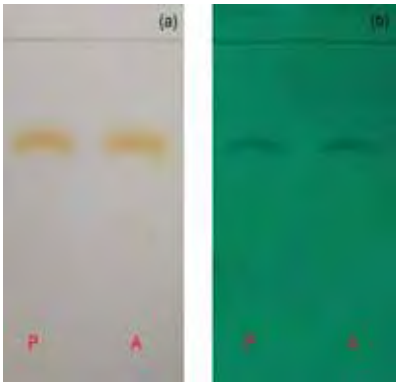


Figura 7- Cromatograma de solução de ampicilina sódica obtido através do Sistema 4, revelado com vapores de iodo (a) e em câmara de luz UV - 364 nm (b). Fase estacionária: TLC Sílica gel 60 F_{254}. Fase móvel: etanol : água purificada (90:10 v/v). P: Padrão de ampicilina sódica (5 mg/mL). A: Amostra de ampicilina sódica pó para solução injetável (5 mg/mL).



Os Sistemas 5 (etanol : água purificada, 95:5, v/v) e 6 (etanol 100%) apresentaram valores adequados de R_f, 0,62 e 0,60, respectivamente. No entanto, as manchas não ficaram bem delimitadas.

Quanto à revelação das manchas no Sistema 4, os dois tipos realizados mostraram-se eficientes, como demonstrado na Figura 7. Os cromatogramas revelaram duas manchas bem delimitadas e separadas. A mancha referente à solução da substância de referência foi similar em posição, cor e formato em relação à mancha obtida com a solução da amostra. Isto mostra que o método é eficaz para a identificação da ampicilina sódica em pó para solução injetável. No entanto, pode-se notar que a revelação com iodo resulta manchas mais fortes do que a revelação com a luz UV. Ambos os agentes reveladores são vantajosos e devem ser recomendados a fim de substituir o agente revelador preconizado pela Farmacopeia Brasileira (2010), que é a solução de ninidrina 0,3%.

Embora a literatura descreva alguns métodos para identificação de ampicilina sódica matéria prima e em pó para solução injetável por CCD, estes métodos geralmente utilizam como fases móveis misturas de solventes potencialmente tóxicos, tais como acetato de amônio e acetona, além de necessitarem de ajuste de pH com ácido acético glacial. Além disso, os métodos descritos utilizam soluções de bicarbonato de sódio para o preparo das soluções de trabalho (FARMACOPEIA PORTUGUESA, 2005; BP, 2010; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). O método desenvolvido neste trabalho mostrou vantagens por ser mais simples, econômico e seguro para os operadores do que os métodos já descritos na literatura.

5.4.3.2. Degradação acelerada

A análise por CCD foi realizada com a fase móvel constituída por etanol : água purificada (90:10, v/v) nos tempos de 0,5; 0,3; 24 e 48 horas. A revelação das manchas foi realizada das duas maneiras descritas no item 5.4.2.1. A placa de sílica utilizada teve as dimensões de 10,0 x 10,0 cm.

A Tabela 6 apresenta todos os dados encontrados na análise por CCD da degradação acelerada da ampicilina sódica em pó liofilizado para solução injetável. As Figuras 8, 9, 10 e 11 mostram os cromatogramas referentes a esta análise.

Tabela 6- Análise por CCD da degradação acelerada de ampicilina sódica em pó liofilizado para preparações injetáveis

Tempo (h)	Degradação neutra	Degradação fotolítica	Degradação ácida	Degradação alcalina	Degradação oxidativa
0,5	**UV[2]:** AMP[1]: R_f = 0,73 Manchas extras: não apareceram **Iodo[3]:** AMP: R_f = 0,73 Manchas extras: não apareceram	**UV:** AMP: R_f = 0,73 Manchas extras: não apareceram **Iodo:** AMP: R_f = 0,73 Manchas extras: não apareceram	**UV:** AMP: R_f = 0,73 Manchas extras: não apareceram **Iodo:** AMP: R_f = 0,73 Manchas extras: não apareceram	**UV:** AMP: R_f = 0,73 Manchas extras: não apareceram **Iodo:** AMP: R_f = 0,73 Manchas extras: não apareceram	**UV:** AMP: não apresentou mancha Manchas extras: R_f = 0,84; 0,64 e 0,49 **Iodo:** Não apareceu nenhuma mancha
3,0	**UV:** Igual ao cromatograma de 0,5 h **Iodo:** AMP: R_f = 0,73 Manchas extras: R_f = 0,64	**UV:** Igual ao cromatograma de 0,5 h **Iodo:** Igual ao cromatograma de 0,5 h	**UV:** Igual ao cromatograma de 0,5 h **Iodo:** AMP: R_f = 0,73 Manchas extras: R_f = 0,64	**UV:** Igual ao cromatograma de 0,5 h **Iodo:** AMP: R_f = 0,73 Manchas extras: R_f = 0,64	**UV:** Igual ao cromatograma de 0,5 h **Iodo:** Não apareceu nenhuma mancha

Continua na próxima página

Tabela 6 (continuação)- Análise por CCD da degradação acelerada de ampicilina sódica em pó liofilizado para preparações injetáveis

Tempo (h)	Degradação neutra	Degradação fotolítica	Degradação ácida	Degradação alcalina	Degradação oxidativa
24,0	**UV:** AMP: R_f = 0,73 Manchas extras: R_f = 0,84; 0,64 e 0,49 **Iodo:** AMP: R_f = 0,73 Manchas extras: R_f = 0,84 e 0,64	**UV:** AMP: R_f = 0,73 Manchas extras: não apareceram **Iodo:** AMP: R_f = 0,73 Manchas extras: R_f = 0,64	**UV:** AMP: R_f = 0,73 Manchas extras: R_f = 0,84; 0,64 e 0,49 **Iodo:** AMP: R_f = 0,73 Manchas extras: R_f = 0,84 e 0,64	**UV:** AMP: R_f = 0,73 Manchas extras: Rf = 0,84; 0,64 e 0,49 **Iodo:** AMP: R_f = 0,73 Manchas extras: R_f = 0,84 e 0,64	**UV:** AMP: não apresentou mancha Manchas extras: R_f = 0,84; 0,64 e 0,49 **Iodo:** Não apareceu nenhuma mancha
48,0	**UV:** AMP: R_f = 0,73 (baixa intensidade) Manchas extras: R_f = 0,84 e 0,64 **Iodo:** Igual ao cromatograma de 24 h	**UV:** AMP: R_f = 0,73 Manchas extras: não apareceram **Iodo:** Igual ao cromatograma de 24 h	**UV:** AMP: R_f = 0,73 (baixa intensidade) Manchas extras: R_f = 0,84 e 0,64 **Iodo:** Igual ao cromatograma de 24 h	**UV:** AMP: R_f = 0,73 (baixa intensidade) Manchas extras: R_f = 0,84 e 0,64 **Iodo:** Igual ao cromatograma de 24 h	**UV:** AMP: não apresentou mancha Manchas extras: R_f = 0,84 e 0,64 **Iodo:** Igual ao cromatograma de 24 h

[1] AMP: amostra de ampicilina sódica em pó liofilizado para solução injetável

[2] UV: Revelação das manchas em câmara de luz UV (365 nm)

[3] Iodo: Revelação das manchas submetendo as placas cromatográficas a vapores de iodo

Figura 8- Cromatogramas obtidos por CCD da degradação de ampicilina sódica em pó liofilizado para solução injetável após 30 minutos. Fase estacionária: TLC Sílica gel 60 F_{254}. Fase móvel: etanol : água purificada (90:10 v/v). 1: ampicilina sódica amostra íntegra. 2: degradação neutra (água, 60 ºC). 3: degradação fotolítica (luz UVC 254 nm). 4: degradação ácida (HCl 0,001 *M*, 60 ºC). 5: degradação alcalina (NaOH 0,001 *M*, 60 ºC). 6: degradação oxidativa (H_2O_2 3%, 60 ºC). Revelação com vapores de iodo (a) e em câmara de luz UV - 364 nm (b).

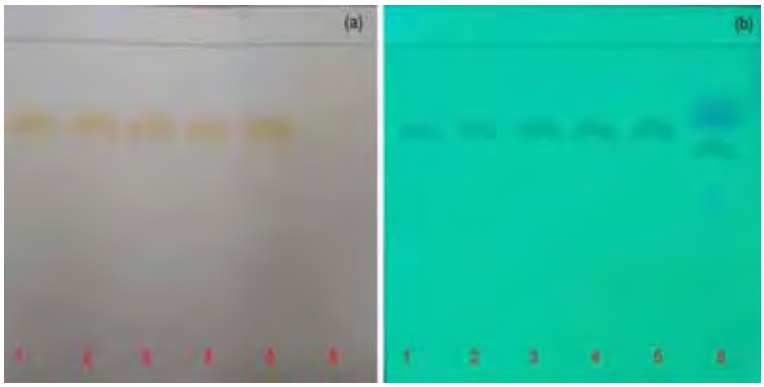


Figura 9- Cromatogramas obtidos por CCD da degradação de ampicilina sódica em pó liofilizado para solução injetável após 180 minutos. Fase estacionária: TLC Sílica gel 60 F_{254}. Fase móvel: etanol : água purificada (90:10 v/v). 1: ampicilina sódica amostra íntegra. 2: degradação neutra (água, 60 ºC). 3: degradação fotolítica (luz UVC 254 nm). 4: degradação ácida (HCl 0,001 *M*, 60 ºC). 5: degradação alcalina (NaOH 0,001 *M*, 60 ºC). 6: degradação oxidativa (H_2O_2 3%, 60 ºC). Revelação com vapores de iodo (a) e em câmara de luz UV - 364 nm (b).

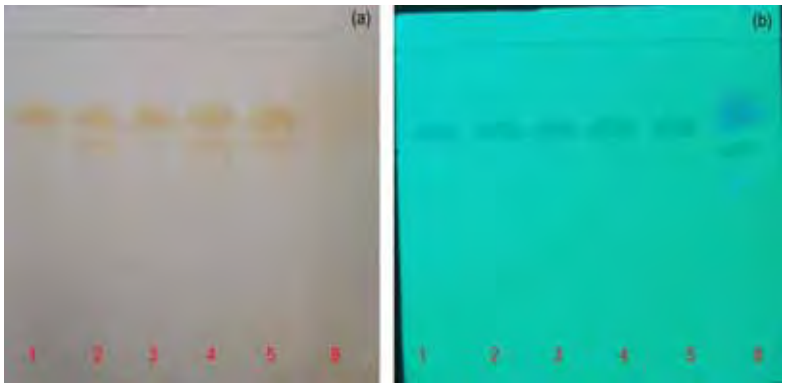


Figura 10- Cromatogramas obtidos por CCD da degradação de ampicilina sódica em pó liofilizado para solução injetável após 24 horas. Fase estacionária: TLC Sílica gel 60 F_{254}. Fase móvel: etanol : água purificada (90:10 v/v). 1: ampicilina sódica amostra íntegra. 2: degradação neutra (água, 60 ºC). 3: degradação fotolítica (luz UVC 254 nm). 4: degradação ácida (HCl 0,001 *M*, 60 ºC). 5: degradação alcalina (NaOH 0,001 *M*, 60 ºC). 6: degradação oxidativa (H_2O_2 3%, 60 ºC). Revelação com vapores de iodo (a) e em câmara de luz UV - 364 nm (b).

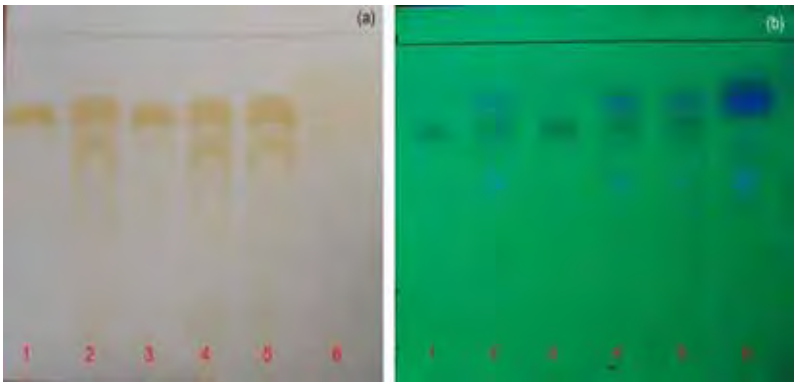
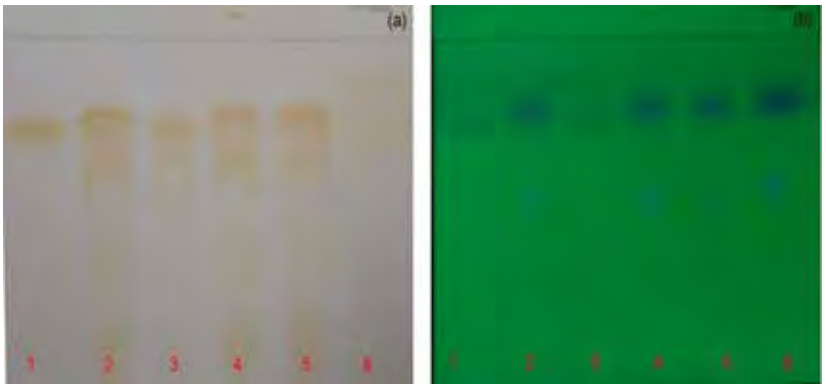


Figura 11- Cromatogramas obtidos por CCD da degradação de ampicilina sódica em pó liofilizado para solução injetável após 48 horas. Fase estacionária: TLC Sílica gel 60 F_{254}. Fase móvel: etanol : água purificada (90:10 v/v). 1: ampicilina sódica amostra íntegra. 2: degradação neutra (água, 60 ºC). 3: degradação fotolítica (luz UVC 254 nm). 4: degradação ácida (HCl 0,001 *M*, 60 ºC). 5: degradação alcalina (NaOH 0,001 *M*, 60 ºC). 6: degradação oxidativa (H_2O_2 3%, 60 ºC). Revelação com vapores de iodo (a) e em câmara de luz UV - 364 nm (b).



Pela análise dos dados obtidos, é possível observar que a solução da amostra de ampicilina sódica foi mais estável em condições fotolíticas e a máxima degradação foi observada pela condição oxidativa, na qual em 30 minutos a mancha referente à amostra de ampicilina sódica havia desaparecido, sugerindo a degradação total do fármaco. Três manchas adicionais foram comuns para as degradações neutra, ácida, básica e oxidativa (R_f de 0,84; 0,64 e 0,49) e uma destas três manchas também apareceu na degradação fotolítica (R_f de 0,64). Segundo dados da literatura, a principal rota de degradação da ampicilina é a hidrólise, sendo que este processo é acelerado por condições extremas ácidas e básicas. Os principais produtos de degradação formados são decorrentes da clivagem do anel β-lactâmico presente na molécula, os quais podem sofrer subsequentes degradações, formando produtos de degradação adicionais (IVASHKIV, 1973; SHAKOOR, TAYLOR, 1996).

Os resultados mostraram a capacidade indicativa de estabilidade do método proposto, o qual pode ser aplicado para análise qualitativa da ampicilina sódica na forma farmacêutica de pó para solução injetável em ensaios de rotina do Controle de Qualidade deste fármaco.

5.5. Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho

5.5.1. Considerações gerais

No espectro eletromagnético, a porção situada entre as regiões do visível e das micro-ondas corresponde à radiação infravermelha. Das três regiões do infravermelho (próximo, médio e distante), a região vibracional do infravermelho médio, situada entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1}, é a mais utilizada para fins de identificação de compostos (SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2007; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; PAVIA et al., 2010). A Farmacopeia Brasileira (2010) considera a espectrofotometria no infravermelho médio como um ensaio de identificação por excelência, visto que é capaz de distinguir substâncias com diferenças estruturais.

A espectrofotometria de absorção na região do infravermelho é preconizada por alguns compêndios oficiais como teste para identificação de ampicilina sódica matéria prima e também na forma farmacêutica de pó para preparações injetáveis (FARMACOPEIA PORTUGUESA, 2005; BP, 2010; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; USP 33, 2010; JP, 2011).

5.5.2. Material e método

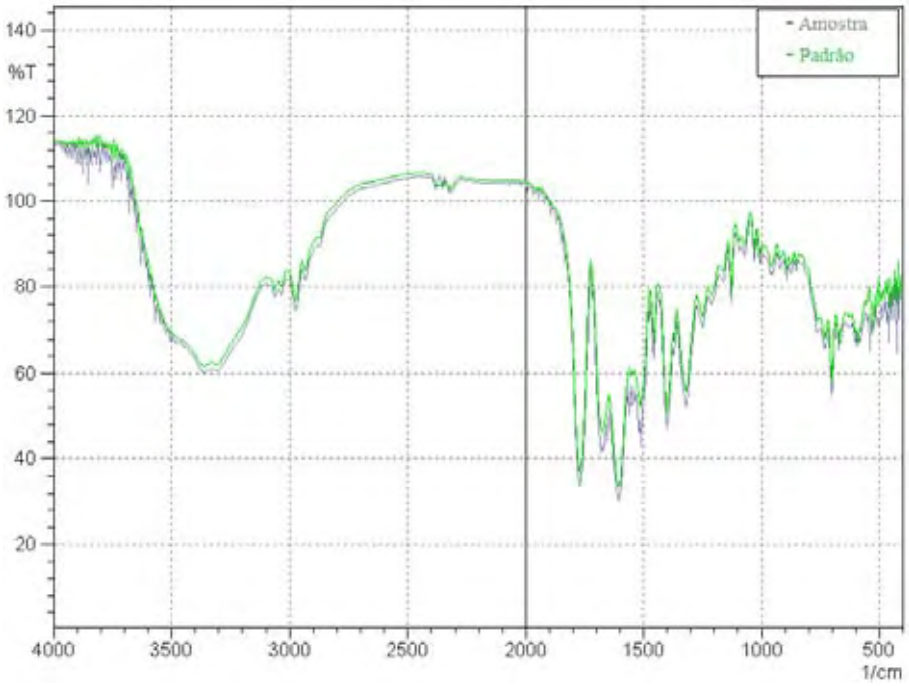
O equipamento de infravermelho empregado foi Shimadzu (Kyoto, Japão), com transformada de Fourier, modelo IR Prestige-21, que permite a digitalização de espectros e a obtenção de arquivos eletrônicos das análises. A região espectral compreendida na análise foi de 4000 a 500 cm^{-1}, com intervalos de 2 cm^{-1}. O brometo de potássio (KBr) utilizado para a confecção das pastilhas foi da marca Synth (São Paulo, Brasil), de grau analítico. Antes de sua utilização, o KBr foi dessecado a 120^{o}C em estufa modelo 702.780 (Quimis, SP, Brasil), até peso constante.

Para o preparo da pastilha de ampicilina sódica SQR, foi pesada massa de pó equivalente a 2,0 mg do fármaco (descrito no item 4.2), que foi devidamente homogeneizada com 148 mg de KBr, perfazendo massa total da pastilha de 150 mg. A leitura foi realizada em transmitância e o espectro foi obtido com auxílio do software *IR Solution*. O mesmo procedimento foi realizado com a ampicilina sódica na forma farmacêutica (descrita no item 4.3).

5.5.3. Resultados e discussão

Os espectros obtidos com ampicilina sódica SQR e ampicilina sódica pó para solução injetável encontram-se sobrepostos e apresentados na Figura 12.

Figura 12- Sobreposição dos espectros de absorção na região do infravermelho de ampicilina sódica SQR e ampicilina sódica pó para solução injetável.



Os espectros da SQR e da amostra de ampicilina sódica apresentaram as mesmas bandas de absorção, e este fato é um forte indício da identidade desta substância e da ausência de adjuvantes, impurezas e produtos de degradação na forma farmacêutica, os quais apresentariam bandas diferentes.

A Figura 13 apresenta um espectro de absorção da ampicilina sódica SQR com as suas principais bandas de absorção marcadas. A Tabela 7 compara estes dados com os apresentados na literatura, mostrando que as bandas apresentadas na análise do fármaco estão de acordo com o esperado para a estrutura química da molécula de ampicilina sódica (PAVIA et al., 2010).

Figura 13- Espectro de absorção por infravermelho da ampicilina sódica SQR com as suas principais bandas de absorção marcadas.

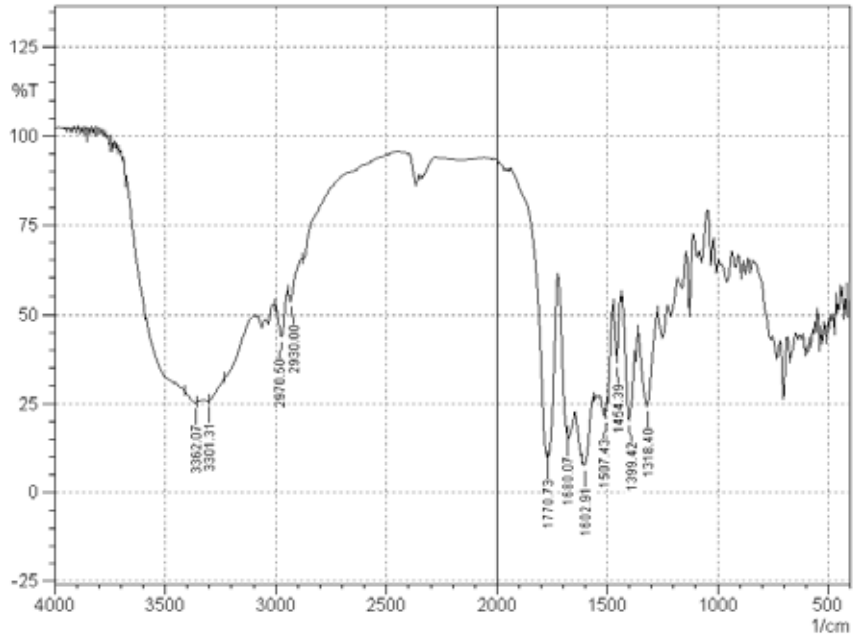


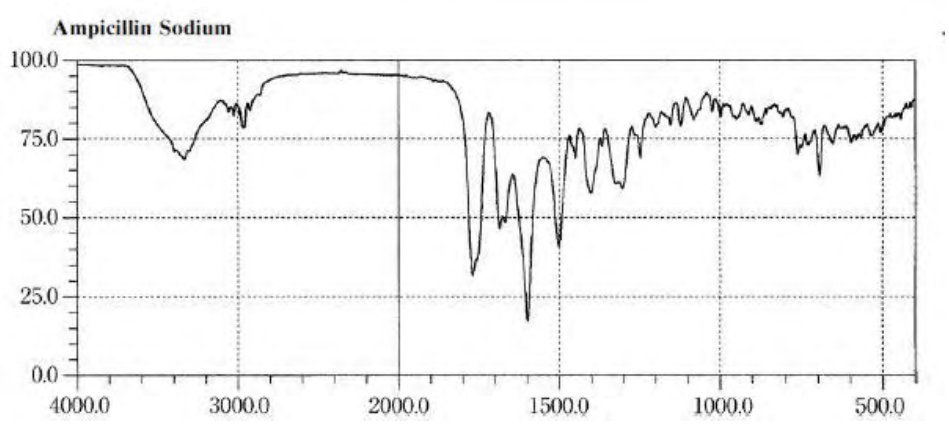
Tabela 7- Comparação das bandas de absorção apresentadas pela ampicilina sódica SQR na região do infravermelho com dados apresentados na literatura

Frequências visualizadas (cm^{-1})	**Faixa de frequências de referência (cm^{-1})[1]**	**Grupamentos responsáveis**
3362; 3301	3500-3300	N-H
3050	3100-3000	C_{sp2}-H
2970; 2930	3000-2850	C_{sp3}-H
1770	1760-1700 [2]	C=O (íon carboxilato)
1680	1680-1630	C=O (amidas)
1602	1650-1550	COO^- (íon carboxilato)
1602; 1507; 1454	1600-1450[3]	C=C (anel aromático)
1399	1400	COO^- (íon carboxilato)
1318; 1100	1350-1000	C-N

[1] PAVIA et al., 2010
[2] Valores de referência para grupamentos carbonila provenientes de ácidos carboxílicos
[3] Podem aparecer até 4 bandas dentro desta faixa

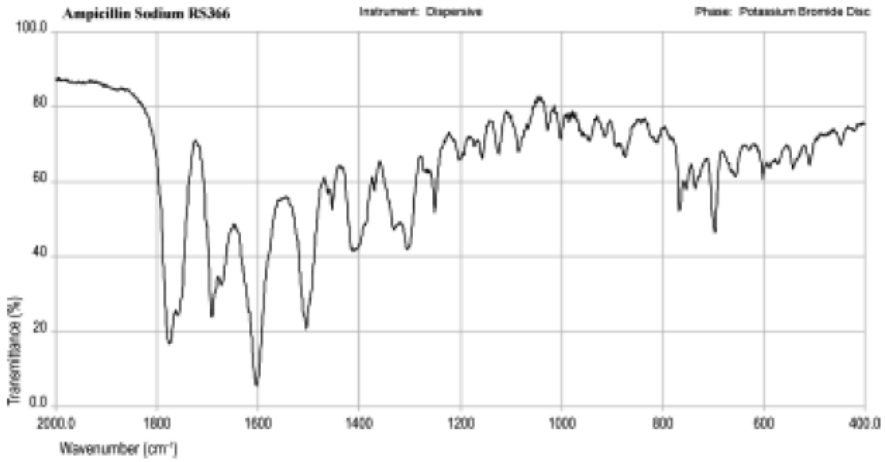
As Figuras 14 e 15 apresentam os espectros de absorção no infravermelho publicados pela JP (2011) e BP (2010), respectivamente. Observa-se que os dados apresentados na Tabela 7 estão de acordo com os espectros apresentados pela literatura.

Figura 14- Espectro na região do infravermelho de ampicilina sódica apresentado pela JP (2011).



Fonte**:** JP, 2011.

Figura 15- Espectro na região do infravermelho de ampicilina sódica apresentado pela BP (2010).



Fonte**:** BP, 2010.

6. ANÁLISE QUANTITATIVA

6.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

6.1.1. Considerações gerais

A cromatografia líquida de alta eficiência vem contribuindo de maneira significativa com a análise de medicamentos (RAMBLA-ALEGRE et al., 2011). É um método que se destaca por apresentar algumas propriedades especiais, tais como grande poder de resolução, alta velocidade de separação, capacidade de quantificação exata, permitindo ainda análises repetitivas e reprodutivas com a mesma coluna. Além disso, possibilita o uso de uma ampla variedade de fases móveis e estacionárias, permitindo a análise de grande número de compostos com alta eficiência (JEFFERY et al., 1992).

Este método é utilizado em várias áreas da ciência, com destaque para o acompanhamento de sínteses, em análises de pesticidas, no isolamento de produtos naturais e sintéticos e na produção e controle de qualidade de medicamentos, entre muitas outras aplicações (DEGANI, CASS, VIEIRA, 1998).

A CLAE é descrita por algumas referências farmacopeicas para análise de ampicilina ou de substâncias relacionadas. A USP 33 (2010) descreve o método para a ampicilina e recomenda como fase estacionária uma coluna analítica C_{18} com as dimensões de 300 x 4,0 mm, com partículas de 5 a 10 μm. Como fase móvel, sugere uma mistura de água, acetonitrila, fosfato de potássio monobásico 1 *M* e ácido acético 1 *N* (909:80:10:1), em modo isocrático de eluição, com vazão de 2 mL/min e detecção UV em 254 nm.

As Farmacopeias Portuguesa (2005) e Britânica (BP, 2010) descrevem o método apenas para substâncias relacionadas. Para isso, sugerem coluna analítica C_{18} com as dimensões de 250 x 4,6 mm, com partículas de 5 μm. Como fase móvel, recomendam a eluição em modo gradiente das seguintes soluções: Solução A - 0,5 mL de ácido acético diluído, 50 mL de solução de fosfato monopotássico 0,2 *M*, 50 mL de acetonitrila e água q.s.p. 1000 mL. Solução B - 0,5 mL de ácido acético diluído, 50 mL de fosfato monopotássico 0,2 *M*, 400 mL de acetonitrila e água q.s.p. 1000 mL, com vazão de 1 mL/min e detecção UV em 254 nm.

