



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA**  
**Coordenação do Curso de Química Licenciatura e Bacharelado**  
**Trabalho de Conclusão de Curso – TCC**

**WILLIAM BARROS VELOSO**

**DETERMINAÇÃO DE AMPICILINA EMPREGANDO**  
**ELETRODO DE COBRE EM SISTEMA BIA COM**  
**DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA**

São Luís

2018

**WILLIAM BARROS VELOSO**

**DETERMINAÇÃO DE AMPICILINA EMPREGANDO  
ELETRODO DE COBRE EM SISTEMA BIA COM  
DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA**

Monografia apresentada junto à Coordenação do Curso de Química da Universidade Federal do Maranhão como um dos requisitos para obtenção do grau de Licenciado em Química.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luiza Maria Ferreira Dantas

São Luís

2018

Ficha gerada por meio do SIGAA / Biblioteca com dados fornecidos pelo autor.  
Núcleo Integrado de Bibliotecas / UFMA

Barros Veloso, William.

Determinação de ampicilina empregando eletrodo de cobre em sistema BIA com detecção amperométrica / William Barros Veloso. - 2018.

49 f.

Orientadora: Luiza Maria Ferreira Dantas.

Monografia (Graduação) - Curso de Química, Universidade Federal do Maranhão, São Luis, 2018.

1. Ampicilina. 2. Análise por Injeção em Batelada. 3. Determinação rápida. 4. Eletrodo de cobre. I. Maria Ferreira Dantas, Luiza. II. Título.



**DETERMINAÇÃO DE AMPICILINA EMPREGANDO ELETRODO DE COBRE EM SISTEMA BIA COM DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA**

**WILLIAM BARROS VELOSO**

ESTA MONOGRAFIA FOI JULGADA ADEQUADA COMO UM DOS REQUISITOS OBRIGATÓRIOS PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE LICENCIADO EM QUÍMICA

Aprovada em 13 de dezembro de 2018.

**BANCA EXAMINADORA:**

Prof. Dr. IRANALDO SANTOS DA SILVA  
Departamento de Tecnologia Química/CCET/UFMA

Representando a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> LUIZA MARIA FERREIRA DANTAS (Orientadora)

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> ISAIDE DE ARAUJO RODRIGUES  
Departamento de Química/CCET/UFMA

Prof.<sup>a</sup> Msc. PAULINA ANDRÉA VIANA DE CARVALHO  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão - IFMA

Dedico este trabalho à minha mãe Eunice e ao meu pai Expedito, os quais sempre me apoiaram e em todo tempo deram o máximo de si, sem medir esforços, para que eu pudesse chegar até aqui.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por sempre estar comigo me concedendo força diante de cada dificuldade e por me dar a convicção de, a cada dia, lutar pelos meus sonhos.

À minha mãe Eunice e ao meu pai Expedito, pelo amor, pelo suporte e por serem minha maior inspiração e exemplo de vida. E aos meus irmãos Douglas e Lorrana, pelo amor e companheirismo durante toda essa caminhada.

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luiza Dantas por todo conhecimento transmitido, pela amizade construída, pela confiança em mim depositada e por ter acreditado em mim desde o início.

Ao Prof. Dr. Iranaldo Silva, pela amizade, pelo grande suporte durante todo o desenvolvimento deste trabalho, por compartilhar conhecimentos e experiências que vão além da vida acadêmica e pelos momentos de descontração na “hora do café”.

À amiga Geysel, pela amizade, pelo auxílio na realização das análises e pela oportunidade de participar de algumas de suas produções científicas.

À amiga Nara, por todo incentivo, apoio e suporte mesmo antes de entrar no Laboratório de Eletroquímica, pelo compartilhamento de conhecimentos iniciais, os quais foram de fundamental importância por despertar em mim o interesse pela pesquisa.

Aos meus amigos Lucas, Patrick e Matheus, que estiveram presente durante toda graduação no curso de Química Licenciatura, pela amizade e por todos os momentos de descontração.

A todos os colegas do Laboratório de Eletroquímica, pelo acolhimento, companheirismo e por todas as confraternizações em que estivemos juntos.

Aos demais colegas do curso de Química Licenciatura e Bacharelado turma 2015.1 pelas sólidas amizades construídas.

Aos amigos Juliana, Jonas, Lili e Rômulo por estarem sempre ao meu lado, por todo apoio e incentivo.

Ao Programa Foco Acadêmico / UFMA, pela concessão da bolsa de iniciação científica, a qual foi de grande ajuda na execução do trabalho.

À FAPEMA, pelo suporte financeiro ao projeto vinculado a este trabalho.

*“The mind that opens itself to a new idea  
will never go back to its original size.”*

*(Albert Einstein)*

## RESUMO

A ampicilina é um antibiótico pertencente ao grupo das penicilinas, que por sua vez compõem a classe dos  $\beta$ -lactâmicos, compostos que são caracterizados pela presença do anel  $\beta$ -lactâmico em sua estrutura e por notória eficiência no tratamento de doenças infecciosas. Devido à vital importância desses antibióticos, o monitoramento da biodisponibilidade desse composto em formulações farmacêuticas e em fluidos biológicos é indispensável. Métodos cromatográficos, espectrofotométricos e amperométricos já foram desenvolvidos para determinação de ampicilina em fármacos, porém os mesmos demandam elevado custo, tempo de análise ou tratamento prévio da amostra. Neste trabalho foi desenvolvido um método eletroanalítico simples, rápido, preciso, sensível e de baixo custo para determinação de ampicilina utilizando sistema de Análise por Injeção em Batelada (BIA) com detecção Amperométrica. Inicialmente realizou-se um estudo do comportamento ciclovoltagemétrico da ampicilina frente ao eletrodo convencional de cobre ( $\phi = 2$  mm). Os resultados mostraram um aumento na intensidade da corrente anódica obtendo-se um valor máximo quando o potencial atinge 0,025V, sendo este o potencial escolhido para as medidas amperométricas. Medidas voltamétricas também foram utilizadas para a otimização de parâmetros como eletrólito de suporte e pH do meio, dentre os quais o tampão Britton-Robbinson 0,10 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0) apresentou melhores resultados. O método BIA foi executado em célula eletroquímica adequada para este sistema, realizando-se injeções de pequenas alíquotas do padrão e da amostra diretamente na superfície de uma placa de circuito impresso de cobre (eletrodo de trabalho), no qual aplicou-se um potencial constante (+0,025 V) durante todo o tempo de análise. O sinal analítico foi obtido por meio de um pico transiente de corrente em que a intensidade é proporcional à concentração do antibiótico. Avaliou-se a influência de agitação do sistema, volume de injeção e vazão da micropipeta eletrônica utilizada para as injeções, obtendo-se maior frequência analítica em sistema sob agitação, maiores repetibilidade e valor de corrente utilizando-se volume de injeção e vazão iguais a 100,0  $\mu$ L e 76,9  $\mu$ L s<sup>-1</sup>, respectivamente. O método desenvolvido apresentou faixa linear entre 1,0 e 100,0  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> mostrando-se rápido (120 injeções h<sup>-1</sup>), preciso (DPR = 3,5 %, n = 18), sensível (LD = 0,25  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> e LQ = 0,83  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>) e exato quando aplicado em amostra comercial do fármaco. Os resultados obtidos por meio do método BIA foram validados por comparação com dois métodos analíticos reportados na literatura para determinação de ampicilina, por HPLC e espectrofotometria UV-Vis, mostrando-se estatisticamente iguais.

**Palavras-chave:** Ampicilina. Análise por Injeção em Batelada. Eletrodo de cobre. Determinação rápida.



## ABSTRACT

*Ampicillin is an antibiotic from the group of penicillins which makes up the class of  $\beta$ -lactams, compounds characterized by the presence of the  $\beta$ -lactam ring in their structure and by notoriously efficient in the treatment of infectious diseases. Due to the vital importance of these antibiotics, monitoring their bioavailability in pharmaceutical formulations and biological fluids is indispensable. Chromatographic, spectrophotometric and amperometric methods have already been developed for the determination of ampicillin in drugs, but they require a high cost, time of analysis or previous treatment of the sample. In this work, a simple, fast, accurate, sensitive and low cost electroanalytical method for the determination of ampicillin using BIA system with amperometric detection is developed. Initially, a study was performed on the cyclic voltammetric behavior of ampicillin versus the conventional copper electrode ( $\phi = 2$  mm). The results showed an increase in the intensity of the anodic current obtaining a maximum value when the potential reaches 0,025V, being this the potential chosen for the amperometric measurements. Voltammetric measurements were also used for the optimization of parameters such as electrolyte support and pH of the system, where the Britton-Robbinson buffer 0.10 mol L<sup>-1</sup> (pH 7.0) presented better results. The BIA method was performed in a suitable electrochemical cell for the system and injections of small aliquots of the standard and the sample were made directly on the surface of a printed circuit board of copper (working electrode), in which a same potential was applied during the entire analysis time. The analytical signal was obtained by a current transient peak in which the intensity is proportional to the concentration of the antibiotic. The influence of system agitation, injection volume and electronic micropipette flow rate for the injections was evaluated, obtaining a higher analytical frequency in the system under agitation, higher repeatability and current value using injection volume and flow equal to 100.0  $\mu$ L and 76.9  $\mu$ L s<sup>-1</sup>, respectively. The developed method presented a linear range between 1.0 and 100.0  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> proving to be a fast (120 h<sup>-1</sup> injection), a accurate (DPR = 3.5%, n = 18) sensitive (LOD = 0.25  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> and LOQ = 0.83  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>) and exact method when applied in a commercial sample of the drug. The results obtained using the BIA method were validated by comparison with two analytical methods reported in the literature for the determination of ampicillin by HPLC and UV-Vis spectrophotometry, which were statistically the same.*

**Keyword:** Ampicillin. Batch Injection Analysis. Copper electrode. Fast determination.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estrutura química da ampicilina: (A) anel  $\beta$ -lactâmico e (B) anel tiazolidínico. .... 18
- Figura 2:** Etapas de injeção em sistema BIA..... 22
- Figura 3:** Célula eletroquímica convencional..... 26
- Figura 4:** Sistema de análise por injeção em batelada com detecção amperométrica (BIA). . 27
- Figura 5:** Voltamogramas cíclicos obtidos com ECV ( $\phi = 2,0$  mm) (—) no branco, tendo como eletrólito de suporte KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , (—) após a adição de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4$  e (—) após adição de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de AMP,  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ ..... 30
- Figura 6:** Voltamograma cíclico obtido com o eletrodo de cobre ( $\phi = 2,0$  mm) em tampão BR  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0 (—) na ausência e (—) na presença de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de AMP,  $\nu = 50 \text{ mVs}^{-1}$  ..... 31
- Figura 7:** Voltamogramas cíclicos do eletrodo de cobre em (A) tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0; (B) tampão BR  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0; (C) tampão acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 4,5 (D) NaOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e (E) KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , (—) apenas no eletrólito de suporte e (—) na presença de AMP  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . ..... 33
- Figura 8:** Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo de cobre ( $\phi = 2,0$  mm) em tampão BR  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH (A) 5,0 (B) 6,0 (C) 7,0 (D) 8,0 e (E) 9,0; (—) antes e (—) após adição de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de AMP,  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ ..... 34
- Figura 9:** Dependência da corrente de pico anódico ( $I_{pa}$ ) e do potencial de pico anódico ( $E_{pa}$ ) em função da variação do pH. .... 35
- Figura 10:** Influência da agitação do meio na obtenção do sinal analítico: (a) sistema em repouso e (b) sob agitação. .... 36
- Figura 11:** (A) Efeito da variação do volume de injeção ( $10 - 190 \mu\text{L}$ ); (B) Efeito de variação da vazão (a)  $22,7 \mu\text{L s}^{-1}$ , (b)  $45,4 \mu\text{L s}^{-1}$  e (c)  $76,9 \mu\text{L s}^{-1}$ , para solução padrão de AMP  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  em sistema BIA com detecção amperométrica em tampão BR (pH 7,0);  $E = +0,025 \text{ V}$ ;  $V_{inj} = 100 \mu\text{L}$ . ..... 37
- Figura 12:** Resultado dos experimentos de repetibilidade do método BIA para sucessivas injeções ( $n=18$ ) de ampicilina  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  em tampão BR  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0 como eletrólito de suporte;  $E = +0,025\text{V}$ ;  $V_{inj} = 100 \mu\text{L}$ ; vazão =  $76,9 \mu\text{L s}^{-1}$ ..... 38
- Figura 13:** Curva de calibração construída a partir da obtenção do amperograma após adição de soluções padrão de ampicilina nas concentrações 1,0; 10,0; 20,0; 40,0; 60,0 e  $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$

<sup>1</sup>. Inserido: Amperograma de BIA para análise de ampicilina. Parâmetros: eletrólito de suporte: tampão BR 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0; potencial de trabalho: +0,025V vs Ag/AgCl/KCl<sub>sat</sub>; Vinj: 100 μL. .... 38

