



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA – IQ**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO ANTIMONIATO DE
MEGLUMINA USADO NO TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE E
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA ESPECIAÇÃO DE
ANTIMÔNIO**

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do grau de mestre em Química – Área de concentração – Química Analítica do Curso de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Departamento de Química Analítica, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Keity Margareth Doretto

Orientadora: Profa. Dra Susanne Rath

Campinas – SP

Julho de 2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP**

D731s Doretto, Keity Margareth.
Síntese e caracterização do antimoniato de meglumina usado no tratamento de leishmaniose e desenvolvimento de métodos para especiação de antimônio / Keity Margareth Doretto. -- Campinas, SP: [s.n], 2008.

Orientadora: Susanne Rath.

Dissertação - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Química.

1. Antimônio. 2. Ácido cloranílico. 3. Voltametria adsortiva com redissolução catódica. 4. Cromatografia líquida de alta eficiência. I. Rath, Susanne. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Synthesis and characterization of meglumine antimoniate and development of methods for antimony speciation

Palavras-chaves em inglês: Antimony, Chloranilic acid, Square wave adsorptive stripping cathodic voltammetry, High performance liquid chromatography

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora: Susanne Rath (orientadora), Lúcia Codognoto de Oliveira (UNIVAP-São José dos Campos), Anne Hélène Fostier (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 25/07/2008

Dedico este trabalho à minha família, minha mãe, minhas irmãs Sheila e Lucilaine, meu cunhado Alexandre, meu sobrinho Giovani, meu namorado Bruno que sempre estiveram ao meu lado dando apoio em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À Deus, que nos fortalece nos momentos mais difíceis.

À Professora Dra. Susanne Rath, meu especial agradecimento e admiração pela segura orientação, incentivo, paciência e carinho, tornando possível o desenvolvimento deste trabalho, além dos ensinamentos nestes dois anos de convivência.

À minha família pelo seu amor incondicional e incentivo.

Ao Bruno por todo amor, compreensão e paciência dedicados a mim e nos momentos passados juntos.

Aos colegas, companheiros e amigos do grupo GTAF em especial ao pessoal do laboratório: Larissa, Jonas, Raquel, Leandro, Ricardo, Leonardo, Thaís que contribuíram de forma direta ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pelos momentos de descontração!

Ao Professor Félix Guillermo Reyes Reyes (FEA/UNICAMP) pela cooperação e disponibilização do seu laboratório para a realização de uma etapa deste trabalho.

A CAPES pela bolsa de estudo concedida.

À Universidade Estadual de Campinas, em especial ao Instituto de Química, pela oportunidade concedida.

À CPG do Instituto de Química/UNICAMP pela atenção e dedicação com que se dirige aos alunos.

Aos funcionários do Instituto de Química/UNICAMP pela prestação de serviços.

A todos, muito obrigada!

Curriculum Vitae

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Keity Margareth Doretto
Data de Nascimento: 17/09/1981
Nacionalidade: Brasileira
Naturalidade: Campinas - SP
E-mail: kdoretto@yahoo.com.br

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

2006 –2008: Mestrado em Química Analítica sob orientação da profa. Dra. Susanne Rath com auxílio de bolsa Capes
Trabalho: “Síntese e caracterização do antimoniato de meglumina e desenvolvimento de métodos para especificação de antimônio”
Universidade Estadual de Campinas
Unicamp – Campinas/SP

2002 – 2005: Graduação em Química Bacharelado
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
UNESP – Araraquara/SP.

3. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

3.1. *Iniciação científica*

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos utilizando espectrofotometria de absorção no ultravioleta e espectroscopia de reflectância difusa para análise de metoclopramida contida em medicamentos, financiado por CNPq/PIBIQ sob o número do processo: 107823/2004-7 na Instituição Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” no período de 2004 a 2006.

3.2. *Resumo de trabalho científico apresentado em congresso*

1. Determinação de Sb(V) na presença de ácido cloranílico por voltametria adsorviva de redissolução. DORETTO, K.M.; RATH, S.; In: 14º Encontro Nacional de Química Analítica - ENQA, João Pessoa. Anais do 14º Encontro Nacional de Química Analítica, 2007.

2. Determinação de metoclopramida em medicamentos utilizando a combinação spot - test por espectroscopia de reflectância difusa. GOTARDO, M. A.; DORETTO,

K.M.; PEZZA, H. R.; PEZZA, L.; In: 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia. Anais do 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006.

3. Centro de Ciências de Araraquara (CCA) Plantão de Dúvidas. OLIVEIRA, I. T.; FERNANDES, D. C.; DORETTO, K.M. ; MEDEIROS, J. B. ; BONI, T. C. ; OLIVEIRA, L. A. A.; LAS, W. C.; In: II Evento de Educação em Química, Araraquara. Anais do II Evento de Educação em Química, 2004.

4. Outros

4.1. Monitorias:

03/2008 – 07/2008: Química Analítica III – QA-316
Universidade Estadual de Campinas
Departamento de Química Analítica

08/2007 – 12/2007: Química Analítica IV – QA-416
Universidade Estadual de Campinas
Departamento de Química Analítica

08/2003 – 03/2004: Plantão de Dúvidas do Centro de Ciências da Unesp
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

4.2. Cursos extracurriculares:

1. “Biotecnologia e Química Medicinal no Combate às Doenças Tropicais”, ministrada pelo Prof. Dr. Adriano D. Andricopulo com duração de 9 horas, durante a XXXV Semana da Química realizada no período de 16 a 21 de outubro de 2005 no Instituto de Química da Unesp de Araraquara.

2. “Química Forense”, ministrada pelo Prof. Dr. Valter Stefani com duração de 8 horas, durante a XXXV Semana da Química realizada no período de 16 a 21 de outubro de 2005 no Instituto de Química da Unesp de Araraquara.

3. “Metrologia em Química e ISSO-Guia 17025”, ministrada pelo Prof. Dr. Fernando Luis Ferttonani, Prof. Dr. José Paschoal Batistoti e Prof. Dr. Ossamo Hojo com duração de 16 horas, durante a XXXII Semana da Química realizada no período de 20 a 25 de outubro de 2002 no Instituto de Química da Unesp de Araraquara.

RESUMO

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO ANTIMONIATO DE MEGLUMINA E DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA ESPECIAÇÃO DE ANTIMÔNIO

Palavras-chave: Antimônio, ácido cloranílico, voltametria adsortiva com redissolução catódica por onda quadrada, cromatografia líquida de alta eficiência.

Compostos orgânicos a base de antimônio ainda são empregados no tratamento de leishmaniose e, no Brasil, o fármaco de primeira escolha continua sendo o antimoníato de N-metilglucamina (ANMG). Este fármaco a base de Sb(V) não possui estrutura química definida, tendo sido relatados, entre outros, a presença de Sb(III) como contaminantes.

O objetivo deste trabalho foi a síntese e caracterização de ANMG e o desenvolvimento e validação de métodos analíticos para a especificação de antimônio (Sb(III) e Sb(V)) no ANMG, usando a voltametria de onda quadrada e a cromatografia líquida de alta eficiência associada a um detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD).

A determinação de Sb(III) no ANMG foi realizada por voltametria de onda quadrada, usando o eletrodo de gota pendente de mercúrio (HMDE) e ácido clorídrico $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte. Para a determinação de Sb(V) foi avaliado o uso da voltametria adsortiva com redissolução catódica por onda quadrada usando o ácido cloranílico (AC) como agente complexante. No entanto, o método não apresentou seletividade para a determinação de Sb(V) no ANMG na presença de Sb(III) e N-metilglucamina. Sendo assim, foi desenvolvido e validado um método HPLC-DAD para a especificação de Sb(V) no ANMG, através do complexo formado com AC. A separação foi realizada em uma coluna de fase reversa octadecil híbrida e uma fase móvel composta de solução aquosa de ácido fosfórico pH 2 e metanol por eluição com gradiente e quantificação em 310 nm. Todos os métodos desenvolvidos foram validados mediante avaliação dos seguintes parâmetros: faixa linear, linearidade, sensibilidade, seletividade, precisão intra-ensaio e inter-ensaio, limites de detecção e quantificação e exatidão.

O produto de síntese, obtido a partir da reação entre Sb(V) N-metilglucamina, foi caracterizado por análise elementar e espectrometria de massas em *tandem* por interface de ionização por electrospray (ESI-MS/MS Q-ToF). Foi confirmada a coexistência de várias espécies de antimônio em solução, assim foi possível realizar a especificação de antimônio, quanto ao estado de oxidação, por essa técnica.

ABSTRACT

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF MEGLUMINE ANTIMONIATE AND DEVELOPMENT OF METHODS FOR ANTIMONY SPECIATION

Keywords: Antimony, chloranilic acid, square wave adsorptive stripping cathodic voltammetry, high performance liquid chromatography

Organic compounds containing antimony are still employed in the treatment of leishmaniasis and, in Brazil, the drug of choice, continues to be N-methylglucamine antimoniate (ANMG). This drug containing Sb(V) doesn't possess a defined chemical structure, and several contaminants Sb(III), among others, has been reported.