A Farmacopeia Japonesa (JP, 2011) também descreve o método para substâncias relacionadas, recomendando coluna analítica C_{18} com as dimensões de 150 x 4,6 mm, com

partículas de 5 µm. Como fase móvel, sugere preparar uma solução dissolvendo 5,94 g de hidrogênio fosfato de diamônio em 850 mL de água, adicionar 100 mL de acetonitrila e ajustar o pH para 5,0 com ácido fosfórico, adicionando água q.s.p. 1000 mL, com detecção UV em 230 nm e vazão ajustada para o pico sair em tempo de retenção próximo a 6 minutos.

Buscando-se na literatura, outros métodos por CLAE são encontrados para a quantificação da ampicilina em diferentes matrizes, tais como formulações farmacêuticas e cosméticas, fluidos biológicos, alimentos de origem animal, meio aquático e efluentes (Tabela 8).

Com o objetivo de aperfeiçoar o sistema, foi desenvolvido um novo método analítico para quantificação da ampicilina sódica em pó para solução injetável por CLAE, utilizando como fase móvel uma mistura de etanol e água, visando tornar o método mais simples, mais seguro para o operador e mais econômico e ainda minimizar os problemas que a presença de soluções-tampão na constituição de fases móveis poderia causar no sistema cromatográfico.

Tabela 8- Métodos de análise descritos na literatura para a determinação de ampicilina utilizando CLAE

Condições	Sistema de detecção	Matrizes	Tempo de corrida aproximado	Referência
Coluna analítica YWC-C_{18} (150 x 50 mm; 10 µm). Fase móvel: fosfato ácido, metanol e acetonitrila (82:8:10, v/v/v).	UV em 254 nm	Urina humana	ND*	ZHAO et al., 1990
Coluna analítica Spherisorb C_{18}. Fase móvel: solução-tampão acetato de amônio 1 m*M* e acetonitrila, com eluição em modo gradiente.	UV em 208 nm	Soro humano	15 minutos	MENDEZ-ALVAREZ et al., 1991
Coluna analítica Hichrom Hypersil C_{18} (150 x 4,6 mm; 5 µm). Fase móvel: mistura contendo 10 partes de acetonitrila e 90 partes de uma mistura de solução do composto 18-coroa-6 0,011 *M* em metanol e solução de fosfato monopotássico 0,067 *M* (1:9, v/v). A vazão foi de 1,0 mL/min.	UV em 210 nm	Plasmas canino e bovino	t_R = 7,1 minutos	NELIS et al., 1992
Coluna C_{18} µBondapak Cis (300 x 3,9 mm). Fase móvel: solução tampão fosfato (pH 3,5) e metanol. A vazão foi de 1,5 mL/min.	UV em 225 nm	Plasma humano	t_R = 23 minutos	AKHTAR, KHAN, KHAN, 1993
Coluna LiChrospher C_{18} (5µm). Fase móvel: mistura de metanol, acetonitrila e solução tampão fosfato.	UV em 210 nm	Misturas de amoxicilina, ampicilina, benzilpenicilina, cloxacilina e dicloxacilina	12 minutos	KANIOU, ZACHARIADIS, STRATIS, 1993
Coluna analítica Waters µBondapak C_{18} Radial-Pak (100 x 8,0 mm; 10 µm). Fase móvel: solução tampão acetato, metanol e acetonitrila, em diferentes proporções, com vazão de 2,0 mL/min.	Detecção amperométrica pulsada integrada	Substância de referência	25 minutos	KIRCHMANN, WELCH, 1993

Continua na próxima página

Tabela 8 (continuação)- Métodos de análise descritos na literatura para a determinação de ampicilina utilizando CLAE

Condições	Sistema de detecção	Matrizes	Tempo de corrida aproximado	Referência
Fase móvel: solução de fosfato monopotássico 0,1 *M* e acetonitrila (92:8, v/v).	UV em 214 nm	Soro humano	ND	LI et al., 1993
Coluna analítica Spherisorb C_{18} (300 x 4,6 mm; 10 µm). Fase móvel: solução de acetato de sódio 0,01 *M* (pH 5.0) e acetonitrila (90:10, v/v).	UV em 230 nm	ND	ND	ZHAO, QIAN, LI, 1993
Coluna C_{18} (100 x 4,6 mm; 10 µm). Fase móvel: acetonitrila e solução de ortofosfato monopotássico 0,1 *M* (pH 5,6) (23:77, v/v). Vazão de 1,0 mL/min.	Fluorescência em 346 nm (exc) e 422 (emi)	Soro humano	8 minutos	LAL et al., 1994
Coluna cromatográfica LiChrosorb C_{18} (10 µm). Fase móvel: acetonitrila e solução de ácido acético 1% (75:25, v/v), em modo isocrático de eluição e vazão de 1,5 mL/min.	UV em 240 nm	Matéria prima, cápsula (ampicilina e dicloxacilina)	ND	ABDEL-MOETY et al., 1995
Coluna analítica LiChrospher 100 C_{18} (5 µm). Fase móvel: acetonitrila e solução de ácido acético 1% (51:40, v/v), em uma vazão de 1,8 mL/min.	UV em 240 nm	Formulações farmacêuticas	ND	AL-KHAMEES et al., 1995
Coluna cromatográfica C_{18} LiChrospher (5 µm). Fase móvel: acetonitrila e solução de ácido acético 1% (39:61, v/v), em modo isocrático de eluição e vazão de 2,0 mL/min.	UV em 240 nm	Matéria prima, formulações farmacêuticas (ampicilina e dicloxacilina)	ND	AL-RASHOOD, 1995

Continua na próxima página

Tabela 8 (continuação)- Métodos de análise descritos na literatura para a determinação de ampicilina utilizando CLAE

Condições	Sistema de detecção	Matrizes	Tempo de corrida aproximado	Referência
Coluna C_{18} Phenomenex Ultracarb 5 ODS-30 (250 x 4,6 mm; 5 µm). A fase móvel: acetonitrila e solução tampão fosfato 0,02 *M* (pH 7,0). A eluição ocorreu em modo gradiente e a vazão foi de 1,0 mL/min.	UV em 230 nm	Plasma, urina e bile de ratos	30 minutos	LEE, LEE, LEE, 1995
Coluna analítica YWC-C_{18} (200 x 4,6 mm; 10 µm). Fase móvel: solução tampão acetato (pH 4,5) e metanol (55:45, v/v). A vazão foi de 1,0 mL/min.	UV em 254 nm	Cápsula (ampicilina e cloxacilina)	t_R = 3 minutos	ZHANG et al., 1995
Coluna analítica C_{18} Shodex (250 x 4,6 mm; 5 µm). Fase móvel: solução de fosfato monopotássico 0,10 *M* e acetonitrila (90:10, v/v), com pH ajustado para 5,0 com solução de hidróxido de potássio.	UV em 230 nm	Injetável (ampicilina sódica e sulbactam)	ND	ARGEKAR, KUNJIR, 1996
Coluna analítica C_{18} Hypersil (100 x 2,0 mm; 3 µm). Fase móvel: acetonitrila e solução tampão fosfato 20 m*M* (15:85, v/v), pH 2,4, incorporando dodecil sulfato de sódio 100 m*M*. A vazão foi de 0,4 mL/min em modo isocrático de eluição.	UV-DAD em 230 nm	Cápsula, xarope e suspensão	24 minutos	SHAKOOR, TAYLOR, 1996
Coluna analítica Nova-Pak C_{18} (150 x 3,9 mm; 4 µm). Fase móvel: solução tampão fosfato 0,1 *M* pH 6,5 (contendo mono-hidrogenosulfato de tetrabutilamônio 0,02 *M* e tiosulfato 0,0157 *M*), metanol e acetonitrila (70:12:18, v/v/v). Modo isocrático de eluição e vazão de 0,8 mL/min.	UV em 325 nm	Leite de vaca	25 minutos	VERDON, COUEDOR, 1996

Continua na próxima página

Tabela 8 (continuação)- Métodos de análise descritos na literatura para a determinação de ampicilina utilizando CLAE

Condições	Sistema de detecção	Matrizes	Tempo de corrida aproximado	Referência
Coluna analítica C_{18} Phenomenex Prodigy ODS-3 (250 x 4,6 mm; 5 µm). Fase móvel: acetonitrila e solução tampão fosfato monopotássico 0,02 *M* (pH 5,5) (32:68, v/v) por 12 minutos. Depois disso, a proporção muda para 50:50, v/v, por mais 10 minutos.	Fluorescência em 347 nm (exc) e 425 (emi)	Leite de vaca	22 minutos	LUO et al., 1997
Coluna C_{18} Phenomenex Prodigy ODS-3 (250 x 4,6 mm; 5 µm). Fase móvel: acetonitrila e solução tampão fosfato monopotássico 0,02 *M* (pH 3,5) (25:75, v/v). A vazão foi de 1,0 mL/min.	Fluorescência em 346 nm (exc) e 422 (emi)	Carne bovina, carne de porco, frango e peixe-gato	t_R = 12,5 minutos	LUO, ANG, THOMPSON JR, 1997
Coluna analítica LiChrosorb C_{18} (250 x 4,6 mm; 10 µm). Fase móvel: água, solução de fosfato monopotássico 1 *M*, ácido acético e acetonitrila (909:10:1:80, v/v/v/v), sob vazão de 2,0 mL/min.	UV em 254 nm	Cápsula	ND	PHAM, NGUYEN, 1997
Coluna analítica Kromasil KR100 C_8 (250 x 3,2; 5 µm). Fase móvel: solução de fosfato monopotássico 0,015 *M* e por uma mistura de tiossulfato de sódio 0,015 *M* e acetonitrila (80:20, v/v). A vazão foi de 0,55 mL/min	UV em 325 nm	Músculo e fígado bovinos	40 minutos	ROSE et al., 1997

Continua na próxima página

Tabela 8 (continuação)- Métodos de análise descritos na literatura para a determinação de ampicilina utilizando CLAE

Condições	Sistema de detecção	Matrizes	Tempo de corrida aproximado	Referência
Coluna Waters Nova-Pak C_{18} (150 x 3,9 mm; 4 µm). Fase móvel: duas soluções, sendo uma preparada misturando-se 100 mL de acetonitrila em 900 mL de tampão fosfato pH 6,5, e a outra preparada misturando-se 300 mL de acetonitrila em 700 mL de tampão fosfato pH 6,5. A vazão foi de 1,0 mL/min e a eluição em modo gradiente.	UV em 323 nm	Leite de vaca cru	50 minutos	SORENSEN et al., 1997
Coluna cromatográfica Phenomenex Luna C_8 (150 x 4,6; 5 µm). Fase móvel: solução de acetonitrila 20%, solução tampão acetato 500 m*M* (pH 3,75) e água (20:20:60, v/v/v).	Detecção amperométrica pulsada integrada	Leite cru	35 minutos	DASENBROCK, LACOURSE, 1998
Coluna Ultrasphere C_{18}. Fase móvel: solução de metanol 40% contendo heptanosulfonato de sódio 9 m*M*, fosfato monopotássico 30 m*M* e 0,04% de trietilamina, ajustada para pH 5,0 com ácido fosfórico 1 *M*, eluída e uma vazão de 1,0 mL/min.	UV em 230 nm	Preparações farmacêuticas	ND	EL SAYED, YOUNIS, EL-SHANAWANY, 1998
Coluna Hypersil C_{18} (150 x 4,6 mm; 5 µm). Fase móvel: solução tampão fosfato 50 m*M* contendo 0,1% de trietilamina, ajustado para pH 3,0 com ácido ortofosfórico, e metanol (70:30, v/v). A eluição ocorreu em modo isocrático e a vazão foi de 1,0 mL/min.	UV em 229 nm	Fluxo apical a basolateral através de monocamadas de células Caco-2 (estudo de permeação de ampicilina)	8 minutos	ERAH, BARRETT, SHAW, 1998

Continua na próxima página

Tabela 8 (continuação)- Métodos de análise descritos na literatura para a determinação de ampicilina utilizando CLAE

Condições	Sistema de detecção	Matrizes	Tempo de corrida aproximado	Referência
Coluna Supelcosil LC-18 (150 x 4,6 mm; 5 µm). Para as amostras de leite, fase móvel: solução de ácido fosfórico 0,01 *M*, fosfato monopotássico 0,005 *M* e dodecil sulfato de sódio; e acetonitrila (65:35, v/v). Para as amostras de tecidos, fase móvel: solução de fosfato monopotássico 0,0083 *M* e fosfato de sódio dibásico 0,0017 *M*; e acetonitrila (78:22, v/v).	Leite: UV em 215 nm Tecidos: fluorescência	Leite, rim e fígado	40 minutos	MOATS, ROMANOWSKY, 1998
Coluna analítica Spherisorb C_{18}. Fase móvel: solução tampão fosfato e acetonitrila (78:22, v/v).	Fluorescência em 360 nm (exc) e 430 (emi)	Plasma humano	t_R = 7,3 minutos	TAN, XU, ZHUO, 1998
Coluna analítica C_{18} Inertsil ODS-3 (250 x 4,6 mm; GL Science). Fase móvel: acetonitrila e fosfato monossódico 10 m*M* (6,5:93,5, v/v).	UV em 220 nm	Soro humano	20 minutos	ISHIDA et al., 1999
Coluna Waters Nova-Pak C_{18} (150 x 3,9 mm; 4 µm). Fases móveis: A) 100 mL de acetonitrila em 900 mL de tampão fosfato pH 6,5; B) 240 mL de acetonitrila e 60 mL de metanol em 700 mL de tampão fosfato pH 6,5; C) 300 mL de acetonitrila e 200 mL de metanol em 500 mL de tampão fosfato pH 6,5. Modo gradiente e vazão de 1 mL/min.	UV em 323 nm	Músculo, fígado e rim bovinos e suínos	50 minutos	SORENSEN et al., 1999
Coluna cromatográfica Alltima C_{18} (150 x 2,1 mm; 5 µm). Fase móvel: água e acetonitrila, ambas contendo 0,1% de ácido fórmico. Modo gradiente de eluição e vazão de 0,25 mL/min.	Ionização por eletrospray e espectrometria de massas em tandem	Leite de vaca	17 minutos	DAESELEIRE, RUYCK, VAN RENTERGHEM, 2000

Continua na próxima página

Tabela 8 (continuação)- Métodos de análise descritos na literatura para a determinação de ampicilina utilizando CLAE

Condições	Sistema de detecção	Matrizes	Tempo de corrida aproximado	Referência
Coluna cromatográfica ODP. Fase móvel: solução de fosfato dipotássico 100 m*M* e acetonitrila (78:22, v/v).	Fluorescência em 390 nm (exc) e 485 (emi)	Soro bovino	t_R = 7,3 minutos	HONG, KONDO, 2000
Coluna analítica µBondapak C_{18}. Fase móvel: metanol e tampão fosfato 0,0035 *M* (54:46, v/v).	UV em 225 nm	Injetável (ampicilina e cloxacilina)	ND	YANG et al., 2000
Coluna analítica LiChrosorb C_{18} (250 x 3,9 mm; 5 µm). Fase móvel: solução de ácido fosfórico 1% (pH 7,5) e metanol (76:24, v/v). Modo isocrático de eluição e vazão de 1,0 mL/min.	UV em 254 nm	Cápsula (ampicilina e probenecida)	ND	ZARAPKAR, HALKAR, RANE, 2000
Coluna cromatográfica Vydac C_8 (150 x 4,6 mm; 5 µm). Fase móvel: acetonitrila 6% em tampão acetato de sódio 100 m*M* (pH 3,75). Modo isocrático de eluição e vazão de 1 mL/min.	Detecção amperométrica pulsada integrada	Padrão de ampicilina	15 minutos	HANKO et al., 2001
Coluna analítica YMC ODS-AQ (50 x 2 mm; 3 µm). Fase móvel: água e uma solução de água e acetonitrila (35:65, v/v), ambas as fases contendo 0,1% de ácido fórmico. A eluição ocorreu em modo gradiente, em vazão de 0,3 mL/min.	Ionização por eletrospray e espectrometria de massas em tandem	Leite de vaca	20 minutos	RIEDIKER, STADLER, 2001

Continua na próxima página

Tabela 8 (continuação)- Métodos de análise descritos na literatura para a determinação de ampicilina utilizando CLAE

Condições	Sistema de detecção	Matrizes	Tempo de corrida aproximado	Referência
Coluna Waters Nova-Pak C_{18} (150 x 3,9 mm; 3 µm). Fases móveis: A) 100 mL de acetonitrila em 900 mL de tampão fosfato pH 6,5; B) 240 mL de acetonitrila e 60 mL de metanol em 700 mL de tampão fosfato pH 6,5; C) 300 mL de acetonitrila e 200 mL de metanol em 500 mL de tampão fosfato pH 6,5. Modo gradiente e vazão de 1 mL/min.	UV-DAD em 323 nm	Soros bovino e suíno	50 minutos	SORENSEN, SNOR, 2001
Coluna Selectosphere C_{18} (25 × 4,6 mm). Fase móvel: água, acetonitrila, fosfato de potássio 1 *M* e ácido acético 1 *N* (909:80:10:1, v/v/v/v), em vazão de 2,5 mL/min.	UV em 254 nm	Comprimido	t_R = 5 minutos	DE LUX PUTRA, 2002
Coluna analítica Phenomenex Luna C_{18} (250 x 4,6 mm; 5 µm). Fase móvel: mistura de 1% de ácido acético em água e 1% de ácido acético em metanol (30:70, v/v), em modo isocrático, com vazão de 0,5 mL/min.	Ionização por eletrospray e espectrometria de massas em tandem	Leite de vaca	15 minutos	HOLSTEGE et al., 2002
Coluna Alltech Econosphere C_{18} (5 µm). Fase móvel: metanol e solução tampão acetato de sódio 0,1 *M*, pH 4,8 ajustado com ácido acético glacial, em vazão de 1 mL/min.	UV em 230 nm	Soro humano	t_R = 12,5 minutos	METZ, KOHLHEPP, GILBERT, 2002
Coluna analítica Waters YMC ODS-AQ (50 x 4,6 mm; 3 µm). Fase móvel: solução aquosa 0,1% de ácido fórmico e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico, modo gradiente de eluição e vazões de 0,3 e 0,5 mL/min.	Ionização por eletrospray e espectrometria de massas em tandem	Rim bovino	33 minutos	FAGERQUIST, LIGHTFIELD, 2003

Continua na próxima página

Tabela 8 (continuação)- Métodos de análise descritos na literatura para a determinação de ampicilina utilizando CLAE

Condições	Sistema de detecção	Matrizes	Tempo de corrida aproximado	Referência
Coluna Discovery C_{18} column (150 x 4.6 mm; 5 μm). Fase móvel: acetonitrila e fosfato monpotássico 0,01 *M*, pH 3,5 ajustado com ácido fosfórico. Eluição em gradiente e vazão de 1,2 mL/min.	UV em 232 nm	Comprimido dispersível	6,5 minutos	ZHOU, 2003
Coluna analítica C_{18}. Fase móvel: solução tampão fosfato e metanol (65:35, v/v), ajustada para pH 4,0, eluída em uma vazão de 1,3 mL/min.	UV em 257 nm	Matéria prima e cápsula	ND	EL-BARY et al., 2004
Coluna Hypersil C_{18} (150 x 4,6 mm; 5 μm). Fase móvel: acetonitrila e solução tampão fosfato (pH 2,5) (45:55), com vazão de 1,0 mL/min.	UV em 230 nm	Cápsula (ampicilina e probenecida)	ND	SHENG; SONG; YANG, 2004
Coluna analítica Hypersil CN. Fase móvel: solução tampão fosfato e acetonitrila, em vazão de 1,0 mL/min.	UV em 236 nm	Cápsula (ampicilina e probenecida)	ND	KAN, 2005
Coluna cromatográfica Luna C_{18} (150 x 4,6 mm; 5 μm). Fase móvel: água com 0,01% de ácido trifluoroacético, e acetonitrila, também com 0,01% de ácido trifluoroacético. Modo gradiente e vazão de 1,5 mL/min.	UV-DAD em 220 nm	Águas residuais	25 minutos	BENITO-PEÑA et al., 2006
Coluna analítica C_{18}. Fase móvel: acetonitrila e solução tampão de brometo de cetil trimetil amônio e fosfato monopotássico 0,01 *M* (pH 6,5) (50:50, v/v).	UV em 230 nm	Cápsula (ampicilina e flucloxacilina)	ND	CHEN, CHANG, JIANG, 2006
Coluna cromatográfica Hypersil SCX. Fase móvel: solução tampão fosfato (pH 6,0) e acetonitrila (90:10, v/v).	UV em 225 nm	Injetável (ampicilina e cloxacilina)	ND	LIU, YANG, QIU, 2006

Continua na próxima página

Tabela 8 (continuação)- Métodos de análise descritos na literatura para a determinação de ampicilina utilizando CLAE

Condições	Sistema de detecção	Matrizes	Tempo de corrida aproximado	Referência
Coluna analítica Symmetry Shield RP8 (250 x 4,6 mm; 5 μm). Fase móvel: solução de fosfafo monopotássico 0,01 *M* (pH 2,5) e acetonitrila (85:15, v/ v).	Fluorescência em 358 nm (exc) e 440 (emi)	Ração animal	ND	LIU et al., 2006
Coluna analítica C_{18} (200 x 4,6 mm; 5 μm). Fase móvel: acetonitrila a 7,5%, em vazão de 1 mL/min.	UV em 210 nm	Soro humano	ND	WANG, ZHANG, LU, 2006
Coluna analítica C_{18}. Fase móvel: solução de fosfato monopotássico 0,1 *M*, dodecil sulfato de sódio 0,012 *M*, metanol e acetonitrila (280:300:200:220, v/v/v/v), ajustada para pH 2,8 com ácido fosfórico.	UV em 225 nm	Injetável (ampicilina e flucloxacilina)	ND	XING, ZHANG, GAO, 2006
Coluna Symmetry Shield C_{18} (150 x 3,9 mm; 5 μm). Fase móvel: solução de fosfato monopotássico 0,068 *M* (pH 3,0) e acetonitrila (92:8, v/v).	UV em 210 nm	Plasma humano	ND	ZHAO et al., 2006a
Coluna Symmetry Shield TM C_{18} (150 x 3,9 mm; 5 μm). Fase móvel: fosfato monopotássico 0,068 *M* (pH 3,0) e acetonitrila (92:8, v/v).	UV em 210 nm	Cápsula	ND	ZHAO et al., 2006b
Coluna analítica Luna C_{18}. Fase móvel: solução salina tamponada e acetonitrila (50:50, v/v), com vazão de 1 mL/min.	UV em 230 nm	Injetável	ND	CHEN, DONG, LU, 2007
Coluna analítica C_{18} Flexit Jour Inertsil ODS2 (250 x 4,6 mm, 5 μm). Fase móvel: acetonitrila e solução tampão fosfato pH 5,0, em vazão de 1 mL/min e eluição em gradiente.	UV em 225 nm	Formulações farmacêuticas (ampicilina e cloxacilina)	20 minutos	KUMAR, BHUTANI, SINGH, 2007

Continua na próxima página

Tabela 8 (continuação)- Métodos de análise descritos na literatura para a determinação de ampicilina utilizando CLAE

Condições	Sistema de detecção	Matrizes	Tempo de corrida aproximado	Referência
Coluna C_{18} Higgins Clipeus (150 x 3,0 mm; 5 µm). Fase móvel: ácido acético 5 m*M* em água e metanol (75:25, v/v), em vazão de 0,15 mL/min.	Ionização por eletrospray e espectrometria de massas	Rim, leite e fígado provenientes de animais	20 minutos	MSAGATI, NINDI, 2007
Coluna Supelco Nucleosil C_{18} (250 x 4,6 mm; 5 µm). Fase móvel: água ultrapura, acetonitrila e solução de difosfato de potássio 1 *M* (910:80:10).	UV em 234 nm	Meio aquático	14,4 minutos	SANTOS, PIZZOLATO, CUNHA, 2007
Coluna analítica de β-ciclodextrina Cyclobond I (250 x 4,6 mm; 5 µm), Advanced Separation Technologies. Fase móvel: metanol 5 m*M* e solução tampão acetato tetraetilamônio pH 4,5 (35:65, v/v), com vazão de 0,8 mL/min e modo isocrático.	UV-DAD em 280 nm	Injetável	35 minutos	TSOU et al., 2007
Coluna analítica Zorbax SB C_{18} (250 x 4,6 mm; 5 µm). Fases móveis: A) solução tampão fosfato de potássio 10 m*M* pH 5,1 e metanol (95:5, v/v) e B) solução tampão fosfato de potássio 10 m*M* (pH 5,1) e metanol (5:95, v/v), com vazão de 1,0 mL/min e modo gradiente.	UV-DAD em 230 nm	Cápsula e comprimido	25 minutos	GAUDIANO et al., 2008
Coluna cromatográfica Agilent Zorbax SB-C_{18} (50 x 2,1 mm; 1,8 µm). Fases móveis: A) mistura de água contendo ácido nonafluoropentanóico 1 m*M* com 0,5% de ácido fórmico e B) acetonitrila e metanol (50:50, v/v) com 0,5% de ácido fórmico. Vazão de 0,3 mL/min e eluição em modo gradiente.	Ionização por eletrospray e espectrometria de massas em tandem	Mel	25 minutos	HAMMEL et al., 2008

Continua na próxima página

Tabela 8 (continuação)- Métodos de análise descritos na literatura para a determinação de ampicilina utilizando CLAE

Condições	Sistema de detecção	Matrizes	Tempo de corrida aproximado	Referência
Coluna Phenomenex Prodigy ODS-3 (150 x 3 mm; 5 µm). Fase móvel: solução de ácido fórmico 0,1% em água e solução de ácido fórmico 0,1% em acetonitrila; vazão de 0,3 mL/min em modo gradiente.	Ionização por eletrospray e espectrometria de massas em tandem	Rim bovino	34,5 minutos	MASTOVSKA, LIGHTIELD, 2008
Coluna cromatográfica Hypersil BDS C_8 (150 mm x 4,6 mm; 5 µm). Fase móvel: solução tampão diidrogenofosfato de sódio diidratado de ortofosfato 0,25 *M*, ajustado para pH 5,0 com hidróxido de sódio 1 *M*, e acetonitrila; vazão de 1,5 mL/min, em modo gradiente.	UV em 220 nm	Matéria prima	ND	RAJU et al., 2008
Coluna Waters Sunfire C_{18}. Fase móvel: acetonitrila e fosfato monopotássico 0,05 *M* (6,5:93,5, v/v); vazão de 1,2 mL/min, em modo isocrático.	UV em 210 nm	Plasma humano	ND	XU et al., 2008
Coluna ACE-5 (150 x 4,6 mm; 5 µm). Fase móvel: metanol e solução tampão fosfato (60:40, v/v); vazão de 1,0 mL/min, em modo isocrático.	UV em 220 nm	Cápsula	9 minutos	BAROT et al., 2009
Coluna Shimpak C_{18} (300 x 4,6 mm; 5 µm). Fase móvel: solução de fosfato diidrogenado (pH 3,5) e acetonitrila (87,5:12,5, v/v), com vazão de 1,0 mL/min e modo isocrático.	UV-DAD em 215 nm	Plasma humano	ND	GOMES DO NASCIMENTO et al., 2009

Continua na próxima página

Tabela 8 (continuação)- Métodos de análise descritos na literatura para a determinação de ampicilina utilizando CLAE

Condições	Sistema de detecção	Matrizes	Tempo de corrida aproximado	Referência
Coluna analítica C_{12} Phenomenex Hydro-RP (50 x 2,0 mm; 4 µm). Fase móvel: água e metanol, ambos com 0,1% de ácido fórmico; vazão de 0,7 mL/min, em modo gradiente.	Ionização por eletrospray e espectrometria de massas em tandem	Leite de vaca	10 minutos	KANTIANI et al., 2009
Coluna cromatográfica Agilent LiChrospher C_{18} (12,5 x 4,6 mm; 5 µm). Fase móvel: água e acetonitrila, ambas com 0,1% de ácido fórmico; modo gradiente, em vazão de 1 mL/min.	UV-DAD em 220 nm; ionização por eletrospray e espectrometria de massas (MS); e espectrometria de massas em tandem (MS/MS)	Leite de vaca	20 minutos (UV-DAD) e 15 minutos (MS e MS/MS)	MARTÍNEZ-HUELAMO et al., 2009
Coluna analítica $C_{18.}$ Fase móvel: acetonitrila e água, ambas adicionadas de 0,1% de ácido fórmico, em modo gradiente.	Ionização por eletrospray e espectrometria de massas em tandem	Leite de vaca	22 minutos	QIN et al., 2009