**Figura 14:** (A) Amperograma BIA obtido para a curva analítica de adição de padrão da ampicilina (a) 10, (b) 20, (c) 30 (d) 40 μmol L<sup>-1</sup> e (e) amostra de ampicilina em cápsula; E= 0,025 V vs Ag/AgCl/KCl<sub>sat</sub>. (B) Curva de adição de padrão no sentido crescente de concentração do padrão ( $y = 0,09904x + 0,5642$ ;  $r = 0,9948$ ). .... 40

**Figura 15: I** - Cromatograma obtido com (a) solução padrão de ampicilina 6,7 mmol L<sup>-1</sup>, (b) e (c) amostras de ampicilina em cápsulas;  $\lambda = 220$  nm. **II** - Espectro de absorção de solução padrão de ampicilina 1,0 mmol L<sup>-1</sup>; Inserido: curva de calibração correspondente ( $R = 0,998$ ). .... 41

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Lista de reagentes utilizados e suas respectivas procedências. ....	24
<b>Tabela 2:</b> Composição da fase móvel em função do tempo. ....	28
<b>Tabela 3:</b> Comparação do desempenho do método proposto com resultados obtidos em trabalhos anteriores .....	39
<b>Tabela 4:</b> Concentrações de ampicilina por cápsula obtidas pelo método BIA proposto, CLAE-UV Espectrofotometria UV-Vis. ....	41

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

<b>AMP</b>	Ampicilina
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>BIA</b>	Análise por Injeção em Batelada
<b>BR</b>	Tampão Britton-Robbinson
<b>CLAE</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>ECV</b>	Eletrodo de carbono vítreo
<b>DPR</b>	Desvio Padrão Relativo
<b>Epa</b>	Potencial de pico anódico
<b>Epc</b>	Potencial de pico catódico
<b>FIA</b>	Análise por Injeção em Fluxo
<b>Ipa</b>	Corrente de pico anódico
<b>Ipc</b>	Corrente de pico catódico
<b>LD</b>	Limite de Detecção
<b>LQ</b>	Limite de Quantificação
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PCI</b>	Placa de Circuito Impresso
<b>UV-Vis</b>	Espectrofotometria de ultravioleta e visível
<b>VC</b>	Voltametria Cíclica
$\nu$	Velocidade de varredura
$\lambda$	Comprimento de onda

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
1.1. INTRODUÇÃO GERAL	15
1.2. JUSTIFICATIVA DO TEMA	16
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
2.1. OBJETIVO GERAL	17
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
<b>3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>18</b>
3.1. AMPICILINA	18
3.1.1. DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DE AMPICILINA	19
3.2. TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS	20
3.3. ANÁLISE POR INJEÇÃO EM BATELADA (BIA) COM DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA	21
<b>4. PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>24</b>
4.1. REGENTES, SOLUÇÕES E AMOSTRA	24
4.2. INSTRUMENTAÇÃO	25
4.3. CONSTRUÇÃO DOS ELETRODOS	25
4.3.1. ELETRODO DE TRABALHO (PLACA DE CIRCUITO IMPRESSO DE COBRE - PCI)	25
4.3.2. ELETRODO DE REFERÊNCIA (AG/AGCL/KCL <sub>SAT</sub> )	26
4.3.3. ELETRODO AUXILIAR (FIO DE PLATINA)	26
4.4. MEDIDAS ELETROQUÍMICAS	26
4.5. ANÁLISE COMPARATIVA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) PARA DETERMINAÇÃO DE AMPICILINA	28
4.6. ANÁLISE COMPARATIVA POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS PARA DETERMINAÇÃO DE AMPICILINA	28
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	<b>30</b>
5.1. COMPORTAMENTO VOLTAMÉTRICO DA AMPICILINA	30
5.1.1. ESCOLHA DO ELETRÓLITO DE SUPORTE	32
5.1.2. ESTUDO DO PH	33
5.1.3. SELEÇÃO DO POTENCIAL DE TRABALHO	35

<b>5.2. ANÁLISE POR INJEÇÃO EM BATELADA COM DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA (BIA-AMPE)</b>	<b>35</b>
5.2.1. INFLUÊNCIA DA AGITAÇÃO	36
5.2.2. VOLUME DE INJEÇÃO E VAZÃO DA MICROPIPETA	36
5.2.3. REPETIBILIDADE E LINEARIDADE	37
5.2.4. APLICAÇÃO EM AMOSTRA COMERCIAL DO FÁRMACO	40
<b>5.3. VALIDAÇÃO DO MÉTODO</b>	<b>40</b>
<b><u>6. CONCLUSÃO</u></b>	<b><u>43</u></b>
<b><u>REFERÊNCIAS</u></b>	<b><u>44</u></b>

# 1. INTRODUÇÃO

---

## 1.1. Introdução Geral

Os antibióticos constituem um grupo de medicamentos naturais ou sintéticos que podem ser caracterizados como bactericidas, quando são capazes de causar a morte de bactérias e fungos, ou ainda, bacteriostáticos quando inibem o seu crescimento [1]. A sua descoberta é considerada um dos eventos mais importantes da saúde nos tempos modernos, e não apenas pelo seu impacto no tratamento de doenças infecciosas, mas também por seus efeitos em outras atividades biológicas [2].

Dentre os diversos tipos de antibióticos há o grupo dos  $\beta$ -lactâmicos, os quais apresentam em sua estrutura o anel  $\beta$ -lactâmico, na maioria das vezes fundido a outro anel heterocíclico de cinco membros, a tiazolidina [3]. A especificidade biológica desse grupo de antibióticos é devido a sua interferência na biossíntese do peptidoglicano, um polímero constituído de açúcares e aminoácidos que envolve completamente as bactérias, dando rigidez à parede celular e protegendo-as de sua própria pressão osmótica [4].

A ampicilina é um antibiótico pertencente ao grupo dos  $\beta$ -lactâmicos e um derivado da penicilina, sendo classificada como uma aminopenicilina semi-sintética [5]. Os antibióticos a base de penicilina constituem o mais importante grupo de antimicrobianos, sendo esses compostos os mais utilizados para essa finalidade a mais de 80 anos [6]. Devido a vital importância desses antibióticos em fluidos biológicos e em preparações farmacêuticas torna-se de grande importância o desenvolvimento de métodos mais sensíveis, seletivos e de menor custo, capazes de quantificar com precisão e exatidão esse composto nas mais diferentes matrizes.

Diversas técnicas analíticas têm sido utilizadas na determinação desses compostos em várias amostras de fármacos e fluidos biológicos, dentre elas pode-se destacar as técnicas cromatográficas [7] [8], espectrofotométricas [9] [10] e amperométricas [11] dentre as quais os métodos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por espectrometria de massas e UV-Vis são os mais utilizadas [12].

Por outro lado, as técnicas eletroanalíticas apresentam algumas vantagens na determinação do princípio ativo em formulações farmacêuticas e em compostos bioativos quando comparadas às técnicas convencionais supracitadas, podendo-se destacar pela simplicidade na operação, rapidez na resposta analítica, custo instrumental relativamente baixo



e sensibilidade [11] [13]. Estudos relacionados à oxidação eletroquímica de ampicilina, bem como de outros antibióticos da mesma classe [11] [14], permitem a determinação desses compostos por meio de técnicas eletroanalíticas.

Segundo Angnes e Quintino (2004) a técnica de Análise por Injeção em Batelada (BIA) associada a um sistema de detecção amperométrica tem se mostrado uma poderosa ferramenta para análises farmacêuticas, ambientais e de alimentos [15].

A Análise por Injeção em Batelada (BIA) foi proposta por Wang e Taha (1991) [16] na qual realiza-se injeções de pequenos volumes do padrão ou da amostra que se deseja analisar diretamente na superfície do eletrodo de trabalho utilizando uma micropipeta. O eletrodo de trabalho permanece imerso em um grande volume de eletrólito de suporte, de maneira que ao se injetar o padrão ou a amostra estes sejam imediatamente diluídos no eletrólito após a obtenção do sinal transiente. Essa técnica apresenta vantagens com relação a Análise por Injeção em Fluxo (FIA) por não haver a necessidade da utilização de injetores e bombas além de manter características desta, tais como: alta velocidade de análise, simplicidade, sensibilidade, repetibilidade e possibilidade de se trabalhar com baixos volumes de reagentes e amostras [15].

## **1.2. Justificativa do tema**

A ampicilina, bem como os demais compostos derivados de penicilina, tem sido o grupo de antimicrobianos mais utilizados há pelo menos 80 anos, e ainda constituem o mais importante grupo de antibióticos [6]. Diante disso, torna-se necessário o desenvolvimento de técnicas capazes de monitorar sua biodisponibilidade nas mais diferentes matrizes, como por exemplo em fármacos.

Alguns métodos de determinação analítica de ampicilina já foram desenvolvidos e estão disponíveis na literatura, como citados anteriormente, porém os mesmos demandam elevados custo, tempo de análise e/ou necessitam de tratamento prévio da amostra.

Desta forma, propõe-se o método de Análise por Injeção em Batelada (BIA) com detecção amperométrica como uma técnica eletroanalítica rápida, direta, sensível, exata, precisa e de baixo custo, para determinação de ampicilina em fármacos, uma vez que não há relatos na literatura da utilização desta técnica para tal finalidade.

## 2. OBJETIVOS

---

### 2.1. Objetivo Geral

Desenvolver um método de Análise por Injeção em Batelada (BIA) com detecção Amperométrica utilizando eletrodo de placa de circuito impresso de cobre para determinação rápida e direta de ampicilina em formulações farmacêuticas.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o comportamento ciclovoltamétrico da ampicilina frente ao eletrodo de cobre;
- Otimizar parâmetros experimentais como: eletrólito de suporte, pH do meio, potencial de trabalho, volume de injeção, vazão da micropipeta e influência da agitação;
- Aplicar o método desenvolvido na determinação de ampicilina em amostras comerciais do fármaco;
- Validar o método desenvolvido comparando seus resultados com análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Espectrofotometria UV-Vis.

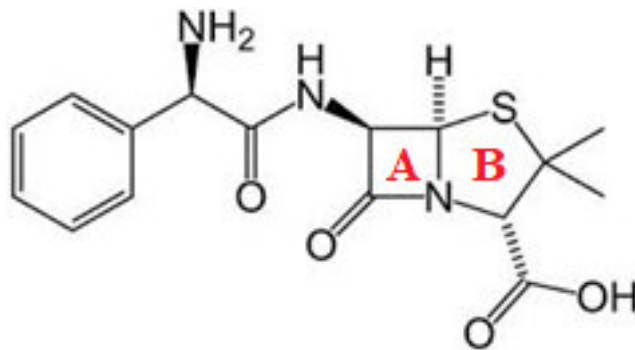
### 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

---

#### 3.1. Ampicilina

A ampicilina (AMP) é um antibiótico que pertence ao grupo dos  $\beta$ -lactâmicos, sendo este formado por compostos que possuem como estrutura básica a penicilina, estrutura essa formada por um anel  $\beta$ -lactâmico (A) ligado a um outro anel heterocíclico denominado tiazolidina (B), como mostrado na Figura 1, sendo estes os principais responsáveis pela atividade biológica dessas substâncias. Os compostos deste grupo diferem-se entre si apenas pelos substituintes ligados à sua estrutura básica [17].

**Figura 1:** Estrutura química da ampicilina: (A) anel  $\beta$ -lactâmico e (B) anel tiazolidínico.



O mecanismo de ação da ampicilina, bem como dos demais antibióticos que pertencem ao grupo dos  $\beta$ -lactâmicos, baseia-se em sua capacidade de inibir a síntese do peptidoglicano [18], um polímero complexo formado por polissacarídeos e polipeptídeos, que conferem proteção, garantem o crescimento e o desenvolvimento desses micro-organismos, e sem o qual a bactéria não se manteria íntegra [19].

A ampicilina é indicada no tratamento de uma série de doenças, dentre as quais podem se destacar: infecções otorrinolaringológicas e urinárias, sinusite, meningite [20], bronquite crônica [5] dentre outras. É ainda utilizada antes da realização de procedimentos cirúrgicos gastrointestinais e geniturinários, bem como de maneira profilática contra a doença perinatal causadas por estreptococos do Grupo B [21].

Quanto à toxicidade desses compostos, a mesma é considerada baixa quando comparada a outros antibióticos, sendo uma das classes mais seguras de antimicrobianos. Possíveis efeitos colaterais graves causados por esses compostos estão relacionados à hipersensibilidade, eventuais reações adversas são brandas e dentre elas podem-se manifestar exantemas e diarreias [21].

Atualmente a ampicilina é comercializada em três formas diferentes: anidra, triidratada e sódica. As formas anidra e triidratada são encontradas normalmente em cápsulas, pó para suspensão oral e comprimidos, sendo empregadas em formulações de uso oral [22]. Já a ampicilina sódica é encontrada em formulações farmacêuticas para aplicação intramuscular ou intravenosa [23].