The aim of this work was the synthesis and characterization of ANMG and the development and validation of analytical methods for antimony speciation (Sb(III) and Sb(V)) in ANMG, using square wave voltammetry (SWV) and high performance liquid chromatography coupled to a diode array detector (HPLC-DAD). The determination of Sb(III) in ANMG was accomplished by SWV, using the hanging mercury drop electrode (HMDE) and 2.0 mol L⁻¹ hydrochloric acid as a supporting electrolyte. For the determination of Sb(V) the use of square wave adsorptive stripping cathodic voltammetry was evaluated, using the HMDE and chloranilic acid (AC) as a complexing agent. However, the method didn't present selectivity for the determination of Sb(V) in ANMG in the presence of Sb(III) and N-methylglucamine. Due to this fact, a HPLC-DAD method was developed and validated for the speciation of Sb(V) in ANMG by formation of a compound with AC. The separation was carried out with a reverse phase octadecyl hybrid column with a mobile phase composed of an aqueous phosphoric solution, pH 2 and methanol over gradient elution and quantification at 310 nm. All of the development methods were validated by evaluation of the following parameters: linear range, linearity, sensitivity, selectivity, intra-assay and inter-assay precisions, limit of detection, limit of quantification and accuracy.

The product obtained by synthesis using Sb(V) and N-methylglucamine as reagents, was characterized by elementary analysis and by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS Q-ToF). The presence of several species containing antimony in solution was confirmed and antimony speciation, in relation to the oxidation state, was carried out.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	xix
LISTA DE TABELAS	xxi
LISTA DE QUADROS.....	xxiii
LISTA DE FIGURAS.....	xxv
1. INTRODUÇÃO	3
1.1. Leishmaniose	3
1.2. Vetores	4
1.3. Áreas Endêmicas	5
1.4. Diagnóstico da doença	7
1.5. Fármacos empregados no tratamento de Leishmaniose	8
1.6. Antimoniato de N-metilglucamina	11
1.7. Aspectos toxicológicos e farmacológicos.....	14
1.8. Métodos analíticos para a determinação de antimônio em diferentes matrizes.....	15
1.9. Validação de métodos analíticos	21
1.9.1. Faixa Linear	24
1.9.2. Linearidade	25
1.9.3. Sensibilidade	25
1.9.4. Precisão	25
1.9.5. Seletividade	26
1.9.6. Limite de detecção	26
1.9.7. Limite de Quantificação	27
1.9.8. Exatidão	27
1.9.9. Robustez	28
2. OBJETIVOS.....	31
3. EXPERIMENTAL	35
3.1. Reagentes e soluções.....	35
3.2. Amostras.....	37

3.3. Equipamentos	37
3.4. Métodos	38
3.4.1. Determinação de antimônio (III) por Voltametria de Onda Quadrada	38
3.4.1.1. Validação do método	39
3.4.2. Estudo da reação química entre AC e Sb(V) por espectrofotometria	41
3.4.3. Determinação de antimônio (V) por Voltametria Adsorptiva com Redissolução Catódica por Onda Quadrada	43
3.4.4. Desenvolvimento do método de cromatografia líquida de alta eficiência	44
3.4.4.1. Análise de amostras	47
3.4.4.2. Validação do método	47
3.4.5. Determinação de antimônio total por Espectrometria de Absorção Atômica por chama	49
3.5. Sínteses	49
3.5.1. Antimoniato de N-metilglucamina	49
3.5.2. Reação entre o Sb₂O₃ e N-metilglucamina	50
3.6. Caracterização dos produtos de síntese	50
3.6.1. Espectrometria de Massas	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1. Método para a determinação de antimônio (III) por Voltametria de Onda Quadrada	53
4.1.1. Seletividade: avaliação do método para a determinação de Sb(III) no antimoniato de N-metilglucamina	58
4.1.2. Parâmetros de validação	60
4.2. Métodos para a determinação de antimônio pentavalente	64
4.2.1. Estudo da reação química entre AC e Sb(V) por espectrofotometria	64
4.2.2. Desenvolvimento de método para a determinação de antimônio (V) por Voltametria Adsorptiva com Redissolução Catódica por Onda Quadrada ...	69
4.2.2.1. Otimização dos parâmetros da SWAdSV	71
4.2.2.2. Influência da concentração de AC no comportamento eletroquímico do complexo [Sb(V)(AC)]	79

4.2.2.3. Dependência da corrente de pico em função das concentrações de Sb(V) e ácido cloranílico.....	80
4.2.2.4. Seletividade: avaliação do método para a determinação de Sb(V) no antimoniato de N-metilglucamina.....	83
4.2.3. Desenvolvimento de método para a determinação de antimônio (V) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	86
4.2.3.1. Seletividade: avaliação do método para a determinação de Sb(V) no antimoniato de N-metilglucamina.....	94
4.2.3.2. Parâmetros de validação	97
4.2.4. Síntese do Antimoniato de N-metilglucamina	101
4.2.5. Caracterização	103
4.2.5.1. Análise Elementar	103
4.2.5.2. Espectrometria de Massas	103
5. CONCLUSÕES	117
6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	121
ANEXO A.....	127

LISTA DE ABREVIATURAS

ΔE_s	Incremento de varredura de potencial
a	Amplitude de pulsos
AC	Ácido Cloranílico
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, do inglês <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANMG	Antimoniato de N-metilglucamina
As	Fator de assimetria
As(III)	Arsênio trivalente
BEPA	Boletim Epidemiológico Paulista
Bi(III)	Bismuto trivalente
BR	Britton-Robinson
Cd(II)	Cádmio bivalente
Cu(II)	Cobre bivalente
CV	Voltametria Cíclica, do inglês <i>Cyclic Voltammetry</i>
CVE	Centro de Vigilância Epidemiológica no Estado de São Paulo
DAD	Detector de arranjo de diodos
E_d	Potencial de deposição
ESI-MS	Espectrometria de Massas com ionização por eletrospray, do inglês <i>Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i>
f	Freqüência de aplicação dos pulsos de potencial
FA	Fase aquosa
FAAS	Espectrometria de Absorção Atômica por Chama, do inglês <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FO	Fase orgânica
GSH	Glutathiona, forma reduzida

HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana, do inglês <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HMDE	Eletrodo de Gota Pendente de Mercúrio, do inglês <i>Hanging Mercury Drop Electrode</i>
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
I_p	Corrente de pico
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LVA	Leishmaniose Visceral Americana
N	Número de pratos
NMG	N-metilglucamina
Pb(II)	Chumbo bivalente
r	Coeficiente de correlação linear
RSD	Estimativa do Desvio Padrão Relativo
s	Estimativa do Desvio Padrão
Sb(V)	Antimônio pentavalente
Sb(III)	Antimônio trivalente
SUCEN	Superintendência de Controle de Endemias
SWAdSV	Voltametria Adsorptiva de Redissolução por Onda Quadrada, do inglês <i>Square Wave Adsorptive Stripping Voltammetry</i>
SWV	Voltametria de Onda Quadrada, do inglês <i>Square Wave Voltammetry</i>
t_d	Tempo de deposição
t_R	Tempo de retenção
WHO	Organização Mundial da Saúde, do inglês <i>World Health Organization</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Alguns métodos para a determinação de antimônio, em diferentes matrizes, reportados na literatura no período de 1990 a 2007.	20
Tabela 1.2. Relação de corrente de pico e frequência de aplicação dos pulsos de potencial (f), de acordo com cada sistema, sendo k a constante de velocidade da reação.	22
Tabela 3.1. Condições experimentais para a realização do método das variações contínuas.	42
Tabela 4.1. Parâmetros de validação do método de determinação de antimônio trivalente em antimoniato de N-metilglucamina usando voltametria de onda quadrada.	62
Tabela 4.2. Concentrações de antimônio trivalente obtidas para o antimoniato de N-metilglucamina pelo método proposto (SWV) e FAAS (antimônio total) e HPLC (Sb(V)).	63
Tabela 4.3. Resultados obtidos para sensibilidade obtida a partir de curvas analíticas na faixa de concentração de Sb(V) de $6,0 \cdot 10^{-6}$ a $4,0 \cdot 10^{-5}$ mol L ⁻¹ , empregando diferentes concentrações de AC.	80
Tabela 4.4. Parâmetros avaliados para diferentes fases móveis.	87
Tabela 4.5. Parâmetros de validação do método de determinação de antimônio pentavalente em antimoniato de N-metilglucamina usando ácido cloranílico como agente complexante por HPLC.	100
Tabela 4.6. Concentrações de antimônio pentavalente obtidas para o antimoniato de N-metilglucamina pelo método proposto (HPLC usando o ácido cloranílico como agente complexante) e FAAS (antimônio total) e SWV (Sb(III)).	101
Tabela 4.7. Resultados obtidos para a análise elementar do produto de síntese do antimoniato de N-metilglucamina.	103
Tabela 4.8. Íons identificados e intensidade relativa dos mesmos para as amostras de antimoniato de N-metilglucamina por espectrometria de massas.	108

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1. Estrutura química de antimoniais empregados na clínica médica (Rath <i>et al.</i> , 2003).....	9
Quadro 1.2. Fármacos alternativos empregados na terapia da leishmaniose (Rath <i>et al.</i> , 2003).....	10
Quadro 1.3. Estrutura química dos agentes complexantes empregados na determinação de antimônio.....	18
Quadro 1.4. Classificação dos testes, segundo sua finalidade.....	23
Quadro 1.5. Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.....	24