Continua na próxima página

Tabela 8 (continuação)- Métodos de análise descritos na literatura para a determinação de ampicilina utilizando CLAE

Condições	Sistema de detecção	Matrizes	Tempo de corrida aproximado	Referência
Coluna analítica MZ-Analysentechnik Perfectsil C_{18} ODS-2 (250 x 4 mm; 5 µm). Fases móveis: A) solução de ácido trifluoroacético 0,1% (v/v) e B) mistura de acetonitrila e metanol (90:10, v/v), em modo gradiente de eluição, em vazão de 1,1 mL/min.	UV-DAD em 240 nm	Plasma bovino e formulações farmacêuticas para uso veterinário	25 minutos	SAMANIDOU, GIANNAKIS, PAPADAKI, 2009
Coluna analítica Shim-pack CLC-ODS. Fase móvel: fosfato monopotássico 0,02 *M* e acetonitrila (93:7, v/v), em vazão de 1 mL/min.	UV a 230 nm	Injetável	ND	SUN, SU, LI, 2009
Coluna analítica Hypersil SCX. Fase móvel: solução tampão fosfato pH 6,0 e acetonitrila (90:10, v/v), em modo isocrático.	UV em 225 nm	Injetável	ND	TAN, LIU, 2009
Coluna analítica Ultimate MAQ C_{18} (250 x 4.6 mm; 5 µm). Fases móveis: A) solução de ácido acético a 12%, diidrogenofosfato de potássio 0,2 *M*, acetonitrila e água (0,5:50:50:900, v/v/v/v) e B) solução de ácido acético a 12%, diidrogenofosfato de potássio 0,2 *M*, acetonitrila e água (0,5:50:400:550, v/v/v/v). A vazão foi de 1 mL/min em modo gradiente.	UV em 254 nm	Injetável	50 minutos	ZHOU, HU, 2009
Coluna analítica X-Terra C_8 (4,6 x 250 mm; 5 µm). Fase móvel: mistura de tampão fosfato de potássio dibásico pH 3,7 e metanol (80:20, v/v).	UV-DAD em 215 nm	Injetável	5 minutos	CIONE, LIBERALE, SILVA, 2010

Continua na próxima página

Tabela 8 (continuação)- Métodos de análise descritos na literatura para a determinação de ampicilina utilizando CLAE

Condições	Sistema de detecção	Matrizes	Tempo de corrida aproximado	Referência
Coluna Phenomenex Gemini C_{18} (150 x 4,6 mm; 5 μm). Fase móvel: solução de ácido fórmico a 0,1% pH 2,6 e acetonitrila; vazão de 0,7 mL/min em modo gradiente.	UV-DAD em 230 nm	Amostras de peixe e marisco	34 minutos	FERNANDEZ-TORRES et al., 2010a
Coluna Phenomenex Gemini C_{18} (150 x 4,6 mm; 5 μm). Fase móvel: solução de ácido fórmico a 0,1% pH 2,6 e acetonitrila; vazão de 1,0 mL/min em modo gradiente.	UV-DAD em 230 nm	Urina humana	34 minutos	FERNANDEZ-TORRES et al., 2010b
Coluna Agilent Zorbax Eclipse Plus C_{18} (100 x 2,1 mm; 3,5 μm). Fase móvel: acetonitrila e água com 0,1% de ácido fórmico, com vazão de 0,2 a 0,3 mL/min e modo gradiente.	Ionização por eletrospray e espectrometria de massas em tandem	Água potável e águas residuais	30 minutos	FERRER, ZWEIGENBAUM, THURMAN, 2010
Coluna Kromasil KR100-5 C_{18} (250 x 4,6 mm; 5 μm). Fase móvel: solução tampão fosfato 0,01 *M* pH 5,6 e acetonitrila (15:85; v/v), com vazão de 1,5 mL/min, em modo isocrático.	Fluorescência em 354 nm (exc) e 445(emi)	Leite de cabra	ND	FERRINI, et al., 2010
Coluna analítica Phenomenex C_{12} Hydro-RP (50 x 2,0 mm; 4 μm). Fase móvel: água contendo 0,1% de ácido fórmico e metanol contendo 0,1% de ácido fórmico, com vazão de 0,7 mL/min, em modo gradiente.	Ionização por eletrospray e espectrometria de massas em tandem	Ração animal	10 minutos	KANTIANI et al., 2010

Continua na próxima pagina

Tabela 8 (continuação)- Métodos de análise descritos na literatura para a determinação de ampicilina utilizando CLAE

Condições	Sistema de detecção	Matrizes	Tempo de corrida aproximado	Referência
Coluna analítica Dionex Vydac C_{18} (250 x 4,6 mm; 5 µm). Fase móvel: solução tampão fosfato 5 m*M* (pH 6,6) e metanol (55:45, v/v); vazão de 1 mL/min, em modo gradiente.	UV-DAD em 215 nm	Leite de vaca	8 minutos	KUKUSAMUDE et al., 2010
Coluna analítica Waters Atlantis guard C_{18} (20 x 3,9 mm; 3 µm). Fase móvel: solução aquosa de ácido fórmico 0,1% e acetonitrila; vazão de 1 mL/min em modo gradiente.	Ionização por eletrospray e espectrometria de massas em tandem	Músculo bovino	16,5 minutos	MARTOS et al., 2010
Coluna Waters X-bridge C_{18} (30 x 4,6 mm; 2,5 µm). Fase móvel: acetonitrila e solução tampão fosfato 50 m*M* pH 2,4 (8:92, v/v), com vazão de 1,0 mL/min, em modo isocrático.	UV em 210 nm	Plasma humano	7 minutos	MC WHINNEY et al., 2010
Coluna Shim-Pack ODS (250 × 4,6 mm; 5 µm). Fase móvel: água, acetonitrila, solução tampão fosfato monopotássico 1 *M* pH 3.0 e solução de ácido acético 1 *M* (909:80:10:1), com vazão de 1,5 mL/min, em modo isocrático.	UV em 254 nm	Injetável	12 minutos	SILVA et al., 2010
Coluna Waters Symmetry C_{18} (150 x 3,0 mm; 5 µm). Fase móvel: solução de ácido fórmico a 0,2% em água e solução de ácido fórmico a 0,2% em acetonitrila, em modo gradiente de eluição, com vazão de 0,4 mL/min.	Ionização por eletrospray e espectrometria de massas em tandem	Carne suína, leite e ração animal	20 minutos	VAN HOLTHOON et al., 2010
Coluna cromatográfica C_{18}. Fase móvel: acetonitrila e solução de amônia 0,1%, em modo gradiente.	UV em 210 nm	Leite e carne suína	10 minutos	YE, GU, ZHANG, 2010

Continua na próxima página

Tabela 8 (continuação)- Métodos de análise descritos na literatura para a determinação de ampicilina utilizando CLAE

Condições	Sistema de detecção	Matrizes	Tempo de corrida aproximado	Referência
Coluna analítica Agilent TC C_{18} (150 x 4,6 mm; 5 µm). Fase móvel: metanol e água; em vazão de 1,5 mL/min.	UV em 320 nm	Leite	5 minutos	ZHANG et al., 2010
Coluna analítica Symmetry Shield, C_8 (150 x 4,6 mm; 4 µm). Fase móvel: solução tampão fosfato de potássio dibásico 0,05 *M* pH 7,3 e acetonitrila (87:13, v/v).	UV-DAD em 210 nm	Plasma humano	9 minutos	ALSWAYEH, ALVI, HAMMAMI, 2011
Coluna analítica Phenomenex Gemini C_{18} (150 x 4,6 mm; 5 µm). Fase móvel: solução de ácido fórmico a 0,1% em água (pH 2,6) e acetonitrila. Modo gradiente com vazão de 0,4 mL/min.	Ionização por eletrospray e espectrometria de massas em tandem	Amostras de peixe e marisco	50 minutos	FERNANDEZ-TORRES et al., 2011a
Coluna Phenomenex Gemini C_{18} (150 x 4,6 mm; 5 µm). Fase móvel: ácido fórmico a 0,1% em água (pH 2,6) e acetonitrila, em modo gradiente a 0,7 mL/min.	UV-DAD em 230 nm e fluorescência (não foi aplicado para ampicilina)	Amostras de peixe e marisco	35 minutos	FERNANDEZ-TORRES et al., 2011b
Coluna cromatográfica Hy-Purity C_{18} (150 x 2,1 mm; 3,5 µm). Fase móvel: A) Solução de ácido fórmico a 0,1% e B) acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico.	Ionização por eletrospray e espectrometria de massas em tandem	Produtos da pesca	8 minutos	GUO et al., 2011
Coluna analítica Agilent Zorbax Eclipse XDB-C_8 (150 x 4,6 mm; 5 µm). Fase móvel: água e acetonitrila (85:15, v/v), com pH ajustado para 3,2. Vazão de 1 mL/min, em modo gradiente.	Ionização por eletrospray e espectrometria de massas em tandem	Leite de vaca	10 minutos	JUNZA, AMATYA, BARBOSA, 2011

Continua na próxima página

Tabela 8 (continuação)- Métodos de análise descritos na literatura para a determinação de ampicilina utilizando CLAE

Condições	Sistema de detecção	Matrizes	Tempo de corrida aproximado	Referência
Coluna Phenomenex Kinetex TM (150 x 4,6 mm; 2,6 µm). Fase móvel: acetato de amônio 0,05 *M* e acetonitrila. Vazão em modo gradiente.	UV-DAD em 226 nm	Leite de vaca	20 minutos	KARAGEORGOU, SAMANIDOU, 2011
Coluna Unison UK-C_{18} (50 x 2,0 mm; 3 µm). Fase móvel: solução aquosa de formiato de amônio 10 m*M* contendo 0,1% de ácido fórmico e metanol. Vazão em modo gradiente.	Ionização por eletrospray e espectrometria de massas em tandem	Soro humano	13 minutos	OHMORI et al., 2011
Coluna cromatográfica Zorbax SB C_{18} (100 x 2,1 mm; 3,5 µm). Fase móvel: solução aquosa de ácido fórmico a 0,2% e acetonitrila. Vazão a 0,3 mL/min em modo gradiente.	Ionização por eletrospray e espectrometria de massas em tandem	Produtos cosméticos	30 minutos	WU et al., 2011
Coluna Higgins TM C_{18} (250 x 4,6 mm; 5 µm). Fase móvel: mistura de metanol, acetonitrila e isopropanol (100:2:5, v/v/v) e solução de fosfato monopotássico 0,01 *M* (pH 3.5) na proporção de 23:77 (v/v). Vazão de 1 mL/min.	UV em 210 nm	Soro humano	ND	ZHAO et al., 2011

* ND: dado não descrito

6.1.2. Material

Para a análise cromatográfica foram utilizadas ampicilina sódica SQR e ampicilina sódica em pó liofilizado para preparações injetáveis descritas nos itens 4.2 e 4.3, respectivamente.

Todas as soluções e fases móveis utilizadas durante este trabalho foram preparadas a partir de água ultrapura obtida através de equipamento Milli-Q Plus (Milipore, EUA). O etanol utilizado na preparação da fase móvel possuía grau HPLC e foi adquirido da J.T. Backer (México). Para os estudos de degradação forçada, foram utilizados os seguintes solventes: solução de ácido clorídrico (Qhemis) 0,001 *M*, solução de hidróxido de sódio (Cinética) 0,001 *M* e solução de peróxido de hidrogênio (Vetec Química Fina) 3%. A fase móvel, após preparada, foi submetida à degaseificação em banho ultrassônico modelo USC2800A (Unique, SP, Brasil), por 30 minutos. Todas as soluções foram filtradas através de membrana de 0,45 µm (Pall Corporation, Michigan, EUA) antes de serem injetadas.

O equipamento de CLAE usado foi Waters, modelo 1525 (Waters Chromatography Systems, CA, EUA), conectado a detector de UV/Visível Waters 2487 e injetor manual 7725i com loop de 20 µL (Rheodyne Breeze, CA, EUA). A separação cromatográfica foi realizada através de condições isocráticas de fase reversa em coluna Agilent Zorbax C_{18}, 5 µm, 4,6 x 150 mm (Agilent, Santa Clara, CA, EUA).

O software *Microsoft Excel* (2007) foi utilizado para a construção da curva analítica.

Os seguintes equipamentos também foram utilizados: banho-maria modelo Q334M (Quimis, SP, Brasil); balança analítica modelo H51 (Mettler Toledo, Suíça); micropipetador modelo 20-200 µL (Digipet, PR, Brasil); câmara UV com espelhos em seu interior, equipada com lâmpada UVC (254 nm).

6.1.3. Preparo das fases móveis

Misturas de etanol e água foram preparadas em diferentes proporções antes de serem colocadas no equipamento. Cada fase móvel foi filtrada e levada ao ultrassom por 30 minutos para degaseificação antes do uso.

6.1.4. Método

6.1.4.1. Ensaios preliminares

Ensaios preliminares foram realizados com o objetivo de encontrar condições favoráveis para a quantificação da ampicilina sódica em pó para solução injetável, bem como reduzir a assimetria do pico, os danos para a coluna cromatográfica e a geração de resíduos. Desta forma, a Tabela 9 apresenta alguns parâmetros que foram testados durante os testes preliminares.

Tabela 9- Parâmetros cromatográficos testados durante ensaios preliminares para desenvolvimento de método por CLAE para quantificação de ampicilina sódica em pó para injetável

Parâmetros	**Descrição**
Colunas cromatográficas	Waters Symmetry C_{18} (250 x 4,6 mm; 5 µm) (Milford, MA, EUA) Agilent Zorbax C_{18} (150 x 4,6 mm; 5 µm) (Santa Clara, CA, EUA)
Fases móveis	etanol : água (50:50, v/v) etanol: água (40:60, v/v) etanol : água (30:70, v/v)
Vazão (mL/min)	0,5 1,0

A partir dos resultados obtidos com as diferentes colunas analíticas, fases móveis e vazões foi possível estabelecer os parâmetros ideais para a realização do método. Estas condições estão apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10- Parâmetros estabelecidos para a determinação de ampicilina sódica pelo método de CLAE

Parâmetros	Descrição
Fase móvel	etanol : água (40:60, v/v)
Coluna analítica	Agilent Zorbax C_{18} (150 x 4,6 mm; 5 µm)
Detecção	210 nm
Vazão	0,5 mL/min
Volume de injeção	20 µL
Temperatura	25^{o}C ± 2 ^{o}C
Tempo de retenção	± 3,1 minutos

6.1.4.2. Obtenção da curva analítica

Para a realização da curva analítica, foram pesados analiticamente 20,57 mg de ampicilina SQR (o equivalente a 20,0 mg de ampicilina sódica descrita no item 4.2), depois transferidos para balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água, para obtenção de solução estoque com concentração teórica de 200 µg/mL. Alíquotas de 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 e 6,0 mL desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL, e os volumes foram completados com água, para obtenção das soluções de trabalho com as concentrações de 70, 80, 90, 100, 110 e 120 µg/mL de ampicilina sódica SQR. Cada concentração foi preparada em triplicata e submetida à filtração antes das injeções.

6.1.4.3. Determinação de ampicilina sódica em pó liofilizado para solução injetável

6.1.4.3.1. Preparo da solução de ampicilina sódica SQR

Para balões volumétricos de capacidade de 10 mL foram transferidos volumes de 4,5 mL de solução de ampicilina sódica SQR com concentração de 200 µg/mL. Os volumes foram completados com água para obtenção de soluções com concentração de 90 µg/mL. Foram preparadas 7 soluções, as quais foram submetidas à filtração antes das injeções.

6.1.4.3.2. Preparo da solução de ampicilina sódica amostra

Os conteúdos de vinte frascos-ampola de ampicilina sódica em pó para solução injetável (descritos no item 4.3) foram misturados. Desta mistura, foram exatamente pesados 20 mg, que foram transferidos para balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água, para obtenção de solução estoque com concentração de 200 µg/mL. Alíquotas de 4,5 mL desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL, cujos volumes foram completados com água purificada, para obtenção de soluções com concentração de 90 µg/mL. Foram preparadas 7 soluções, as quais foram submetidas à filtração antes das injeções.

6.1.4.3.3. Cálculo do teor de ampicilina sódica na amostra

A concentração de ampicilina sódica na amostra foi calculada pela Equação 1 e o seu teor percentual foi calculado pela Equação 2.

$$Ca = Aa \times \frac{Csr}{Asr} \qquad \textbf{Equação 1}$$

$$Ca\% = Ca \times \frac{100}{Ct} \qquad \textbf{Equação 2}$$

Em que:

Ca = concentração da amostra (µg/mL)

Ca%= concentração percentual da amostra

Csr = Concentração da substância química de referência (µg/mL)

Aa = Área absoluta da amostra

Asr = Área absoluta da substância química de referência

Ct = concentração teórica de ampicilina sódica na amostra (µg/mL)

6.1.4.4. Validação do método

O método foi validado pela determinação dos seguintes parâmetros: conformidade do sistema, linearidade, precisão, exatidão, robustez, seletividade, limites de detecção e de quantificação, de acordo com o preconizado pela literatura (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 33, 2010).

6.1.4.4.1. Linearidade

Para a validação do método, foram utilizadas seis concentrações de ampicilina sódica SQR (70,0; 80,0; 90,0; 100,0; 110,0 e 120,0 µg/mL). A linearidade foi avaliada por meio do cálculo da regressão linear através dos mínimos quadrados e ANOVA.

6.1.4.4.2. Precisão

A precisão do método foi avaliada em dois quesitos: a repetibilidade e a precisão intermediária. A repetibilidade (intradia) foi estudada pela realização da análise de 7 injeções de soluções de ampicilina sódica SQR na concentração de 90 µg/mL, no mesmo dia e em condições de trabalho idênticas. O valor do desvio padrão relativo percentual (DPR%) entre as determinações foi analisado. A precisão intermediária (interdias e entre analistas), por sua vez, foi avaliada através da realização de determinações de ampicilina sódica na amostra de pó para solução injetável em três dias diferentes e também por um segundo analista, sob as mesmas condições experimentais. Os valores de DPR% entre os doseamentos foram calculados (ICH, 2005).

6.1.4.4.3. Exatidão

A exatidão do método foi realizada através do ensaio de recuperação, no qual quantidades conhecidas de ampicilina sódica SQR foram adicionadas a quantidades conhecidas de amostra (ICH, 2005). A recuperação foi realizada em três níveis, R1, R2 e R3, e as soluções foram preparadas segundo a Tabela 11, em triplicata.

Tabela 11- Preparo das soluções para o teste de recuperação do método cromatográfico para ampicilina sódica

	Ampicilina sódica amostra (200 µg/mL) (mL)	**Ampicilina sódica SQR (200 µg/mL) (mL)**	**Concentração teórica final (µg/mL)[1,2]**
Amostra	3,5	-	70,0
R1	3,5	0,5	80,0
R2	3,5	1,5	100,0
R3	3,5	2,5	120,0
Padrão	-	3,5	70,0

[1] Balão volumétrico de 10 mL
[2] Cada nível de concentração foi preparado em triplicata

A porcentagem de recuperação (R%) foi calculada através da Equação 3, determinada pela AOAC (AOAC, 2002):

$$R\% = \left[\frac{(Cf - Cu)}{Cs}\right] \times 100$$ **Equação 3**

Na qual:

Cf = concentração da substância de amostra adicionada de padrão (SQR) (µg/mL)

Cu = concentração da amostra (µg/mL)

Cs = concentração teórica da substância química de referência adicionada (µg/mL)

6.1.4.4.4. Robustez

Para a avaliação da robustez do método, os seguintes parâmetros foram variados individualmente: quantidade de etanol na fase móvel (3 unidades percentuais acima e abaixo da concentração de etanol na fase móvel), comprimento de onda no detector UV-Vis (2 unidades de comprimento de onda acima e abaixo do comprimento de onda de trabalho), vazão (0,05 mL/min acima e abaixo da vazão de trabalho), marca da coluna (Phenomenex) e marca do etanol (Tedia). Para isso, foram realizados doseamentos de ampicilina sódica na amostra de pó para solução injetável nas diferentes condições propostas. As respostas obtidas

foram avaliadas quanto ao DPR% entre as determinações, comparando-as com as condições normais de trabalho.

6.1.4.4.5. Seletividade

A seletividade do método foi determinada submetendo soluções de ampicilina sódica em pó para solução injetável em concentrações de 90 µg/mL à degradação acelerada por condições ácida, básica, neutra e fotolítica para avaliar a interferência de produtos de degradação na quantificação da ampicilina sódica.

A solução da amostra foi preparada em HCl 0,001 *M* e NaOH 0,001 *M* para as hidrólises ácida e básica, respectivamente. As amostras foram aquecidas a 60 ºC, por 48 horas. Ambas as soluções foram neutralizadas com NaOH 0,001 *M* e HCl 0,001 *M*, respectivamente, antes de serem injetadas no equipamento. A degradação neutra foi realizada através da exposição de solução aquosa da amostra à temperatura de 60 ºC, em banho de aquecimento, por 48 horas. A fotodegradação foi induzida através da exposição de uma solução aquosa da amostra à luz ultravioleta (UVC, 254 nm) por 48 horas. É importante destacar que todas as amostras foram injetadas no equipamento em concentrações de 90 µg/mL.

Obs: não foi possível realizar a degradação oxidativa porque o peróxido de hidrogênio, substância necessária para a realização do ensaio, apresenta um grande pico característico no mesmo tempo de retenção da ampicilina sódica, encobrindo o pico do fármaco, nas condições de trabalho propostas.

6.1.4.4.6. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados com base no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva, conforme descrito na literatura (ICH, 2005). Foram realizadas três curvas diferentes para a obtenção dos dados necessários para os cálculos. Os valores foram calculados através das Equações 4 e 5.

$$LD = \frac{3{,}3\sigma}{IC} \qquad \textbf{Equação 4}$$

$$LQ = \frac{10\sigma}{IC} \qquad \textbf{Equação 5}$$

Em que:

σ = desvio padrão do intercepto

IC = inclinação da curva analítica

6.1.4.4.7. Teste de conformidade do sistema cromatográfico

Para a verificação da conformidade do sistema cromatográfico selecionado, foram preparadas e injetadas seis soluções de ampicilina sódica SQR na concentração de 90 µg/mL. Após esta etapa, foram avaliados os seguintes parâmetros: tempo de retenção (t_R), área do pico, número de pratos (N) e os fatores de cauda (FC), de assimetria (A_S) e de retenção (k). Além disso, foram calculados e analisados os valores de DPR% para cada um deles.

Os valores de t_R e área do pico cromatográfico foram fornecidos pelo software do equipamento de CLAE utilizado.

O número de pratos foi calculado segundo a Equação 6.

$$N = 5{,}54 \times (t_R/W_{50})^2 \qquad \textbf{Equação 6}$$

Em que:

t_R = tempo de retenção (em minutos)

W_{50} = largura do pico à meia altura

Os fatores de cauda (FC) e de assimetria (A_S) foram calculados segundo as Equações 7 e 8, respectivamente, sendo A_S calculado a 10% da altura do pico, e FC calculado a 5% desta altura. A Figura 16 mostra as medidas relacionadas ao cálculo destes parâmetros.

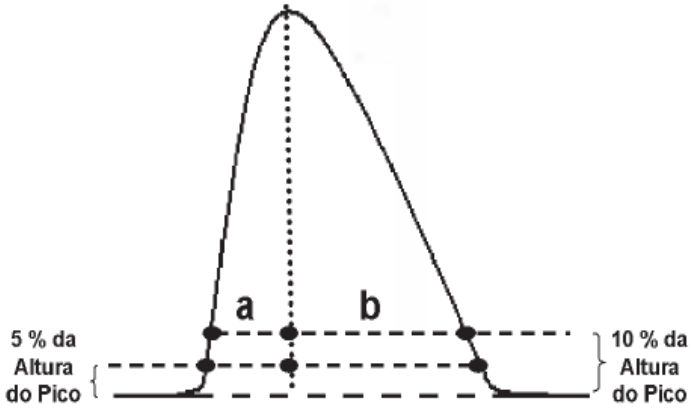
$$FC = (a + b)/2a \qquad \textbf{Equação 7}$$

$$As = b/a \qquad \textbf{Equação 8}$$

Em que:

a e b = distâncias entre o sinal máximo do pico até as linhas verticais e perpendiculares à linha de base que interceptam o traço a 5% (para o cálculo do FC) ou 10% (para o cálculo de A_S) de sua altura (Figura 16).

Figura 16- Medidas relacionadas à determinação dos fatores de cauda (FC) e assimetria do pico cromatográfico (A_S), calculados pelas Equações 2 e 3.



Fonte: PASCHOAL et al., 2008.

O fator de capacidade (k), por sua vez, foi calculado através da Equação 9.

$$k = \left(\frac{t_R - t_0}{t_0}\right) \qquad \textbf{Equação 9}$$

Em que:

t_R = tempo de retenção

t_0 = tempo de retenção do composto não-retido

Obs: as equações foram baseadas em informações das seguintes fontes: COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006 e PASCHOAL et al., 2008.

6.1.5. Resultados

6.1.5.1. Ensaios preliminares

Entre todas as combinações dos parâmetros cromatográficos citados na Tabela 9, algumas observações podem ser realizadas:

- Com a utilização da coluna Waters Symmetry C_{18} (250 x 4,6 mm; 5 µm), a pressão de trabalho ficou próxima à do limite superior do equipamento (4000 psi) quando misturas de etanol e água foram testadas, em qualquer vazão, inviabilizando o seu uso.
- O uso da coluna analítica Agilent Zorbax C_{18} (150 x 4,6 mm; 5 µm) não apresentou problemas quanto à pressão de trabalho, que se manteve

seguramente distante do limite máximo do equipamento em todas as vazões testadas.

- Vazão de 1,0 mL/min na coluna Agilent Zorbax fez com que os tempos de retenção ficassem abaixo de 1 minuto para todas as fases móveis testadas, tornando o seu uso inadequado.
- As três fases móveis testadas apresentaram picos simétricos na coluna analítica Agilent Zorbax C_{18}, com vazão de 0,5 mL/min. No entanto, os tempos de retenção foram diferentes para cada fase móvel, como o descrito a seguir:
    - Etanol : Água (50:50, v/v): aproximadamente 2,4 minutos.
    - Etanol : Água (40:60, v/v): aproximadamente 3,1 minutos.
    - Etanol : Água (30:70, v/v): aproximadamente 3,8 minutos.

A Figura 17 apresenta o cromatograma típico obtido pelo método proposto, utilizando a coluna analítica Agilent Zorbax C_{18} (150 x 4,6 mm; 5 µm), vazão de 0,5 mL/min e fase móvel constituída por etanol e água na proporção de 40:60 (v/v). A Figura 18 mostra a sobreposição dos cromatogramas de soluções aquosas de 90 µg/mL de ampicilina sódica SQR e na forma farmacêutica de pó para solução injetável.

Figura 17- Cromatograma de ampicilina sódica SQR (90 µg/mL) obtido pelo método cromatográfico proposto. Fase móvel: etanol : água (40:60, v/v). Fase estacionária: Agilent Zorbax C_{18} (150 x 4,6 mm; 5 µm).