### ***3.1.1. Determinação analítica de ampicilina***

Inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas a nível mundial a respeito do controle de qualidade na produção de fármacos, uma vez que, de acordo com a OMS (Organização Mundial da Saúde), é necessário garantir que os medicamentos produzidos atendam às necessidades prioritárias da saúde e aos padrões de qualidade, eficácia e de segurança, caso contrário, todos os outros serviços de saúde serão certamente comprometidos [24]. Dessa forma é de fundamental importância o desenvolvimento de métodos analíticos eficazes e de confiança para controle de qualidade de medicamentos, e que esses possam ser utilizados em análises de rotina [25].

Diversas técnicas analíticas têm sido desenvolvidas para determinação de ampicilina nas mais diferentes matrizes, sejam elas fármacos, fluidos biológicos, dentre outras.

Métodos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando coluna de fase reversa, fase móvel composta por tampão fosfato e acetonitrila em sistema de eluição gradiente, detector UV [26] [27] e Espectrômetro de Massas [28] foram desenvolvidos para quantificação de ampicilina em medicamentos e amostras de efluentes respectivamente, os quais se mostraram sensíveis com limites de quantificação que atingem uma escala de  $10^{-12}$  mol L<sup>-1</sup>.

Um método utilizando Cromatografia em Camada Delgada (CCD) também é reportado na literatura para testes de controle de qualidade em medicamentos à base de ampicilina, para tal utilizou-se placas recobertas com silicato de titânio (IV) e como fase móvel empregou-se uma mistura 1:1 de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,1 mol L<sup>-1</sup>) e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,1 mol L<sup>-1</sup>). O método mostrou-se rápido, seletivo, preciso e exato, sendo indicado para análises de rotina [29].

Espectrofotometria UV-Vis também tem sido utilizada na determinação de ampicilina em formulações farmacêuticas [30], nesses casos é realizado procedimentos de pré-tratamento da amostra onde a ampicilina é complexada com reagentes adequados dando origem a soluções de coloração intensa e conseqüentemente obtendo-se maiores valores de absorvância. A espectrofotometria derivada também é utilizada em alguns casos nos quais se deseja determinar

dois ou mais compostos simultaneamente em que há sobreposição de espectros, método amplamente utilizado em composições farmacêuticas, clínicas e bioquímicas [31].

Técnica de Análise por Injeção em Fluxo (FIA) acoplado a um sistema de detecção por quimioluminescência também foi utilizada para quantificação de ampicilina em amostras de medicamento e urina. O método baseia-se na interação entre a ampicilina e um complexo Ag-luminol, o qual mostrou-se sensível com limite de detecção de 169 ng/mL e recuperação entre 104 – 106% [6].

Técnicas de Eletroforese Capilar acopladas a Espectrofotômetro UV-Vis [31] e Espectrômetro de Massas [32] também foram desenvolvidas para separação e quantificação de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, inclusive ampicilina, em amostras de leite bovino e músculos de frango respectivamente. Resultados apresentam limites de detecção de 8  $\mu$ g/kg em amostras de músculo de frango e taxas de recuperação superiores a 72% para testes realizados em amostras de leite.

### 3.2. Técnicas Eletroanalíticas

As técnicas eletroanalíticas constituem um conjunto de métodos qualitativos e quantitativos utilizados na determinação de um analito por meio de sua eletrólise, processo em que uma determinada reação química é forçada a ocorrer na superfície de um eletrodo, devido a imposição de uma diferença de potencial elétrico [33].

Dentre as técnicas eletroanalíticas conhecidas, a voltametria destaca-se por possibilitar análises de amostras com pouca ou nenhuma etapa de tratamento, logo essas etapas podem trazer o risco de contaminação às amostras. Em voltametria as informações são obtidas a partir do registro de curva de corrente versus potencial feitas durante a eletrólise [34].

A amperometria é o outro exemplo de técnica eletroanalítica, na qual aplica-se um potencial elétrico constante e a intensidade da corrente obtida é proporcional à concentração da espécie eletroativa no meio. Esta técnica pode ser utilizada, por exemplo, no monitoramento da concentração de um determinado analito durante uma titulação para fixação do ponto final. Os resultados para esta técnica são expressos em um gráfico de corrente versus tempo [33].

A magnitude da corrente produzida pelas reações de oxirredução é mensurada a partir da aplicação de uma diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência

no interior de uma célula eletroquímica, essas reações ocorrem, mais precisamente, interface eletrodo/solução [35].

A célula eletroquímica é o meio onde ocorrem as reações, ela é composta por pelo menos dois eletrodos, um eletrodo de trabalho e um de referência, sendo mais viável a utilização de um terceiro eletrodo denominado eletrodo auxiliar ou conta-eletrodo. O eletrodo de trabalho deve ser constituído de materiais condutores, permitindo assim a sua polarização, como por exemplo C, Au, Cu, Pt, Ni dentre outros. Em contrapartida, o eletrodo de referência não deve sofrer variação em seu potencial, alguns dos mais utilizados são: o eletrodo padrão de hidrogênio (EPH), eletrodos de calomelano saturado (ECS) e o eletrodo de prata/cloreto de prata ( $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}_{\text{sat}}$ ), o qual possui potencial constante durante todo o experimento que é 0,199 V, sendo este último utilizado em todas as análises eletroquímicas neste trabalho. É entre o eletrodo de trabalho e o terceiro eletrodo chamado de auxiliar que a corrente flui na célula eletroquímica, um fio de platina pode ser usado para esta finalidade [35].

O equipamento onde os sinais de excitação são gerados pela variação do potencial de maneira sistemática é chamado de potenciostato, o qual é conectado a um microcomputador que registra a corrente resultante das reações envolvidas [34].

### **3.3. Análise por Injeção em Batelada (BIA) com detecção Amperométrica**

A Análise por Injeção em Batelada (BIA) foi uma técnica proposta por Wang e Taha (1991) na qual realiza-se injeções de pequenos volumes do padrão ou da amostra, que se deseja analisar, diretamente na superfície do eletrodo de trabalho utilizando uma micropipeta. O eletrodo de trabalho permanece imerso em um grande volume de eletrólito de suporte, de maneira que ao se injetar o padrão ou a amostra, estes sejam imediatamente diluídos no eletrólito após a obtenção do sinal transiente [16].

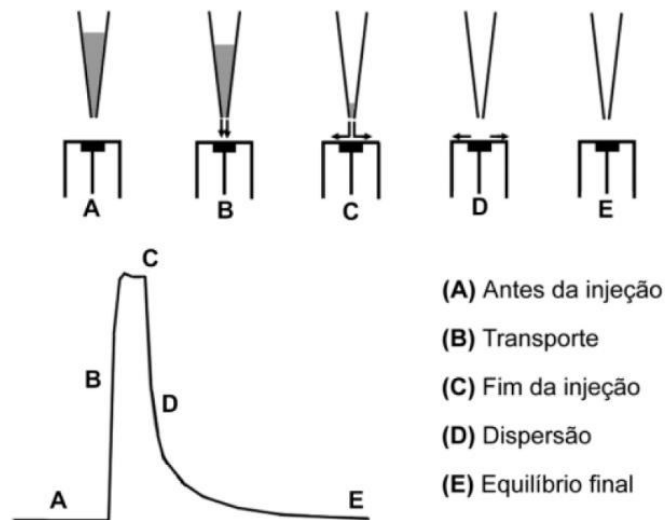
A célula eletroquímica no sistema BIA é composta por três eletrodos (trabalho, referência e auxiliar), e possui normalmente capacidade para grandes volumes de eletrólito de suporte (entre 50 e 100 mL) e os eletrodos são posicionados em locais estratégicos que permitam um encaixe reprodutível da micropipeta que será utilizada nos processos de injeção. O eletrodo de trabalho é posicionado de forma oposta ao sistema de injeção [13].

Inicialmente o método de injeção no sistema BIA era realizado utilizando micropipetas manuais, dessa forma, havia-se uma grande dependência da habilidade do operador. Atualmente, com o intuito de minimizar variações operacionais e aumentar a reprodutibilidade

do sistema, utiliza-se micropipetas motorizadas, nas quais é possível programar alguns parâmetros como volume de injeção e vazão da micropipeta [36].

O sinal analítico obtido no sistema BIA é semelhante àquele obtido em sistemas de Análise por Injeção em Fluxo (FIA), nos quais obtém-se sinais transientes proporcionais à concentração dos analitos em questão [15]. O perfil do sinal pode ser explicado pelas diferentes etapas de injeção, como mostra a Figura 2.

**Figura 2:** Etapas de injeção em sistema BIA



Fonte: Quintino e Angnes (2004)

De acordo com imagem acima, o processo de injeção no sistema BIA pode ser dividido em cinco etapas. A primeira etapa, representada pela letra (A), corresponde ao período antes da injeção, onde a corrente medida permanece constante ao longo do tempo, nesta etapa há não transferências de elétrons entre a solução e o eletrodo de trabalho, sendo esta corrente, atribuída apenas ao eletrólito de suporte (corrente capacitiva). A segunda etapa (B), corresponde ao exato momento em que é realizada a injeção da solução padrão ou amostra que se deseja analisar, na qual observa-se um rápido aumento na intensidade da corrente referente ao processo redox ocorrido na interface eletrodo/solução. Após a finalização da injeção (etapa C) a corrente atinge um valor máximo, e depois esse valor começa a diminuir (etapa D) na proporção em que a solução injetada dilui-se no eletrólito de suporte, reestabelecendo-se as condições iniciais (etapa E) [15].

A utilização de técnicas eletroanalíticas, principalmente amperometria e voltametria, como método de detecção acoplado ao sistema BIA, vem ganhando bastante espaço em pesquisas que utilizam este método para determinações individuais ou simultâneas nas mais

variadas amostras, principalmente em formulações farmacêuticas, alimentos e antioxidantes em combustíveis [37] [38]. Além disso há a possibilidade de se utilizar tanto eletrodos quimicamente modificados quanto eletrodos livres de qualquer modificação como por exemplos, a utilização de eletrodos impressos de pasta de carbono e filmes fino de metais como o ouro [39] [40].

O sistema BIA também pode ser operado com ou sem processos de agitação mecânica, porém esse procedimento não influencia na magnitude do sinal obtido, este parâmetro apenas influencia no processo de diluição da amostra fazendo com que, em alguns casos, o sinal retorne à linha base mais rapidamente, aumentando a frequência analítica do método [41].

A utilização do sistema BIA com detecção amperométrica permite ainda a realização de ensaios em amostra real sem a necessidade de utilização de eletrólitos de suporte ou análises em meios mais resistivos. Isso é possível injetando-se a amostra diretamente e de forma rápida na superfície do eletrodo de trabalho, criando-se uma zona fina sobre a superfície do eletrodo. No entanto, é importante ter em mente que, em alguns casos, a modificação na dupla camada elétrica pode gerar mudanças significativas de sinal e aumento da queda ôhmica, podendo assim deslocar o potencial onde ocorre a reação redox de interesse [15].



## 4. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1. Regentes, soluções e amostra

Os reagentes utilizados nas análises eram de grau analítico e as soluções foram preparadas utilizando água deionizada em sistema de purificação MilliQ (Millipore), bem como no preparo das amostras do fármaco. Na Tabela 1 estão apresentados todos os reagentes utilizados nas análises e suas respectivas procedências:

**Tabela 1:** Lista de reagentes utilizados e suas respectivas procedências.

REAGENTE	ORIGEM
Ampicilina sódica (C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>4</sub> S)	Sigma-Aldrich
Ácido fosfórico (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	Isofar
Ácido nítrico (HNO <sub>3</sub> )	
Ácido clorídrico (HCl)	
Ácido acético (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> )	Merck S.A
Ácido bórico (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	
Cloreto de potássio (KCl)	
Ácido fórmico (CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	
Acetonitrila (C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N)	
Sulfato de cobre (CuSO <sub>4</sub> )	Dinâmica
Hidróxido de sódio (NaOH)	

As soluções padrão de ampicilina eram preparadas diariamente, diluindo-se em água deionizada a quantidade necessária do padrão para uma solução de concentração igual a 10 mmol L<sup>-1</sup>, sendo esta a solução padrão de trabalho. As amostras foram adquiridas em farmácia local e consistiu em uma caixa deste medicamento contendo 10 cápsulas de ampicilina 500 mg. As soluções de amostra do fármaco foram preparadas a partir da mistura do conteúdo de 10 cápsulas do medicamento, em seguida era pesada a massa referente a uma cápsula, diluída em água deionizada e submetida a banho ultrassom durante 20 minutos.