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Medidas relacionadas à determinação dos parâmetros cromatográficos: a) fatores de capacidade e de separação, resolução e número de pratos; b) fatores de assimetria e de alargamento.	45
Figura 4.1. Voltamograma de onda quadrada para o Sb(III) $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Eletrólito suporte HCl $2,0 \text{ mol L}^{-1}$; $f = 200 \text{ s}^{-1}$; $a = 25 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$	54
Figura 4.2. (a) Voltamogramas registrados para diferentes frequências da onda quadrada. (b) Dependência da corrente de pico com a frequência da onda quadrada. Eletrólito suporte HCl $2,0 \text{ mol L}^{-1}$, concentração de Sb(III) $7,50 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $a = 5 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 1 \text{ mV}$	55
Figura 4.3. (a) Voltamogramas registrados em diferentes amplitudes de pulso da onda quadrada. (b) Dependência da corrente de pico com a amplitude de pulso. Eletrólito suporte HCl $2,0 \text{ mol L}^{-1}$, concentração de Sb(III) $7,50 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 1 \text{ mV}$	56
Figura 4.4. (a) Voltamogramas registrados em diferentes incrementos de varredura de potencial da onda quadrada. (b) Dependência da corrente de pico com o incremento de varredura da onda quadrada. Eletrólito suporte HCl $2,0 \text{ mol L}^{-1}$, concentração de Sb(III) $7,50 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 5 \text{ mV}$	57
Figura 4.5. (a) Influência da concentração de NMG na intensidade da corrente de pico para o Sb(III). Concentração de Sb(III) $2,75 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. (b) Voltamogramas para o antimônio trivalente na presença dos íons Sb(V), As(III), Pb(II), Cu(II), Cd(II) e Bi(III) ($4,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Eletrólito suporte HCl $2,0 \text{ mol L}^{-1}$, concentração de Sb(III) $4,50 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $f = 200 \text{ s}^{-1}$, $a = 25 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$	59
Figura 4.6. (a) Curva analítica obtida para o Sb(III) por SWV. (b) Gráfico dos resíduos. Eletrólito suporte HCl $2,0 \text{ mol L}^{-1}$; $f = 200 \text{ s}^{-1}$; $a = 25 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$	61
Figura 4.7. Estrutura química do ácido cloranílico.	64
Figura 4.8. Espectro de absorção do AC e do complexo formado entre AC e Sb(V). Concentração de AC $1,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e Sb(V) $8,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de solução aquosa de HClO_4 $0,010 \text{ mol L}^{-1}$	65

Figura 4.9. Absorbância do AC, do AC com adição de Sb(V) e do delta de absorbância em função do pH. Concentração de AC e Sb(V) $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio tampão BR na faixa de pH 2 a 11.	66
Figura 4.10. Absorbância do AC, do AC com adição de Sb(V) e do delta de absorbância em função do pH. A concentração de AC e Sb(V) foram, respectivamente, de $6,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de solução aquosa de ácido fosfórico.	67
Figura 4.11. Variação da absorbância (310 nm) em função do tempo. Concentração de AC $1,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e Sb(V) $8,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de solução aquosa de HClO_4 $0,010 \text{ mol L}^{-1}$	68
Figura 4.12. Influência da fração molar entre Sb(V) e AC na absorbância do complexo formado.	69
Figura 4.13. Voltamogramas cíclicos obtidos para o AC e complexo $[\text{Sb(V)(AC)}]$. Eletrólito suporte HClO_4 $0,010 \text{ mol L}^{-1}$, concentração de AC $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e Sb(V) $4,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, potencial de deposição = $-0,5 \text{ V}$, tempo de deposição = 30 s, tempo de reação igual a 5 min e velocidade de varredura de 150 mV s^{-1}	70
Figura 4.14. Influência do potencial de deposição sobre a intensidade de corrente de pico do complexo $[\text{Sb(V)(AC)}]$ por SWAdSV. Eletrólito suporte HClO_4 $0,010 \text{ mol L}^{-1}$, concentração de AC $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, Sb(V) $3,57 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $f = 200 \text{ s}^{-1}$, $a = 15 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$, $t_d = 30 \text{ s}$, tempo de equilíbrio = 5 s e tempo de reação química entre AC e Sb(V) igual a 5 min.	72
Figura 4.15. Influência do tempo de deposição sobre a intensidade de corrente de pico do complexo $[\text{Sb(V)(AC)}]$ por SWAdSV. Eletrólito suporte HClO_4 $0,010 \text{ mol L}^{-1}$, AC $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, Sb(V) $3,57 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $E_d = -0,5 \text{ V}$, $f = 200 \text{ s}^{-1}$, $a = 15 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$, tempo de equilíbrio = 5 s e tempo de reação química entre AC e Sb(V) igual a 5 min.	73
Figura 4.16. (a) Voltamogramas em função da freqüência da onda quadrada, (b) Dependência da corrente de pico do complexo $[\text{Sb(V)(AC)}]$ com a freqüência da onda quadrada. Eletrólito suporte HClO_4 $0,010 \text{ mol L}^{-1}$, concentração de AC e Sb(V) de $2,50 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $3,57 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2$	

mV, $t_d = 30$ s, $E_d = -0,5$ V, tempo de equilíbrio igual 5 s e tempo de reação química entre AC e Sb(V) igual a 5 min.....74

Figura 4.17. (a) Voltamogramas em função da amplitude de pulso da onda quadrada, (b) Dependência da corrente de pico do complexo [Sb(V)(AC)] com a amplitude de pulso. Eletrólito suporte HClO₄ 0,010 mol L⁻¹, concentração de AC e Sb(V) de $2,50 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹ e $3,57 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹, respectivamente, $f = 100$ s⁻¹, $\Delta E_s = 2$ mV, $t_d = 30$ s, $E_d = -0,5$ V e tempo de equilíbrio igual a 5 s e tempo de reação química entre AC e Sb(V) para formação do complexo igual a 5 min.....75

Figura 4.18. (a) Voltamogramas em função do incremento de varredura de potencial da onda quadrada, (b) Dependência da corrente de pico do complexo [Sb(V)(AC)] com o incremento de varredura de potencial. Eletrólito suporte HClO₄ 0,010 mol L⁻¹, concentração de AC e Sb(V) de $2,50 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹ e $3,57 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹, respectivamente, $f = 100$ s⁻¹, $a = 50$ mV, $t_d = 30$ s, $E_d = -0,5$ V e tempo de equilíbrio igual a 5 s e tempo de reação química entre AC e Sb(V) igual a 5 min.....77

Figura 4.19. Reação de formação do complexo [Sb(V)(AC)] por SWAdSV. Eletrólito suporte HClO₄ 0,010 mol L⁻¹, concentração de AC $2,5 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹ e Sb(V) $3,57 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹, $f = 200$ s⁻¹, $a = 15$ mV, $\Delta E_s = 3$ mV, $E_d = -0,5$ V, $t_d = 30$ s e tempo de equilíbrio = 5 s.....78

Figura 4.20. Influência da concentração do AC na formação do complexo [Sb(V)(AC)]. Eletrólito suporte HClO₄ 0,010 mol L⁻¹, concentração de Sb(V) $5,0 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹, $E_d = -0,5$ V, $t_d = 30$ s, $f = 200$ s⁻¹, $a = 15$ mV, $\Delta E_s = 3$ mV, e tempo de equilíbrio = 5 s e tempo de reação química entre AC e Sb(V) igual a 5 min.....79

Figura 4.21. Dependência da corrente de pico em função das diferentes concentrações de ácido clorânico. Eletrólito suporte HClO₄ 0,010 mol L⁻¹, concentração de Sb(V) na faixa de $6,10 \cdot 10^{-6}$ a $42,1 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹, $f = 200$ s⁻¹, $a = 15$ mV, $\Delta E_s = 3$ mV, $E_d = -0,5$ V, $t_d = 30$ s e tempo de equilíbrio = 5 s e tempo de reação química entre AC e Sb(V) = 5 min.81

Figura 4.22. (a) Curva analítica obtida para o Sb(V) por SWAdSV, (b) Gráfico dos resíduos. Eletrólito suporte HClO₄ 0,010 mol L⁻¹, concentração de AC $2,0 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹, $f = 200$ s⁻¹, $a = 15$ mV, $\Delta E_s = 3$ mV, $E_d = -0,5$ V, $t_d = 30$ s e tempo de equilíbrio = 5 s e tempo de reação química entre AC e Sb(V) = 5 min.....82