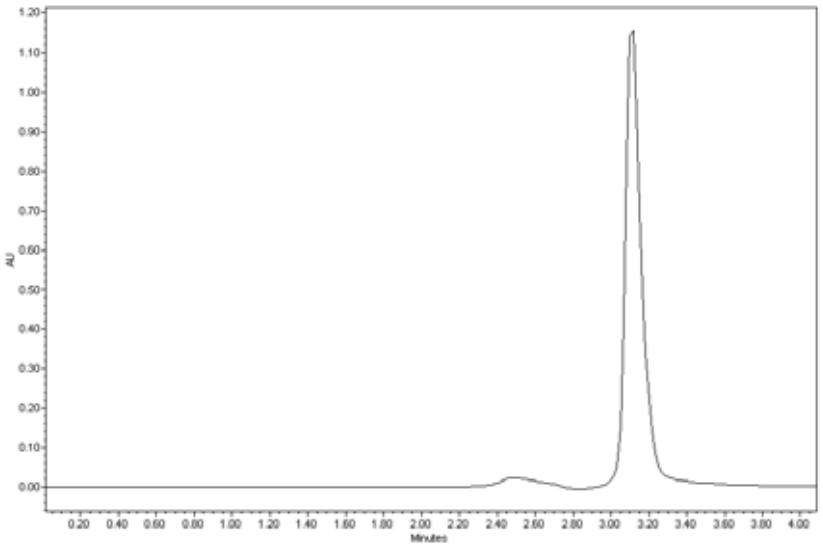
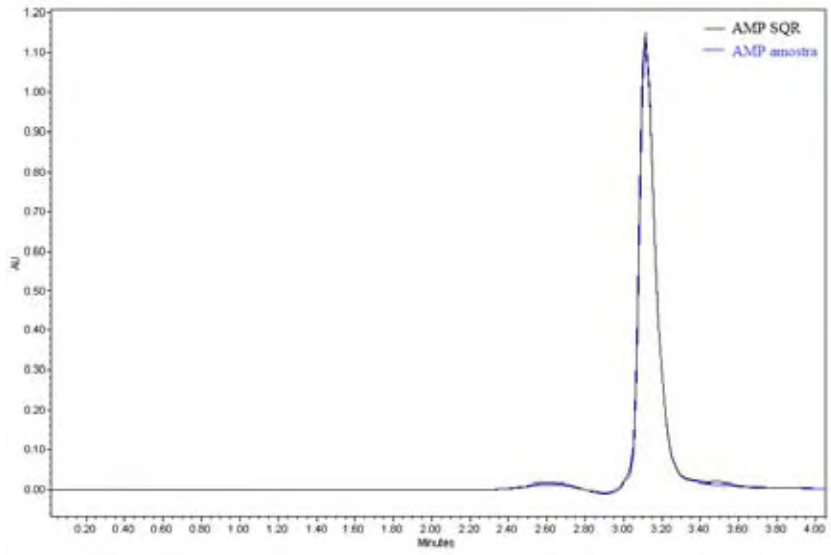


Figura 18- Sobreposição de cromatogramas de ampicilina sódica SQR e em pó para solução injetável, nas mesmas concentrações (90 µg/mL). Fase móvel: etanol : água (40:60, v/v). Fase estacionária: Agilent Zorbax C_{18} (150 x 4,6 mm; 5 µm). AMP: ampicilina sódica.



6.1.5.2. Validação do método analítico

6.1.5.2.1. Linearidade

Os valores das áreas obtidas para a curva analítica de ampicilina sódica SQR estão apresentados na Tabela 12.

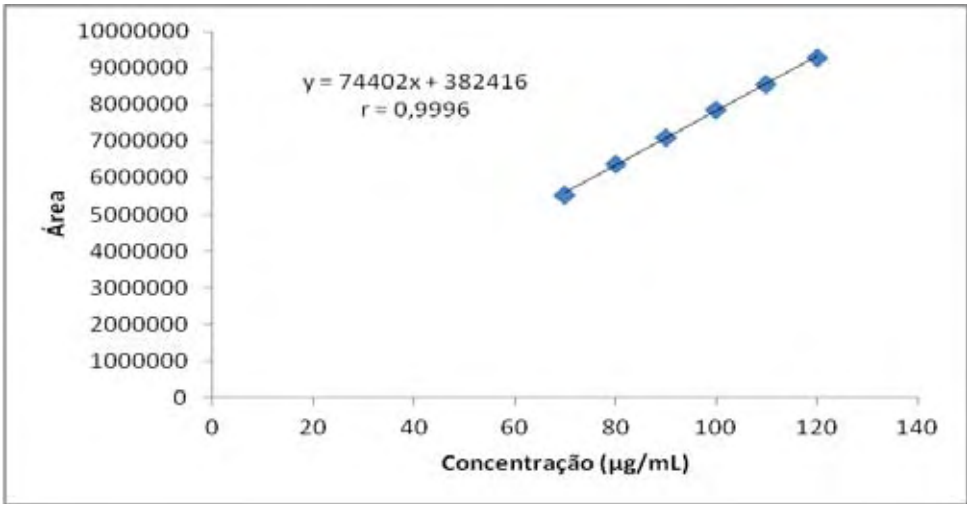
Tabela 12- Valores das áreas referentes ao pico de ampicilina sódica SRQ para a construção da curva analítica de CLAE

Concentração (µg/mL)	**Áreas[1] (AU)**	**Área média ± e.p.m.[2]**	**DPR[3] (%)**
70	5538756 5484302 5589774	5537611 ± 30452,43	0,95
80	6283548 6463920 6345967	6364478 ± 52885,187	1,44
90	7057666 7159669 7121864	7113066 ± 29772,41	0,72
100	7797528 7823268 7930539	7850445 ± 40730,44	0,90
110	8500265 8492330 8666973	8553189 ± 56937,71	1,15
120	9188972 9291749 9374510	9285077 ± 53664,00	1,00

[1] Valor médio de três determinações
[2] e.p.m.: erro padrão da média
[3] DPR: desvio padrão relativo

Cada valor médio das áreas absolutas obtidas na determinação da curva analítica foi disposto em um gráfico em relação à sua respectiva concentração, conforme ilustrado na Figura 19.

Figura 19- Curva analítica de ampicilina sódica SQR obtida pelo método cromatográfico. Fase móvel: etanol : água (40:60, v/v). Fase estacionária: Agilent Zorbax C_{18} (150 x 4,6 mm; 5 µm).



A ANOVA calculada para os dados da curva analítica de ampicilina sódica SQR está apresentada na Tabela 13.

Tabela 13- Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva analítica de ampicilina sódica SQR, utilizando o método por CLAE

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Variância	F calculado	F tabelado
Entre concentrações	5	29082003418783	5816400683756	938,79*	3,11
Regressão linear	1	29082003418783	29082003418783	4693,94*	4,75
Desvio da linearidade	4	0,00003	0,0000075	0,00000	2,96
Resíduo	12	74347719735,6	6195643311		
Total	17	29156351138519			

*Significativo para $p < 0,05$

6.1.5.2.2. Precisão

A precisão do método foi avaliada em três parâmetros: intradia, interdias e entre-analistas. Os resultados foram expressos com base nos valores de DPR percentuais. A

precisão intradia forneceu um valor de DPR de 0,75%. Os valores percentuais de DPR apresentados pelos parâmetros interdias e entre-analistas estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14- Determinação da precisão interdias e entre-analistas do método para ampicilina sódica por CLAE

Interdias					Entre-analistas			
Amostra	**Dia**	**Teor[1] (g/frasco)**	**Teor[1] (%)**	**DPR[2] (%)**	**Analista**	**Teor[1] (g/frasco)**	**Teor[1] (%)**	**DPR[2] (%)**
1	1	0,980	97,98	1,22	1	0,980	97,98	0,72
	2	0,969	96,88		2	0,990	98,98	
	3	0,956	95,62					

[1] média de três determinações
[2] DPR = desvio padrão relativo

6.1.5.2.3. Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo ensaio de recuperação, o qual foi realizado em três níveis de concentração e os resultados estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15- Determinação da exatidão do método analítico para análise de ampicilina sódica por CLAE

	Ampicilina sódica SQR adicionada (µg/mL)	**Ampicilina sódica SQR encontrada[1] (µg/mL)**	**Recuperação (%)**	**DPR[2] (%)**	**Recuperação média (%)**
R1	10,0	10,08	100,78	1,68	99,54
R2	30,0	29,60	98,67	0,96	
R3	50,0	49,59	99,17	1,80	

[1] média de três determinações
[2] DPR = desvio padrão relativo (dentro de cada nível de recuperação)

6.1.5.2.4. Robustez

A robustez foi avaliada por meio de pequenas modificações, individuais, nos seguintes parâmetros do método: quantidade de etanol na fase móvel, comprimento de onda no detector

UV-Vis, vazão, marca da coluna e marca do etanol. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16- Parâmetros da avaliação da robustez do método analítico para análise de ampicilina sódica por CLAE

Variável	**Faixa investigada**	**Ampicilina sódica (g/frasco)**	**Ampicilina sódica (%)**	**DPR[1] (%)**
Etanol (%)	37	0,941	94,06	1,85
	40	0,956	95,62	
	43	0,976	97,59	
Comprimento de onda (nm)	208	0,991	99,09	1,77
	210	0,969	96,88	
	212	1,003	100,33	
Vazão (mL/min)	0,45	0,967	96,70	1,37
	0,50	0,976	97,61	
	0,55	0,993	99,34	
Marca da coluna	Agilent	1,007	100,70	0,44
	Phenomenex	1,001	100,08	
Marca do etanol	J. T. Baker	0,980	97,98	1,20
	Tedia	0,997	99,66	

[1] DPR = desvio padrão relativo

6.1.5.2.5. Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram calculados para determinar a sensibilidade do método. O valor calculado para o limite de detecção foi de 4,76 µg/mL e o limite de quantificação foi de 14,41 µg/mL.

6.1.5.2.6. Seletividade e estudos de degradação forçada

O estudo da degradação forçada da amostra de ampicilina sódica em pó para solução injetável foi realizado para verificar as propriedades indicadoras de estabilidade do método proposto. Em todas as condições de estresse pelas quais a amostra foi submetida, houve decréscimo do pico da ampicilina sódica e a formação de novos picos nos cromatogramas. A amostra foi mais estável em condição fotolítica e apresentou maior degradação em condição alcalina.

A Tabela 17 apresenta os dados obtidos no estudo de degradação forçada da amostra. As Figuras 20, 21, 22 e 23 apresentam os cromatogramas obtidos com as degradações ácida, alcalina, fotolítica e neutra, respectivamente.

Tabela 17- Resultados obtidos no estudo de degradação forçada da amostra de ampicilina sódica em pó para solução injetável para avaliação da seletividade do método de CLAE

Degradação	**Área remanescente do pico principal de ampicilina sódica**	**Tempos de retenção dos novos picos**
Ácida	**48 horas:** 12,43%	**48 horas:** 2,50; 4,60 e 5,83 minutos
Alcalina	**48 horas:** 0,00% (desaparecimento do pico principal)	**48 horas:** 2,51; 3,60 e 5,81 minutos
Fotolítica	**24 horas:** 96,79% **48 horas:** 91,88%	**24 e 48 horas:** 2,31 minutos
Neutra	**24 horas:** 47,93% **48 horas:** 27,44%	**24 e 48 horas:** 2,40; 2,75; 3,59 e 5,71 minutos

Figura 20- Cromatograma da amostra de ampicilina sódica em pó para solução injetável (90 µg/mL) submetida à degradação em meio ácido (HCl 0,001 *M*) após 48 horas a 60 ºC. Fase móvel: etanol : água (40:60, v/v). Fase estacionária: Agilent Zorbax C_{18} (150 x 4,6 mm; 5 µm). AMP: ampicilina sódica. DEG: produto de degradação.

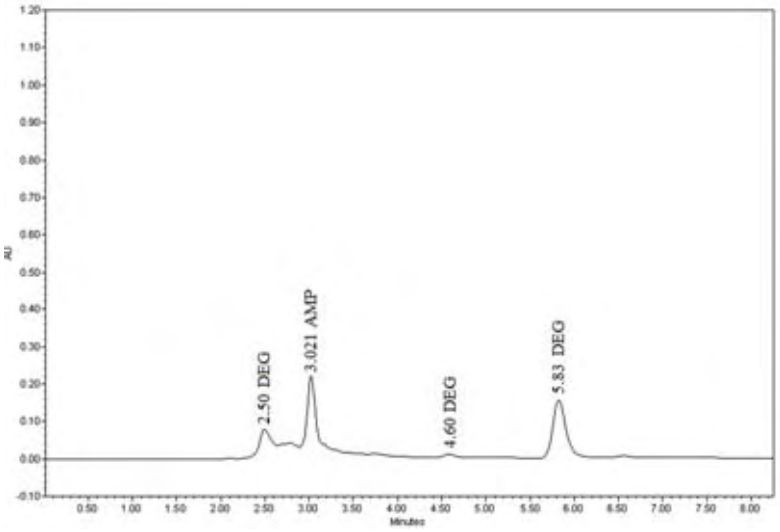


Figura 21- Cromatograma da amostra de ampicilina sódica em pó para solução injetável (90 µg/mL) submetida à degradação em meio básico (NaOH 0,001 *M*) após 48 horas a 60 ºC. Fase móvel: etanol : água (40:60, v/v). Fase estacionária: Agilent Zorbax C_{18} (150 x 4,6 mm; 5 µm). AMP: ampicilina sódica. DEG: produto de degradação.

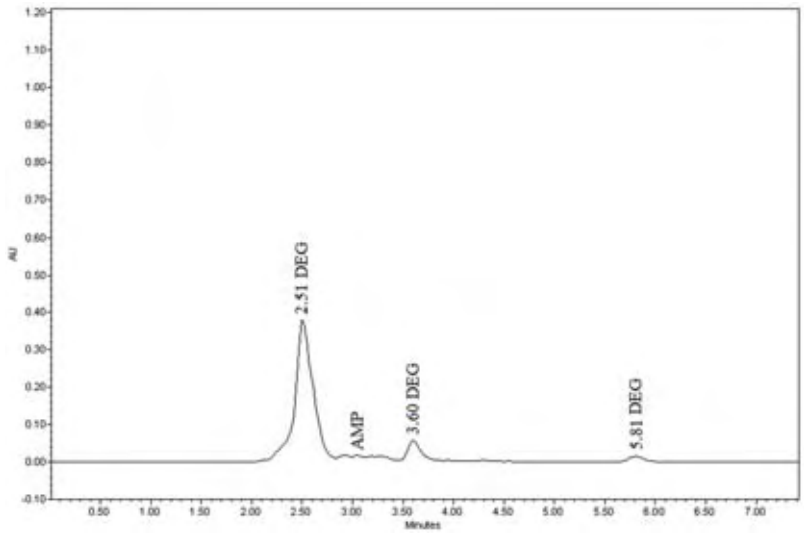


Figura 22- Cromatograma da amostra de ampicilina sódica em pó para solução injetável (90 µg/mL) submetida à degradação na luz ultravioleta após 24 e 48 horas. Fase móvel: etanol : água (40:60, v/v). Fase estacionária: Agilent Zorbax C_{18} (150 x 4,6 mm; 5 µm). AMP: ampicilina sódica. DEG: produto de degradação.

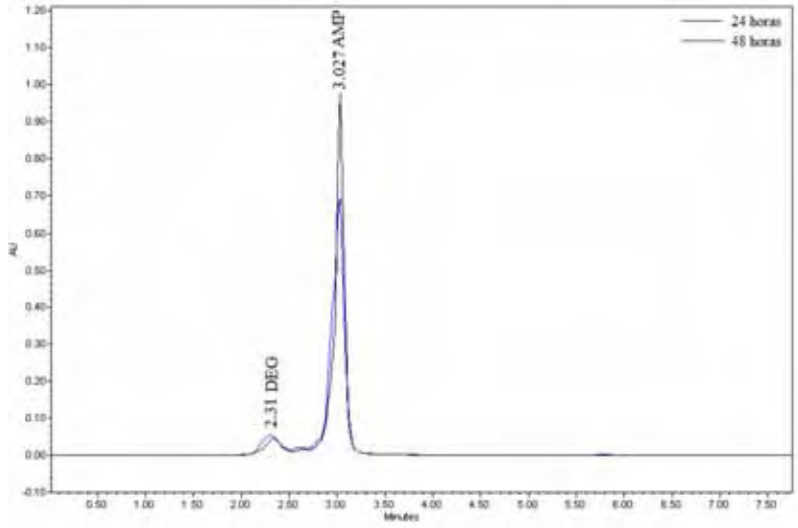
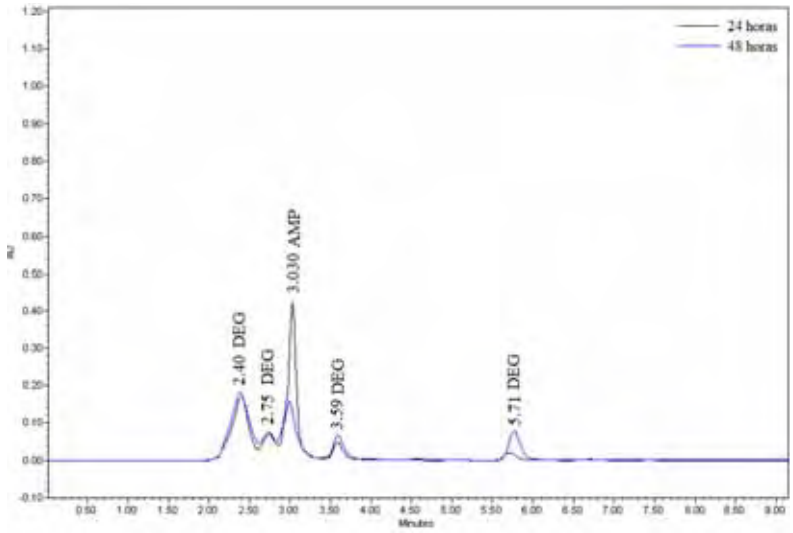


Figura 23- Cromatograma da amostra de ampicilina sódica em pó para solução injetável (90 µg/mL) submetida à degradação em meio neutro (água) após 24 e 48 horas a 60 ºC. Fase móvel: etanol : água (40:60, v/v). Fase estacionária: Agilent Zorbax C_{18} (150 x 4,6 mm; 5 µm). AMP: ampicilina sódica. DEG: produto de degradação.



6.1.5.2.7. Teste de conformidade do sistema cromatográfico

Para a verificação da conformidade do sistema cromatográfico, foram analisados os seguintes parâmetros: tempo de retenção (t_r), área do pico, número de pratos (N) e os fatores de cauda (FC), de assimetria (A_S) e de capacidade (k). Os dados obtidos estão descritos na Tabela 18.

Tabela 18- Análise de conformidade do sistema cromatográfico desenvolvido para análise de ampicilina sódica por CLAE

	Parâmetros avaliados					
	Fator de assimetria	**Fator de cauda**	**Número de Pratos**	**Tempo de retenção**	**Fator de capacidade**	**Área**
	1,20	0,88	6737,53	3,123	2,123	7328217
	1,18	0,86	6724,59	3,120	2,120	7195403
	1,20	0,88	6620,35	3,119	2,119	7193957
	1,20	0,88	6694,45	3,113	2,113	7307687
	1,20	0,88	6737,53	3,123	2,123	7330245
	1,20	0,88	6728,91	3,121	2,121	7337749
Média	1,20	0,88	6707,23	3,120	2,120	7282210
DPR[1]%	0,68	0,93	0,68	0,12	0,175	0,94

[1] DPR: desvio padrão relativo

6.1.6. Discussão

A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) vem contribuindo de maneira significativa com a análise de medicamentos, sendo muito empregada pela indústria farmacêutica na quantificação de fármacos em formulações farmacêuticas. A técnica de CLAE possui grande poder de resolução, alta velocidade de separação, capacidade de medição quantitativa exata e ainda permite análises repetitivas e reprodutivas com a mesma coluna (JEFFERY et al., 1992). Estes motivos contribuem para esta técnica ocupar lugar de destaque dentre os métodos instrumentais de análise.

Existem vários detectores utilizados para separações em CLAE, no entanto, um dos mais utilizados é o detector de ultravioleta. Este é capaz de monitorar a estabilidade de fármacos e formulações farmacêuticas, detectando seus produtos de degradação.

A CLAE é descrita em algumas referências farmacopeicas e também em trabalhos publicados em periódicos nacionais e internacionais para a análise de ampicilina em formulações farmacêuticas, cosméticos, fluidos biológicos, alimentos e no meio aquático, como o descrito no item 6.1.1. No entanto, a maioria das fases móveis sugeridas na literatura envolve a utilização de soluções-tampão em sua composição, o que se configura em uma desvantagem do método, pois os sais que compõem estas soluções tendem a adsorverem-se na coluna analítica, podendo causar entupimentos e diminuindo sua vida útil. Por tal motivo, a utilização de tampões em fases móveis demandam longas lavagens da coluna e de todo sistema cromatográfico para sua remoção.

Durante os ensaios preliminares, foram testadas diferentes condições cromatográficas, tais como a dimensão e a marca da coluna analítica, a fase móvel e a vazão. A coluna analítica Waters Symmetry C_{18} (250 x 4,6 mm; 5 µm) não apresentou resultados satisfatórios, visto que com esta coluna, a pressão de trabalho ficou próxima à do limite superior do equipamento, provavelmente devido à alta viscosidade da fase móvel, constituída por uma mistura de etanol e água. Por tal motivo, optou-se pela coluna analítica Agilent Zorbax C_{18} (250 x 4,6 mm; 5 µm), a qual não apresentou este tipo de problema e se mostrou adequada para as análises.

Quanto à fase móvel, optou-se por não se utilizar soluções-tampão em sua constituição. Desta forma, a fase móvel escolhida foi formada por etanol e água (40:60, v/v). Este fato se configura em uma excelente otimização do método, pois com esta fase móvel minimiza-se os possíveis danos à coluna cromatográfica que a presença de tampões poderia causar. Ao mesmo tempo, torna desnecessária longas lavagens da coluna para a remoção dos sais que compõem essas soluções. A proporção de etanol e água na fase móvel foi escolhida considerando o melhor desempenho desta mistura em cálculos de conformidade do sistema cromatográfico em relação às outras proporções testadas. Pelo mesmo motivo optou-se pela vazão de 0,5 mL/min.

A fase móvel escolhida ainda possui outra vantagem em relação às fases móveis sugeridas pela literatura, que é o fato de utilizar etanol em sua composição no lugar dos solventes mais comumente empregados, tais como o metanol e a acetonitrila. O etanol possui muitas vantagens em relação aos outros solventes, pelo fato de ser menos tóxico para os operadores, de fácil descarte e ainda possuir custo reduzido (RIBEIRO et al., 2004).

O uso de etanol e água como sistema solvente, há algum tempo atrás, não era muito comum por alguns motivos, entre eles, o fato de aumentar a viscosidade do sistema e, consequentemente, a pressão de trabalho. No entanto, os equipamentos modernos suportam

pressões muito mais altas, o que torna viável o uso de etanol na composição de fases móveis (RIBEIRO et al., 2004). Além disso, estudos mostram que misturas de etanol e água apresentam boas propriedades cromatográficas quando usadas com colunas de fase reversa C_8 e C_{18} (MIYABE, TAKEUCHI, TEZUCA, 1999; RIBEIRO et al., 1999; RIBEIRO et al., 2004). Outro motivo pelo qual o etanol é um solvente pouco utilizado em métodos cromatográficos é o fato de que em alguns países, como por exemplo, os Estados Unidos, onde muitos métodos são desenvolvidos, há um rígido controle sobre a comercialização deste solvente (RIBEIRO et al., 2004).

Esta fase móvel também foi escolhida devido ao curto tempo de retenção do fármaco, de 3,1 minutos, aproximadamente. A tendência é que as indústrias adotem a postura de redução, prevenção ou eliminação de resíduos de processo. Desta maneira, ela minimiza a quantidade de efluentes a ser tratado, fato que pode ser uma opção economicamente vantajosa, além de reduzir os impactos de suas atividades sobre o meio ambiente (SANSEVERINO, 2000). Neste contexto, o preparo das soluções de trabalho com água ao invés de fase móvel também foi escolhido com o objetivo de minimizar o uso de solventes orgânicos.

Os testes de conformidade do sistema mostraram que os parâmetros cromatográficos escolhidos para a análise são capazes de fornecer resultados com precisão e exatidão confiáveis, visto que o número de pratos foi superior a 2000, dentro do recomendado, e os valores médios dos fatores de assimetria e de cauda estiveram abaixo do valor-limite de 2,0. Além disso, o valor médio calculado para o fator de capacidade também se mostrou apropriado, acima de 2,0. Do mesmo modo, foi verificada precisão adequada entre os valores de tempo de retenção e de área dos picos cromatográficos, cujos desvios padrão relativos percentuais (DPR%) se encontraram abaixo de 1%, que é o recomendado para testes de conformidade do sistema (FDA, 1994). O ICH (2005) não apresenta valores de referência para os parâmetros analisados, portanto os valores de referência para estes testes foram baseados naqueles sugeridos pelo FDA para a validação de métodos cromatográficos (FDA, 1994). Os outros parâmetros cromatográficos foram validados de acordo com o ICH (2005).

A linearidade do método foi constatada no intervalo de 70,0 a 120,0 µg/mL. Os valores para o intercepto e a inclinação da curva analítica foram 74402 e 382416, respectivamente, com coeficiente de correlação de 0,9996, o que mostra a adequada linearidade do método. A análise estatística (Tabela 13) mostrou que o método apresentou regressão linear significativa, visto que o valor de F calculado (4693,94) foi superior ao de F

tabelado (4,75) para este quesito. Além disso, a análise estatística também mostrou que não houve desvio significativo da linearidade, já que o F calculado (0,00) foi menor que o F tabelado (2,96). Esta análise foi realizada a um nível de significância de 5%.

O método apresentou precisão adequada, visto que os valores de DPR% para os parâmetros intradia, interdias e entre-analistas foram 0,75%, 1,22% e 0,72%, respectivamente, os quais se encontram abaixo de 2,0%. O método também mostrou exatidão apropriada, visto que apresentou valor experimental médio de recuperação de 99,54%, como mostra a Tabela 15.

O valor calculado para o limite de detecção foi de 4,76 µg/mL e para o limite de quantificação foi de 14,41 µg/mL. Estes valores indicam a capacidade do método para detectar e quantificar com confiabilidade ampicilina sódica em pó liofilizado para solução injetável. Além disso, estes valores se encontram abaixo da faixa de trabalho, o que é ideal.

A robustez foi avaliada por meio de pequenas modificações, individualmente, nos seguintes parâmetros do método: quantidade de etanol na fase móvel, comprimento de onda no detector UV-Vis, vazão, marca da coluna e marca do etanol. Os valores calculados de DPR% se mostraram abaixo de 2,0%, conforme mostrado na Tabela 16, comprovando que pode haver pequenas modificações nestes parâmetros sem influenciar de maneira expressiva a análise do fármaco.

Segundo dados da literatura, a principal rota de degradação da ampicilina é a clivagem hidrolítica do anel β-lactâmico presente na molécula, sendo que este processo é acelerado em condições extremas ácidas e básicas. A partir da clivagem hidrolítica desta estrutura, podem ser formados os ácidos peniciloico, penáldico e penílico, os quais são os principais produtos de degradação descritos para a ampicilina. Contudo, estes compostos podem sofrer degradações subsequentes, formando novos produtos de degradação (IVASHKIV, 1973; SHAKOOR, TAYLOR, 1996).

O estudo da degradação forçada da amostra de ampicilina sódica mostrou que em todas as condições de estresse pelas quais a amostra foi submetida, houve decréscimo do pico da ampicilina sódica e a formação de novos picos nos cromatogramas. A amostra foi mais estável em condição fotolítica e apresentou maior degradação em condição alcalina. Estes dados estão de acordo com a literatura, considerando que a principal rota de degradação deste fármaco é através da hidrólise, que é acelerada em condições ácidas e alcalinas. Desta forma, este estudo mostrou que o método possui adequada seletividade, visto que foi possível quantificar a ampicilina sódica mesmo na presença de seus produtos de degradação. Além

disso, este estudo demonstrou a aplicabilidade do método para a indicação de estabilidade do fármaco.

O teor médio de ampicilina sódica determinado no medicamento foi de 96,83%, o qual se encontra de acordo com as especificações farmacopeicas, de 90 a 115% (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

O método proposto cumpre todos os requisitos preconizados pela literatura para validação de métodos cromatográficos. Assim, ele é capaz de quantificar ampicilina sódica em pó liofilizado para preparações injetáveis, além de ser capaz de avaliar sua estabilidade, podendo ser uma alternativa mais prática, econômica e ambientalmente favorável para análises de rotina do controle de qualidade deste fármaco.