Nos testes de verificação da resposta eletroquímica da ampicilina, variação do eletrólito de suporte e do pH do meio, foram utilizados como eletrólito de suporte as seguintes soluções: tampão acetado e tampão fosfato, os quais foram obtidos a partir de soluções dos respectivos ácidos na concentração de 0,1 mol L<sup>-1</sup> e adicionou-se em seguida alíquotas de solução de NaOH 2,0 mol L<sup>-1</sup> até atingir o pH desejado; tampão Britton-Robinson, obtido por meio da mistura de ácido acético (0,1 mol L<sup>-1</sup>) ácido fosfórico (0,1 mol L<sup>-1</sup>) e ácido bórico (0,1 mol L<sup>-1</sup>) seguido da

adição de alíquotas de NaOH 2,0 mol L<sup>-1</sup> para o ajuste do pH nos valores desejados; solução de KCl e NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> preparadas por meio da dissolução destes reagentes em água deionizada na proporção indicada para esta concentração. Todas as soluções foram preparadas conforme procedimentos descritos na literatura [42].

## 4.2. Instrumentação

Os procedimentos eletroquímicos foram realizados utilizando-se um potenciostato Ivium-n-Star controlado pelo software IviumSoft<sup>TM</sup> Electrochemistry, conectado a um microcomputador e um sistema composto por uma célula eletroquímica e três eletrodos, sendo eles: eletrodo de trabalho (eletrodo de cobre e placas de circuito impresso de cobre), de referência (Ag/AgCl/KCl<sub>sat</sub>) e eletrodo auxiliar de platina.

No preparo das soluções tampão foi utilizado um medidor de pH modelo 827 pH Lab Metrohm. Um sistema de banho ultrasson da Unique® USC-1400 foi utilizado para melhor solubilização das amostras do fármaco e na remoção de partículas de alumina que poderiam estar retidas na superfície do eletrodo após processos de polimento. Para agitação no sistema BIA foi utilizado um agitador magnético modelo 751 da Fisaton Equipamentos Científicos Ltda.

## 4.3. Construção dos eletrodos

Todos os eletrodos utilizados nas medidas em sistema BIA foram construídos no próprio laboratório de eletroquímica, e os procedimentos de obtenção estão descritos a seguir:

### 4.3.1. Eletrodo de trabalho (placa de circuito impresso de cobre - PCI)

Placas de circuito impresso (PCI) de cobre foram utilizadas como eletrodo de trabalho no sistema BIA. Este produto consiste em placas de fenolite, um material laminado plástico, denso, duro e termofixo, utilizado normalmente como isolante elétrico. Sobre a superfície deste material é eletrodepositado uma fina camada de cobre altamente puro em um processo denominado galvanoplastia [43].

As PCI's foram adquiridas em uma loja virtual que comercializa equipamentos eletrônicos e possuíam seguintes dimensões: 100 mm de largura, 150 mm de comprimento e 1,6 mm de espessura. Dessa forma, as placas foram adaptadas a dimensões ideais para sua utilização na célula BIA (10 x 55 x 1,6 mm), para isso utilizou-se uma máquina de corte Bremel<sup>®</sup> 4000.

Antes da sua utilização, as placas formam limpas por imersão em solução de  $\text{HNO}_3$  10%, e posteriormente, lavadas abundantemente com água destilada.

#### 4.3.2. Eletrodo de referência ( $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}_{\text{sat}}$ )

Tomando-se um fio de prata previamente limpo, este foi polido com lixa d'água e lavado com água destilada. Em seguida realizou-se a eletrodeposição de cloreto de prata na superfície do fio através da aplicação de potencial constante durante alguns segundos [44]. Introduziu-se o fio recoberto com o filme em uma pipeta de Pasteur adaptada para o tamanho do eletrodo, com a extremidade vedada com separador de baterias para o contato elétrico e contendo solução de  $\text{KCl}$   $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ . A extremidade superior foi vedada com uma pequena rolha de borracha e Parafilm M<sup>®</sup> deixando-se aproximadamente 1,0 cm do fio de prata exposto.

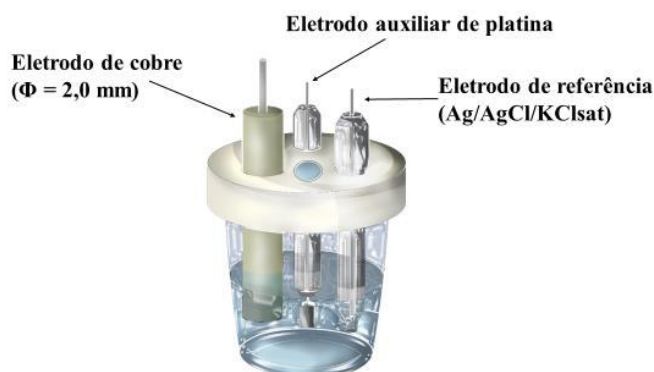
#### 4.3.3. Eletrodo auxiliar (fio de Platina)

O eletrodo auxiliar de platina foi construído tomando-se uma pipeta de Pasteur adaptada ao tamanho que se desejava obter o eletrodo e introduziu-se um fio de platina deixando 2,0 cm do fio exposto na extremidade inferior da pipeta, a qual foi selada em altas temperaturas com o auxílio de bico de Bunsen e a extremidade superior com resina epóxi Araldite. Na ponta do fio de platina foi soldado uma placa desse metal de aproximadamente  $0,5 \text{ cm}^2$ .

### 4.4. Medidas Eletroquímicas

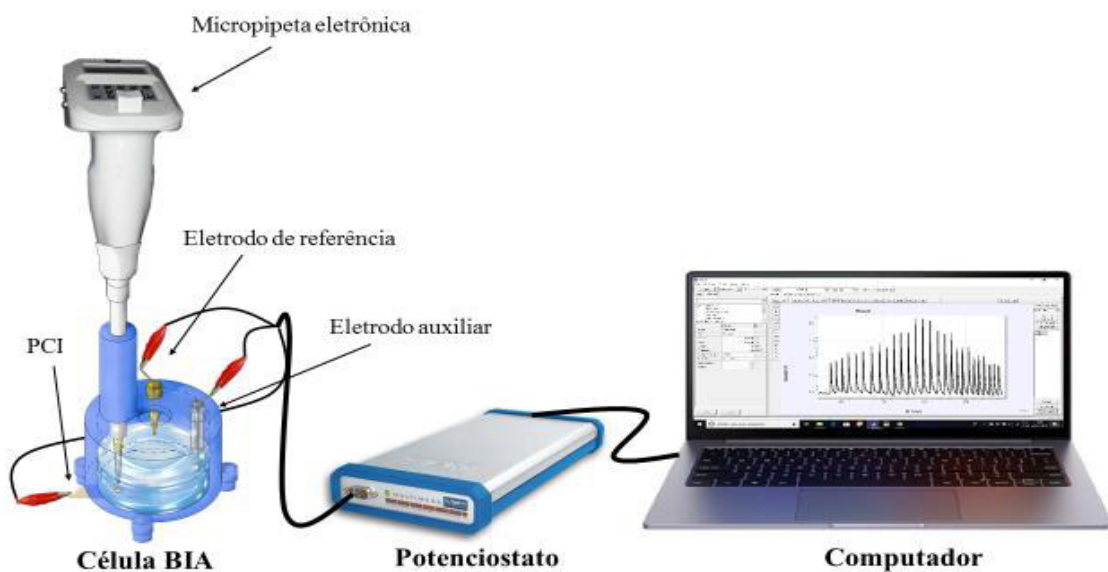
As medidas eletroquímicas foram divididas em duas etapas, primeiramente realizou-se o estudo do comportamento eletroquímico da ampicilina por voltametria cíclica (VC), para isso utilizou-se uma célula eletroquímica convencional composta por três eletrodos, como apresentada na Figura 3.

**Figura 3:** Célula eletroquímica convencional.



Nesse teste foram avaliados alguns parâmetros experimentais, tais como: efeito da variação do eletrólito de suporte e do pH do meio. No estudo do efeito da variação do eletrólito de suporte foi avaliado a resposta eletroquímica da ampicilina em cinco eletrólitos de suporte distintos, foram eles: tampão acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 4,5, tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0, tampão Britton-Robinson  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0, KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e NaOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Para os testes de variação do pH do meio sobre a resposta eletroquímica da ampicilina utilizou-se o tampão Britton-Robinson  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em uma faixa de pH entre 5,0 e 9,0.

**Figura 4:** Sistema de análise por injeção em batelada com detecção amperométrica (BIA).



Fonte: autor (2018)

A segunda etapa dos testes eletroquímicos consistiu no desenvolvimento do método proposto por meio da otimização de parâmetros instrumentais do sistema BIA. Esse sistema (Figura 4) era composto basicamente por uma célula eletroquímica, específica para este método, conectada ao potenciostato, o qual é responsável por controlar a diferença de potencial aplicada entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência, que por sua vez está conectado a um computador para processamento dos dados.

A célula eletroquímica no sistema BIA consiste em um recipiente cilíndrico com capacidade máxima de 100 mL, possui uma tampa removível e nela há três orifícios, dois para a inserção dos eletrodos auxiliar e de referência, e outro com um diâmetro maior, para a ponteira da pipeta eletrônica. Na parte inferior há um compartimento para acomodação da placa de cobre, a qual atua como eletrodo de trabalho.

Ainda nesta etapa foram avaliados o efeito da agitação do sistema sobre a velocidade do sinal transiente e parâmetros instrumentais da micropipeta eletrônica sendo eles: volume de injeção e vazão.

#### **4.5. Análise comparativa por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para determinação de ampicilina**

Os resultados obtidos por meio do método BIA foram validados comparando-os com análises feitas por CLAE utilizando método descrito na literatura para determinação de ampicilina em medicamentos [26].

As medidas foram executadas em sistema Shimadzu constituído por um módulo de distribuição de solvente com bomba de pistão duplo, coluna AQUA RP C18 (150 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m) e detector UV-Vis SPA-10 ( $\lambda = 220$  nm). A fase móvel utilizada era composta por água (A) e acetonitrila (ACN) (B), ambos acidificados com ácido fórmico 0,01%, em modo de eluição gradiente, variando-se de 0 a 70 % a concentração B entre 0 e 20 minutos como descrito na Tabela 2. Os dados foram coletados e processados usando o software Shimadzu LC Solution v. 1.25.

**Tabela 2:** Composição da fase móvel em função do tempo.

<b>Tempo (min)</b>	<b>[B] %</b>
0	0 %
6	30 %
11	70 %
20	0 %

Na realização das medidas utilizou-se solução padrão de ampicilina 6,7 mmol L<sup>-1</sup>, e duas soluções preparadas a partir de amostras comerciais do fármaco. A quantidade de ampicilina por cápsula foi calculada tomando-se a média das áreas de picos de cada amostra, comparadas com a área de pico da solução padrão, sendo todas as medidas realizadas em triplicata.

#### **4.6. Análise comparativa por Espectrofotometria UV-Vis para determinação de ampicilina**

Os resultados obtidos no método proposto foram ainda comparados com aqueles obtidos por espectrofotometria UV-Vis, utilizando um espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-1800 controlado pelo software UVProbe 2.52. A escolha do comprimento de onda a ser utilizado foi

feita por meio da varredura de absorvância variando-se o comprimento de onda entre 800 e 200 nm em solução padrão de ampicilina  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ .

Todas a soluções tanto padrão quanto as amostrar comerciais de ampicilina foram preparadas com água deionizada e a quantificação foi feita por meio da construção da curva de calibração pela medida de absorvância de soluções padrão de ampicilina entre 0,13 e 0,80  $\text{mmol L}^{-1}$  e posterior leitura de amostras do fármaco.

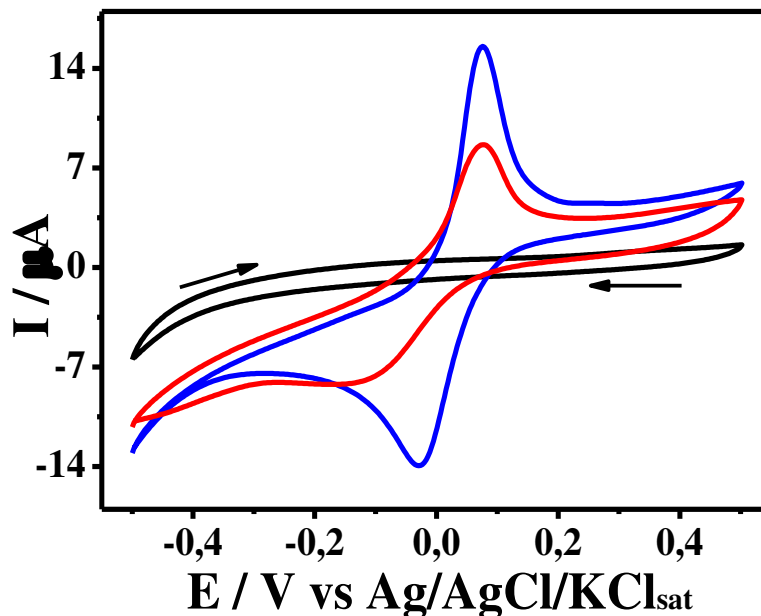
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Comportamento voltamétrico da ampicilina

O estudo do comportamento voltamétrico da ampicilina foi realizado utilizando a técnica de voltametria cíclica (VC), essa técnica foi escolhida devido à grande quantidade de informações que se pode obter por meio dela, registrando-se o voltamograma da corrente (I) gerada pela variação do potencial elétrico (E) em uma determinada faixa. O intuito destes testes iniciais foi o de comprovar a possibilidade de obtenção de uma resposta analítica da ampicilina por meio de técnicas eletroquímicas.