- Figura 4.23.** (a) Voltamograma da variação da concentração da NMG, (b) Influência da concentração de NMG na determinação de Sb(V) por SWAdSV usando AC como agente complexante. Eletrólito suporte HClO_4 $0,010 \text{ mol L}^{-1}$, concentração de AC $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e Sb(V) $4,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $f = 200 \text{ s}^{-1}$, $a = 15 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$, $E_d = -0,5 \text{ V}$, $t_d = 30 \text{ s}$ e tempo de equilíbrio = 5 s e tempo de reação química entre AC e Sb(V) = 5 min84
- Figura 4.24.** Voltamograma da influência de Sb(III) na determinação de antimônio pentavalente por SWAdSV usando AC como agente complexante. Eletrólito suporte HClO_4 $0,010 \text{ mol L}^{-1}$, concentração de AC $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e Sb(V) $1,07 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e, Sb(III) $1,07 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $f = 200 \text{ s}^{-1}$, $a = 15 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$, $E_d = -0,5 \text{ V}$, $t_d = 30 \text{ s}$ e tempo de equilíbrio = 5 s e tempo de reação química entre AC e Sb(V) = 5 min85
- Figura 4.25.** Cromatograma e o espectro de absorção para cada pico. Concentração de Sb(V) $9,12 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($7,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e AC $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($7,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Fase estacionária: octadecil. Fase móvel: FA ($\text{H}_2\text{O}-\text{H}_3\text{PO}_4$, pH 2), FO (metanol). Eluição por gradiente: 100% FA e 0% FO de 0 a 6 min; sendo mudado para 65% FA e 35% FO de 6 a 12 min; voltando à proporção inicial de 12 a 20 min. Vazão de 1 mL min^{-1} . Detecção em 310 nm.88
- Figura 4.26.** Cromatograma em três dimensões (3D) para o complexo $[\text{Sb(V)}(\text{AC})]$. Concentração de Sb(V) $9,12 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($7,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e AC $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($7,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Fase estacionária: octadecil. Fase móvel: FA ($\text{H}_2\text{O}-\text{H}_3\text{PO}_4$, pH 2), FO (metanol). Eluição por gradiente: 100% FA e 0% FO de 0 a 6 min; sendo mudado para 65% FA e 35% FO de 6 a 12 min; voltando à proporção inicial de 12 a 20 min. Vazão de 1 mL min^{-1} . Detecção em 310 nm.89
- Figura 4.27.** (a) Cromatograma para o AC $150,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($7,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$); (b) Cromatograma para o complexo $[\text{Sb(V)}(\text{AC})]$. Concentração de Sb(V) $9,12 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($7,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e AC $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($7,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Fase estacionária: octadecil. Fase móvel: FA ($\text{H}_2\text{O}-\text{H}_3\text{PO}_4$, pH 2), FO (metanol). Eluição por gradiente: 100% FA e 0% FO de 0 a 6 min; sendo mudado para 65% FA e 35% FO de 6 a 12 min; voltando à proporção inicial de 12 a 20 min. Vazão de 1 mL min^{-1} . Detecção em 310 nm.90

Figura 4.28. (a) Cromatograma da amostra de síntese do ANMG e (b) Cromatograma da amostra do fármaco comercial ANMG. Fase estacionária: octadecil. Fase móvel: FA (H₂O-H₃PO₄, pH 2), FO (metanol). Eluição por gradiente: 100% FA e 0% FO de 0 a 6 min; sendo mudado para 65% FA e 35% FO de 6 a 12 min; voltando à proporção inicial de 12 a 20 min. Vazão de 1 mL min⁻¹. Detecção em 310 nm.91

Figura 4.29. Influência da concentração de AC na formação do complexo. Concentração de Sb(V) 18,24 µg mL⁻¹. Fase estacionária: octadecil. Fase móvel: FA (H₂O-H₃PO₄, pH 2), FO (metanol). Eluição por gradiente: 100% FA e 0% FO de 0 a 6 min; sendo mudado para 65% FA e 35% FO de 6 a 12 min; voltando à proporção inicial de 12 a 20 min. Vazão de 1 mL min⁻¹. Detecção em 310 nm.92

Figura 4.30. Acompanhamento da interação da reação entre Sb(V) e AC. Concentração de Sb(V) 9,12 µg mL⁻¹ e AC 150 µg mL⁻¹. Fase estacionária: octadecil. Fase móvel: FA (H₂O-H₃PO₄, pH 2), FO (metanol). Eluição por gradiente: 100% FA e 0% FO de 0 a 6 min; sendo mudado para 65% FA e 35% FO de 6 a 12 min; voltando à proporção de inicial de 12 a 20 min. Vazão de 1 mL min⁻¹. Detecção em 310 nm.93

Figura 4.31. Cromatograma mostrando a influência da concentração de NMG na formação do complexo [Sb(V)(AC)]. Concentração de Sb(V) 18,24 µg mL⁻¹, AC 150 µg mL⁻¹ e NMG 102,5 µg mL⁻¹. Fase estacionária: octadecil. Fase móvel: FA (H₂O-H₃PO₄, pH 2), FO (metanol). Eluição por gradiente: 100% FA e 0% FO de 0 a 6 min; sendo mudado para 65% FA e 35% FO de 6 a 12 min; voltando à proporção inicial de 12 a 16 min. Vazão de 1 mL min⁻¹. Detecção em 310 nm.94

Figura 4.32. Influência da concentração de NMG na formação do complexo. Concentração de Sb(V) 18,24 µg mL⁻¹ e AC 150 µg mL⁻¹. Fase estacionária: octadecil. Fase móvel: FA (H₂O-H₃PO₄, pH 2), FO (metanol). Eluição por gradiente: 100 % FA e 0% FO de 0 a 6 min; sendo mudado para 65 % FA e 35 % FO de 6 a 12 min; voltando à proporção inicial de 12 a 20 min. Vazão de 1 mL min⁻¹. Detecção em 310 nm.95

Figura 4.33. Cromatograma do Sb(V) na presença do íon Sb(III) (relação Sb(V):Sb(III) em 1:1, sendo a concentração de Sb (III) e (V) 9,12 µg mL⁻¹ e de AC

150,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Fase estacionária: octadecil. Fase móvel: FA ($\text{H}_2\text{O}-\text{H}_3\text{PO}_4$, pH 2), FO (metanol). Eluição por gradiente: 100% FA e 0% FO de 0 a 6 min; sendo mudado para 65% FA e 35% FO de 6 a 12 min; voltando à proporção inicial de 12 a 20 min. Vazão de 1 mL min^{-1} . Detecção em 310 nm.97

Figura 4.34. (a) Curva analítica obtida para o Sb(V) por HPLC. (b) Gráfico dos resíduos. Concentração de AC 150,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Fase estacionária: octadecil. Fase móvel: FA ($\text{H}_2\text{O}-\text{H}_3\text{PO}_4$, pH 2), FO (metanol). Eluição por gradiente: 100% FA e 0% FO de 0 a 6 min; sendo mudado para 65% FA e 35% FO de 6 a 12 min; voltando à proporção inicial de 12 a 20 min. Vazão de 1 mL min^{-1} . Detecção em 310 nm.....98

Figura 4.35. A) Espectro de massas do fármaco comercial ANMG (A1); B) espectro de massas do fármaco comercial ANMG (A2). *Electrospray* no modo positivo, voltagem do cone 60 V, temperatura de desolvatação 400 °C, temperatura da fonte 140 °C, voltagem do capilar 4000 V e energia de colisão de 10 V.....105

Figura 4.36. C) Espectro de massas do fármaco comercial ANMG (A3); D) espectro de massas do fármaco comercial ANMG (A4). *Electrospray* no modo positivo, voltagem do cone 60 V, temperatura de desolvatação 400 °C, temperatura da fonte 140 °C, voltagem do capilar 4000 V e energia de colisão de 10 V.....106

Figura 4.37. E) Espectro de massas do fármaco comercial ANMG (A6); F) espectro de massas do produto de síntese (A7). *Electrospray* no modo positivo, voltagem do cone 60 V, temperatura de desolvatação 400 °C, temperatura da fonte 140 °C, voltagem do capilar 4000 V e energia de colisão de 10 V.107

Figura 4.38. A) Espectro MS-MS do íon m/z 507 do fármaco comercial ANMG (A4); B) espectro MS-MS do íon m/z 507 do produto de síntese (A6) e C) espectro MS-MS do íon m/z 820 do fármaco comercial ANMG (A4). *Electrospray* no modo positivo, voltagem do cone 60 V, temperatura de desolvatação 400 °C, temperatura da fonte 140 °C, voltagem do capilar 4000 V e energia de colisão de 20 V, sendo que para o item C a energia de colisão foi de 30 V.....109