6.2. Ensaio microbiológico – Turbidimétrico

6.2.1. Considerações gerais

A potência de antimicrobianos é avaliada comparando-se a dose que inibe o crescimento de um micro-organismo suscetível em relação à dose de uma substância padrão do antimicrobiano que produz inibição similar. A Farmacopeia Brasileira (2010) descreve duas maneiras de se realizar a avaliação da potência dos antimicrobianos, uma pelo método de difusão em ágar e a outra pelo turbidimétrico.

O ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico se baseia na inibição do crescimento de um cultivo microbiano em solução uniforme do antimicrobiano, em um caldo que favorece o seu rápido crescimento na ausência desse fármaco (ESMERINO et al., 2004). Desta maneira, permite a determinação da potência do fármaco através da medida da turbidez causada pela inibição do crescimento do micro-organismo por este antimicrobiano.

As Farmacopeias Brasileira (2010) e Japonesa (JP, 2011) preconizam a avaliação da potência da ampicilina sódica apenas pelo ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar, que é baseado na medição do tamanho das zonas de inibição causadas pelo crescimento microbiano, em ágar nutriente. Existem também outros trabalhos na literatura que descrevem a determinação da ampicilina pelo método de difusão em ágar em diferentes matrizes, tais como formulações farmacêuticas (SHU, YAO, YANG, 1988; EJIKEME, ADEMOLA, 2010; UDOBI, UBULOM, AKPABIO, 2011) e alimentos de origem animal (WANG et al., 1999; ZHANG et al., 2004).

Buscando-se na literatura, não se encontra nenhum trabalho que tenha realizado o ensaio turbidimétrico para avaliação da ampicilina sódica na forma farmacêutica pó liofilizado para solução injetável. No entanto, há um trabalho que realizou o método turbidimétrico para ampicilina triidratada, nas formas farmacêuticas cápsula e xarope (CHAKRABARTI et al., 1981). Porém, segundo a Farmacopeia Brasileira (2010), a ampicilina triidratada possui estrutura molecular, pH e parâmetros de solubilidade diferentes que a ampicilina sódica, portanto, é interessante o desenvolvimento de um método microbiológico por turbidimetria para a ampicilina na forma sódica, em pó para solução injetável.

Este método é interessante, principalmente, pelo menor tempo de análise em relação ao método por difusão em ágar.

6.2.2. Ensaios preliminares para estabelecimento dos parâmetros analíticos

Para a quantificação de ampicilina sódica, foram realizados testes preliminares para padronizar as condições a serem utilizadas, verificando parâmetros como micro-organismo, meio de cultura, solução diluente, concentrações do inóculo e do fármaco, conforme descrito na Tabela 19.

Tabela 19- Parâmetros testados durante o desenvolvimento do ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico

Parâmetros	**Descrição**
Micro-organismos	*Bacillus subtilis* ATCC 9372 IAL 1027
	Kocuria rhizophila ATCC 9341 IAL 636
	Staphylococcus epidermidis ATCC 12228 IAL 2150
	Staphylococcus aureus ATCC 6538 IAL 1851
	Staphylococcus aureus ATCC 26923
Meios de cultura	caldo Brain Heart Infusion (BHI)
	caldo Casoy
	caldo Mueller-Hinton
Soluções diluentes	água
	solução tampão pH 6,0
	solução tampão pH 8,0
Concentrações do inóculo	4,0 %
	5,0 %
	6,0 %
	8,0 %
	10,0 %
Concentrações das soluções padrão e amostra	0,05; 0,1; 0,2 µg/mL
	1,0; 2,0; 4,0 µg/mL
	2,0; 4,0; 8,0 µg/mL
	4,0; 8,0; 16,0 µg/mL
	5,0; 10,0; 20,0 µg/mL

Após a realização dos ensaios preliminares, os parâmetros apresentados na Tabela 20 foram selecionados, por apresentarem melhor desempenho na análise.

Tabela 20- Parâmetros estabelecidos para a determinação de ampicilina sódica em pó para solução injetável pelo método turbidimétrico

Parâmetros	Descrição
Micro-organismo	*Staphylococcus aureus* ATCC 26923
Meios de cultura	caldo Casoy
Diluente	água
Concentração do inóculo	6,0%
Concentrações das soluções padrão e amostra	2,0; 4,0; 8,0 μg/mL

6.2.3. Material

Para o desenvolvimento do método turbidimétrico foram utilizadas ampicilina sódica SQR e ampicilina sódica em pó liofilizado para preparações injetáveis descritas nos itens 4.2 e 4.3, respectivamente.

Para os testes preliminares, foram usados os seguintes meios de cultura, com suas respectivas marcas: caldo BHI (Merck, Alemanha); caldo Casoy (Difco, EUA) e caldo Mueller-Hinton (Acumedia, EUA). Também foi utilizado o meio de cultura ágar Casoy (Difco, EUA) para a manutenção dos micro-organismos teste. Formaldeído grau analítico (Qhemis) foi usado para interromper o crescimento dos micro-organismos.

Os meios de cultura foram esterilizados antes do uso em autoclave vertical modelo AV (Phoenix Luferco, SP, Brasil). A incubação dos micro-organismos foi realizada em aparelho incubador Shaker modelo MA420 (Marconi, SP, Brasil) e estufa para cultura bacteriológica ECB 1.2 digital (Odontobrás, SP, Brasil). Para as leituras, utilizou-se espectrofotômetro modelo DU 530 (Beckman Coulter, CA, EUA).

O software *Microsoft Excel* (2007) foi utilizado para a construção das curvas analíticas.

Também foram usados os seguintes equipamentos: micropipetador modelo 20-200 μL (Digipet, PR, Brasil); balança analítica modelo H10 (Mettler Toledo, Suíça) e balança semi-analítica modelo B160 (Micronal, SP, Brasil).

6.2.4. Método

6.2.4.1. Preparo do meio de cultura

Todos os meios de cultura foram preparados conforme indicado pelos fabricantes em seus respectivos rótulos, sendo dissolvidos em água sob aquecimento e esterilizados em autoclave (condições: 121 ºC, 1 atm) durante 15 minutos.

6.2.4.2. Preparo do inóculo

O micro-organismo *Staphylococcus aureus* ATCC 26923 foi inoculado com auxílio de alça de platina para caldo Casoy e mantido, para o seu crescimento, em estufa microbiológica à temperatura de 35 ºC ± 2 ºC, durante as 21 horas anteriores à realização do experimento. Depois disso, o inóculo foi padronizado em espectrofotômetro a 580 nm, obtendo-se transmitância de 25% ± 2%. O meio de cultura padronizado foi preparado e utilizado imediatamente (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

6.2.4.3. Preparo da solução de ampicilina sódica SQR

Para o preparo da solução de ampicilina sódica SQR, foram pesados 20,57 mg de ampicilina SQR (o equivalente a 20,0 mg de ampicilina sódica descrita no item 4.2), transferidos para balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água, para obtenção de solução com concentração de 200 µg/mL. Alíquotas de 0,1; 0,2 e 0,4 mL desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL, para obtenção das soluções de trabalho com as concentrações de 2,0; 4,0 e 8,0 µg/mL.

6.2.4.4. Preparo da solução de ampicilina sódica amostra

Os conteúdos de vinte frascos-ampola de ampicilina sódica em pó para solução injetável (descritos no item 4.3) foram misturados. Desta mistura, foram exatamente pesados 20 mg, que foram transferidos para balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água, para obtenção de solução estoque com concentração de 200 µg/mL. Desta solução, foram transferidas alíquotas de 0,1; 0,2 e 0,4 mL para balões volumétricos de 10 mL, completando o volume com água, para obtenção das soluções de trabalho com as concentrações de 2,0; 4,0 e 8,0 µg/mL, respectivamente.

6.2.4.5. Ensaio

O preparo do inóculo foi realizado como descrito no item 6.2.4.2. Depois disso, foram distribuídos em tubos de ensaio idênticos contendo 10 mL de caldo Casoy estéril, 200 µL das soluções padrão ou amostra, descritas nos itens 6.2.4.3 e 6.2.4.4, respectivamente. Posteriormente foram adicionados 0,6 mL de caldo nutriente inoculado. Desta forma, foram utilizados 20 tubos de ensaio em retas paralelas 3 x 3, sendo três tubos para cada concentração do padrão e da amostra, um para o controle positivo (contendo caldo e o inóculo, sem adição de ampicilina sódica) e um para o controle negativo (contendo somente o caldo). Para cada concentração do padrão e da amostra foram feitas três réplicas.

Os tubos foram incubados em banho de aquecimento com agitador orbital, à temperatura de 35,0 °C ± 2,0 °C, por 4 horas. Após o período de incubação, foi interrompida a multiplicação dos micro-organismos pela adição de 0,5 mL de solução de formaldeído 12% em cada tubo. Em seguida o aparelho foi zerado pelo tubo de ensaio contendo o controle negativo e as leituras de absorvância em cada tubo foram efetuadas no comprimento de onda de 530 nm em espectrofotômetro.

Em cada ensaio, os resultados foram analisados estatisticamente e a potência foi calculada.

6.2.4.6. Obtenção da curva analítica

A curva analítica foi construída de acordo com o descrito no item 6.2.4.5, utilizando-se o delineamento 3x3, conforme o preconizado pela Farmacopeia Brasileira (2010). A reta foi construída em gráfico logarítmo da concentração versus a média das absorvâncias, com as médias das absorvâncias de cada uma das concentrações da SQR. Foram realizadas três curvas, em três dias diferentes.

6.2.4.7. Cálculo da potência de ampicilina sódica

Para o cálculo da potência do medicamento, foi realizado o procedimento descrito no item 6.2.4.5. Depois disso, a potência foi calculada através da equação de Hewitt (HEWITT, 2004), a qual está descrita pela Equação 10.

$$\text{Potência (\%)} = \text{Antilog } M \times 100$$

$$M = F/b$$

$$b = E/I$$

Equação 10

Na qual:

$$F = 1/3[(\bar{A}_1+\bar{A}_2+\bar{A}_3)-(\bar{P}_1+\bar{P}_2+\bar{P}_3)]$$

I=logatitmo da razão das doses

$$E = 1/4[(\bar{A}_3+\bar{P}_3)-(\bar{A}_1+\bar{P}_1)]$$

6.2.4.8. Validação do método

O método foi validado pela determinação dos seguintes parâmetros: linearidade, precisão, exatidão e robustez, de acordo com o preconizado pela literatura (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 33, 2010).

6.2.4.8.1. Linearidade

A curva analítica foi construída a partir da média de três curvas realizadas em três dias diferentes, conforme descrito no item 6.2.4.6. Os dados obtidos na construção da curva analítica foram analisados para obtenção da equação da reta pelo método dos mínimos quadrados e a verificação da linearidade e paralelismo foi constatada através da ANOVA.

6.2.4.8.2. Precisão

A precisão do método foi avaliada em dois quesitos: a repetibilidade e a precisão intermediária. A repetibilidade (intradia) foi estudada pela realização da leitura de 7 tubos diferentes, na mesma concentração de ampicilina sódica SQR (4,0 µg/mL), mesmo dia e mesmas condições experimentais. O valor do desvio padrão relativo percentual (DPR%) entre as determinações foi analisado. A precisão intermediária (interdias e entre analistas), por sua vez, foi avaliada através da realização de determinações da potência de ampicilina sódica na amostra de pó liofilizado para solução injetável em três dias diferentes e também por um

segundo analista, sob as mesmas condições experimentais. Os valores de DPR% entre os doseamentos foram calculados (ICH, 2005).

6.2.4.8.3. Exatidão

A exatidão do método foi realizada através do ensaio de recuperação, no qual quantidades conhecidas de ampicilina sódica SQR foram adicionadas a quantidades conhecidas de amostra (ICH, 2005). A recuperação foi realizada em três níveis, R1, R2 e R3, e as soluções foram preparadas segundo a Tabela 21, em triplicata. O restante do procedimento é igual ao descrito no item 6.2.4.5, com a única diferença sendo o preparo das soluções.

Tabela 21- Preparo das soluções para o teste de recuperação do método turbidimétrico

	Volume adicionado de amostra (200 µg/mL) (µL)	**Volume adicionado de ampicilina sódica SQR (200 µg/mL) (µL)**	**Concentração final (µg/mL)[1,2]**
Amostra	100	-	2,0
R1	100	60	3,2
R2	100	100	4,0
R3	100	140	4,8
Padrão	-	100	2,0

[1] Balão volumétrico de 10 mL
[2] Cada nível de concentração foi preparado em triplicata

A porcentagem de ampicilina sódica recuperada foi calculada pela equação da reta, seguida pela Equação 3, determinada pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2002) e descrita no item 6.1.4.4.3.

6.2.4.8.4. Robustez

Para a avaliação da robustez do método, foram variados dois parâmetros, individualmente: o tempo de incubação do inóculo (1 hora acima e abaixo do tempo de incubação de trabalho) e o comprimento de onda de leitura dos resultados em espectrofotômetro (5 unidades de comprimento de onda abaixo e acima do comprimento de

onda de trabalho) após a incubação em banho de aquecimento sob agitação. Para isso, foram realizadas determinações da potência de ampicilina sódica na amostra de pó para solução injetável nas diferentes condições propostas. As respostas obtidas foram avaliadas quanto ao DPR% entre as determinações, comparando-as com as condições normais de trabalho.

6.2.5. Resultados

6.2.5.1. Ensaios preliminares

Durante a realização dos ensaios preliminares para a padronização dos parâmetros para o ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico (Tabela 19), primeiro foram testados os micro-organismos de baixa patogenicidade, *Kocuria rhizophila*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus epidermidis*. No entanto, foi possível notar que a *Kocuria rhizophila* não apresentou crescimento uniforme nos caldos nutrientes testados, formando colônias em forma de aglomerados ao invés de turvar o meio, que era o ideal para o teste; este fato tornou inviável a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro de maneira precisa e confiável. Em relação aos micro-organismos *S. epidermidis* e *B. subtilis*, não foi verificada linearidade adequada, ou seja, não houve correlação apropriada entre as concentrações do antimicrobiano e a sua ação inibitória sobre estes micro-organismos. Além disso, as respostas obtidas com estas bactérias não foram reprodutíveis. Com isso, optou-se pelo micro-organismo *Staphylococcus aureus* ATCC 26923, o qual mostrou resultados reprodutíveis e adequada linearidade.

Quanto aos meios de cultura testados, os caldos BHI e Casoy apresentaram resultados satisfatórios e muito parecidos, quando testados com o *S. aureus*. Devido à maior disponibilidade do caldo Casoy no laboratório, este meio de cultura foi escolhido para o ensaio. Já no caldo Mueller-Hinton, o *S. aureus* apresentou crescimento lento, o que tornou o uso deste meio de cultura inadequado.

As soluções diluentes testadas, água e soluções-tampão pH 6,0 e 8,0, apresentaram resultados parecidos. Desta forma, optou-se pelo uso da água devido à praticidade de seu uso e economia do material necessário para o preparo das soluções-tampão. Dentre as várias concentrações de inóculo testadas, a concentração de 6% apresentou os melhores resultados, devido ao crescimento em quantidade adequada do micro-organismo. O mesmo ocorreu com as concentrações de ampicilina sódica na faixa de 2,0 a 8,0 µg/mL, as quais mostraram

melhor linearidade e precisão dos resultados, os quais foram confirmados com testes estatísticos.

6.2.5.2. Validação do método analítico

6.2.5.2.1. Linearidade

Os valores de absorvância obtidos durante avaliação da linearidade do método, para as soluções em diferentes concentrações de ampicilina sódica SQR e amostra, estão mostradas na Tabela 22.

Tabela 22- Valores de absorvância determinados para a construção da curva analítica de ampicilina sódica pelo método turbidimétrico

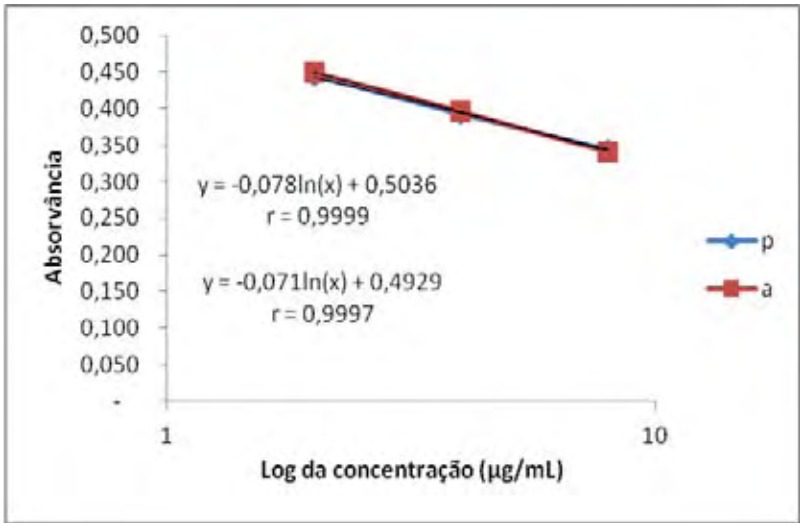
µg/mL	Absorvância[1]					
	P1 (2,0)	**P2 (4,0)**	**P3 (8,0)**	**A1 (2,0)**	**A2 (4,0)**	**A3 (8,0)**
Dia 1	0,436	0,382	0,327	0,432	0,382	0,331
Dia 2	0,443	0,401	0,353	0,447	0,406	0,351
Dia 3	0,457	0,395	0,355	0,469	0,400	0,342
Absorvância média	0,444	0,393	0,345	0,449	0,396	0,341
DPR[2](%)	4,88	2,47	4,53	4,14	3,15	2,93

[1] Média de três determinações
[2] DPR: desvio padrão relativo

As curvas analíticas de ampicilina sódica SQR e amostra (Figura 24) foram construídas com as médias dos valores das absorvâncias das três curvas analíticas obtidas durante os ensaios de linearidade e paralelismo.

As equações da reta, determinadas pelo método dos mínimos quadrados, são: $y = -0,078\ln(x) + 0,5036$, com um coeficiente de correlação (r) igual a 0,9999, para a ampicilina sódica SQR e $y = -0,073\ln(x) + 0,4956$, com r de 0,9998, para o fármaco em pó para solução injetável.

Figura 24- Representação gráfica das curvas analíticas de soluções de ampicilina sódica SQR e amostra, em concentrações de 2,0; 4,0 e 8,0 µg/mL, obtidas pelo método turbidimétrico. p: padrão. a: amostra.



A ANOVA calculada para os dados das curvas analíticas de ampicilina sódica é mostrada na Tabela 23.

Tabela 23- Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção das curvas analíticas de ampicilina sódica, utilizando o método turbidimétrico

Fontes de variação	**GL**	**SQ**	**QM**	**F_{cal}**	**F_{tab}**
Preparação	1	0,000013	0,000013	0,0683	4,96
Regressão	1	0,032137	0,032137	**175,6853***	4,96
Paralelismo	1	0,000061	0,000061	0,3321	4,96
Quadrático	1	0,000001	0,000001	0,0074	4,96
Diferença de quadrático	1	0,000006	0,000006	0,0342	4,96
Entre doses	5	0,032218	0,006444	**35,2255***	3,33
Entre tubos	2	0,000991	0,000495	2,7082	4,10
Dentro (erro)	10	0,001829	0,000183	.....	.....
Total	17	0,035038	.....	.....	.....

*Significativo para $p < 0,05$

6.2.5.2.2. Precisão

A precisão do método foi avaliada em três parâmetros: intradia, interdias e entre analistas. Os resultados foram expressos com base nos valores de DPR%. A precisão intradia (repetibilidade), na qual a concentração de 4,0 µg/mL de ampicilina sódica SQR foi repetida por 7 vezes, sob as mesmas condições experimentais, laboratório e analista, forneceu valor percentual de DPR de 3,35%. Os valores percentuais de DPR apresentados pelo parâmetro interdias estão apresentados na Tabela 24.

Tabela 24- Valores determinados da potência de ampicilina sódica em pó liofilizado para solução injetável na avaliação da precisão interdias do método turbidimétrico

Dia	Teor de ampicilina sódica		Potência média (%) ± e.p.m.[1]	DPR[2] (%)
	g/frasco	%		
1	0,9882	98,82		
2	0,9707	97,07	98,05 ± 0,52	0,91
3	0,9826	98,26		

[1] e.p.m.: erro padrão da média
[2] DPR: desvio padrão relativo

A precisão entre-analistas também foi avaliada, variando-se o analista e mantendo-se as mesmas condições experimentais e laboratório. Este parâmetro forneceu valor de DPR% de 2,92.

6.2.5.2.3. Exatidão

A exatidão do método foi determinada através do teste de recuperação. Na Tabela 25 encontram-se os valores de recuperação obtidos através da Equação 3, para cada nível de concentração testado. O valor médio de recuperação obtido foi de 100,79%.

Tabela 25- Resultados obtidos no teste de recuperação do método turbidimétrico para determinação de ampicilina sódica em pó liofilizado para solução injetável

	Ampicilina sódica SQR adicionada (µg/mL)	**Ampicilina sódica SQR encontrada (µg/mL)**	**Recuperação (%)**	**DPR[1] (%)**	**Recuperação média (%)**
R1	1,20	1,20	100,27	1,05	
R2	2,00	2,02	100,23	0,71	100,79
R3	2,80	2,82	100,88	0,69	

[1] DPR: desvio padrão relativo (dentro de cada nível de recuperação)

6.2.5.2.4. Robustez

A robustez foi avaliada, modificando-se dois parâmetros, individualmente: o comprimento de onda para leitura dos resultados e o tempo de incubação do inóculo. Os valores de potência da ampicilina sódica na forma farmacêutica obtidos após estas modificações não apresentaram diferença significativa, como mostra a Tabela 26, apresentando valores de DPR% inferiores a 3,36.

Tabela 26- Valores obtidos na avaliação da robustez do método turbidimétrico para análise de ampicilina sódica em pó para solução injetável

Variável	**Faixa investigada**	**Ampicilina sódica (g/frasco)**	**Ampicilina sódica (%)**	**DPR[1] (%)**
Tempo de incubação do inóculo (horas)	20	0,9844	98,44	0,76
	21	0,9707	97,07	
	22	0,9826	98,26	
Comprimento de onda para leitura dos resultados (nm)	525	1,0000	100,00	3,36
	530	0,9707	97,07	
	535	0,9350	93,50	

[1]DPR: desvio padrão relativo

6.2.6. Discussão

Os ensaios microbiológicos de antimicrobianos, segundo a Farmacopeia Brasileira (2010), definem a potência de um produto contendo antimicrobiano comparando-se a dose que inibe o crescimento de um micro-organismo sensível em relação à dose de uma substância de referência do fármaco que produz inibição similar.

Existem dois tipos de ensaios microbiológicos para determinação da potência de antimicrobianos: por difusão em ágar e por turbidimetria (FARMACOPEIA PORTUGUESA, 2005; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; JP, 2011). No entanto, o método turbidimétrico possui a vantagem de ser mais rápido que o primeiro, tornando-se conveniente às análises rotineiras de controle de qualidade.

O ensaio microbiológico por turbidimetria permite a determinação da potência do fármaco, através da medida da turbidez causada pela inibição do micro-organismo pelo antimicrobiano (FARMACOPEIA PORTUGUESA, 2005; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Métodos físico-químicos usados para quantificação de antimicrobianos, tais como CLAE e espectrofotometria no UV, embora sejam precisos, não são capazes de indicar a verdadeira atividade biológica do fármaco. Muitas vezes, quando se tenta correlacionar os resultados obtidos em ensaios microbiológicos com aqueles obtidos em métodos físico-químicos, os resultados podem se mostrar diferentes. Por este motivo, os ensaios microbiológicos para a determinação da potência de antimicrobianos ainda desempenham um papel essencial nos processos de fabricação e de controle de qualidade destes fármacos (MORENO, SALGADO, 2007).

Durante o desenvolvimento do método, foram testadas concentrações de antimicrobiano que variam entre 0,05 e 20,0 µg/mL. Diante disso, foram escolhidas as concentrações de 2,0; 4,0 e 8,0 µg/mL por terem apresentado a melhor correlação entre a dose e a resposta da substância em análise. Da mesma forma foi realizada a escolha do micro-organismo *Staphylococcus aureus*, já que, dentre as bactérias analisadas, foi a que apresentou melhor resposta frente à ampicilina sódica.

A quantidade de ampicilina sódica presente nas amostras de pó para solução injetável analisadas foi, em média, de 98,05%, valor que se encontra dentro do limite de 90 a 115% permitido pela Farmacopeia Brasileira (2010).

Quanto aos parâmetros de validação do método, a linearidade foi comprovada através de análise estatística (Tabela 23). Através dela, verificou-se que não existe desvio da linearidade nas curvas analíticas provenientes da substância química de referência e amostra. Esta conclusão é baseada no fato de que o parâmetro "quadrático" apresentou F calculado (0,0074) menor que F tabelado (4,96), assim como ocorreu com a "diferença de quadrático", na qual F calculado (0,0342) também apresentou valor inferior ao de F tabelado (4,96). A linearidade do método também foi demonstrada avaliando-se os coeficientes de correlação (r) de 0,9999 e 0,9996, para SQR e amostra, respectivamente, valores excelentes para um ensaio biológico. Também foi evidenciado, estatisticamente, que não existe diferença significativa na inclinação das curvas analíticas da substância química de referência e da amostra, já que o parâmetro "paralelismo" apresentou F calculado (0,3321) menor que F tabelado (4,96). Esta análise foi realizada a um nível de significância de 5%.

A precisão do método foi avaliada em três quesitos: intradia, interdias e entre-analistas. Os parâmetros interdias e entre-analistas foram realizados através da comparação das potências obtidas em diferentes dias, no caso da precisão interdias e através de diferentes analistas, para a entre-analistas. A precisão intradia foi realizada através da leitura de 7 tubos diferentes, na mesma concentração e mesmas condições experimentais. O valor de DPR% obtido na precisão interdias foi de 0,91%, na entre analistas foi 2,92% e intradia, 3,35%. Estes valores se encontram abaixo do valor estabelecido pela RE n^{o}899, de 5% (BRASIL, 2003).

A exatidão do método foi comprovada pelo teste de recuperação. Neste teste, quantidades conhecidas da substância de referência foram adicionadas à amostra para quantificação da substância. A recuperação média estimada foi de 100,79%, dado que demonstra a exatidão do método proposto.

A robustez do método foi realizada variando-se tanto o tempo de incubação do inóculo, quanto o comprimento de onda de leitura das amostras no espectrofotômetro. O método se mostrou robusto para estes dois parâmetros, pois os valores de DPR% se mostraram inferiores ao limite de 5%.

Assim sendo, o método proposto mostrou-se linear, preciso, exato e robusto, atendendo a todas as exigências para uma adequada quantificação de ampicilina sódica em pó para solução injetável, podendo ser utilizado em análises de rotina do controle de qualidade como uma alternativa ao método de difusão em ágar, encontrado na literatura (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

6.3. Espectrofotometria na região do infravermelho

6.3.1. Considerações gerais

No espectro eletromagnético, a porção situada entre as regiões do visível e das micro-ondas corresponde à radiação infravermelha. Das três regiões do infravermelho (próximo, médio e distante), a região vibracional do infravermelho médio, situada entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1}, é a mais utilizada para fins de identificação de compostos (SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2007; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; PAVIA et al., 2010). A Farmacopeia Brasileira (2010) considera a espectrofotometria no infravermelho médio como um ensaio de identificação por excelência, visto que é capaz de distinguir substâncias com diferenças estruturais.

A espectroscopia no infravermelho se baseia no fato de que as ligações químicas das moléculas possuem frequências vibracionais naturais, as quais correspondem a níveis energéticos ou vibracionais da molécula. Considerando que uma molécula absorve apenas frequências selecionadas de radiação no infravermelho, serão absorvidas apenas aquelas que equivalem às suas frequências vibracionais naturais, o que provoca um aumento da amplitude dos movimentos vibracionais das ligações da mesma. No entanto, apenas as ligações que apresentam uma variação no seu momento dipolar durante esta vibração são capazes de absorver radiação na região do infravermelho. Desta maneira, a frequência das vibrações pode ser associada a um determinado tipo de banda (PAVIA et al., 2010).