Trabalhos anteriormente reportados na literatura comprovam a formação de um complexo estável entre antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, dentre eles a ampicilina, e íons Cu(II) por meio de técnicas polarográficas de espectroscópicas [45] [46]. Esse fato pôde ser comprovado registrando-se o voltamogramas cíclicos do eletrodo de carbono vítreo (ECV) em uma solução aquosa contendo íons Cu(II) antes e após a adição de ampicilina, como mostra a Figura 5.

**Figura 5:** Voltamogramas cíclicos obtidos com ECV ( $\phi = 2,0$  mm) (—) no branco, tendo como eletrólito de suporte KCl  $0,1$  mol  $L^{-1}$ , (—) após a adição de  $1,0$  mmol  $L^{-1}$  de  $CuSO_4$  e (—) após adição de  $1,0$  mmol  $L^{-1}$  de AMP,  $\nu = 50$  mV  $s^{-1}$ .

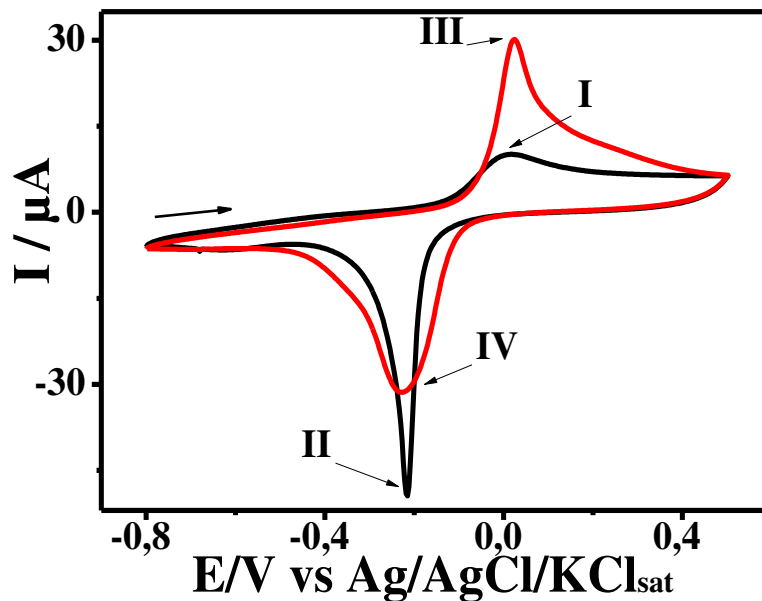


Os resultados mostram que após a adição de  $1,0$  mmol  $L^{-1}$  de  $CuSO_4$  há a formação de dois picos, um em  $E = -0,03$  V e outro em  $E = 0,07$  V, os quais correspondem respectivamente

à redução e oxidação do cobre presente no meio. Após a adição de ampicilina os valores de corrente de pico anódico ( $I_{pa}$ ) e catódico ( $I_{pc}$ ) diminuem significativamente, indicando que quantidade íons  $\text{Cu(II)}$  anteriormente livres no meio, diminuiu e agora boa parte destes encontram-se ligados à ampicilina, além disso o complexo formado mostra-se eletroquimicamente inativo na faixa de potencial estudada e nas condições avaliadas.

Alguns trabalhos reportados na literatura relatam sobre a utilização de eletrodo de cobre na determinação de substâncias que formam complexo com este metal como aminoácidos e alguns pesticidas como glifosato, em condições nas quais estes analitos não sofrem qualquer processo de oxidação e/ou redução [47]. Dessa forma, pela existência de trabalhos que comprovam a formação de complexos entre ampicilina e cobre, espera-se que seja possível a determinação desse antibiótico utilizando eletrodo de cobre, este teste foi realizado e os resultados estão apresentados na Figura 6.

**Figura 6:** Voltamograma cíclico obtido com o eletrodo de cobre ( $\phi = 2,0$  mm) em tampão BR  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0 (—) na ausência e (—) na presença de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de AMP,  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .



Os resultados mostram que, antes da adição de AMP há a formação de dois picos (I e II) em  $+0,025 \text{ V}$  e  $-0,215 \text{ V}$  respectivamente, referentes à oxidação e redução do cobre do eletrodo e conseqüentemente à formação de uma camada anódica superficial composta basicamente por óxidos de cobre ( $\text{Cu}_2\text{O}$  e  $\text{CuO}$ ) [48].

Após a adição do antibiótico, obtendo-se uma concentração de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de AMP na célula eletroquímica, verifica-se um aumento acentuado na intensidade da corrente no sentido



anódico de varredura (III), esse efeito ocorre devido à presença dos grupos funcionais amino e carboxila na molécula de ampicilina, os quais, em condições adequadas, favorecem a formação de quelatos com íons cobre que compõem a camada superficial do eletrodo. A formação desses complexos provoca a dissolução do filme superficial de óxidos de cobre do eletrodo, deslocando, pelo princípio de Le Chatelier, o equilíbrio de formação da camada no sentido dos produtos e, conseqüentemente, um aumento na corrente de oxidação proporcional à quantidade do filme consumido [47] [48].

Dessa forma, pode-se determinar AMP utilizando eletrodo de cobre, explorando o efeito da formação de complexo entre este antibiótico e os íons metálicos presentes na camada de óxidos superficial, sobre a intensidade da corrente de pico anódica, uma vez que esta aumenta proporcionalmente com a concentração de AMP.

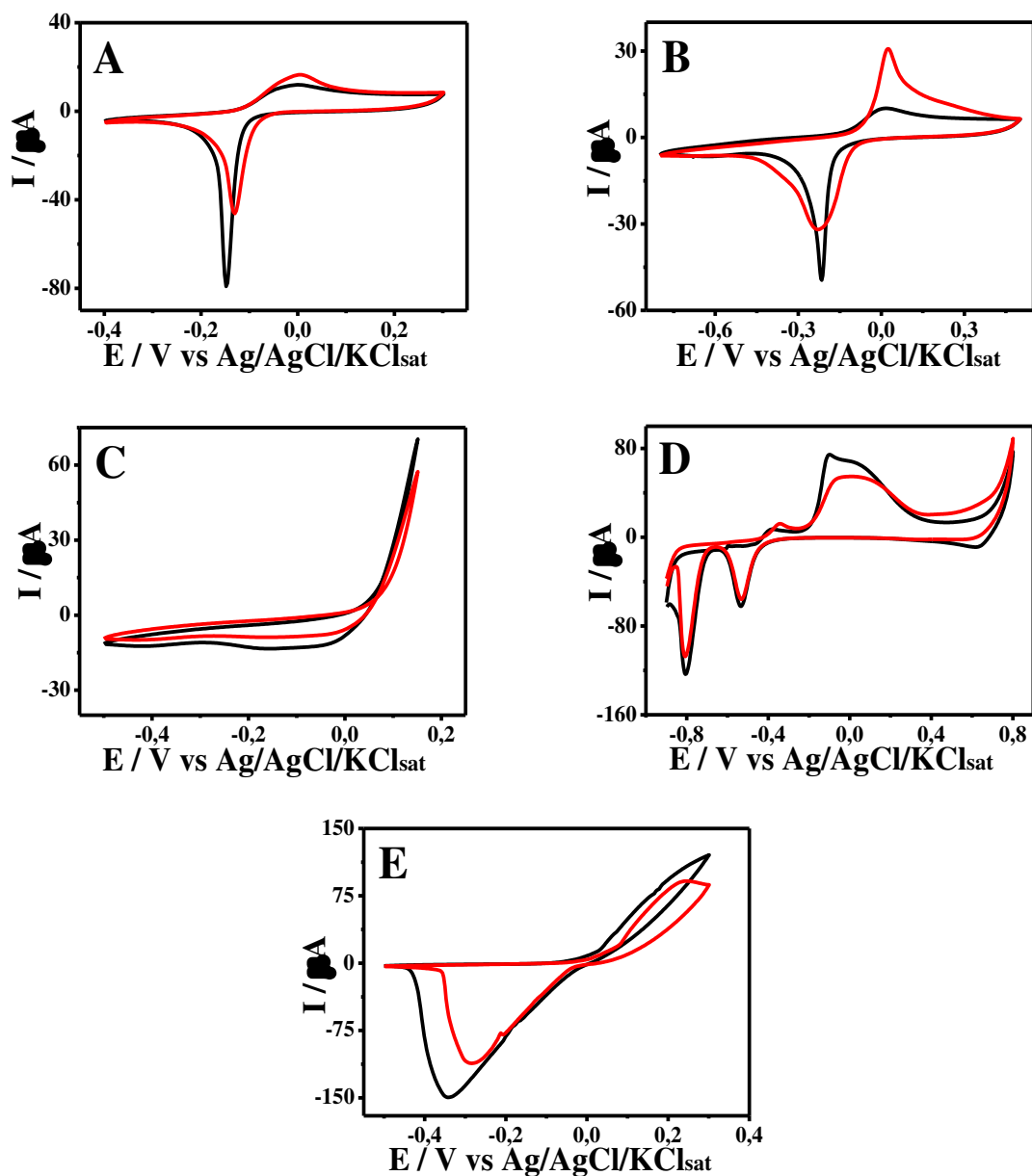
#### ***5.1.1. Escolha do eletrólito de suporte***

Um passo muito importante ao se realizar o estudo do comportamento eletroquímico de qualquer analito é a escolha do eletrólito de suporte, o qual deve ser quimicamente estável, ou seja, não sofrer qualquer tipo de reação com as espécies presentes no meio, e nem reações de oxidação e redução em toda a faixa de potencial estudada [49].

Foram avaliados cinco eletrólitos de suporte: tampão acetato (pH 4,5), tampão BR (pH 7,0) tampão fosfato (pH 7,0), NaOH e KCl todos na concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Registrou-se os voltamogramas cíclicos do eletrodo de cobre em cada um desses eletrólitos de suporte, antes e após a adição de AMP (Figura 7).

Os dados obtidos mostram que o eletrólito de suporte que mostrou melhor resposta, indicada por um aumento na  $I_{pa}$  caracterizando a presença do analito, foi o tampão BR (B) além de obter melhor definição do pico em relação aos demais. Em tampão acetato (C), NaOH (D) e em KCl (E) não se observou resposta significativa após a adição do analito. Diante disso, escolheu-se o tampão BR  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  como eletrólito de suporte ideal para determinação de ampicilina utilizando eletrodo de cobre.