Figura 4.39. Proposta para as estruturas dos íons m/z 507 e 314, com perda de um fragmento de m/z de 193.....	110
Figura 4.40. Espectro de massas do produto da reação entre Sb ₂ O ₃ e NMG (A8). <i>Electrospray</i> no modo positivo, voltagem do cone 60 V, temperatura de desolvatação 300 °C, temperatura da fonte 120 °C, voltagem do capilar 3500 V e energia de colisão de 5 V.....	111
Figura 4.41. A) Espectro MS-MS do íon m/z 314 do fármaco comercial ANMG (A1), voltagem do capilar 4000 V e energia de colisão de 15 V; B) espectro MS-MS do íon m/z 314 do produto de síntese (A7), voltagem do capilar 2800 V e energia de colisão de 20 V e C) espectro MS-MS do íon 314 do produto de reação entre Sb ₂ O ₃ , voltagem do capilar 3500 V e energia de colisão de 10 V. <i>Electrospray</i> no modo positivo, voltagem do cone 60 V, temperatura de desolvatação 300 °C, temperatura da fonte 120 °C.....	112
Figura A.1. Cromatograma para o complexo [Sb(V)(AC)]. Concentração de Sb(V) 9,12 µg mL ⁻¹ e de AC 150,0 µg mL ⁻¹). Fase estacionária: octadecil. Fase móvel: FA (H ₂ O-H ₃ PO ₄ , pH 2), FO (metanol). Eluição por gradiente: 100% FA e 0% FO de 0 a 6 min; sendo mudado para 65% FA e 35% FO de 6 a 12 min; voltando à proporção inicial de 12 a 20 min. Vazão de 1 mL min ⁻¹ . Detecção em 310 nm.....	127
Figura A.2. Cromatograma para o Sb(V) na presença de Sb(III) (relação Sb(V):Sb(III) de 1:0,1, sendo a concentração de Sb(III) 0,912 µg mL ⁻¹ , Sb(V) 9,12 µg mL ⁻¹ e de AC 150,0 µg mL ⁻¹). Fase estacionária: octadecil. Fase móvel: FA (H ₂ O-H ₃ PO ₄ , pH 2), FO (metanol). Eluição por gradiente: 100% FA e 0% FO de 0 a 6 min; sendo mudado para 65% FA e 35% FO de 6 a 12 min; voltando à proporção inicial de 12 a 20 min. Vazão de 1 mL min ⁻¹ . Detecção em 310 nm.....	127
Figura A.3. Cromatograma para o Sb(V) na presença de As(III) (relação Sb(V):As(III) de 1:0,1, sendo a concentração de As(III) 0,912 µg mL ⁻¹ , Sb(V) 9,12 µg mL ⁻¹ e de AC 150,0 µg mL ⁻¹). Fase estacionária: octadecil. Fase móvel: FA (H ₂ O-H ₃ PO ₄ , pH 2), FO (metanol). Eluição por gradiente: 100% FA e 0% FO de 0 a 6 min; sendo mudado para 65% FA e 35% FO de 6 a 12 min; voltando à proporção inicial de 12 a 20 min. Vazão de 1 mL min ⁻¹ . Detecção em 310 nm.....	128

Figura A.4. Cromatograma para o Sb(V) na presença de Pb(II) (relação Sb(V):Pb(II) de 1:0,1, sendo a concentração de Pb(II) $0,912 \mu\text{g mL}^{-1}$, Sb(V) $9,12 \mu\text{g mL}^{-1}$ e de AC $150,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Fase estacionária: octadecil. Fase móvel: FA ($\text{H}_2\text{O}-\text{H}_3\text{PO}_4$, pH 2), FO (metanol). Eluição por gradiente: 100% FA e 0% FO de 0 a 6 min; sendo mudado para 65% FA e 35% FO de 6 a 12 min; voltando à proporção inicial de 12 a 20 min. Vazão de 1 mL min^{-1} . Detecção em 310 nm.128

Figura A.5. Cromatograma para o Sb(V) na presença de Cu(II) (relação Sb(V):Cu(II) de 1:0,1, sendo a concentração de Cu(II) $0,912 \mu\text{g mL}^{-1}$, Sb(V) $9,12 \mu\text{g mL}^{-1}$ e de AC $150,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Fase estacionária: octadecil. Fase móvel: FA ($\text{H}_2\text{O}-\text{H}_3\text{PO}_4$, pH 2), FO (metanol). Eluição por gradiente: 100% FA e 0% FO de 0 a 6 min; sendo mudado para 65% FA e 35% FO de 6 a 12 min; voltando à proporção inicial de 12 a 20 min. Vazão de 1 mL min^{-1} . Detecção em 310 nm.129

Figura A.6. Cromatograma para o Sb(V) na presença de Cd(II) (relação Sb(V):Cd(II) de 1:0,1, sendo a concentração de Cd(II) $0,912 \mu\text{g mL}^{-1}$, Sb(V) $9,12 \mu\text{g mL}^{-1}$ e de AC $150,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Fase estacionária: octadecil. Fase móvel: FA ($\text{H}_2\text{O}-\text{H}_3\text{PO}_4$, pH 2), FO (metanol). Eluição por gradiente: 100% FA e 0% FO de 0 a 6 min; sendo mudado para 65% FA e 35% FO de 6 a 12 min; voltando à proporção inicial de 12 a 20 min. Vazão de 1 mL min^{-1} . Detecção em 310 nm.129

Figura A.7. Cromatograma para o Sb(V) na presença de Bi(III) (relação Sb(V):Bi(III) de 1:0,1, sendo a concentração de Bi(III) $0,912 \mu\text{g mL}^{-1}$, Sb(V) $9,12 \mu\text{g mL}^{-1}$ e de AC $150,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Fase estacionária: octadecil. Fase móvel: FA ($\text{H}_2\text{O}-\text{H}_3\text{PO}_4$, pH 2), FO (metanol). Eluição por gradiente: 100% FA e 0% FO de 0 a 6 min; sendo mudado para 65% FA e 35% FO de 6 a 12 min; voltando à proporção inicial de 12 a 20 min. Vazão de 1 mL min^{-1} . Detecção em 310 nm.130

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença infecciosa tropical, não contagiosa causada por protozoário da família *Tripanosomatidae* e do gênero *Leishmania sp* (BERMAN, 1988). No novo mundo, são reconhecidas oito espécies de *Leishmanias* responsáveis pela doença no homem, pertencentes ao subgênero *Vianna* (V) e *Leishmania* (L), onde os agentes etiológicos correspondentes são: *Leishmania* (V) *braziliensis*, *Leishmania* (V) *guyanensis*, *Leishmania* (V) *panamensis*, *Leishmania* (V) *lainsoni*, *Leishmania* (L) *mexicana*, *Leishmania* (L) *amazonensis*, *Leishmania* (L) *venezuelensis* e *Leishmania* (L) *chagasi* (GRIMALDI *et al.*, 1989).

De modo geral, a leishmaniose pode ser classificada em quatro formas principais: (i) leishmaniose visceral americana (LVA) ou calazar, a mais séria das formas sendo fatal caso não seja tratada, (ii) leishmaniose cutânea, a forma mais comum que causa lesões na pele, (iii) leishmaniose mucocutânea, que causa úlceras na pele e que pode levar a destruição de tecidos no nariz e boca e a (iv) leishmaniose cutânea difusa, que produz lesões crônicas na pele que se assemelham com a hanseníase. Estas três últimas formas de leishmaniose são atualmente classificadas como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) ou úlcera de Bauru (WHO ^(a), 2008).

A descoberta dos agentes etiológicos das leishmanioses só ocorreu em 1885, quando Cunningham, na Índia, descreveu formas amastigotas de calazar, sendo que nesta mesma época já se registravam casos no Brasil. Em 1898, o pesquisador russo Borovisky demonstrou ser um protozoário o agente etiológico do Botão do Oriente. Em 1903, Leishman e Donovan realizaram as primeiras descrições do protozoário responsável pelo Calazar indiano, denominado mais tarde de *Leishmania donovani*. No mesmo ano, Wright descreveu o parasita do Botão do Oriente, conhecido atualmente como *Leishmania tropica* (FIOCRUZ ^(a), 2008).

Como o calazar na região do mediterrâneo atingia principalmente crianças, as evidências de diferenças entre o organismo causador do calazar de uma região para

outra justificaram o estabelecimento de uma espécie *Leishmania infantum*, por Nicole, em 1908. Um organismo semelhante foi descrito por Wright em 1903 em uma criança com Botão do Oriente na Síria, sendo proposto o nome de *Helcosoma tropicum* para este parasita. Mais tarde ele foi colocado no gênero *Leishmania tropica*.

No continente americano, várias doenças que criavam lesões freqüentes em determinadas regiões eram chamadas de úlcera de Bauru, ferida brava, uta, entre outros. A correlação destas lesões com um protozoário do gênero *Leishmania* foi estabelecida por Gaspar Viana, em 1909, no Instituto Oswaldo Cruz, recebendo o nome de *Leishmania braziliensis* (RATH *et al.*, 2003).

No estado de São Paulo, o agente etiológico responsável pela ocorrência da doença, principalmente da forma cutânea, é a *Leishmania (V) braziliensis*.

1.2. Vetores

Os protozoários do gênero *Leishmania sp.* são heteroxenos que necessitam de dois tipos diferentes de hospedeiros para sua completa evolução: (1) um vetor invertebrado e (2) um hospedeiro definitivo.

Os vetores invertebrados são dípteros da família *Psychodidae*, pertencentes ao gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo), com vasta distribuição nos climas quentes e temperados. Somente as fêmeas são hematófagas, pois necessitam do sangue para o desenvolvimento dos ovos. Pertencem ao tipo dos dípteros de atividade crepuscular e pós-crepuscular, abrigando-se durante o dia em lugares úmidos, sombrios e bem protegidos dos ventos e são encontrados em tocas de animais silvestres. Os ovos são postos em locais cobertos pelo musgo. A evolução leva pouco mais de um mês (FIOCRUZ ^(b), 2008).

No Brasil, o inseto transmissor é conhecido por diferentes nomes, como tatuquira, mosquito palha, asa dura, asa branca, cangalhinha, birigui, entre outros.