O espectro no infravermelho de uma amostra pode ser obtido submetendo-a a um feixe de luz infravermelha. Através do exame da luz transmitida é possível verificar quanta energia foi absorvida em cada comprimento de onda. Este processo pode ser realizado por meio de um espectrômetro de infravermelho por dispersão, no qual a amostra é submetida a um feixe monocromático, que tem sua frequência variada com o tempo para obter-se os dados. Também se pode usar um espectrômetro de transformada de Fourier, o qual mede todos os comprimentos de onda de uma só vez. Este último é o mais utilizado nos últimos tempos e possui a vantagem de ser mais rápido e mais sensível que o primeiro (JEFFERY et al., 1992; SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2007; PAVIA et al., 2010).

É uma técnica que apresenta muitas vantagens em relação a outros métodos físico-químicos, pois não é necessário o estágio de extração da amostra e é apropriado para fármacos com problema de solubilidade, pois podem ser preparados na forma de pó para obtenção de pastilhas de KBr, por exemplo. Desta forma, economiza-se tempo de análise e custos com

solventes e membranas (MORENO, SALGADO, 2012a). Além disso, a maior vantagem deste método é o fato de não se utilizar solventes orgânicos e, desta maneira, não gerar resíduos. Com isso, diminui-se a quantidade de efluentes gerados pelas indústrias para serem tratados, o que resulta em economia para a indústria e benefícios para o meio ambiente.

No entanto, existem poucos trabalhos na literatura que utilizam esta região do espectro eletromagnético para a quantificação de fármacos (GARRIGUES, GALLIGNANI, DE LA GUARDIA, 1993; MATKOVIC et al., 2004; FAROUK, MOUSSA, AZZAZY, 2011; SHERAZI, ALI, MAHESAR, 2011; MORENO, SALGADO, 2012a; TÓTOLI, SALGADO, 2012).

Considerando todas as vantagens que esta técnica apresenta em relação aos outros métodos descritos para a quantificação da ampicilina sódica em formulações farmacêuticas, o objetivo deste trabalho é propor um método analítico para quantificação da ampicilina sódica em pó para solução injetável por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier. Deste modo, a técnica poderá ser utilizada em análises de rotina do controle de qualidade deste fármaco como uma alternativa às existentes, contribuindo economicamente com a indústria e trazendo benefícios para o meio ambiente.

- **Outros métodos espectrofotométricos descritos na literatura para ampicilina**

Buscando-se na literatura, não se encontra nenhum método descrito para a quantificação da ampicilina utilizando a faixa do infravermelho médio do espectro eletromagnético. No entanto, existem vários trabalhos que utilizaram a espectrofotometria na região do UV, principalmente a correspondente ao visível (UV-Vis), como demonstrado na Tabela 27.

Tabela 27- Métodos de análise descritos na literatura para a determinação de ampicilina utilizando UV-Vis

Condições	Detecção	Matrizes	Referência
Reações entre a ampicilina (como doadora de elétrons) e os compostos 2,3-dicloro-5,6-diciano-*p*-benzoquinona (DDQ) e 7,7,8,8-tetraciano-quinodimetano (TCNQ) (como aceptores de elétrons), formando complexos de transferência de carga.	460 nm (complexo entre ampicilina e DDQ) 842 nm (complexo entre ampicilina e TCNQ)	Cápsula, injetável	ASKAL, SALEH, OMAR, 1991
Reação de hidrólise da ampicilina com formaldeído, em meio constituído por tampão fosfato pH 2,5.	373 nm (após diluição em ácido sulfúrico 2 *M*)	Cápsula, injetável, xarope (contendo ampicilina e cloxacilina)	AKANNI, AYIM, 1992
Reação entre a ampicilina e o reagente acetilacetona-formaldeído (pH 4,3), resultando em um produto colorido.	400 nm	Matéria prima, comprimido, cápsula, injetável, gotas pediátricas, suspensão oral	DEVANI, PATEL, PATEL, 1992
Complexos de transferência de carga formados através da reação da ampicilina com os ácidos pícrico e picrâmico (aceptores de elétrons), em pH 9,0.	437 nm (complexo entre ampicilina e ácido pícrico) 477 nm (complexo entre ampicilina e ácido picrâmico)	Matéria prima, cápsula, injetável, xarope	AMIN, MOUSTAFA, ISSA, 1994
Complexo de transferência de carga formado entre a ampicilina e a substância cloranil (aceptora de elétrons).	550 nm	Preparações farmacêuticas	AMIN, 1996
Reação de soluções aquosas de ampicilina e hematoxilina, com a formação de produto colorido.	555 nm	Preparações farmacêuticas	ELSHERIEF, 1996
Formação de complexos de transferência de carga, utilizando o composto *p*-benzoquiniona como aceptor de elétrons, para formação do complexo colorido ampicilina-*p*-benzoquinona.	472 nm	Cápsula, xarope	LI, ZHAO, TONG, 1997

Continua na próxima página

Tabela 27 (continuação)- Métodos de análise descritos na literatura para a determinação de ampicilina utilizando UV-Vis

Condições	Detecção	Matrizes	Referência
UV por derivadas, utilizando água como solvente.	268 nm	Injetável	MAHGOUB, ALY, 1998
Reação da ampicilina com iodato de potássio, ácido clorídrico e tetracloreto de carbono.	520 nm	Comprimido, cápsula	QURESHI, QAYOOM, HELALET, 1999
Formação de complexos de transferência de carga, utilizando o composto *p*-benzoquiniona como aceptor de elétrons.	472 nm	Injetável	SONG et al., 1999
Hidrólise de ampicilina com HCl 1 *M*, seguido de neutralização com NaOH 1 *M* e reação com cloreto de paládio(II), em solução tampão Britton-Robinson pH 6,0.	335 nm	Cápsula, injetável, suspensão	BELAL et al., 2000
Violeta de pirocatecol utilizado como reagente cromogênico.	604 nm	Matéria prima, cápsula, xarope, injetável	AMIN, 2001
Redução de íons de Ce(IV) com ampicilina. Depois disso, os íons Ce(III) formados foram complexados com arsenazo III.	655 nm	Preparações farmacêuticas	BUHL, SZPIKOWSKA-SROKA, 2001
Reação química entre ampicilina e periodato de potássio, em meio ácido.	520 nm	Preparações farmacêuticas	MOHAMED, 2001
Formação de complexo com o Azul da Prússia.	700 nm	Cápsula, suspensão, comprimido	FARHADI et al., 2002
Formação de complexos de transferência de carga, utilizando o composto *p*-nitrofenol como aceptor de elétrons.	-	Supositório de ampicloxacilina	GE et al., 2003
Reação entre ampicilina (e outros antimicrobianos β-lactâmicos e aminoglicosídeos) e 2,3-dicloro-5, 6-diciano-p-benzoquinona.	326, 380 e 480 nm	Matéria prima e amostras forenses	THANGADURAI, SHUKLA, ANJANEYULU, 2003
Espectrofotometria no UV com duplo comprimento de onda.	325 e 361,4 nm	Supositório de ampicloxacilina	XU, OU, 2003

Continua na próxima página

Tabela 27 (continuação)- Métodos de análise descritos na literatura para a determinação de ampicilina utilizando UV-Vis

Condições	Detecção	Matrizes	Referência
O reagente de fenol segundo Folin-Ciocalteou foi usado para reagir com a ampicilina, com a formação de produto colorido.	750 nm	Matéria prima, injetável e cápsula	AHMAD, RAHMAN, ISLAM, 2004
Reação entre 1,2-naftoquinona-4-sulfônico de sódio e ampicilina sódica em solução tampão pH 9,0.	463 nm	Injetável	XU, WANG, XIAO, 2004
Hematoxilina foi utilizada como agente cromogênico na reação com a ampicilina, em meio metanólico. Água foi utilizada como solvente.	585 nm	Comprimido	RAGHAVENDRA, SURYANARAYANA, 2010
Reagente Folin-Ciocalteou foi utilizado na reação com a ampicilina.	740 nm	Matéria prima e formulações farmacêuticas	SINGH, MAHESHWARI, 2010
O método empregado foi UV por derivadas. As soluções de trabalho foram preparadas em solução de NaOH 0,1 *N*.	222,2 nm	Comprimido (contendo ampicilina e probenecida)	KURIAN, KURIEN, 2011
Reação com ninidrina e molibdato de sódio.	570 nm	Formulações farmacêuticas	NAGARAJA et al., 2011
Reações de ampicilina com NaOH 2 *M*, ácido sulfúrico 2 *M* e formaldeído contendo tampão fosfato pH 2,5.	373 nm	Suspensão (contendo ampicilina e cloxacilina)	UDOBI, UBULOM, AKPABIO, 2011
Foram utilizados dois métodos: A) método das equações simultâneas, no qual foi empregada água como solvente; B) índice de absorção, ou método Q, no qual foram utilizados dois comprimentos de onda, sendo um deles o λ_{max} da cloxacilina e o outro é o comprimento de onda no qual a ampicilina e a cloxacilina apresentam a mesma absortividade molar, utilizando também a água como solvente.	216 nm (método das equações simultâneas) 248 e 195 nm (método do índice de absorção ou método Q)	Matéria prima, cápsula (contendo ampicilina e cloxacilina)	HAPSE et al., 2012
Ninidrina foi utilizada como agente cromogênico.	564 nm	Matéria prima	ZHANG, 2012

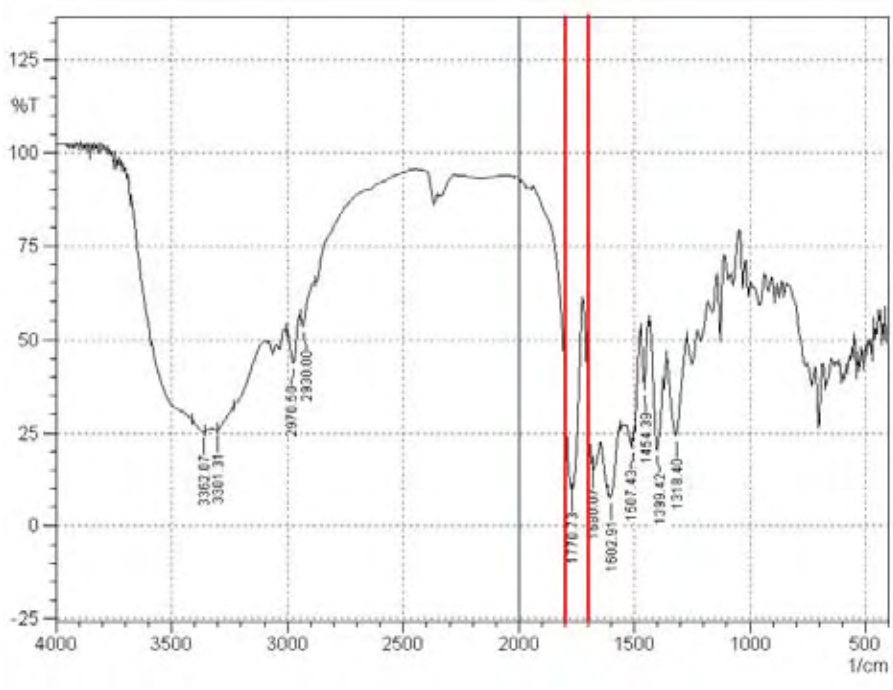
6.3.2. Material

Para a análise espectrofotométrica no infravermelho médio, foram utilizadas ampicilina sódica SQR e ampicilina sódica em pó liofilizado para preparações injetáveis descritas nos itens 4.2 e 4.3, respectivamente. O brometo de potássio (KBr) utilizado para a confecção das pastilhas foi da marca Synth (Diadema, São Paulo, Brasil), de grau analítico. Antes de sua utilização, o KBr foi dessecado a 120^{o}C até peso constante em estufa modelo 702.780 (Quimis, SP, Brasil).

O equipamento de infravermelho empregado foi Shimadzu (Kyoto, Japão), com transformada de Fourier, modelo IR Prestige-21, que permite a digitalização de espectros e a obtenção de arquivos eletrônicos das análises. A região espectral compreendida na análise foi de 4000 a 500 cm^{-1}, com intervalos de 2 cm^{-1}. Após a obtenção dos espectros e com o auxílio do software IR Solution, a análise quantitativa foi realizada na região espectral compreendida entre 1800 a 1700 cm^{-1} (Figura 25), referente à banda de uma das carbonilas da molécula de ampicilina sódica, que teve sua altura analisada em termos de absorvância.

O software *Microsoft Excel* (2007) foi utilizado para a construção da curva analítica.

Figura 25- Espectro de absorção por infravermelho da ampicilina sódica SQR com a delimitação da região espectral compreendida na análise quantitativa.



6.3.3. Método

6.3.3.1. Obtenção da curva analítica

Massas equivalentes a 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0 mg de ampicilina sódica SQR (previamente diluída em brometo de potássio a 1:10, p/p) foram tomadas e diluídas em quantidades suficientes de brometo de potássio para a obtenção de pastilhas para leitura com massa total de 150 mg. Os pós foram misturados e moídos até a obtenção de uma mistura homogênea. Assim, esta mistura foi comprimida em uma prensa mecânica por 15 minutos para formar pastilhas translúcidas, através das quais o feixe do espectrômetro pode passar.

6.3.3.2. Determinação de ampicilina sódica no medicamento

6.3.3.2.1. Preparo das pastilhas de ampicilina sódica SQR

Foram tomadas massas de pó equivalentes a 2,0 mg de ampicilina sódica (20,0 mg da diluição 1:10 em KBr) e devidamente homogeneizadas com 130 mg de brometo de potássio, perfazendo massa total da pastilha de 150 mg. As determinações foram realizadas em triplicata e as leituras em absorvância.

6.3.3.2.2. Preparo das pastilhas de ampicilina sódica amostra

Os conteúdos de vinte frascos-ampola de ampicilina sódica em pó para solução injetável foram misturados. Desta mistura, foram tomadas massas de pó equivalentes a 2,0 mg de ampicilina sódica (20,0 mg da diluição 1:10 em KBr) e devidamente homogeneizadas com 130 mg de brometo de potássio, perfazendo massa total da pastilha de 150 mg. As determinações foram realizadas em triplicata e as leituras em absorvância.

6.3.3.2.3. Cálculo do teor de ampicilina sódica na amostra

A concentração de ampicilina sódica na amostra foi calculada pela Equação 1 e o seu teor percentual foi calculado pela Equação 2, ambas descritas no item 6.1.4.3.3. Obs: neste caso, a unidade usada foi mg/150 mg (ou mg/pastilha), ao invés de µg/mL, como descrito no item mencionado.

6.3.3.3. Validação do método

O método foi validado pela determinação dos seguintes parâmetros: linearidade, precisão, exatidão, robustez e limites de detecção e quantificação, de acordo com o preconizado pela literatura (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 33, 2010).

6.3.3.3.1. Linearidade

Para verificar a linearidade do método, foram utilizadas cinco concentrações de ampicilina sódica SQR (1,0 – 3,0 mg/pastilha), que foram avaliadas em três dias diferentes. A linearidade foi avaliada por meio do cálculo da regressão linear através dos mínimos quadrados e a avaliação estatística foi feita pela ANOVA.

6.3.3.3.2. Precisão

A precisão do método foi avaliada em dois quesitos: a repetibilidade (intradia) e a precisão intermediária (interdias e entre analistas). A repetibilidade foi estudada pela realização da análise de 7 pastilhas de ampicilina sódica SQR na concentração de 2 mg/150 mg, no mesmo dia e em condições de trabalho idênticas. O valor do desvio padrão relativo percentual (DPR%) entre as determinações foi analisado. A precisão intermediária, por sua vez, foi avaliada através da realização de doseamentos de ampicilina sódica na amostra de pó liofilizado para solução injetável em três dias diferentes e também por um segundo analista, sob as mesmas condições experimentais. Os valores de DPR% entre os teores obtidos foram calculados (ICH, 2005).

6.3.3.3.3. Exatidão

A exatidão do método foi realizada através do ensaio de recuperação, no qual quantidade conhecida de ampicilina sódica SQR foi adicionada à quantidade conhecida de amostra (ICH, 2005). A recuperação foi realizada em três níveis, R1, R2 e R3, e as soluções foram preparadas segundo a Tabela 28, em triplicata.

Tabela 28- Preparo das pastilhas para o teste de recuperação do método de espectrometria por infravermelho para ampicilina sódica

	Ampicilina sódica amostra (mg) (diluição 1:10, p/p em KBr)	**Ampicilina sódica SQR (mg) (diluição 1:10, p/p em KBr)**	**Quantidade de brometo de potássio[1] (mg)**	**Concentração teórica final (mg/pastilha)**
Amostra	10,0	-	140,0	1,0
R1	10,0	6,0	134,0	1,6
R2	10,0	10,0	130,0	2,0
R3	10,0	14,0	126,0	2,4
Padrão	-	10,0	140,0	1,0

[1] Quantidade suficiente para o preparo de pastilhas com massa total de 150 mg

A porcentagem de recuperação (R%) foi calculada através da Equação 3, determinada pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2002) e descrita no item 6.1.4.4.3. Obs: a unidade neste caso será em mg/150 mg ao invés de µg/mL, como descrito na equação mencionada.

6.3.3.3.4. Robustez

A robustez do método foi avaliada com o propósito de mostrar a confiabilidade da análise com relação a pequenas variações em seus parâmetros de trabalho, ou seja, mostrar que a validade do método é mantida mesmo com pequenas variações das suas condições de trabalho. Os seguintes parâmetros foram variados individualmente: massa total da pastilha (2 mg acima e abaixo do peso total das pastilhas de trabalho), marca do brometo de potássio (Shimadzu) e tempo de compressão das pastilhas (5 minutos abaixo e acima do tempo de compressão de trabalho). As respostas obtidas foram avaliadas quanto ao DPR% entre os doseamentos.

6.3.3.3.5. Limites de detecção e de quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram calculados através das Equações 4 e 5, respectivamente, descritas no item 6.1.4.4.6, com base no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva (ICH, 2005).

6.3.4. Resultados

6.3.4.1. Linearidade

Os valores das absorvâncias obtidas para a curva analítica de ampicilina sódica SQR estão demonstrados na Tabela 29.

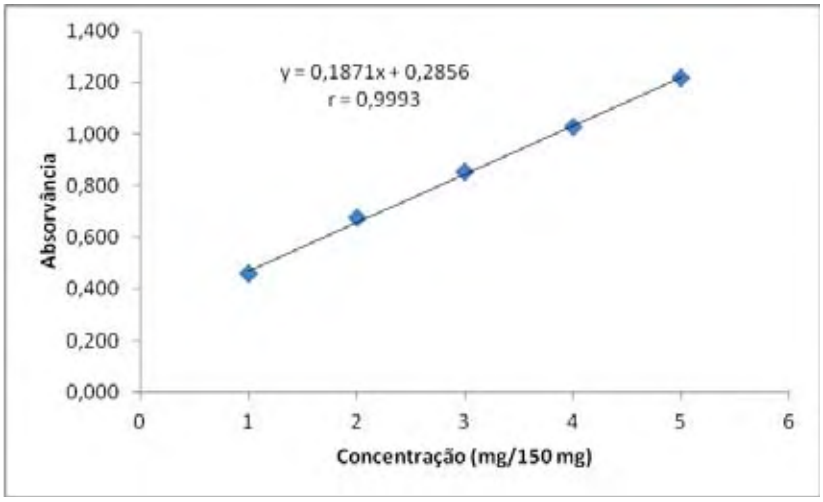
Tabela 29- Valores das absorvâncias referentes à ampicilina sódica SRQ para a construção da curva analítica através do método de espectrofotometria na região do infravermelho

Concentração (mg/150 mg)	**Absorvância**[1]	**Absorvância média ± e.p.m.**[2]	**DPR**[3] **(%)**
1,0	0,465 0,463 0,451	0,460 ± 0,0045	1,69
1,5	0,673 0,680 0,674	0,675 ± 0,0023	0,59
2,0	0,861 0,871 0,826	0,852 ± 0,0137	2,80
2,5	1,051 1,009 1,025	1,028 ± 0,0120	2,03
3,0	1,244 1,228 1,183	1,219 ± 0,0182	2,60

[1] Valor médio de três determinações
[2] e.p.m.: erro padrão da média
[3] DPR: desvio padrão relativo

A curva de analítica para ampicilina sódica SRQ foi construída através da disposição do valor médio das absorvâncias em relação às suas respectivas concentrações, como representado na Figura 26.

Figura 26- Representação gráfica da curva analítica de ampicilina sódica pelo método espectrofotométrico na região do infravermelho.



A ANOVA calculada para os dados da curva analítica de ampicilina sódica SQR está apresentada na Tabela 30.

Tabela 30- Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção da curva analítica de ampicilina sódica SQR, utilizando o método de espectrofotometria na região do infravermelho

Fontes de variação	**Graus de liberdade**	**Soma de quadrados**	**Variância**	**F calculado**	**F tabelado**
Entre concentrações	4	1,0514E+00	2,6285E-01	**632,37***	3,48
Regressão linear	1	1,0499E+00	1,0499E+00	**2525,96***	4,96
Desvio da linearidade	3	1,4574E-03	4,8581E-04	1,17	3,71
Resíduo	10	4,1566E-03	4,1566E-04	.....	.....
Total	14	1,0556E+00	.....	.....	.....

*Significativo para $p < 0,05$

6.3.4.2. Precisão

A precisão do método foi avaliada em três parâmetros: intradia, ou repetibilidade; interdias, ou intermediária; e entre analistas. Os resultados foram expressos com base nos valores de DPR%. A precisão intradia forneceu um valor de DPR% de 1,70%. Os valores de DPR% apresentados pelos parâmetros interdias e entre analistas estão apresentados na Tabela 31.

Tabela 31- Determinação da precisão interdias e entre analistas do método de espectrofotometria na região do infravermelho

Interdias					**Entre-analistas**			
Amostra	**Dia**	**Teor[1] (g/frasco)**	**Teor[1] (%)**	**DPR[2] (%)**	**Analista**	**Teor[1] (g/frasco)**	**Teor[1] (%)**	**DPR[2] (%)**
1	1	0,984	98,44	1,29	1	0,960	96,01	2,47
	2	0,960	96,01		2	0,927	92,71	
	3	0,968	96,75					

[1] média de três determinações
[2] DPR = desvio padrão relativo

6.3.4.3. Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo ensaio de recuperação, o qual foi realizado em três níveis de concentração e os resultados estão apresentados na Tabela 32.

Tabela 32- Determinação da exatidão do método analítico para análise de ampicilina sódica por espectrofotometria na região do infravermelho

	Ampicilina sódica SQR adicionada (mg)	**Ampicilina sódica SQR encontrada[1] (mg)**	**Recuperação[1] (%)**	**DPR[2] (%)**	**Recuperação média (%)**
R1	0,6	0,60	99,45	0,71	
R2	1,0	1,01	100,71	1,21	100,28
R3	1,4	1,41	100,68	1,53	

[1] média de três determinações
[2] DPR = desvio padrão relativo (dentro de cada nível de recuperação)

6.3.4.4. Robustez

A robustez foi demonstrada por meio de pequenas modificações, individualmente, nos seguintes parâmetros do método: massa total da pastilha, marca do brometo de potássio e tempo de compressão da pastilha. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 33.

Tabela 33- Parâmetros da avaliação da robustez do método analítico para análise de ampicilina sódica por espectrofotometria na região do infravermelho

Variável	Faixa investigada	Ampicilina sódica (g/frasco)	Ampicilina sódica (%)	DPR[1] (%)
Massa total da pastilha	148 mg	0,984	98,36	1,27
	150 mg	0,992	99,21	
	152 mg	0,968	96,75	
Marca do KBr	Synth	0,984	98,44	1,28
	Shimadzu	0,967	96,67	
Tempo de compressão das pastilhas	10 minutos	0,992	99,21	1,54
	15 minutos	0,974	97,40	
	20 minutos	0,962	96,22	

[1] DPR = desvio padrão relativo

6.3.4.5. Limites de detecção e de quantificação

O valor calculado para o limite de detecção foi de 0,87 µg/g e o limite de quantificação foi de 2,66 µg/g.

6.3.5. Discussão

Com o objetivo de diminuir os impactos ambientais de suas atividades sobre o meio ambiente, as indústrias devem buscar alternativas para reduzir, prevenir ou eliminar a geração de resíduos químicos em seus processos de rotina. Desta maneira, a substituição de metodologias analíticas que empreguem solventes orgânicos por outras que não os utilizem é uma medida que pode ser tomada para esta finalidade (NOLASCO, TAVARES, BENDASSOLLI, 2006). Desta forma, a espectroscopia no infravermelho médio é uma boa

opção, por se tratar de um método que não utiliza solventes orgânicos e ainda permite a quantificação de compostos.

A espectroscopia no infravermelho baseia-se no fato de que as moléculas, ao absorverem energia, sofrem uma transição para um estado de maior energia ou estado excitado, sendo que apenas transições de energia vibracional ocorrem na região do infravermelho médio. As vibrações induzidas por radiação infravermelha compreendem estiramentos e tensionamentos de ligações inter-atômicas e modificações de ângulos de ligações (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Considerando que uma molécula absorve apenas frequências selecionadas de radiação no infravermelho, serão absorvidas apenas aquelas que equivalem às suas frequências vibracionais naturais, o que provoca um aumento da amplitude dos movimentos vibracionais das suas ligações. Desta maneira, a frequência das vibrações pode ser associada a um determinado tipo de banda (PAVIA et al., 2010).

A técnica de espectroscopia na região do infravermelho apresenta outras vantagens, além do fato de não utilizar solventes orgânicos. Trata-se de uma técnica rápida, a qual requer mínimo ou nenhum pré-tratamento da amostra, fornece precisão comparável a outros métodos e ainda auxilia na detecção de falsificação e impurezas. Através desta técnica, a amostra pode ser digitalizada, em média, até 64 vezes em qualquer estado físico e em menos de um minuto, com alta resolução e precisão (FAROUK, MOUSSA, AZZAZY, 2011). Além disso, é uma técnica apropriada para fármacos com problema de solubilidade, já que podem ser preparados na forma de pastilhas (MORENO, SALGADO, 2012a).

A curva analítica para ampicilina sódica SRQ foi construída através da disposição do valor médio das absorvâncias em relação às suas respectivas concentrações, mostrando linearidade adequada na faixa entre 1,0 e 3,0 mg/pastilha. O coeficiente de correlação (r) apresentado foi de 0,9993, valor muito próximo à unidade, o que mostra a linearidade do método. Além disso, a análise estatística dos resultados (Tabela 30) demonstrou que não existe desvio de linearidade significativo, a um nível de significância de 5%, já que, para este parâmetro, o F calculado (1,17) apresentou valor inferior que o de F tabelado (3,71).

O método apresentou precisão adequada, visto que os valores de DPR% para os parâmetros intradia, interdias e entre-analistas foram 1,70%, 1,29% e 2,47%, respectivamente, os quais se encontram abaixo dos 5,0% recomendados pela RDC n^{o} 899 de 2003 (BRASIL, 2003). O método também mostrou exatidão apropriada, uma vez que apresentou valor experimental médio de recuperação de 100,28%, como mostra a Tabela 32.

A robustez foi avaliada por meio de pequenas modificações, individualmente, nos seguintes parâmetros do método: massa total da pastilha, marca do brometo de potássio e tempo de compressão da pastilha. Os valores calculados de DPR% se mostraram abaixo de 2,0%, conforme mostrado na Tabela 33, comprovando que pode haver pequenas modificações nestes parâmetros sem influenciar de maneira significativa a análise do fármaco.

Quanto aos limites de detecção e quantificação, estes foram calculados para determinar a sensibilidade do método. O valor calculado para o limite de detecção foi de 0,87 µg/g e o limite de quantificação foi de 2,66 µg/g. Os valores obtidos indicam a confiabilidade do método para detectar e quantificar a ampicilina sódica em pó para solução injetável.