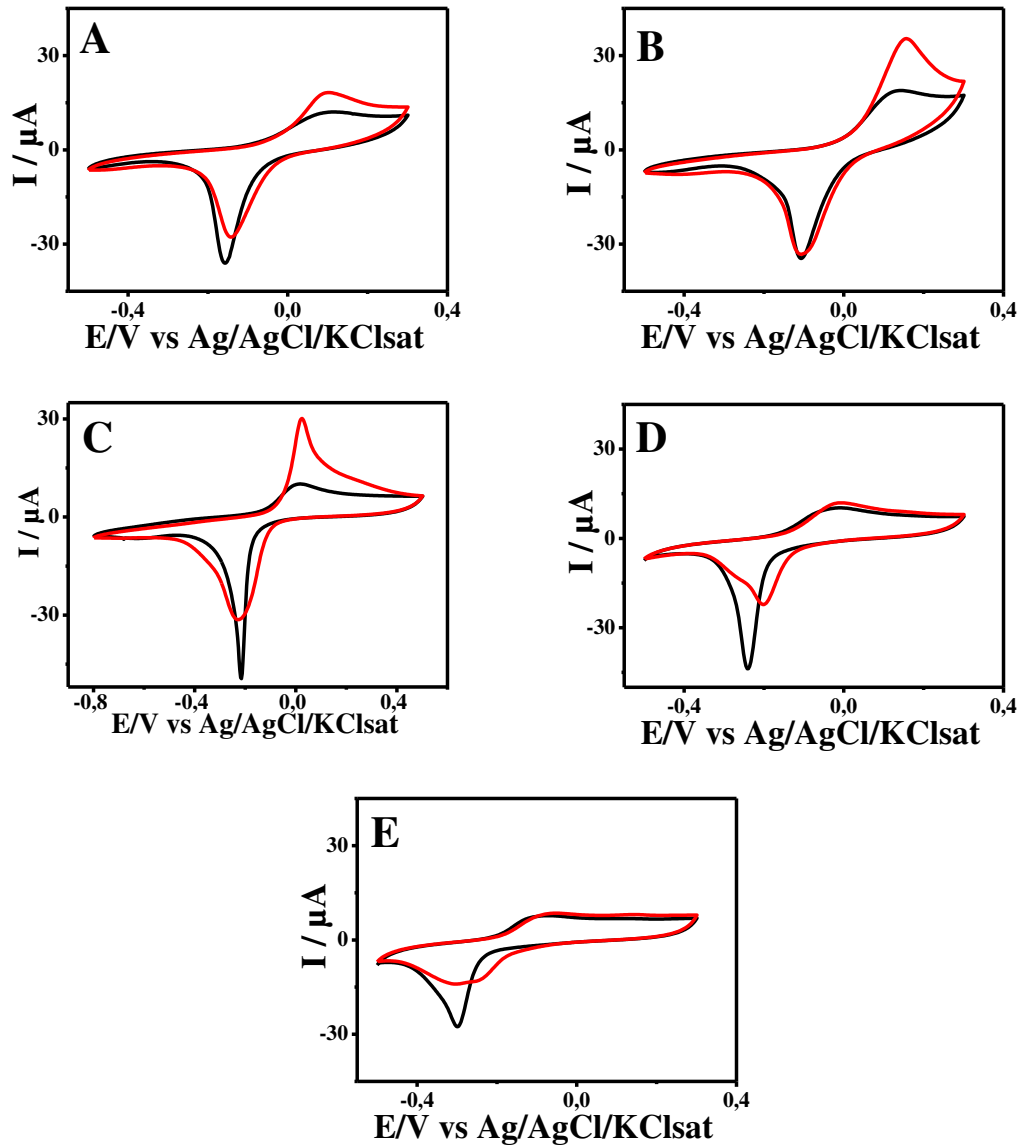
**Figura 7:** Voltamogramas cíclicos do eletrodo de cobre em (A) tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0; (B) tampão BR  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0; (C) tampão acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 4,5 (D) NaOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e (E) KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , (—) apenas no eletrólito de suporte e (—) na presença de AMP  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .



### 5.1.2. Estudo do pH

Experimentos voltamétricos também foram utilizados para verificar a influência do pH do meio sobre a resposta eletroquímica da AMP frente ao eletrodo de cobre e assim definir o melhor pH de trabalho. Para isso, tomando-se o mesmo eletrólito de suporte, variou-se o pH do meio entre 5 e 9. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 8.

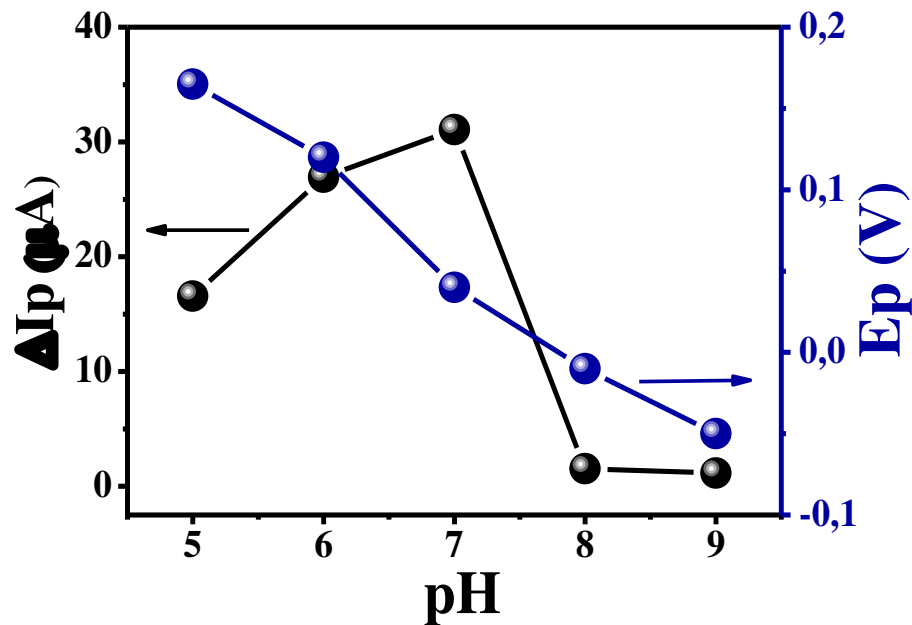
**Figura 8:** Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo de cobre ( $\phi = 2,0$  mm) em tampão BR  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH (A) 5,0 (B) 6,0 (C) 7,0 (D) 8,0 e (E) 9,0; (—) antes e (—) após adição de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de AMP,  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .



Por meio dos resultados pode-se observar um aumento crescente na  $I_{pa}$  em valores de pH entre 5,0 e 7,0 (Figura 8A, B e C), para valores de pH acima de 7,0 (Figura 8D e E) verifica-se que o sinal analítico diminui bruscamente. Isso pode ser melhor observado relacionando-se a variação da  $I_{pa}$  ( $\Delta I_{pa}$ ) em função do pH, como mostrado na Figura 9.

Por apresentar melhor resposta analítica para as condições estudadas, escolheu-se pH 7,0 como sendo o meio ideal para realização das análises. Apesar das respostas obtidas em pH 5 e 6, as análises tornam-se inviáveis nessas condições pois o antibiótico em estudo sofre degradação em meio ácido [28].

**Figura 9:** Dependência da corrente de pico anódico ( $I_{pa}$ ) e do potencial de pico anódico ( $E_{pa}$ ) em função da variação do pH.



Observa-se ainda, de acordo com a Figura 9, um deslocamento linear do potencial de pico anódico ( $E_{pa}$ ) para valores menos positivos em função do aumento do pH, avaliando-se a inclinação da curva formada pelos picos, esta possui valor igual a 0,056 V, sendo bem próximo do valor teórico (0,059 V) para reações eletroquímicas onde o número de prótons é igual ao número de elétrons [50].

### 5.1.3. Seleção do potencial de trabalho

O potencial de trabalho, ou seja, aquele que será aplicado de forma constante ao eletrodo de trabalho nos testes amperométricos, foi definido como sendo o potencial de pico anódico obtido nos testes voltamétricos. De acordo com a Figura 6 observa-se que o sinal analítico referente à presença de ampicilina possui um valor máximo em  $E = +0,025V$ , dessa forma esse foi o potencial escolhido para os testes BIA com detecção amperométrica.

## 5.2. Análise por Injeção em Batelada com Detecção Amperométrica (BIA-AMPE)

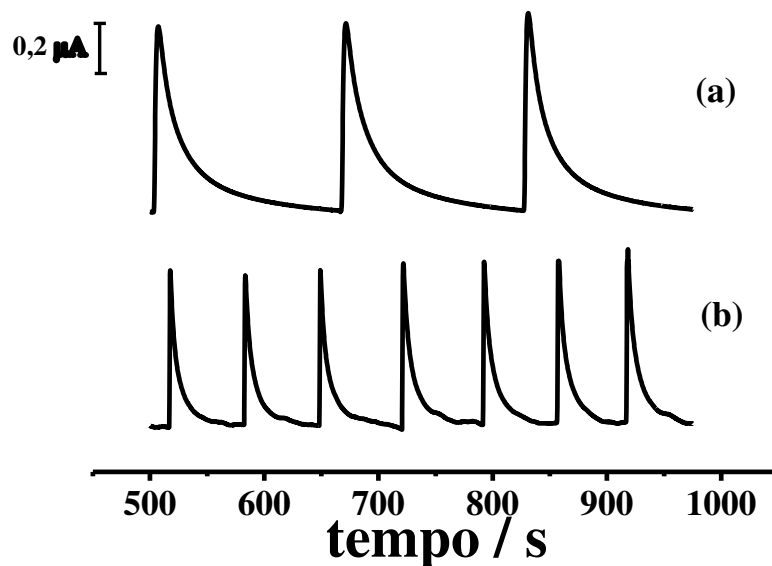
A partir dos resultados obtidos nos experimentos voltamétricos definiu-se alguns parâmetros a serem utilizados no sistema BIA, tais como: eletrólito de suporte, pH do meio e potencial de trabalho. A partir disso, otimizou-se os parâmetros específicos do sistema BIA.

### 5.2.1. Influência da agitação

O primeiro parâmetro relacionado ao sistema BIA a ser avaliado foi a influência da agitação. Tal experimento foi executado injetando alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  da solução padrão de ampicilina 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  avaliando-se o tempo necessário para que o sinal analítico retornasse à linha base.

Verifica-se que nos experimentos realizados sob agitação (Figura 10b), após a formação do sinal transiente a corrente volta mais rapidamente à linha base quando comparado ao mesmo experimento realizado sem agitação (Figura 10a), proporcionando maior frequência analítica e consequentemente maior rapidez na execução do método.

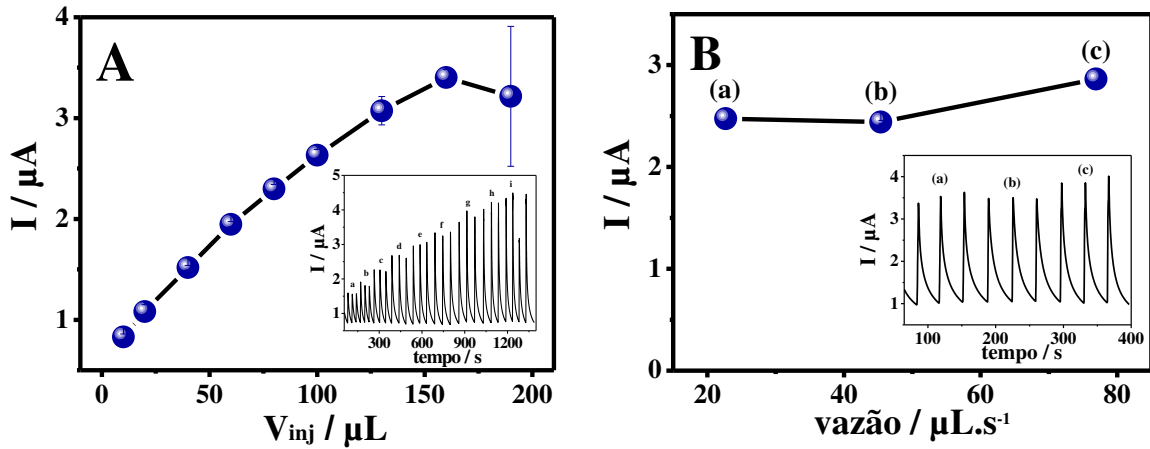
**Figura 10:** Influência da agitação do meio na obtenção do sinal analítico: (a) sistema em repouso e (b) sob agitação.



### 5.2.2. Volume de injeção e vazão da micropipeta

Posteriormente foram otimizados os demais parâmetros, sendo eles o volume de injeção e a vazão da micropipeta eletrônica. Os resultados para volume de injeção (Figura 11A) mostram que o sinal analítico aumenta proporcionalmente ao volume injetado, porém para volumes acima de 100  $\mu\text{L}$  geram-se maiores valores de desvio padrão relativo (DPR), portanto a fim de obter melhores valores analíticos com menor DPR, o volume de injeção de 100  $\mu\text{L}$  foi escolhido como sendo o volume ideal para os testes em BIA.

**Figura 11:** (A) Efeito da variação do volume de injeção (10 – 190  $\mu\text{L}$ ); (B) Efeito de variação da vazão, (a) 22,7  $\mu\text{L s}^{-1}$ , (b) 45,4  $\mu\text{L s}^{-1}$  e (c) 76,9  $\mu\text{L s}^{-1}$ , para solução padrão de AMP 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em sistema BIA com detecção amperométrica em tampão BR (pH 7,0);  $E = +0,025 \text{ V}$ ;  $V_{\text{inj}} = 100 \mu\text{L}$ .



Os resultados para vazão (Figura 11B) da micropipeta mostram que esse parâmetro não influencia significativamente nos valores de corrente, havendo uma pequena variação entre elas. Dessa forma, foi escolhido para os experimentos posteriores uma vazão de 76,9  $\mu\text{L s}^{-1}$  pois nele obteve-se menor valor de DPR entre as injeções.