Os hospedeiros como o cão e a raposa têm um papel preponderante na manutenção do parasita na natureza e são então chamados de reservatórios. No

contexto epidemiológico, os reservatórios representam a principal fonte de infecção dos flebotomíneos que posteriormente transmitirão a doença ao homem. No Brasil, os reservatórios mais importantes são os cães (no ciclo rural e, particularmente nas áreas urbanas) e as raposas (no ciclo silvestre e rural) que agem como mantenedores do ciclo da doença. No entanto, o cão doméstico é considerado o reservatório epidemiologicamente mais importante para a leishmaniose visceral americana (FIOCRUZ ^(c), 2008).

O papel do cão como reservatório para a *Leishmania* foi enunciado pela primeira vez por Nicolle, em 1908, na Tunísia quando experimentalmente foi comprovada a infecção deste animal. Posteriormente, no mesmo país, foi comprovada a transmissão natural em cães e, assim, registrado o primeiro foco de Leishmaniose Visceral canina no mundo. No Brasil, as primeiras evidências de LVA foram constatadas em Abaeté (PA) como resultado dos trabalhos desenvolvidos por uma comissão instituída pelo Instituto Oswaldo Cruz (SUCEN ^(a), 2008).

O protozoário, em seu ciclo de desenvolvimento, assume duas formas evolutivas: promastigota e amastigota. Os flebótomos, do gênero *Lutzomyia* e *Psychopopygus*, infectam-se ao picar o hospedeiro/reservatório ou um indivíduo contaminado aspirando macrófagos parasitados ou amastigotas livres no sangue ou tecidos e, podem, assim, transmitir a doença ao homem. Estudos parasitológicos da leishmania mostraram que a forma promastigota do parasita é flagelada e extracelular e vive no tubo intestinal do inseto e, esta forma promastigota é introduzida em mamíferos através da picada de fêmeas flebotomíneos. As formas promastigotas são rapidamente fagocitadas por células de defesa do sangue, conhecidas por macrófagos, e transformados na forma amastigota arredondada, sem flagelo no meio intracelular (BERMAN, 1988).

1.3. Áreas Endêmicas

A leishmaniose é considerada endêmica em 88 países, dos quais 72 são países considerados em desenvolvimento. De acordo com a Organização Mundial da

Saúde (WHO), a leishmaniose afeta 100 mil pessoas a cada ano nas regiões endêmicas, enquanto 147 milhões de pessoas estão em áreas de risco, sendo que 90% dos casos de leishmaniose visceral em humanos ocorrem na Índia, Sudão, Bangladesh, Nepal e Brasil, e 90% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem no Irã, Afeganistão, Síria, Arábia Saudita, Brasil e Peru (WHO ^(b), 2008). A doença atinge principalmente a população pobre desses países e continua negligenciada pelo setor privado da economia e tem cabido ao setor público, apesar dos recursos escassos e infra-estrutura inadequada, investir no desenvolvimento de novas drogas e métodos de diagnósticos mais eficientes.

No Brasil, a leishmaniose está presente em quatro das cinco regiões. Até os anos 90, a quase totalidade dos casos ocorria na região nordeste; entretanto, ao longo dos anos, houve uma expansão para a região Norte, Sudeste e Centro Oeste (CVE ^(a), 2006).

Desde o primeiro relato em 1999, até maio de 2004, a leishmaniose foi registrada em 23 municípios no Estado de São Paulo, abrangendo as regiões de Araçatuba, Bauru e Marília. Em Bauru (a aproximadamente 200 km do município de Araçatuba) foram registrados 18 casos da doença no período de 1999 a 2004 e dois óbitos. Em 2002, a transmissão humana foi verificada em 14 municípios: 13 situados na região de Araçatuba e 1 na região de Bauru (CVE ^(b), 2004).

Segundo o Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA) do mês de março de 2007, os municípios do Estado de São Paulo foram reclassificados - segundo a situação epidemiológica - para leishmaniose visceral americana. A doença expandiu-se para outras regiões do Estado, destacando-se a transmissão de leishmaniose visceral americana canina nas regiões Metropolitana de São Paulo e de São João da Boa Vista, sendo que na primeira ainda não foi encontrada a presença do vetor - *Lutzomyia longipalpis* (CVE ^(c), 2007).

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença de crescente importância em indivíduos portadores da infecção por HIV. A partir de meados da década de 80, a co-infecção LV/HIV foi registrada em 31 países de vários continentes – Ásia, África, América do sul (inclusive o Brasil) e Europa. No Brasil, a ampliação da área de distribuição geográfica da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e sua

extensão para camadas mais pobres da população e a crescente urbanização da LV permitem supor que a prevalência da co-infecção LV/HIV venha a aumentar nos próximos anos (SUCEN^(a), 2008).

A manifestação da LV como doença associada à AIDS pode ocorrer após infecção primária por *Leishmania sp.* Em algumas regiões de Portugal e da Espanha, a LV é a terceira infecção oportunista mais comum em portadores de AIDS. Nestes países, a elevada frequência desta associação é devida tanto à reativação da infecção leishmaniótica quanto a uma forma alternativa de infecção primária, decorrente da inoculação intravenosa de *Leishmania sp.*, por meio de compartilhamento de agulhas e seringas, entre viciados em drogas (transmissão inter-humana). Dentre os casos notificados, cerca de 90% eram do sexo masculino usuários de drogas endovenosas. Pela sua importância em indivíduos infectados pelo HIV, a LV está incluída como critério indicativo de diagnóstico da AIDS (SUCEN^(a), 2008).

1.4. Diagnóstico da doença

De modo geral, o diagnóstico da leishmaniose é baseado nos exames clínicos dos sintomas que difere para cada tipo de leishmaniose, nos dados epidemiológicos que devem levar em consideração as informações sobre a procedência do paciente e nos dados laboratoriais para que o diagnóstico seja confirmado (SUCEN^(b, c), 2008).

O diagnóstico clínico é complexo, pois a doença no homem pode apresentar sinais e sintomas que são comuns a outras patologias presentes nas áreas onde incide a leishmaniose visceral, como por exemplo, a doença de Chagas, malária, esquistossomose, febre tifóide e tuberculose (GONTIJO & MELO, 2004).

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado por: ensaios parasitológicos e imunológicos. No ensaio parasitológico, a verificação da presença do parasita pode ser feita em material de biópsia ou punção aspirativa do baço, fígado ou medula óssea, onde o material é examinado em lâminas coradas, inoculados em meios de cultura ou em animais de laboratório (hamster). Nos ensaios imunológicos, diferentes

técnicas têm sido utilizadas no diagnóstico da leishmaniose visceral como a reação de imunofluorescência indireta e ensaios imunoenzimáticos (GONTIJO & MELO, 2004).

1.5. Fármacos empregados no tratamento de Leishmaniose

Apesar de apresentar grande prevalência mundial, poucos avanços foram obtidos no tratamento das leishmanioses.

Em 1912, Gaspar Vianna introduziu o uso do tártaro emético, antimonial trivalente, na terapêutica da leishmaniose (VIANNA, 1912). Porém, devido aos efeitos tóxicos e severos efeitos colaterais deste fármaco, os antimoniais foram substituídos pelos antimoniais pentavalentes. Na década de 20 do século passado, Bramachari desenvolveu o primeiro medicamento a base de antimônio pentavalente, a uréia estibamina. Em 1936, Schmidt introduziu o gluconato de antimônio (V) sódico, conhecido comercialmente como Solustibosan[®] (Bayer) ou Pentostam[®] (Glaxo Wellcome) (MARSDEN, 1985).

Outro antimonial pentavalente foi desenvolvido durante a segunda guerra mundial, o antimoniato N-metilglucamina que é comercializado atualmente como Glucantime[®] ou antimoniato de meglumina. Enquanto o Pentostam[®] é distribuído, até hoje, nos países de língua inglesa, o antimoniato de N-metilglucamina, manufaturado originalmente pela Rhône-Poulenc-Rohrer na França, é comercializado nos países de línguas francesa e espanhola. No Brasil, o medicamento a base de antimônio utilizado na terapêutica da leishmaniose é o fármaco comercializado pelo nome de Glucantime[®] ou antimoniato de meglumina (MARSDEN, 1985).

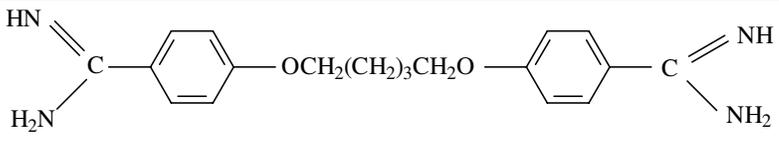
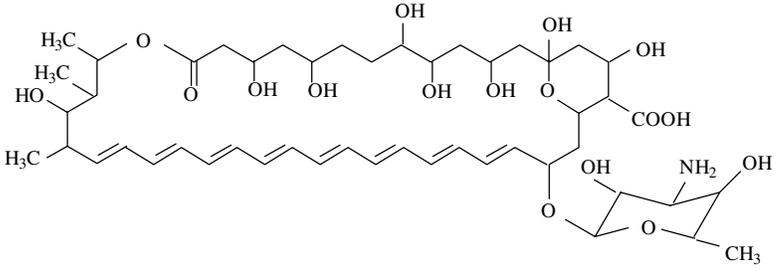
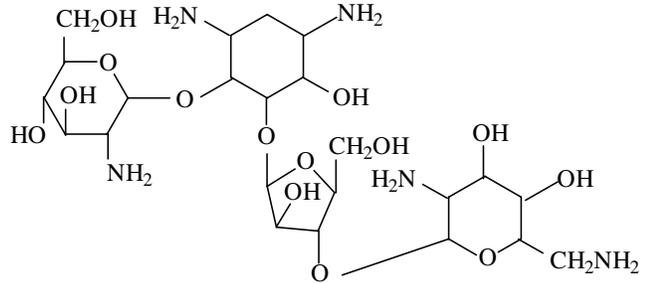
Os principais fármacos estibiados (a base de antimônio) empregados na terapia da leishmaniose estão apresentados no Quadro 1.1.