O teor médio de ampicilina sódica determinado no medicamento foi de 97,07%, o qual se encontra de acordo com as especificações farmacopeicas, de 90 a 115% (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

O método proposto cumpre todos os requisitos preconizados pela literatura para validação de métodos analíticos (BRASIL, 2003; ICH, 2005). Desta forma, o método de espectrofotometria na região do infravermelho é capaz de quantificar ampicilina sódica em pó liofilizado para preparações injetáveis, podendo ser usado como uma alternativa ambientalmente favorável em análises de rotina do controle de qualidade deste fármaco, já que se trata de uma técnica limpa, tanto para o meio ambiente como para os operadores, rápida e de baixo custo de manutenção ambiental.

Finalmente, este método validado foi publicado em periódico de circulação internacional:

TÓTOLI, E.G.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of the quantitative analysis of ampicillin sodium in powder for injection by Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR). **Physical Chemistry**, v. 2, n. 6, p. 103-108, 2012.

7. ANÁLISE COMPARATIVA DOS MÉTODOS PROPOSTOS

A comparação entre métodos analíticos é uma ferramenta necessária para determinar se os procedimentos são analiticamente equivalentes. Desta maneira, com a finalidade de estabelecer uma comparação entre os métodos propostos neste trabalho para a quantificação de ampicilina sódica em pó liofilizado para solução injetável, foi realizada análise estatística dos teores médios de ampicilina sódica obtidos pelos diferentes métodos usando análise de variância (ANOVA), considerando nível de significância de 5%.

Os resultados obtidos na determinação quantitativa de ampicilina sódica pelos métodos propostos encontram-se na Tabela 34. A análise estatística destes valores experimentais obtidos para o doseamento de ampicilina pelos diferentes métodos propostos encontra-se na Tabela 35.

Tabela 34- Valores obtidos na determinação do teor de ampicilina sódica em pó liofilizado para solução injetável utilizando os métodos propostos

Parâmetros	**Método**		
	CLAE[1]	**MICRO[2]**	**IR[3]**
Teor (%)	97,98	98,82	98,44
	96,88	97,07	96,01
	95,62	98,26	96,75
Teor médio (%)	96,83	98,05	97,07

[1] CLAE: método por cromatografia líquida de alta eficiência
[2] MICRO: ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico
[3] IR: método por espectrofotometria na região do infravermelho

Tabela 35- Análise de variância dos resultados obtidos para o doseamento de ampicilina sódica em pó liofilizado para solução injetável pelos métodos propostos

Fontes de variação	**Graus de liberdade**	**Soma de quadrados**	**Quadrado médio**	**F calculado**	**F tabelado***
Entre grupos	2	2,52885	1,26443	1,01	5,14
Dentro dos grupos	6	7,48245	1,24708		
Total	8	10,01130			

*Significativo para $p < 5\%$

Analisando-se os dados obtidos através da análise de variância (ANOVA), apresentados na Tabela 35, observa-se que os teores de ampicilina sódica determinados pelas diferentes técnicas não apresentaram diferença estatisticamente significativa para $p < 0,05$, já que o valor de F calculado (1,01) se apresentou inferior ao valor de F tabelado (5,14).

Embora a análise estatística tenha demonstrado que as técnicas de CLAE, IR e ensaio turbidimétrico apresentaram resultados estatisticamente semelhantes em relação ao doseamento da ampicilina sódica na forma farmacêutica em questão, é necessário ressaltar que existem diferenças entre estes métodos quando se considera as vantagens e desvantagens de cada um.

O método por CLAE é seletivo, sendo adequado para a determinação de produtos de degradação e impurezas na matriz analisada. No entanto, requer o uso de equipamento e solventes de alto custo, além de utilizar grandes volumes de solventes como fase móvel e colunas estacionárias, que tornam a manutenção da técnica de elevado custo e fonte de contaminação ocupacional e ambiental.

O método por infravermelho, por sua vez, não necessita do uso de solventes orgânicos e ainda gera quantidade mínima de resíduos. Além disso, o material necessário para a confecção das pastilhas é de custo acessível, o que torna o preço das análises relativamente baixo (quando não se considera o valor do equipamento). Outra vantagem desta técnica é a rapidez de análise. No entanto, demanda maior rigor quanto ao controle de umidade e temperatura do ambiente, além de requerer equipamento de elevado custo.

O método microbiológico, realizado através do ensaio turbidimétrico, fornece informações importantes quanto à potência do produto farmacêutico. Considerando que, segundo a literatura, algumas vezes, o cálculo do teor do fármaco através da potência fornece resultados diferentes que quando este é calculado por métodos físico-químicos, a realização de métodos microbiológicos se torna necessária para antimicrobianos (MORENO, SALGADO, 2007). Além disso, é uma técnica que não utiliza solventes orgânicos, não causando preocupação com os resíduos químicos. No entanto, este método demanda maior tempo de execução, embora este tempo seja inferior ao necessário para o ensaio por difusão em ágar, o qual é sugerido pelas farmacopeias brasileira (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010) e japonesa (JP, 2011).

As principais características dos métodos propostos neste trabalho estão descritas na Tabela 36, as quais foram classificadas de zero a quatro, de acordo com o nível mínimo até máximo do parâmetro observado.

Tabela 36- Principais características dos métodos propostos

	CLAE[1]	**MICRO**[2]	**IR**[3]
Custo do equipamento	4	1	3
Uso de solventes orgânicos	4	0	0
Geração de resíduos orgânicos	4	0	0
Tempo de execução	1	2	1
Manuseio	2	3	2

[1] CLAE: método por cromatografia líquida de alta eficiência
[2] MICRO: ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico
[3] IR: método por espectrofotometria na região do infravermelho
Obs: Para a escala de valores, foram atribuídos 0 para o nível mais baixo e 4 para o mais alto.

8. DISCUSSÃO GERAL

O desenvolvimento de métodos analíticos eficazes para o controle de qualidade dos medicamentos comercializados é de extrema importância, uma vez que dados analíticos não confiáveis podem causar grandes problemas, tanto para a saúde da população, quanto financeiros para a indústria farmacêutica que o produz. Desta forma, a etapa de validação é indispensável para a apresentação de um método analítico à comunidade científica, já que assegura a confiabilidade dos dados analíticos gerados (LA ROCA et al., 2007).

O desenvolvimento de métodos analíticos para a análise de antimicrobianos é uma das atividades do grupo de pesquisa no qual este trabalho foi desenvolvido. Este grupo possui vários artigos científicos publicados a este respeito, entre eles: ALÉSSIO, SALGADO, 2012; CORRÊA et al., 2012; FIORENTINO, SALGADO, 2012; MORENO, SALGADO, 2012a; MORENO, SALGADO, 2012b; PASSONI, SALGADO, 2012; SILVA, SALGADO, 2012; TÓTOLI, SALGADO, 2012; VIEIRA, RICARTE, SALGADO, 2012; VIEIRA, SALGADO, 2012.

Neste trabalho, a ampicilina sódica foi a substância ativa escolhida para o estudo devido ao fato de ser um antimicrobiano utilizado em muitos países e recomendado pela Organização Mundial da Saúde. Além disso, foi percebido que, embora haja muitos métodos analíticos descritos na literatura para este fármaco, havia a necessidade do desenvolvimento de metodologias otimizadas, considerando a minimização do uso de solventes orgânicos ou a utilização de solventes menos tóxicos para os operadores, além de métodos mais práticos e rápidos.

Quanto à análise qualitativa da ampicilina sódica, os métodos propostos, os quais incluem a análise das características físicas, teor de umidade, solubilidade, cromatografia em camada delgada e espectrofotometria na região do infravermelho, foram relativamente simples e constituíram passos importantes para assegurar que o medicamento analisado possuía as características preconizadas pela literatura e pelo fabricante. Deve ser destacado o desenvolvimento de método indicativo de estabilidade por cromatografia em camada delgada. O método desenvolvido emprega fase móvel muito simples, composta apenas por etanol e água, além de ser capaz de separar produtos de degradação, o que demonstra sua capacidade indicativa de estabilidade.

Na análise quantitativa foram desenvolvidos e validados três métodos analíticos, com características e custos diferentes: CLAE, espectrofotometria na região do infravermelho e

ensaio microbiológico por turbidimetria. A validação foi realizada com base nos guias ICH (2005) e RDC nº 899 (BRASIL, 2003), os quais indicam os principais parâmetros a serem avaliados durante a validação de um método analítico.

Em se tratando da validação dos métodos quantitativos, foi possível verificar que todos eles apresentaram linearidade adequada, com coeficientes de correlação (r) superiores a 0,999, o que foi confirmado através da análise de variância dos dados obtidos para a construção das curvas analíticas. Os valores encontrados para a precisão dos três métodos foram considerados adequados, pois todos apresentaram DPR% inferiores a 5%. Com relação à exatidão, os três métodos apresentaram resultados satisfatórios, uma vez que todos os valores obtidos ficaram bem próximos a 100%. Todos se mostraram também robustos para os parâmetros testados (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

O método de CLAE ainda mostrou ser indicativo de estabilidade, pois amostras de pó liofilizado para solução injetável foram submetidas a condições forçadas de degradação ácida, alcalina, fotolítica e neutra, e em todos os casos o método cromatográfico foi capaz de diferenciar a ampicilina sódica dos demais produtos de degradação.

Durante o desenvolvimento dos três métodos analíticos, houve a preocupação de se minimizar a utilização de solventes orgânicos ou desenvolver técnicas que não os utilizem, já que esta é uma estratégia cada vez mais adotada pelos laboratórios químicos e farmacêuticos com objetivo de minimizar os impactos de suas atividades sobre o meio ambiente. Assim, a procura por técnicas limpas e rápidas é um tema extremamente importante para a rotina destes segmentos, já que garantir e realizar o controle de qualidade de produtos e processos sem prejudicar o meio ambiente vem ao encontro das necessidades globalizadas. Além disso, no decorrer deste trabalho, também foram buscadas técnicas rápidas, simples e econômicas, com a finalidade de contribuir com o controle de qualidade da ampicilina sódica em pó liofilizado para solução injetável na indústria farmacêutica.

Desta forma, nas condições do presente trabalho, pode-se afirmar que os métodos cromatográfico, espectrofotométrico e microbiológico forneceram resultados satisfatórios para todos os atributos da validação. Assim sendo, este trabalho permitiu o desenvolvimento e a validação de três métodos analíticos para a quantificação de ampicilina sódica em pó liofilizado para solução injetável.

9. CONCLUSÕES

- No presente trabalho foi possível desenvolver e validar novos métodos analíticos para a determinação de ampicilina sódica em amostras de pó liofilizado para solução injetável.
- As características qualitativas da ampicilina sódica foram determinadas satisfatoriamente através da análise de suas características físicas, umidade e solubilidade, além dos métodos por espectrofotometria na região do infravermelho e CCD, os quais se mostraram adequados para a identificação do fármaco no produto farmacêutico.
- O método por CCD, além de ser adequado para a identificação do fármaco no produto farmacêutico, ainda possibilitou a separação e detecção de produtos de degradação, mostrando sua capacidade indicativa de estabilidade. Do mesmo modo, o método desenvolvido apresentou vantagens em relação aos métodos farmacopeicos, principalmente por utilizar solventes com menor toxicidade e custo reduzido, trazendo maior segurança aos operadores e tornando o método menos dispendioso.
- As análises quantitativas permitiram desenvolver e validar alguns métodos analíticos para determinação de ampicilina sódica em pó liofilizado para solução injetável, tais como CLAE, ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico e espectrofotometria na região do infravermelho médio. Os métodos avaliados no presente trabalho mostraram-se precisos, exatos, não apresentando diferenças estatisticamente significativas entre eles.
- Quanto ao método cromatográfico, a utilização do etanol e a ausência de soluções tampão na composição da fase móvel se mostraram alternativas vantajosas para a realização do método. Além disso, apresentou a vantagem de permitir a separação de produtos de degradação, embora gere maior quantidade de resíduos de solventes orgânicos quando comparado aos outros métodos quantitativos validados.
- O ensaio microbiológico realizado através do método turbidimétrico se mostrou adequado para a determinação da potência da ampicilina sódica no produto farmacêutico analisado. Além disso, possui a vantagem de não utilizar solventes orgânicos em suas análises e exigir equipamento de custo reduzido em relação aos outros métodos validados, embora demande maior tempo de execução.
- O método espectrofotométrico na região do infravermelho médio, embora não seja muito utilizado para fins de quantificação, se mostrou adequado para o propósito, apresentando

as vantagens de ser um método rápido e que não utiliza solventes orgânicos em suas análises, podendo ser uma alternativa econômica e ambientalmente favorável para a quantificação deste fármaco. Além disso, este fato é um incentivo para se aplicar a espectrofotometria na região do infravermelho médio para a quantificação de outros fármacos, assim como foi feito com a ampicilina sódica.

- Os três métodos quantitativos mostraram-se apropriados para a quantificação da ampicilina sódica em amostras de pó liofilizado para solução injetável, podendo ser usados como alternativas para análises do controle de qualidade deste fármaco.
- Este trabalho ressalta a importância de uma rigorosa validação de métodos analíticos para o controle de qualidade dos medicamentos comercializados, pois dados analíticos confiáveis são fundamentais para a eficácia terapêutica e segurança destes produtos, evitando que os pacientes consumam medicamentos com a qualidade comprometida.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MOETY, E.M.; AL-RASHOOD, K.A.; AL-DEEB, O.A.; KHATTAB, N.A. Stability indicating HPLC method for determination of ampicillin and dicloxacillin in bulk forms, admixtures, and in capsules. **Scientia Pharmaceutica**, v. 63, p. 7-15, 1995.

AHMAD, A.S.; RAHMAN, N.; ISLAM, F. Spectrophotometric determination of ampicillin, amoxycillin, and carbenicillin using Folin-Ciocalteou phenol reagent. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 59, p. 119-123, 2004.

AKANNI, A.O.; AYIM, J.S.K. Determination of ampicillin in the presence of cloxacillin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 10, p. 43-47, 1992.

AKHTAR, M.J.; KHAN, S.; KHAN, M.A.S. Determination of ampicillin in human plasma by high performance liquid chromatography using ultraviolet detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 11, p. 365-378, 1993.

ALÉSSIO, P.V.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of a successful microbiological agar assay for determination of ceftriaxone sodium in powder for injectable solution. **Pharmaceutics**, v. 4, p. 334-342, 2012.

AL-KHAMEES, H.A.; ABOUNASSIF, M.A.; GAD-KARIEM, E.A.; KANDIL, H.A. Simultaneous determination of ampicillin and cloxacillin in the presence of their degradation products, either in binary mixtures or in pharmaceutical formulations. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 3, p. 104-108, 1995.

AL-RASHOOD, K.A. Simultaneous determination of ampicillin and dicloxacillin in pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 18, p. 2457-2465, 1995.

ALSWAYEH, R.S.; ALVI, S.N.; HAMMAMI, M.M. Ampicillin analysis by fully validated HPLC assay in human plasma. **Analytical Chemistry: An Indian Journal**, v. 10, p. 122-126, 2011.

AMIN, A.S. Modified spectrophotometric method for the determination of some important antibiotics through charge-transfer complexation reaction with chloranil. **Spectroscopy Letters**, v. 29, p. 1003-1011, 1996.

AMIN, A.S. Pyrocatechol violet in pharmaceutical analysis. Part I. A spectrophotometric method for the determination of some β-lactam antibiotics in pure and in pharmaceutical dosage forms. **Il Farmaco**, v. 56, p. 211-218, 2001.

AMIN, A.S.; MOUSTAFA, M.E.; ISSA, Y.M. Spectrophotometric microdetermination of ampicillin and amoxicillin with picric and picramic acids. **Microchemical Journal**, v. 50, p. 6-13, 1994.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis.** 17. ed. Gaithesburg: AOAC, 2002. v. 1, p. xx.

ARGEKAR, A.P.; KUNJIR, S.S. Simultaneous determination of sulbactam and ampicillin sodium in pharmaceutical preparations by high performance liquid chromatography - reverse phase (HPLC - RP). **Indian Drugs**, v. 33, p. 352-354, 1996.

ARIAS, E.R.; TORRES, M.L.H.; MUGUERCIA, H.L.; VALDÉS, D.L.; PÉREZ, D.L. Carbapenémicos y monobactámicos. **Acta Medica**, v. 8, p. 66-70, 1998.

ASKAL, H.F.; SALEH, G.A.; OMAR, N.M. Utility of certain л-acceptors for the spectrophotometric determination of some penicillins. **Analyst**, v. 116, p. 387-390, 1991.

BAROT, T.G.; PATIDAR, K.; KSHARTRI, N.; VYAS, N. Development and validation of LC method for the determination of ampicillin and dicloxacillin in pharmaceutical formulation using an experimental design. **E-Journal of Chemistry**, v. 6, p. 955-964, 2009.

BELAL, F.; EL-KERDAWY, M.M.; EL-ASHRY, S.M.; EL-WASSEEF, D.R. Kinetic spectrophotometric determination of ampicillin and amoxicillin in dosage forms. **Il Farmaco**, v. 55, p. 680-686, 2000.

BENITO-PEÑA, E.; PARTAL-RODERA, A.I.; LEÓN-GONZÁLEZ, M.E.; MORENO-BONDI, M.C. Evaluation of mixed mode solid phase extraction cartridges for the preconcentration of beta-lactam antibiotics in wastewater using liquid chromatography with UV-DAD detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 556, p. 415-422, 2006.

BLIESNER, D.M. **Validating Chromatographic Methods:** A Practical Guide. Hoboken - New Jersey: John Wiley & Sons, 2006. p. 1.

BORINELLI, B.; COLTRO, F.L.Z.; MORIYA, I.; SANTOS, L.M.L. Regulação ambiental e consumo sustentável: uma discussão a partir da percepção dos consumidores de Londrina - PR. **Revista Capital Científico**, v. 8, p. 77-91, 2010.

BP. BRITISH Pharmacopoeia. London: The Stationary Office, 2010. v. I, p. 155-163; v. III., p.2373-2375.

BRASIL. Congresso Nacional. Lei 6938 de 31 de agosto de 1981. Dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente, seus fins e mecanismos de formulação e aplicação, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2 set. 1981.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº899, de 29 de maio de 2003. Aprova o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2 jun. 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n^{o}17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 19 abr. 2010.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 maio 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Listas de medicamentos de referência, genéricos e similares. Disponíveis em: www.anvisa.gov.br Acesso em: 21/06/2012.

BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMAN, B.B. **As bases farmacológicas de Goodman & Gilman.** 12. ed. São Paulo: McGraw-Hill, 2012. p. 1477-1496.

BUHL, F.; SZPIKOWSKA-SROKA, B. Spectrophotometric determination of ampicillin and amoxycillin with Ce(IV) and arsenazo III. **Chemia Analityczna**, v. 46, p. 69-73, 2001.

CHAKRABARTI, K.; CHATTERJEE, S.P.; BASU, M.; CHAKRAVARTI, R.N. Turbidimetric assay of ampicillin using *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P). **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 19, p. 674-675, 1981.

CHEN, R.; CHANG, Y.; JIANG, J. Determination of co-fluampicil capsules and its related substances by HPLC. **Chinese Journal of Pharmaceuticals**, v. 37, p. 633-635, 2006.

CHEN, R.-H.; DONG, Z.-Q.; LU, Y. Determination of ampicillin sodium and cloxacillin sodium in injection by ion-pairs HPLC. **Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy**, v. 24, p. 308-310, 2007.

CIONE, A.P.P.; LIBERALE, M.J.; SILVA, P.M. Development and validation of analytical method for determination of an association of ampicillins in lyophilized powder for injection by HPLC. **Química Nova**, v. 33, p. 203-207, 2010.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a Métodos Cromatográficos.** 7. ed. Campinas: Editora UNICAMP, 1997.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia.** Campinas: Editora UNICAMP, 2006. p. 40.

CORRÊA, J.C.R.; REICHMAN, C.; SOARES, C.D.V.; SALGADO, H.R.N. Performance characteristics of high performance liquid chromatography, first order derivative UV spectrophotometry and bioassay for fluconazole determination in capsules. **Química Nova,** v. 35, p. 530-534, 2012.

DAESELEIRE, E.; RUYCK, H.D.; VAN RENTERGHEM, R. Confirmatory assay for the simultaneous detection of penicillins and cephalosporins in milk using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 14, p. 1404-1409, 2000.

DASENBROCK, C.O.; LACOURSE, W.R. Assay for cephapirin and ampicillin in raw milk by high-performance liquid chromatography-integrated pulsed amperometric detection. **Analytical Chemistry**, v. 70, p. 2415-2420, 1998.

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova Escola**, p. 21-25, 1998.

DE LUX PUTRA, E. Quantitative analysis of generic and branded name ampicillin in tablets using high performance liquid chromatography (HPLC). **Majalah Farmasi Indonesia**, v. 13, p. 223-232, 2002.

DEVANI, M.B.; PATEL, I.T.; PATEL, T.M. Spectrophotometric determination of ampicillin and its dosage forms. **Talanta,** v. 39, p. 1391-1394, 1992.

EJIKEME, U.C.; ADEMOLA, O.J. Microbiological assay of the active component of ampicillin in ampicillin and ampicillin/cloxacillin suspensions using *Bacillus megatharium* NCTC 10342A76 as indicator organism. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, p. 51-54, 2010.

EL-BARY, A.A.; NOUR, S.A.; FOUDA, NA.A.; SOLIMAN, I.I.; SABRI, N.A. A stability indicating high performance liquid chromatographic assay for the determination of ampicillin in bulk and in capsules. **Bulletin of the Faculty of Pharmacy (Cairo University)**, v. 42, p. 85-94, 2004.

EL SAYED, K.S.; YOUNIS, M.E.; EL-SHANAWANY, A.A. HPLC determination of amoxicillin, ampicillin, phenoxymethylpenicillin, flucloxacillin, cloxacillin and dicloxacillin in pharmaceutical preparations. **Zagazig Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 7, p. 38-47, 1998.

ELSHERIEF, H.A. Spectrophotometric determination of some antibiotics using hematoxylin. **Bulletin of the Faculty of Science, Assiut University, B: Chemistry**, v. 25, p. 1-8, 1996.

EP. EUROPEAN Pharmacopoeia. 7.ed. Council of Europe, 2010. v.2. p.1393-1399.

ERAH, P.O.; BARRETT, D.A.; SHAW, P.N. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic assay methods for the analysis of a range of penicillins in in vitro permeation studies. **Journal of Chromatography B**, v. 705, p. 63-69, 1998.

ESMERINO, L.A.; PEREIRA, A.V.; ADAMOWICZ, T.; BORGES, D.M.; TALACIMON, E.A.; SCHELESKY, M.E. Método microbiológico para determinação da potência de antimicrobianos. **Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 10, p. 53-60, 2004.

FAGERQUIST, C.K.; LIGHTFIELD, A.R. Confirmatory analysis of β-lactam antibiotics in kidney tissue by liquid chromatography/electrospray ionization selective reaction monitoring ion trap tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 17, p. 660-671, 2003.

FARHADI, K.; GHADAMGAHI, S.; MALEKI, R.; ASGARI, F.S. Spectrophotometric determination of selected antibiotics using Prussian Blue reaction. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 49, p. 993-997, 2002.

FARMACOPEIA Brasileira. 5. ed. Brasília: Anvisa, 2010. v. I, p. 261-269; v. II, p. 75-87.

FARMACOPEIA Portuguesa. 8. ed. Lisboa: Infarmed, 2005. p. 1216-1221.

FAROUK, F.; MOUSSA, B.A.; AZZAZY, H.M.E-S. Fourier transform infrared spectroscopy for in-process inspection, counterfeit detection and quality control of anti-diabetic drugs. **Spectroscopy**, v. 26, p. 297-309, 2011.

FDA - Food and Drug Administration. **Validation of Chromatographic Methods.** Washington: Center for Drug and Evaluation and Research, 1994.

FDA - Food and Drug Administration. Guidance for Industry: **Analytical Procedures and Methods Validation.** Rockville: Center for Drug Evaluation and Research and Center for Biologics Evaluation and Research, 2000.

FERNANDEZ-TORRES, R.; CONSENTINO, M.O.; BELLO LOPEZ, M.A.; CALLEJÓN MOCHÓN, M. Simultaneous determination of 11 antibiotics and their main metabolites from four different groups by reversed-phase high-performance liquid chromatography-diode array-fluorescence (HPLC-DAD-FLD) in human urine samples. **Talanta**, v. 81, p. 871-880, 2010a.

FERNANDEZ-TORRES, R.; BELLO LOPEZ, M.A.; OLÍAS CONSENTINO, M.; CALLEJÓN MOCHÓN, M.; PEREZ-BERNAL, J.L. Application of enzymatic probe sonication extraction for the determination of selected veterinary antibiotics and their main metabolites in fish and mussel samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 675, p. 156-164, 2010b.

FERNANDEZ-TORRES, R.; BELLO LOPEZ, M.A.; OLÍAS CONSENTINO, M.; CALLEJÓN MOCHÓN, M.; RAMOS PAYAN, M. Enzymatic-microwave assisted extraction and high-performance liquid chromatography–mass spectrometry for the determination of selected veterinary antibiotics in fish and mussel samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, p. 1146-1156, 2011a.

FERNANDEZ-TORRES, R.; BELLO LOPEZ, M.A.; OLÍAS CONSENTINO, M.; CALLEJÓN MOCHÓN, M. Simultaneous determination of selected veterinary antibiotics and their main metabolites in fish and mussel samples by high-performance liquid chromatography with diode array-fluorescence (HPLC-DAD-FLD) detection. **Analytical Letters**, v. 44, p. 2357–2372, 2011b.

FERRER, I.; ZWEIGENBAUM, J.A.; THURMAN, E.M. Analysis of 70 Environmental Protection Agency priority pharmaceuticals in water by EPA Method 1694. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 5674-5686, 2010.

FERRINI, A.M.; TRENTA, S.; MANNONI, V.; ROSATI, R.; CONI, E. Depletion of long-acting ampicillin in goat milk following intramuscular administration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 12199-12203, 2010.

FIORENTINO, F.A.M.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of a stability-indicative agar diffusion assay to determine the potency of flucloxacillin sodium in capsules. **International Journal of Microbiology Research**, v. 4, p. 217-222, 2012.

FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 10**,** p. 226-236, 1929.

GARRIGUES, S.; GALLIGNANI, M.; DE LA GUARDIA, M. FIA-FT-IR determination of ibuprofen in pharmaceuticals. **Talanta**, v. 40, p. 89-93, 1993.

GAUDIANO, M.C.; DI MAGGIO, A.; ANTONIELLA, E., VALVO, L., BERTOCCHI P.; MANNA, L.; BARTOLOMEI, M.; ALIMONTI, S.; RODOMONTE, A.L. An LC method for the simultaneous screening of some common counterfeit and sub-standard antibiotics: validation and uncertainty estimation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, p. 303-309, 2008.

GE, X.; BAI, X.; LIU, R.; YANG, F. Determination of ampicillin in the ampicloxacillin suppository by charge-transfer spectrophotometry. **Journal of Shanxi Medical University**, v. 34, p. 233-234, 2003.

GOMES DO NASCIMENTO, T.; ARAGÃO, C.F.S.; DANTAS DE MEDEIROS, F.; OLIVEIRA, E.J.; MACEDO, R.O. Validation of a method for determination of ampicillin in human plasma using LC-DAD. **Journal of Chromatographic Science**, v. 47, p. 749-755, 2009.

GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química nova**, v. 33, p. 667-679, 2010.

GUO, M.; LI, Z.; TAN, Z.; WU, H.; HAN, X. LENG, K.; ZHAI, Y. Determination of 8 penicillins residues in fishery products by dispersive solid-phase extraction ans liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Instrumental Analysis**, v. 30, p. 969-975, 2011.

HAMMEL, Y.-A.; MOHAMED, R.; GREMAUD, E.; LEBRETON, M.-H.; PHILIPPE, A.G. Multi-screening approach to monitor and quantify 42 antibiotic residues in honey by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1177, p. 58-76, 2008.

HANKO, V.P.; LACOURSE, W.R.; DASENBROCK, C.O.; ROHRER, J.S. Determination of sulfur-containing antibiotics using high-performance liquid chromatography with integrated pulsed amperometric detection. **Drug Development Research**, v. 53, p. 268-280, 2001.