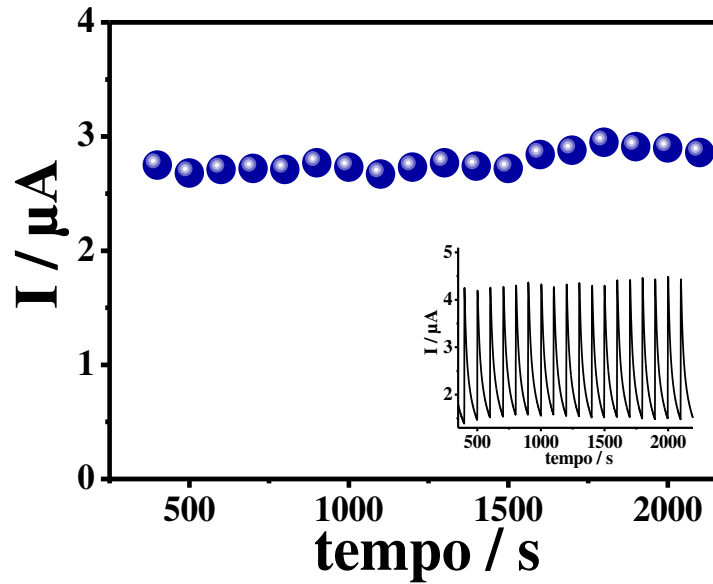
### 5.2.3. Repetibilidade e linearidade

Um experimento de repetibilidade foi realizado com o objetivo de avaliar a precisão deste método, para este teste utilizou-se o mesmo valor de concentração do analito em todas as injeções, volume de injeção e vazão otimizados anteriormente.

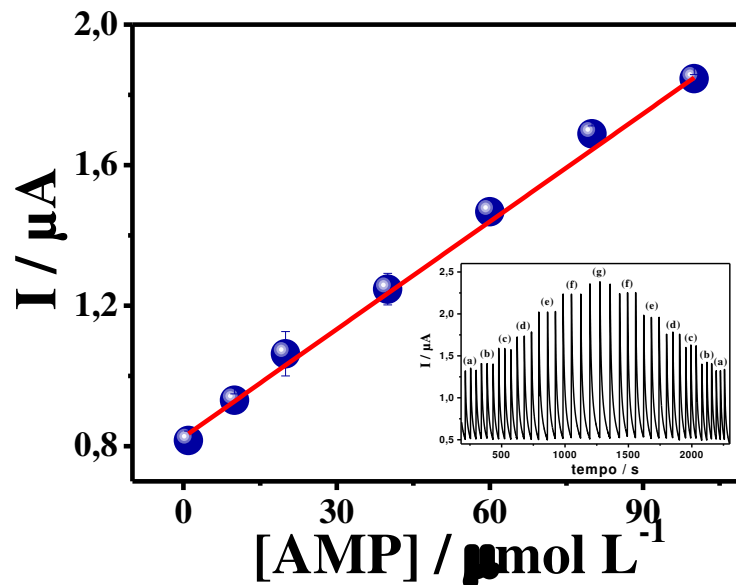
Os resultados apresentados na Figura 12 mostram que não há variação significativa entre as correntes registradas para essas condições ao longo de 18 injeções, bem como um baixo valor de DPR (3,1%). A boa precisão do método pode ser justificada pela utilização de micropipeta eletrônica, pois esta possibilita a realização de injeções com volumes e velocidades extremamente precisos. Esses resultados atestam ainda o bom desempenho e a estabilidade do eletrodo de cobre.

Já a linearidade da resposta eletroquímica foi avaliada realizando-se injeções de soluções padrão do antibiótico em ordem crescente e decrescente de concentração e em triplicata. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 13.

**Figura 12:** Resultado dos experimentos de repetibilidade do método BIA para sucessivas injeções (n=18) de ampicilina  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  em tampão BR  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0 como eletrólito de suporte;  $E = +0,025\text{V}$ ;  $V_{inj} = 100 \mu\text{L}$ ; vazão =  $76,9 \mu\text{L s}^{-1}$ .



**Figura 13:** Curva de calibração construída a partir da obtenção do amperograma após adição de soluções padrão de ampicilina nas concentrações (a) 1,0; (b) 10,0; (c) 20,0; (d) 40,0; (e) 60,0 e (f)  $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Inserido: Amperograma de BIA para análise de ampicilina. Parâmetros: eletrólito de suporte: tampão BR  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0; potencial de trabalho:  $+0,025\text{V}$  vs  $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}_{\text{sat}}$ ;  $V_{inj}$ :  $100 \mu\text{L}$ .



O sistema apresentou comportamento devidamente linear em toda faixa de concentração estudada com coeficiente de correlação adequado ( $R = 0,998$  para concentrações decrescentes). Os coeficientes angular e linear foram respectivamente  $0,0102 \pm 0,0001$  e  $0,8258 \pm 0,0096$  e os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados com base nas seguintes fórmulas [33]:

$$LD = \frac{3 \times Sb}{B} \qquad LQ = \frac{10 \times Sb}{B}$$

Onde: Sb = desvio padrão de dez leituras do branco; B = inclinação da curva de calibração  
Obtendo-se valores de 0,250  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para o limite de detecção e 0,832  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para limite de quantificação.

O LD estimado é compatível com os demais métodos utilizados na determinação de AMP, como mostrado na Tabela 3, com exceção das técnicas cromatográficas, que normalmente apresentam LD's e LQ's inferiores às demais técnicas. Os métodos cromatográficos são empregados quando as concentrações de antibiótico na matriz são extremamente baixas, porém há a necessidade de um tratamento prévio da amostra além da utilização de solventes com elevado grau de pureza, isso demanda um custo elevado quando comparados às demais técnicas.

**Tabela 3:** Comparação do desempenho do método proposto com resultados obtidos em trabalhos anteriores <sup>a</sup>.

TÉCNICA	PARÂMETROS	FAIXA DE TRABALHO ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	LD ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	REFERÊNCIA
AMP	FDCMCPE	40,0 – 700	0,67	[11]
VPD	MIP/MWCNTs/AuNPs/Pt	0,01 – 5,00	1,00	[51]
HPLC-UV	FM: ácido fosfórico/acetonitrila FE: C18 3,0 $\mu\text{m}$ (150 mm x 4,6 mm) $\lambda$ : 220 nm	0,538 – 0,808	-	[26]
HPLC-MS	MP: ácido fórmico/acetonitrila SP: C18 2,5 $\mu\text{m}$ (50 mm x 2,1 mm)	2,69x10 <sup>-6</sup> – 1,34x10 <sup>-6</sup>	2,42x10 <sup>-6</sup>	[28]
UV-VIS	$\lambda$ : 463 nm	5,38 – 215,4	4,03	[52]
BIA	WE: Cu SE: Tampão BR (pH 7,0) E <sub>w</sub> : +0,025V	1,00 – 100,0	0,25	Este trabalho

<sup>a</sup>AMP – Amperometria. FDCMCPE - Eletrodo de pasta de carbono modificado com ácido ferrocenodicarboxílico. MIP/MWCNTs/AuNPs/Pt - Eletrodo de platina modificado com nanotubos de carbono, nanopartículas de ouro polímeros molecularmente impressos. VPD – voltametria de pulso diferencial. HPLC-UV – Cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta. UHPLC-MS – Cromatografia líquida de ultra performance acoplado ao espectrômetro de massas. MP – Fase móvel. SP – Fase estacionária. WE – Eletrodo de trabalho. SE – eletrólito de suporte. UV-VIS – Espectrofotometria UV-Visível. E<sub>w</sub> – potencial de trabalho.

O método proposto por este trabalho pode ser aplicado para a determinação de ampicilina, uma vez a concentração desse antibiótico em formulações farmacêuticas está bem acima do valor de limite de quantificação aqui proposto.

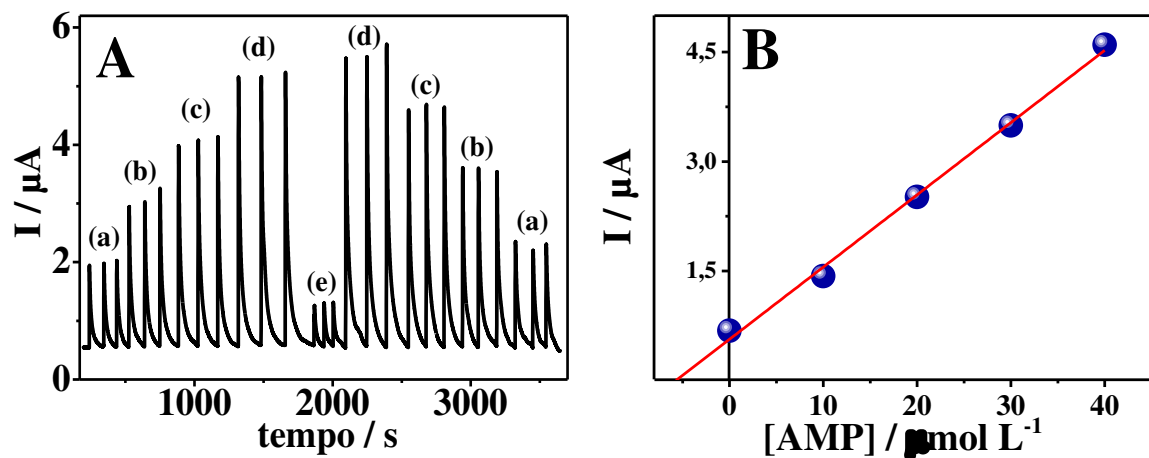
Considerando-se o tempo necessário para que o sinal analítico retornasse à linha de base, estimou-se a frequência analítica em 120 injeções h<sup>-1</sup>, tratando-se, portanto, de um método rápido quando comparado aos demais métodos.



#### 5.2.4. Aplicação em amostra comercial do fármaco

A exatidão do método BIA foi avaliada por meio de sua aplicação na determinação de AMP em amostra comercial do fármaco, para isso fez-se uso de uma curva de adição de padrão. Neste caso, preparou-se uma solução contendo apenas o conteúdo de uma cápsula do medicamento, sem necessidade de pré-tratamento, e realizou-se as medidas aumentando a concentração do padrão. A Figura 14 mostra os resultados obtidos nesse teste.

**Figura 14:** (A) Amperograma BIA obtido para a curva analítica de adição de padrão da ampicilina (a) 10, (b) 20, (c) 30 (d) 40  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e (e) amostra de ampicilina em cápsula;  $E = +0,025 \text{ V vs Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$ . (B) Curva de adição de padrão no sentido crescente de concentração do padrão ( $y = 0,09904x + 0,5642$ ;  $r = 0,9948$ ).



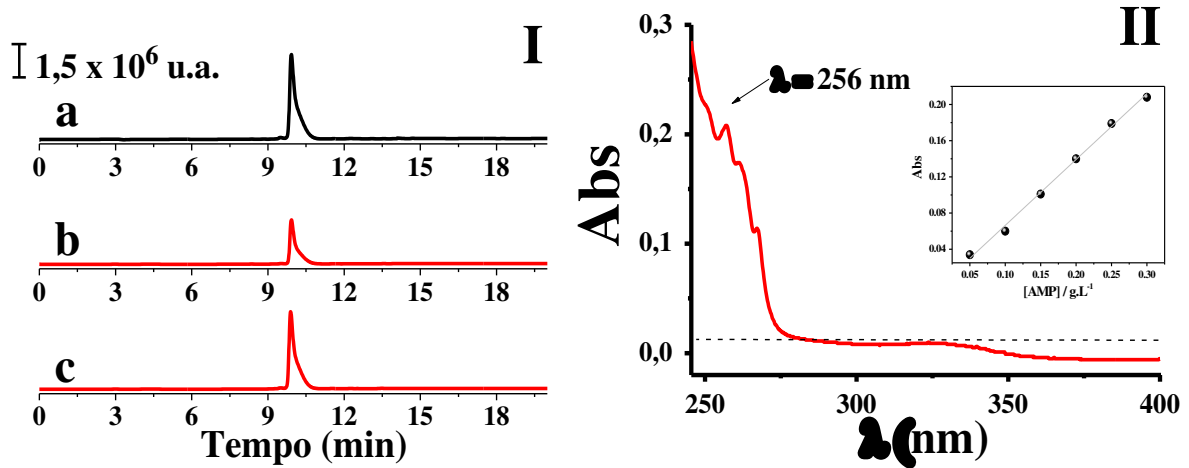
Tomando-se a equação da reta pôde-se calcular a concentração de ampicilina na amostra de medicamento e conseqüentemente a massa desse composto contida em uma cápsula do antibiótico comercial, o valor obtido foi de 0,56 g, o que corresponde a 112% do teor de ampicilina indicado no rótulo do medicamento (0,50 g), este valor, apesar de estar acima do mostrado no rótulo, está dentro do limite permitido pela ANVISA para determinações quantitativas desse composto em formulações farmacêuticas, segundo esta, o valor determinado deve estar dentro da faixa compreendida entre 80% e 120,0% da concentração teórica do teste [23] [53].

### 5.3. Validação do método

Como forma de validar os resultados obtidos por meio do método desenvolvido realizou-se análises para quantificação de ampicilina na mesma amostra comercial utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Espectrofotometria UV-Vis.

Os valores obtidos por ambas as técnicas comprovam a validade e aplicabilidade do método proposto. Os resultados para as análises obtidas por CLAE e UV-Vis estão apresentados na Figura 15.

**Figura 15:** **I** - Cromatograma obtido com (a) solução padrão de ampicilina 6,7 mmol L<sup>-1</sup>, (b) e (c) amostras de ampicilina em cápsulas;  $\lambda = 220$  nm. **II** - Espectro de absorção de solução padrão de ampicilina 1,0 mmol L<sup>-1</sup>; Inserido: curva de calibração correspondente ( $R = 0,998$ ).