Quadro 1.1. Estrutura química de antimoniais empregados na clínica médica (Rath *et al.*, 2003).

Nome Químico	Formula estrutural proposta	Nome comercial
Tartarato de antimônio e potássio	$\left\{ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{CO} - \\ \text{HCO} - \text{Sb} - \text{OH} \\ \text{HCO} / \\ \text{COOH} \end{array} \right\} \text{K}$	Tártaro emético
Uréia estibamina	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{O} = \text{Sb} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{NH} - \text{CO} - \text{NH}_2 \end{array}$	Estibamine [®]
Gluconato de antimônio (V) sódico ou Estibogluconato de sódio	$\left\{ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \qquad \qquad \qquad \text{CH}_2\text{OH} \\ \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \\ \text{CHOH} \qquad \qquad \qquad \qquad \text{CHOH} \\ \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \\ \text{HCO} - \qquad \text{OH} \qquad \text{O}^- \qquad \text{OCH} \\ \qquad \qquad \text{Sb} - \text{O} - \text{Sb} - \qquad \text{OCH} \\ \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \\ \text{HCO} / \qquad \qquad \qquad \qquad \text{OCH} \\ \text{COO}^- \qquad \qquad \qquad \qquad \text{COO}^- \end{array} \right\} \text{Na}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	Pentostam [®] Solustibosan [®]
Antimoniato de N-metilglucamina	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{NHCH}_3^+ \\ \\ \text{HCOH} \\ \\ \text{HOCH} \\ \\ \text{HCOH} \\ \\ \text{HCOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array} \cdot (\text{OH})_2\text{Sb}_2\text{O}^-$	Glucantime [®] ; Antimoniato de meglumina

Além dos antimoniais, atualmente outros fármacos têm sido empregados no tratamento das diversas formas de leishmaniose (Quadro 1.2), entre os quais se destacam a pentamidina, anfotericina B, paromomicina e miltefosine. Entretanto, ainda não se tem disponível um fármaco que apresente um bom índice terapêutico associado a uma baixa toxicidade.

Quadro 1.2. Fármacos alternativos empregados na terapia da leishmaniose (Rath *et al.*, 2003).

Nome Químico	Formula estrutural proposta	Nome comercial
Isetionato de pentamidina		Lomidina
Anfotericina B		Fungizone
Miltefosine	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	
Paromomicina		Humatin

A anfotericina B é um antibiótico antifúngico utilizado como segunda escolha no tratamento de leishmaniose. Os efeitos colaterais deste fármaco são inúmeros e freqüentes, sendo uma das principais complicações deste medicamento a nefrotoxicidade. Uma nova formulação da anfotericina B, a anfotericina-B-lipossomal, vem sendo indicada a pacientes graves de leishmaniose visceral que desenvolveram insuficiência renal ou toxicidade cardíaca durante o uso com antimoníato de N-metilglucamina, porém a anfotericina-B-lipossomal apresenta um custo elevado (Ministério da Saúde ^(a), 2008).

A pentamidina tem desenvolvido bons índices terapêuticos contra leishmaniose, porém sua elevada toxicidade tem levado esse medicamento a ser utilizado como uma segunda alternativa para o tratamento dessa doença. Os principais efeitos colaterais são hipoglicemia prolongada e pancreatite que pode levar ao aparecimento de diabetes *mellitus* (BALAÑA-FOUCE *et al.*, 1998).

A paromomicina, também chamada aminosidine, é um antibiótico aminoglicosídeo que é ativo contra espécies de leishmania *in vivo* e *in vitro*. Estudos clínicos, para se testar a eficácia da paromomicina injetável contra a leishmaniose visceral, têm sido realizados na Índia, onde o tratamento antimonial padrão não é muito efetivo e as taxas de mortalidade são altas (RATH *et al.*, 2003).

O fármaco miltefosine é o primeiro via oral que vêm sendo utilizado na Índia com resultados promissores no tratamento do calazar indiano. Neste país, o antimoniato de N-metilglucamina não é mais o fármaco de primeira escolha no tratamento de leishmaniose, pois o parasita já se mostrou resistente a este medicamento (Ministério da Saúde ^(a), 2008).

1.6. Antimoniato de N-metilglucamina

No Brasil, o medicamento à base de antimônio utilizado como primeira escolha na terapêutica das diferentes formas de leishmaniose continua sendo o antimoniato de N-metilglucamina. O composto, de fórmula estrutural não definida, é solúvel em água e pouco solúvel em solventes orgânicos.

O antimoniato de N-metilglucamina é especialmente eficaz no tratamento de leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral. O medicamento provoca regressão rápida das manifestações clínicas e hematológicas da doença, bem como provoca a esterilização do parasita (RATH *et al.*, 2003).

Baixas dosagens e exposição descontínua do antimoniato de N-metilglucamina são as principais causas de falha terapêutica e do aumento de formas resistentes do parasita *Leishmania* ao antimonial pentavalente (BALAÑA-FOUCE *et al.*, 1998). Com o objetivo de padronizar o esquema terapêutico, a

Organização Mundial da Saúde (WHO) recomenda que a dose deste antimônio seja calculada em mg Sb(V)/kg/dia. O medicamento é apresentado comercialmente em ampolas de 5 mL que contêm 1,5 g do antimônio bruto, correspondendo a 405 mg de Sb(V). Portanto, o medicamento contém 81 mg de Sb(V) por 1 mL de solução injetável. A dose preconizada pela WHO é de 20 mg Sb(V)/kg peso corpóreo/dia, com aplicação endovenosa ou intramuscular, já que o fármaco é dificilmente absorvido por via gastrointestinal (Ministério da Saúde ^(b), 2008).

Após administração endovenosa ou intramuscular, o antimônio de N-metilglucamina é rapidamente absorvido e, praticamente 90% do antimônio é excretado nas primeiras 48 h pelos rins (LIMONGI & CORBETT, 1973; ZANINI *et al.*, 1997/1998).

Antimônios pentavalentes são geralmente 10 vezes menos tóxicos em células de mamíferos quando comparados aos antimônios trivalentes (tártaro emético), utilizados pela primeira vez por Vianna em 1912. Contudo, o antimônio de N-metilglucamina requer administração cautelosa, sob acompanhamento clínico e laboratorial, por ser cardiotoxico, hepatotóxico e nefrotóxico, além de poder promover distúrbios gastrointestinais e respiratórios (RATH *et al.*, 2003).

Os medicamentos, inovadores e similares, vêm apresentando problemas quanto à sua qualidade nas últimas décadas no Brasil, principalmente o que concerne à presença de contaminantes (RATH *et al.*, 2003).

Recentemente, a Gerência de Farmacovigilância em conjunto com as áreas de Inspeção e Registro da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), com a Secretaria de Vigilância em Saúde e Departamento de Assistência Farmacêutica da Secretaria de Ciência e Tecnologia e Insumos Estratégicos do Ministério da Saúde, alertam para possível formação, por uma dinâmica ainda não conhecida, de material particulado visível em algumas ampolas do medicamento antimônio de N-metilglucamina, provenientes de compostos metálicos da formulação. No entanto, não há evidências de que a formação deste particulado possa acarretar danos em seres humanos (Informe SNVS/ANVISA/GFARM, 2007).

O antimônio de N-metilglucamina é usado por mais de meio século e sua estrutura e composição ainda permanecem indeterminadas. Os dados mais

importantes sobre a caracterização do antimoniato de N-metilglucamina foram reportados por Roberts e colaboradores (ROBERTS *et al.*, 1998). Segundo os autores a razão molar antimônio:N-metilglucamina é de 1:1,37 e várias espécies complexas entre o antimônio e N-metilglucamina coexistem em solução e espécies de forma geral Sb_nNMG_{n+1} e Sb_nNMG_n , onde NMG: N-metilglucamina foram identificadas. Demicheli e colaboradores (DEMICHELI *et al.*, 1999; DEMICHELI, *et al.*, 2003), em dois trabalhos distintos sintetizaram o antimoniato de N-metilglucamina e sugerem que o suposto sítio de ligação do antimônio é através do oxigênio do C-3 da N-metilglucamina. Em um segundo trabalho, os autores obtiveram resultados que sugerem que moléculas de N-metilglucamina coordenam com Sb em dois diferentes modos, e sugerem, ainda, ou a existência de no mínimo dois complexos diferentes ou a existência de um complexo maior em que duas moléculas de N-metilglucamina são coordenadas com Sb em uma geometria assimétrica.