HAPSE, S.A; MANE, A.R.; KADAM, S.D.; HAJARE, P.P.; GULVE, S.A. Spectrophotometric estimation of ampicillin and cloxacillin in pure and capsule dosage form by using different methods. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 14, p. 67-70, 2012.

HEWITT, W. **Microbiological assay for pharmaceutical analysis:** a rational approach. Boca Raton: Interpharm/CRC, 2004. p. 18-21.

HOLSTEGE, D.M.; PUSCHNER, B.; WHITEHEAD, G.; GALEY, F.D. Screening and mass spectral confirmation of β-lactam antibiotic residues in milk using LC-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 406-411, 2002.

HONG, C.-C.; KONDO, F. Detection, quantitation, and identification of residual aminopenicillins by high-performance liquid chromatography after fluorescamine derivation. **Journal of Food Protection**, v. 63, p. 1421-1425, 2000.

ICH - **International Conference on Harmonization**. Good manufacturing practice guide for active pharmaceutical ingredients: Q_7. Commission of the European Communities. Geneva, 2000.

ICH - **International Conference on Harmonization**. Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q_2 (R_1). Geneva, 2005.

INMETRO - **Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial.** Orientação sobre validação de métodos analíticos, DOQ-CGCRE-008, 2011.

ISHIDA, M.; KOBAYASHI, K.; AWATA, N.; SAKAMOTO, F. Simple high-performance liquid chromatography determination of ampicillin in human serum using solid-phase extraction disk cartridges. **Journal of Chromatography B**, v. 727, p. 245-248, 1999.

IVASHKIV, E. Ampicillin. In: FLOREY, K. (Ed.). **Analytical Profiles of Drug Substances**. Nova York: Academic Press, 1973, p. 23-24.

JEFFERY, G.H.; BASSET, J.; MENDHAM, J.; DENNEY, R.C. **Vogel:** Análise química quantitativa. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC Livros Técnicos e Científicos, 1992.

JP. JAPANESE Pharmacopoeia. 16th ed. Tokyo Society of Japanese Pharmacopoeia, 2011. p. 385-387.

JUNZA, A.; AMATYA, R.; BARRÓN, D.; BARBOSA, J. Comparative study of the LC–MS/MS and UPLC–MS/MS for the multi-residue analysis of quinolones, penicillins and cephalosporins in cow milk, and validation according to the regulation 2002/657/EC. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 2601-2610, 2011.

KAN, J. Simultaneous determination of ampicillin and probenecid in their compound capsule by HPLC. **Acta Universitatis Medicinalis Anhui**, v. 40, p. 391-392, 2005.

KANIOU, I.P.; ZACHARIADIS, G.A.; STRATIS, J.A. Separation and determination of five penicillins by reversed-phase HPLC. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 16, p. 2891-2897, 1993.

KANTIANI, L.; FARRÉ, M.; SIBUM, M.; POSTIGO, C.; ALDA, M.L.; BARCELÓ, D. Fully automated analysis of β-lactams in bovine milk by online solid phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 81, p. 4285-4295, 2009.

KANTIANI, L.; FARRÉ, M.; FREIXIEDAS, J.M.G.; BARCELÓ, D. Determination of antibacterials in animal feed by pressurized liquid extraction followed by online purification and liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, p. 1195-1205, 2010.

KARAGEORGOU, E.G.; SAMANIDOU, V.F. Development and validation according to European Union Decision 2002/657/EC of an HPLC-DAD method for milk multi-residue analysis of penicillins and amphenicols based on dispersive extraction by QuEChERS in MSPD format. **Journal of Separation Science**, v. 34, p. 1893–1901, 2011.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 10. ed. Porto Alegre: AMGH, 2010. p. 654-661.

KIRCHMANN, E.; WELCH, L.E. High-performance liquid chromatographic separation and electrochemical detection of penicillins. **Journal of Chromatography**, v. 633, p. 111-118, 1993.

KUKUSAMUDE, C.; SANTALAD, A.; BOONCHIANGMA, S.; BURAKHAM, R.; SRIJARANAI, S.; CHAILAPAKUL, O. Mixed micelle-cloud point extraction for the analysis of penicillin residues in bovine milk by high performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 81, p. 486-492, 2010.

KUMAR, V.; BHUTANI, H.; SINGH, S. ICH guidance in practice: Validated stability-indicating HPLC method for simultaneous determination of ampicillin and cloxacillin in combination drug products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 769-773, 2007.

KURIAN, T.; KURIEN, J. Simultaneous multicomponent spectrophotometric analysis of ampicillin and probenecid in pharmaceutical formulation by derivative spectroscopy. **Hygeia: Journal for Drugs and Medicines**, v. 3, p. 57-61, 2011.

LAL, J.; PALIWAL, J.K.; GROVER, P.K.; GUPTA, R.C. Determination of ampicillin in serum by high-performance liquid chromatography with precolumn derivatization. **Journal of Chromatography B**, v. 655, p. 142-146, 1994.

LA ROCA, M.F.; SOARES Sobrinho, J.L.; NUNES, L.C.C.; ROLIM Neto, P.J. Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, p. 177-180, 2007.

LEE, H.; LEE, J.S.; LEE, H.S. Simultaneous determination of ampicillin and metampicillin in biological fluids using high-performance liquid chromatography with column switching. **Journal of Chromatography B**, v. 664, p. 335-340, 1995.

LI, H.; ZHANG, W.; XU, F.; LIU, X. High-performance liquid chromatographic determination of pharmacokinetics of ampicillin in children. **Chinese Journal of Hospital Pharmacy**, v. 13, p. 149-152, 1993.

LI, H.; ZHAO, F.; TONG, S. Application of charge transfer reaction in the determination of ampicillin. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 25, p. 46-48, 1997.

LIU, C.; YEH, L.-C.; KUO, M.-Y.; CHANG, S.-K. Simultaneous determination of amoxicillin and ampicillin in animal feed by high performance liquid chromatography. **Taiwan Veterinary Journal**, v. 32, p. 195-201, 2006.

LIU, H.; YANG, M.; QIU, S. Simultaneous content determination of ampicillin and cloxacillin in a pharmaceutical formulation for injection by HPLC. **Chinese Journal of Antibiotics**, v. 31, p. 56-58, 2006.

LUO, W.; ANG, C.Y.W.; THOMPSON Jr., H.C. Rapid method for the determination of ampicillin residues in animal muscle tissues by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v. 694, p. 401-407, 1997.

LUO, W.; HANSEN Jr., E.B.; ANG, C.Y.W.; DECK, J.; FREEMAN, J.P.; THOMPSON Jr., H.C. Simultaneous determination of amoxicillin and ampicillin in bovine milk by HPLC with fluorescence detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 1264-1268, 1997.

MAHGOUB, H.; ALY, F.A. UV-spectrophotometric determination of ampicillin sodium and sulbactam sodium in two-component mixtures. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 17, p. 1273-1278, 1998.

MARTÍNEZ-HUELAMO, M.; JIMÉNEZ-GÁMEZ, E.; HERMO, M.P.; BARRÓN, D.; BARBOSA, J. Determination of penicillins in milk using LC-UV, LC-MS and LC-MS/MS. **Journal of Separation Science**, v. 32, p. 2385-2393, 2009.

MARTOS, P.A.; JAYASUNDARA, F.; DOLBEER, J.; JIN, W.; SPILSBURY, L.; MITCHELL, M.; VARILLA, C.; SHURMER, B. Multiclass, multiresidue drug analysis, including aminoglycosides, in animal tissue using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 5932-5944, 2010.

MASTOVSKA, K.; LIGHTFIELD, A.R. Streamlining methodology for the multiresidue analysis of β-lactam antibiotics in bovine kidney using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1202, p. 118–123, 2008.

MATKOVIC, S.R.; VALE, G.M.; GALLE, M.; BRIAND, L.E. Desarrollo y validación del análisis cuantitativo de ibuprofeno en comprimidos por espectroscopía infrarroja. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 23, p. 527-532, 2004.

MATSUURA, M.; NAKAZAWA, H.; HASHIMOTO, T.; MITSUHASHI, S. Combined antibacterial activity of amoxicillin with clavulanic acid against ampicillin-resistant strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 17, p. 908-911, 1980.

MC WHINNEY, B.C.; WALLIS, S.C.; HILLISTER, T.; ROBERTS, J.A.; LIPMAN, J.; UNGERER, J.P.J Analysis of 12 beta-lactam antibiotics in human plasma by HPLC with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 2039-2043, 2010.

MENDEZ-ALVAREZ, E.; SOTO-OTERO, R.; SIERRA-PAREDES, G.; AGUILAR-VEIGA, E.; GALAN-VALIENTE, J.; SIERRA-MARCUNO, G. A reversed phase liquid chromatographic method for the simultaneous determination of several common penicillins in human serum. **Biomedical Chromatography**, v. 5, p. 78-82, 1991.

METZ, P.; KOHLHEPP, S.J.; GILBERT, D.N. Study of different off-line sample processing procedures and the measurement of antibiotic and antiviral levels in human serum by high-

performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 773, p. 159-166, 2002.

MILLER, E.L. The penicillins: a review and update. **Journal of Midwifery & Women's Health**, v. 47, p. 426-434, 2002.

MIYABE, K.; TAKEUCHI, S.; TEZUKA, Y. Adsorption characteristics in reversed-phase liquid chromatography using ethanol/water mixed solvent. **Adsorption**, v. 5, p. 15-24, 1999.

MOATS, W.A.; ROMANOWSKI, R.D. Multiresidue determination of b-lactam antibiotics in milk and tissues with the aid of high-performance liquid chromatographic fractionation for clean up. **Journal of Chromatography A**, v. 812, p. 237-247, 1998.

MOHAMED, G.G. Spectrophotometric determination of ampicillin, dicloxacillin, flucloxacillin, and amoxicillin in pharmaceutical preparations using potassium periodate. **Egyptian Journal of Chemistry**, v. 44, p. 181-190, 2001.

MORENO, A.H.; SALGADO, H.R.N. Microbiological assay for ceftazidime injection. **Journal of AOAC International**, v. 90, p. 1379-1382, 2007.

MORENO, A.H.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of the quantitative analysis of ceftazidime in powder for injection by infrared spectroscopy. **Physical Chemistry**, v. 2, p. 6-11, 2012a.

MORENO, A.H.; SALGADO, H.R.N. Comparison of high performance liquid chromatography and three titrimetric methods for the determination of ceftazidime in pharmaceutical formulations. **Advances in Analytical Chemistry**, v. 2, p. 6-13, 2012b.

MSAGATI, T.A.M.; NINDI, M.M. Determination of β-lactam residues in foodstuffs of animal origin using supported liquid membrane extraction and liquid chromatography–mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 100, p. 836-844, 2007.

NAGARAJA, P.; SHRESTHA, A.K.; SHIVAKUMAR, A.; AL-TAYAR, N.G.S. Molybdate assisted ninhydrin based sensitive analytical system for the estimation of drugs containing amine group. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 19, p. 85-93, 2011.

NELIS, H.J.; VANDENBRANDEN, J.; VERHAEGHE, B.; DE KRUIFM, A.; MATTHEEUWS, D.; DE LEENHEER, A.P. Liquid chromatographic determination of ampicillin in bovine and dog plasma by using a tandem solid-phase extraction method. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, p. 1606-1610, 1992.

NOLASCO, F.R.; TAVARES, G.A.; BENDASSOLLI, J.A. Implantação de programas de gerenciamento de resíduos químicos laboratoriais em universidades: análise crítica e recomendações. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 11, p. 118-124, 2006.

OHMORI, T.; SUZUKI, A.; NIWA, T.; USHIKOSHI, H.; SHIRAI, K.; YOSHIDA, S.; OGURA, S.; ITOH, Y. Simultaneous determination of eight β-lactam antibiotics in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 1038-1042, 2011.

OPTACILIN: ampicilina sódica e ampicilina benzatina. Sumaré: Nycomed Pharma, 2013. Disponível em: www.anvisa.gov.br Acesso em: 26/02/2013.

PARISOTTO, G.; SOUZA, J.S.; FERRÃO, M.F.; FURTADO, J.C.; MOLZ, R.F. Análise exploratória aplicada no estudo de medicamentos contendo piroxicam. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 499-505, 2005.

PASCHOAL, J.A.R.; RATH, S. AIROLDI, F.P.S.; REYES, F.G.R. Validation of chromatographic methods for the determination of residues of veterinary drugs in foods. **Química Nova**, v. 31, p. 1190-1198, 2008.

PASSONI, M.H.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of a new and rapid HPLC for determination of lyophilized teicoplanin. **Analytical Methods**, v. 4, p. 1560-1564, 2012.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. **Introdução à espectroscopia.** 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010. p. 17-99.

PHAM, V.N.; NGUYEN, T.T. Ampicillin determination in capsules by HPLC. **Journal of Medical and Pharmaceutical Information**, v. 8, p. 21-25, 1997.

PEREIRA, A.L.; PITA, J.R. Alexander Fleming (1881-1955): Da descoberta da penicilina (1928) ao Prémio Nobel (1945). **Revista da Faculdade de Letras: História**, v. 6, p. 129-151, 2005.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; PINTO, A.F. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos.** 3. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2010. p. 3-4; 16-23.

QIN, F.; ZHENG, W.; CHEN, G.; QIU, S. Determination of six penicillins residues in milk by LC-MS/MS. **Chinese Journal of Antibiotics**, v. 34, p. 348-351, 2009.

QURESHI, S.Z.; QAYOOM, T.; HELALET, M.I. Simultaneous spectrophotometric and volumetric determinations of amoxycillin, ampicillin and cloxacillin in drug formulations: reaction mechanism in the base catalysed hydrolysis followed by oxidation with iodate in dilute acid solution. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 21, p. 473-482, 1999.

RAGHAVENDRA, G.P.A.; SURYANARAYANA, R.V. Spectrophotometric method for the determination of ampicillin and amoxicillin. **Journal of Pharmacy Research**, v. 3, p. 869-872, 2010.

RAJU, C.B.V.N.; SHARMA, H.K.; RAO, C.S.; RAO, G.N. HPLC method development for the determination of substances related to ampicillin in bulk drug. **Analytical Chemistry: An Indian Journal**, v. 7, p. 354-361, 2008.

RAMBLA-ALEGRE, M.; MARTÍ-CENTELLES, R.; ESTEVE-ROMERO, J.; CARDA-BROCH, S. Application of a liquid chromatographic procedure for the analysis of penicillin antibiotics in biological fluids and pharmaceutical formulations using sodium dodecyl sulphate/propanol mobile phases and direct injection. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 4972-4981, 2011.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. **Rang & Dale:** Farmacologia. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. p. 665-666.

REMINGTON: **The Science and Practice of Pharmacy.** 21. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. p. 1638.

RIBEIRO, R.L.V.; GRESPAN, C.B.; COLLINS, C.H.; COLLINS, K.E.; BRUNS, R.E. Optimization through factorial planning of the use of ethanol:water as a mobile phase for reversed phase HPLC. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 22, p. 52-54, 1999.

RIBEIRO, R.L.V.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, K.E.; COLLINS, C.H. Reevaluation of ethanol as organic modifier for use in HPLC-RP mobile phases. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, p. 300-306, 2004.

RIEDIKER, S.; STADLER, R.H. Simultaneous determination of five *β*-lactam antibiotics in bovine milk using liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 73, p. 1614-1621, 2001.

ROLINSON, G.N.; GEDDES, A.M. The 50th anniversary of the discovery of 6-aminopenicillanic acid (6-APA). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 29, p. 3-8, 2007.

ROSE, M.D.; TARBIN, J.; FARRINGTON, W.H.H.; SHEARER, G. Determination of penicillins in animal tissues at trace residue concentrations: II. Determination of amoxicillin and ampicillin in liver and muscle using cation exchange and porous graphitic carbon solid phase extraction and high-performance liquid chromatography. **Food Additives and Contaminants**, v. 14, p. 127-133, 1997.

SAMANIDOU, V.F.; GIANNAKIS, D.E.; PAPADAKI, A. Development and validation of an HPLC method for the determination of seven penicillin antibiotics in veterinary drugs and bovine blood plasma. **Journal of Separation Science**, v. 32, p. 1302-1311, 2009.

SANSEVERINO, A.M. Síntese orgânica limpa. **Química nova**, v. 23, p. 102-107, 2000.

SANTOS, J.H.Z.; PIZZOLATO, T.M.; CUNHA, A.C.B. Desenvolvimento de metodologia analítica para quantificação de fármacos em meio aquático por extração em fase sólida e HPLC. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 1, p. 19-34, 2007.

SHAKOOR, O.; TAYLOR, R.B. Analysis of ampicillin, cloxacillin and their related substances in capsules, syrups and suspensions by high-performance liquid chromatography. **The Analyst**, v. 121, p. 1473-1477, 1996.

SHENG, J.; SONG, Y.; YANG, X. HPLC determination of ampicillin and probenecid in their compound capsules. **Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 24, p. 411-414, 2004.

SHERAZI, S.T.H; ALI, M.; MAHESAR, S.A. Application of Fourier-transform infrared (FT-IR) transmission spectroscopy for the estimation of roxithromycin in pharmaceutical formulations. **Vibrational Spectroscopy**, v. 55, p. 115-118, 2011.

SHU, J.; YAO, H.; YANG, J. Microbiological assay method of β-lactam antibiotics in the presence of aminoglycosides. **Kangshengsu**, v. 13, p. 31-35, 1988.

SILVA, P. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 953-965.

SILVA, R. J.M.C.L.; FARIAS, T.A.L.; FILHO, J.A.R.; FRANCELINO, L.; OLIVEIRA, E.J.A. Validação de método de cromatografia líquida de alta eficiência para análise de ampicilina em injetáveis utilizados em hospitais públicos de Recife, Brasil. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, p. 72-78, 2010.

SILVA, L.M.; SALGADO, H.R.N. Thermal analysis and validation of a UV and visible spectrophotometric methods for the determination of ne antibiotic tigecycline in pharmaceutical product. **Advances in Analytical Chemistry**, v. 2, p. 10-15, 2012.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.** 7. ed. Rio de Janeiro: LTC Livros Técnicos e Científicos, 2007. p. 70-122.

SINGH, D.K.; MAHESHWARI, G. Spectrophotometric determination of penicillins in pure and pharmaceutical formulations using Folin-Ciocalteu reagent. **Drug Testing and Analysis**, v. 2, p. 503-506, 2010.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; DOLAN, J.W. **Introduction to Modern Liquid Chromatography.** 3. ed. New Jersey: Willey, 2010. 912 p.

SONG, J.; WANG, Z.; XUAN, C.; ZHANG, L. Spectrophotometric determination of ampicillin sodium based on charge-transfer reaction. **Journal of Taiyuan University of Science & Engineering**, v. 30, p. 291-292, 1999.

SORENSEN, L.K.; RASMUSSEN, B.M.; BOISON, J.O.; KENG, L. Simultaneous determination of six penicillins in cows' raw milk by a multiresidue high-performance liquid chromatographic method. **Journal of Chromatography B**, v. 694, p. 383-391, 1997.

SORENSEN, L.K.; SNOR, L.K.; ELKÆR, T.; HANSEN, H. Simultaneous determination of seven penicillins in muscle, liver and kidney tissues from cattle and pigs by a multiresidue high-performance liquid chromatographic method. **Journal of Chromatography B**, v. 734, p. 307-318, 1999.

SORENSEN, L.K.; SNOR, L.K. Determination of eight penicillins in serum from cattle and pigs by generic HPLC method. **Chromatographia**, v. 53, p. 367-371, 2001.

SUÁREZ, C.; GUDIOL, F. Antibióticos betalactámicos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 27, p. 116-129, 2009.

SUN, C.; SU, C.; LI, R. Determination of ampicillin sodium/sulbactam sodium in different injections by HPLC. **Shanxi Medical Journal**, v. 38, p. 668-669, 2009.

TAN, J.; XU, J.; ZHUO, H. High-performance liquid chromatography and pharmacokinetics of ampicillin in sultamicillin tablet. **Journal of China Pharmaceutical College**, v. 29, p. 366-369, 1998.

TAN, Z.; LIU, Y. Simultaneous content determination of ampicillin and cloxacillin for injection by HPLC. **Heilongjiang Medicine Journal**, v. 22, p. 442-443, 2009.

THANGADURAI, S.; SHUKLA, S.K.; ANJANEYULU, Y. Spectrophotometric determination of certain β-lactam and aminoglycoside antibiotic drugs using 2,3-dichloro-5,6-dicyano-ρ-benzoquinone. **Oriental Journal of Chemistry**, v. 19, p. 325-330, 2003.

THE MERCK INDEX: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 14. ed. Whitehouse Station: Merck & Co., 2006. p. 94.

TÓTOLI, E.G.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of the quantitative analysis of ampicillin sodium in powder for injection by Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR). **Physical Chemistry**, v. 2, p. 103-108, 2012.

TSOU, T.-L.; HUANG, Y.-C.; LEE, C.-W.; LEE, A.-R.; WANG, H.-J.; CHEN, S.-H. Simultaneous determination of ampicillin, cefoperazone, and sulbactam in pharmaceutical formulations by HPLC with β-cyclodextrin stationary phase. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 2407-2413, 2007.

UDOBI, C.E.; UBULOM, P.M.E.; AKPABIO, E.I. Comparative studies of the spectrophotometric and microbiological assay methods used for the determination of ampicillin levels in ampicillin/cloxacillin combinations. **Current Research Journal of Biological Sciences**, v. 3, p. 31-34, 2011.

USP 33. The United States Pharmacopeia. The National Formulary (NF 28). 33. ed. Rockville, MD: United States Pharmacopoeia Convention, 2010. p. R-457 – R-460.

VALENTINI, S.R.; SOMMER, W.A.; MATIOLI, G. Validação de métodos analíticos. **Arquivos do Mudi**, v. 11, p. 26-31, 2007.

VAN DEN BERG, M.A. Impact of the *Penicillium chrysogenum* genome on industrial production of metabolites. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, p. 45-53, 2011.

VAN HOLTHOON, F.; MULDER, P.P.J.; VAN BENNEKOM, E.O.; HESKAMP, H.; ZUIDEMA, T.; VAN RHIJN, H.J.A. Quantitative analysis of penicillins in porcine tissues, milk and animal feed using derivatisation with piperidine and stable isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, p. 3027-3040, 2010.

VERDON, E.; COUEDOR, P. Determination of ampicillin residues in milk by ion-pair reversed phase high performance liquid chromatography after precolumn derivatization. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 14, p. 1201-1207, 1996.

VIEIRA, D.C.M.; RICARTE, P.C.; SALGADO, H.R.N. Validation of microbiological assay for determination of cefuroxime in injectable preparations. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 31, p. 746, 2012.

VIEIRA, D.C.M.; SALGADO, H.R.N. Development of quantitative methodology for determination of cefuroxime sodium. Advances in Analytical Chemistry, v. 2, p. 67-73, 2012.

WANG, D.; YUAN, Z.; FAN, S.; KONG, K. Study on microbiological determination method for ampicillin residues in tissues of pig and chicken. **Journal of Huazhong Agricultural Univerity**, v. 18, p. 245-247, 1999.

WANG, Y.; ZHANG, N.; LU, H. Serum concentrations of ampicillin and probenecid detected by RP-HPLC. **Journal of Dalian Medical University**, v. 28, p. 240-241, 2006.

WHO - World Health Organization. **Quality Assurance of Pharmaceuticals:** A compendium of guidelines and related materials. v. 2, Good Manufacturing Practices and Inspection. 2. ed. Geneva, 2007.

WILLIAMS, J.D. β-lactamases and β-lactamase inhibitors. **International Journal of Antimicrobial Agents**, p. S3-S7, 1999.

WU, C.S.; ZHANG, J.L.; QIAO, Y.L.; WANG, Y.L.; CHEN, Z.R. Simultaneous determination of 14 β-lactam antibiotics in cosmetic products by liquid chromatography tandem mass spectrometry method. **Chinese Chemical Letters**, v. 22, p. 334-337, 2011.

XAVIER, G.G. Avaliação de programas de qualidade mediante implantação da ISO 9000. **Gestão & Produção**, v. 2, p. 162-172, 1995.

XING, L.; ZHANG, J.; GAO, Y. Determination of flucloxacillin sodium and ampicillin for injection by HPLC. **Chinese Journal of Antibiotics**, v. 31, p. 414-416, 2006.

XU, D.; OU, Z. Determination of ampicillin and cloxacillin sodium in suppository ampicloxacillin by double-wavelength ultraviolet spectrophotometry. **Journal of Shanxi Medical University**, v. 34, p. 575-576, 2003.

XU, F.; FENG, E.; YU, F.; XU, G. Determination of concentration and pharmacokinetics of ampicillin in human plasma by HPLC. **Journal of China Pharmacy**, v. 19, p. 1071-1073, 2008.

XU, L.; WANG, H.; XIAO, Y. Spectrophotometric determination of ampicillin sodium in pharmaceutical products using sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonic as the chromogentic reagent. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 60, p. 3007-3012, 2004.

YANG, Z.; CHEN, J.; CHEN, W.; ZENG, H. Simultaneous determination of ampicillin and cloxacillin for injection by RP-HPLC. **Chinese Journal of Hospital Pharmacy**, v. 20, p. 529-531, 2000.

YE, N.-S.; GU, X.-X.; ZHANG, Q. Development of SPE-HPLC method for simultaneous determination of five beta-lactam antibiotic residues in milk and swine meat samples. **Fenxi Shiyanshi**, v. 29, p. 73-77, 2010.

ZARAPKAR, S.S.; HALKAR, U.P.; RANE, S.H. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of ampicillin and probenecid in capsules. **Indian Drugs**, v. 37, p. 200-203, 2000.

ZEITLER, K.; SALVAS, B.; STEVENS, V.; BROWN, J. Aztreonam lysine for inhalation: New formulation of an old antibiotic. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 69, p. 107-115, 2012.

ZHANG, K.; WANG, D.; YUAN, Z.; FAN, S. Determination of ampicillin residues in chicken meat and swineport. **Chinese Journal of Veterinary Science**, v. 24, p. 470-472, 2004.

ZHANG, X.; SONG, Y.; SHENG, J.; DANG, Q. HPLC determination of ampicillin and cloxacillin in compound Kangxili capsules. **Journal of Northwest University: Natural Science Edition**, v. 25, p. 643-647, 1995.

ZHANG, Y.; YANG, Y.; ZHANG, D.; XU, X. Detection of two penicillins residues in milk by high performance liquid chromatography with pre-column derivatization. **Journal of Instrumental Analysis**, v. 29, p. 403-406, 2010.

ZHANG, Y. Spectrophotometric determination of ampicillin sodium using ninhydrin as chromogenic agents. **Chinese Journal of Applied Chemistry**, v. 29, p. 316-319, 2012.

ZHAO, C.; HE, C.; ZHAO, H.; XIE, J.; WU, Q. HPLC determination of ampicillin in urine. **Journal of Shenyang College of Pharmacy**, v. 7, p. 1-4, 1990.

ZHAO, S.; HUO, Q.; LI, J.; JIANG, Z. Determination of ampicillin and probenecid in human serum by high performance liquid chromatography. **Acta Academiae Medicinae Bengbu**, v. 36, p. 516-518, 2011.

ZHAO, Y.; HE, J.; LIU, S.; DAI, Q. Determination of ampicillin and probenecid concentration in human plasma by high performance liquid chromatography. **Journal of Third Military Medical University**, v. 28, p. 591-593, 2006a.

ZHAO, Y.; HE, J.; LIU, S.; DAI, Q. Amount determination of ampicillin and probenecid by HPLC. **China Pharmaceuticals**, v. 15, p. 27-28, 2006b.

ZHAO, Y.; QIAN, X.; LI, Z. Quantitative determination of ampicillin by high-performance liquid chromatography. **Chinese Journal of Chromatography**, v. 11, p. 59-60, 1993.

ZHOU, M. RP-HPLC gradient elution determination of ampicillin and probenecid in ampicillin and probenecid dispersal tablets. **Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 23, p. 186-188, 2003.

ZHOU, M.; HU, C. Determination of related substances in ampicillin sodium and sulbactam sodium for injection by RP-HPLC gradient elution method. **Chinese Journal of Antibiotics**, v. 34, p. 158-162, 2009.