Os valores obtidos por meio de ambas as técnicas, referentes à massa de ampicilina contida em cada cápsula do medicamento, não diferem daqueles obtidos pelo método proposto nesse trabalho, como mostrado na Tabela 4.

**Tabela 4:** Concentrações de ampicilina por cápsula obtidas pelo método BIA proposto, CLAE-UV Espectrofotometria UV-Vis.

Valor do rótulo	Cápsula de ampicilina (g)			Erro relativo (%)	
	BIA	CLAE-UV	UV-Vis	E <sub>1</sub>	E <sub>2</sub>
<b>0,50</b>	0,56 ± 0,062	0,57 ± 0,093	0,55 ± 0,062	+ 1,8	- 1,8

$n = 3$ ; nível de confiança de 95%; E<sub>1</sub> = erro relativo entre BIA e CLAE-UV; E<sub>2</sub> = erro relativo entre BIA e UV-Vis.

Por meio do teste t de student para dois grupos de medidas, com nível de confiança de 95%, pôde-se concluir que o método BIA proposto é estatisticamente igual ( $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$ ) a ambos os métodos descritos na literatura, sendo, portanto, indicado para análises de rotina.

Esses resultados evidenciam ainda que a presença de partículas sólidas, provenientes dos excipientes, nas amostras do medicamento não interferiram nas medidas eletroquímicas,

destacando outra vantagem desta técnica, já que se trata de uma etapa indispensável em métodos ópticos e cromatográficos.

## 6. CONCLUSÃO

---

Apresentou-se pela primeira vez, um método para determinação de ampicilina em fármacos utilizando eletrodo placa de circuito impresso de cobre em sistema BIA. O efeito de formação de complexo entre a ampicilina e os íons Cu(II) pôde ser explorado para obtenção do sinal analítico, sendo este proporcional à concentração do antibiótico.

O método BIA proposto mostrou-se preciso, obtendo-se um valor de DPR igual a 3,1% ao longo de uma sequência de 18 injeções, exato, sendo comprovado comparando-se os resultados destes com análises feitas por técnicas já utilizadas, sensível, com LD e LQ iguais a 0,25 e 0,83  $\mu\text{mol L}^{-1}$  respectivamente e rápido, com uma frequência analítica de pelo menos 120 injeções  $\text{h}^{-1}$ .

O método foi aplicado com sucesso na determinação de ampicilina em amostra do fármaco, e os resultados foram comparados com dois métodos reportados na literatura para determinação de ampicilina, CLAE-UV e espectrofotometria UV-Vis, os quais mostraram-se estatisticamente iguais, podendo então, ser utilizado em análises de rotina sem que haja a necessidade de preparo da amostra.

## REFERÊNCIAS

---

1. WALSH, C. **Antibiotics: actions, origins, resistance**. Washington: American Society for Microbiology (ASM), 2003.
2. DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and molecular biology reviews**, 74, 2010. 417 - 433.
3. WILLIAMS, J. D.  $\beta$ -lactamases and  $\beta$ -lactamase inhibitors. **International journal of antimicrobial agents**, 12, 1999. S3-S7.
4. MATAGNE, A.; LAMOTTE-BRASSEUR, J.; FRÈRE, J.-M. Catalytic properties of class A  $\beta$ -lactamases: efficiency and diversity. **Biochemical Journal**, 330, 1998. 581-598.
5. ROLINSON, G. N.; GEDDES, M. The 50th anniversary of the discovery of 6-aminopenicillanic acid (6-APA). **International journal of Antimicrobial agents**, 29, 2007. 3-8.
6. MA, L. et al. Flow-injection chemiluminescence determination of penicillin antibiotics in drugs and human urine using luminol-Ag(III) complex system. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 67, p. 219–225, 2012.
7. BAILÓN-PEREZ, M. I. et al. Multiresidue determination of penicillins in environmental waters and chicken muscle samples by means of capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry. **Electrophoresis**, v. 30, p. 1708-1717, 2009.
8. PUIG, P. Sample stacking for the analysis of penicillins by microemulsion electrokinetic capillary chromatography. **Journal of Chromatography B**, 831, 2006. 196-204.
9. AMIN, A. S. Pyrocatechol violet in pharmaceutical analysis. Part I. A spectrophotometric method for the determination of some  $\beta$ -lactam antibiotics in pure and in pharmaceutical dosage forms. **II Farmaco**, 56. 211-218.
10. BELAL, F. E. A. Kinetic spectrophotometric determination of ampicillin and amoxicillin in dosage forms. **II Farmaco**, 55, 2000. 680-686.
11. KHALILZADEH, M. A. E. A. Electrocatalytic determination of ampicillin using carbon-paste electrode modified with ferrocendicarboxylic acid. **Analytical Letters**, 42, 2009. 584-599.
12. SAMANIDOU, V. F.; EVAGGELOPOULOU, EVAGGELIA N; PAPADOYANNIS, IOANNI. Chromatographic analysis of penicillins in pharmaceutical formulations and biological fluids. **Journal of separation science**, 29, 2006. 1879.

13. RIBEIRO, G. A. C. et al. A fast, direct, and sensitive analysis method for catechin determination in green tea by batch injection analysis with multiple-pulse amperometry (BIA-MPA). **Analytical Methods**, 10, 2018. 2034–2040.
14. KÖRBAHTI, B. K.; TAŞYÜREK, SELİN. Electrochemical oxidation of ampicillin antibiotic at boron-doped diamond electrodes and process optimization using response surface methodology. **Environmental Science and Pollution Research**, 22, 2015. 3265-3278.
15. QUINTINO, M. S.; ANGNES, LÚCIO. Batch injection analysis: An almost unexplored powerful tool. **Electroanalysis**, 16, 2004. 513-523.
16. WANG, J.; TAHA, ZIAD. Batch injection analysis. **Analytical chemistry**, 63, 1991. 1053-1056.
17. JOSHI, S. HPLC separation of antibiotics present in formulated and unformulated samples. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, 28, 2002. 795-809.
18. BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMAN, B. B. **As bases farmacológicas de Goodman & Gilman**. 12. ed. São Paulo: McGraw-Hill, 2012. 1477-1496 p.
19. SILVA, P. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 953-965 p.
20. SUÁREZ, C.; GUDIOL, F. Antibióticos betalactámicos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, 27, 2009. 116-129.
21. MILLER, E. L. The penicillins: a review and update. **Journal of Midwifery & Women's Health**, 47, 2002. 426-434.
22. CIONE , A. P. P.; LIBERALE , M. J.; SILVA, M. Desenvolvimento e validação de método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para determinação de associação de ampicilinas em pó liofilizado para injeção.. **Química Nova**, 33, 2010. 203 - 207.
23. ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira**. 5ª. ed. Brasília: [s.n.], v. 2, 2010.
24. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Quality assurance of pharmaceuticals: A compendium of guidelines and related materials. Good manufacturing practices and inspection**. 2. ed. Geneva: [s.n.], v. 2, 2007.
25. PARISOTTO, et al. Análise exploratória aplicada no estudo de medicamentos contendo piroxicam. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, 499-505 2005. ISSN 4.

26. MIGUEL, G. C. E. A. Quantificação de antibióticos beta-lactâmicos em medicamentos veterinários: determinação de amoxicilina e ampicilina por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, 2013.
27. LARSEN, C.; BUNDGAARD, H. Polymerization of Penicillins: V. Separation, identification and quantitative determination of Antigenic Polymerization products in Ampicillin Sodium preparations by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 147, p. 143-150, 1978.
28. KIM, C. E. A. Determination of 18 veterinary antibiotics in environmental water using high-performance liquid chromatography-q-orbitrap combined with on-line solid-phase extraction. **Journal of Chromatography B**, 1084, 2018. 158-165.
29. GHOULIPOUR, V.; SHOKRI, M.; WAQIF-HUSAIN, S. Determination of ampicillin and amoxicillin by high-performance thin-layer chromatography. **Acta Chromatographica**, v. 23, p. 483-498, 2011. ISSN 3.
30. AHMAD, A. S.; RAHMAN, N.; ISLAM, F. Spectrophotometric determination of ampicillin, amoxicillin, and carbenicillin using Folin-Ciocalteu phenol reagent. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 59, p. 119-123, 2004. ISSN 2.
31. 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. ISSN 8.
32. BAILÓN-PÉREZ, M. I. E. A. Trace determination of  $\beta$ -lactam antibiotics in environmental aqueous samples using off-line and on-line preconcentration in capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, 1185, 2008. 273-280.
33. HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 6<sup>a</sup>. ed. Rio de Janeiro: LTC, 362-372 p.
34. ALEIXO, L. M. Voltametria: conceitos e técnicas. **Universidade Estadual de Campinas**, São Paulo, 2003.
35. SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. [S.l.]: Boockman, v. 60, 2002.
36. JOHLL, M. E.; WILLIAMS, D. G.; JOHNSON, D. C. Activated pulsed amperometric detection of cysteine at platinum electrodes in acidic media. **Electroanalysis**, 9, 1997. 1397-1402.
37. TORMIN, T. F. et al. Fast simultaneous determination of BHA and TBHQ antioxidants in biodiesel by batch injection analysis using pulsed-amperometric detection. **Talanta**, 99, 2012. 527-531.

38. SILVA, R. A. B. et al. Batch injection analysis with amperometric detection: application for simultaneous analysis using a single working electrode. **Analytical Methods**, 3, 2011. 2804-2808.
39. BRETT, A. M. O.; MATYSIK, F.; VIEIRA, M. T. Thin-film gold electrodes produced by magnetron sputtering. Voltammetric characteristics and application in batch injection analysis with amperometric detection. **Electroanalysis**, 9, 1997. 209-212.
40. WALCARIUS, A.; LUMBERTS, L.; DEROUANE, E. G. Cation determination in aqueous solution using the methyl viologen-doped zeolite-modified carbon paste electrode. **Electroanalysis**, 7, 1995. 120-128.
41. QUINTINO, M. D. S. M. **Desenvolvimento de sensores eletroquímicos associados a batch injection analysis (BIA) para aplicações analíticas - Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 117. 2003.
42. MORITA, T.; ASSUMPCÃO, M. V. **Manual de soluções, reagentes e solventes; padronização, preparação, purificação**. [S.l.]: Edgard Blucher, 1976.
43. MEHL, E. L. Conceitos fundamentais sobre placas de circuito impresso. **Apostila do curso de Engenharia Elétrica da Universidade Federal do Paraná**, 2016. Disponível em: <[http://www.eletrica.ufpr.br/mehl/te232/textos/PCI\\_Conceitos\\_fundamentais.pdf](http://www.eletrica.ufpr.br/mehl/te232/textos/PCI_Conceitos_fundamentais.pdf)>. Acesso em: 01 nov. 2018.
44. DANTAS, L. M. F. **Uso de eletrodos de cobre e eletrodos modificados como sensores eletroquímicos - Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo. São Pulo. 2015.
45. SHER, A.; VEBER, M.; MAROLT-GOMIŠČEK, M. Spectroscopic and polarographic investigations: Copper (II)-penicillin derivatives. **International journal of pharmaceutics**, 1997, 148. 191-199.
46. FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, ; BADÍA, R.; DÍAZ-GARCÍA, M. E. Insights into the reaction of  $\beta$ -lactam antibiotics with copper (II) ions in aqueous and micellar media: Kinetic and spectrometric studies. **Analytical biochemistry**, 341, 2005. 113-121.
47. COUTINHO, F. B.; COUTINHO, L. F. M.; MAZO, L. H. Estudo do comportamento eletroquímico de substâncias complexantes utilizando eletrodo de cobre. **Química Nova**, 2009, 32. 228-233.
48. AKSU, S. Electrochemical Equilibria of Copper in Aqueous Phosphoric Acid Solutions. **Journal of the Electrochemical Society**, 2009. 387-394.
49. AGOSTINHO, S. M. L. et al. O eletrólito suporte e suas múltiplas funções em processos de eletrodo. **Química Nova**, 27, 2004. 813-817.
50. ALEKSIĆ, M. M. E. A. An extensive study of electrochemical behavior of brimonidine and its determination at glassy carbon electrode. **Electrochimica acta**, 106, 2013. 75-81.



51. WEI, S. E. A. Molecularly Imprinted Electrochemical Sensor for the Determination of Ampicillin Based on a Gold Nanoparticle and Multiwalled Carbon Nanotube-Coated Pt Electrode. **Journal of Applied Polymer Science**, 131, 2014.
52. XU, L.; WANG, HUAIVOU; XIAO, YAN. Spectrophotometric determination of ampicillin sodium in pharmaceutical products using sodium 1, 2-naphthoquinone-4-sulfonic as the chromogenic reagent. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 60, 2004. 3007-3012.
53. RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, 27, 2004. 771-780.