A solução de antimoniato de N-metilglucamina apresenta variações na osmolaridade e eficácia. Com o tempo ocorre polimerização das moléculas complexas que contêm o antimônio, entretanto, não é conhecido se tais polímeros são terapeuticamente ativos. O mecanismo de ação do antimoniato de N-metilglucamina é pouco conhecido. Há indícios que o Sb(III) é substancialmente mais potente do que o Sb(V) contra promastigotas e amastigotas de pelo menos três espécies de Leishmania. Esses resultados reforçam a hipótese de uma conversão metabólica intramacrofágica do Sb(V) em Sb(III), sendo neste caso o Sb(III) o elemento tóxico às leishmanias no estado amastigota (SERENO *et al.*, 1998). Miekeley e colaboradores (MIEKELEY *et al.*, 2002) observaram a conversão *in vivo* do antimoniato de N-metilglucamina para as formas iônicas Sb(V) e Sb(III) em pacientes com leishmaniose tratados com este fármaco. Além disso, observaram também a bio-redução do Sb(V) a sua forma trivalente mais tóxica. Esse mecanismo de redução intracelular do Sb(V) a sua forma trivalente pode ser ou não enzimático.

Até o presente, a biomolécula capaz de induzir a conversão de Sb(V) a sua forma mais tóxica trivalente e a localização onde essa reação ocorre não foram identificadas. Glutathione é um tripeptídeo, reconhecido como o tiol não protéico mais importante encontrado na maioria das células sendo importante ao sistema de

defesa interna do corpo funcionando como um potente antioxidante. A glutatona (GSH, forma reduzida) tem sido investigada para avaliar sua habilidade de promover a redução de Sb(V) a Sb(III) no antimoniato de N-metilglucamina, pois esse tripeptídeo está ligado à desintoxicação ligando-se a toxinas como metais pesados e solventes, transformando-os em uma forma que possa ser excretada pela urina ou bile. Nos estudos realizados por Frézard e colaboradores (FRÉZARD *et al.*, 2001), a reação entre Sb(V) e GSH é favorecida em pH ácido (pH 5) e a uma temperatura elevada (37 °C), condições estas encontradas dentro de fagolisossomos em que residem as Leishmanias. Sendo assim, estes dados reforçam a hipótese de Sb(V) ser convertido por GSH, ou um composto tiol relacionado, para a forma tóxica trivalente em fagolisossomos de macrófagos.

1.7. Aspectos toxicológicos e farmacológicos

Os efeitos tóxicos dos compostos de antimônio são similares aos efeitos de compostos de arsênio. Os compostos trivalentes são dez vezes mais tóxicos quando comparados aos compostos pentavalentes. Intoxicações letais por antimônio ou seus compostos são raros e os sintomas de envenenamento agudo são vômitos, náuseas, diarreia, desidratação e efeitos cardíacos (SEILER & SIGEL, 1988).

O antimônio é considerado um elemento clastogênico, mas não mutagênico no seu estado trivalente, sendo esta espécie responsável pelos efeitos tóxicos e sua meia-vida biológica é relativamente curta em mamíferos, embora haja evidências que certas quantidades são retidas no organismo por um longo período de tempo. Ainda não foi comprovada carcinogenicidade do antimônio em seres humanos. As poucas informações existentes sobre a toxicidade do antimônio são provenientes de compostos orgânicos à base de antimônio de uso farmacológico (GEBEL, 1997).

Em geral, o antimônio se acumula em órgãos vascularizados e tecidos, principalmente rins e fígado, além de possuir alta afinidade pelo baço e sangue. Uma quantidade expressiva de antimônio no sangue pode estar relacionada com a grande afinidade do Sb(III) pelos eritrócitos.

O metabolismo do antimônio está relacionado com a mudança de valência após incorporação no organismo vivo. No homem, assim como em roedores, apenas uma pequena quantidade de Sb(V) é reduzida à forma trivalente. Entretanto, quantidades similares de Sb(III) são oxidados à Sb(V) (GEBEL, 1997).

A excreção de antimônio pentavalente e trivalente em humanos é preferencialmente via renal. Entretanto, principalmente em roedores, o antimônio é removido pela bÍlis. O antimônio pentavalente é excretado mais rapidamente que o antimônio trivalente. Mais de 80% do Sb(V) administrado intravenosamente como estibogluconato é excretado na urina após 6-8 h. A cinética de compostos de antimônio pentavalente (estibogluconato e antimoniato de N-metilglucamina), após injeção intramuscular, pode ser descrita por um modelo de dois compartimentos e três termos farmacocinéticos, representando uma fase inicial de absorção com tempo de meia-vida de 0,85 h, seguida de uma fase de eliminação rápida com tempo de meia-vida de 2,02 h e, por último, uma fase de eliminação com tempo médio de meia-vida de 76 h (GEBEL, 1997).

1.8. Métodos analíticos para a determinação de antimônio em diferentes matrizes

Um número grande com uma variedade ampla de métodos analíticos para a determinação de antimônio está disponível na literatura, tais como: a espectrofotometria (RATH *et al.*, 1997; TIWARI *et al.*, 2006), espectrometria de absorção atômica (FAN, 2007), voltametria de redissolução anódica (BOND *et al.*, 1997; RENEDO & MARTINEZ, 2007), cromatografia de fluído supercrítico (LAINZ *et al.*, 1992), cromatografia líquida de alta eficiência (ZHENG *et al.*, 2001; LINTSCHINGER *et al.*, 1997), potenciometria (MOSTAFA, 2007), extração líquido-líquido em sistema automatizado de análise em fluxo (TRIVELIN *et al.*, 2006), espectrometria de absorção atômica em forno de grafite com geração de hidretos (WIFLADT *et al.*, 1997), polarografia de pulso diferencial (FRANCO *et al.*, 1995), entre outros.

Muitos métodos permitem apenas a determinação do antimônio em um dos estados de oxidação, sendo o outro determinado indiretamente por diferença entre o antimônio total e o previamente determinado. Nesse sentido, as técnicas hífenadas estão sendo empregadas no desenvolvimento de metodologias analíticas, entre as quais se destacam eletroforese capilar com espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (CE-ICP-MS), cromatografia líquida de alta eficiência com espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidretos (HPLC-HG-AFS) (DE GREGORI *et al.*, 2007) e a cromatografia líquida de alta eficiência com espectrometria de absorção atômica e geração de hidretos (HPLC-HG-AAS) (DE GREGORI *et al.*, 2001). A técnica hífenada como cromatografia líquida de alta eficiência com espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (HPLC-ICP-MS) tem sido aplicada preferencialmente devido ao alto poder de separação provido pelo HPLC e a alta seletividade oferecida pelo ICP-MS, tornando possível a determinação de Sb(III) e Sb(V) simultaneamente (ZHENG *et al.*, 2001). Apesar dos métodos que empregam as técnicas hífenadas serem promissores para a especiação de antimônio, estes métodos são pouco viáveis para serem empregados no controle de qualidade de medicamentos nas indústrias, onde se requer métodos simples, de baixo custo e de elevada frequência analítica.

Na determinação de Sb(V) pelo método espectrofotométrico têm sido empregados reagentes cromogênicos como rodamina B (TRIVELIN *et al.*, 2006, MAREN, 1996), verde brilhante (BURNS *et al.*, 1993) e cristal violeta (HUDAK *et al.*, 1997). Os métodos baseiam-se na formação de um par iônico entre o corante catiônico e o ânion hexacloroantimoniato (SbCl_6^-), em que o par iônico formado é extraído para uma fase apolar como benzeno ou tolueno; com posterior determinação do cromóforo por espectrofotometria na região do visível.

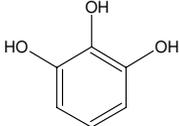
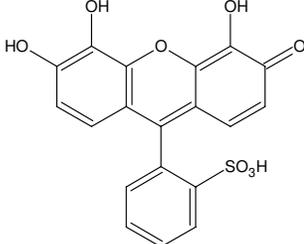
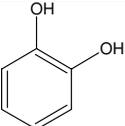
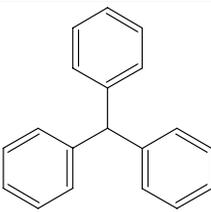
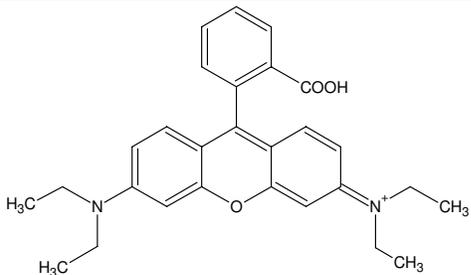
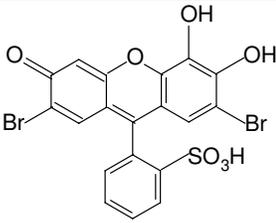
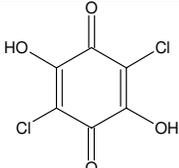
Para a determinação direta de Sb(III) em solução aquosa, reagentes específicos têm sido empregados, como iodeto, molibdato, vermelho de bromopirogalol e verde de malaquita. O uso de iodeto, molibdato e vermelho de bromopirogalol na determinação de Sb(III) foi revisada por Rath e colaboradores (RATH *et al.*, 1997). O procedimento que emprega o iodeto apresenta a vantagem de determinar simultaneamente o Sb(V), visto que nas condições experimentais

recomendadas o antimônio pentavalente é reduzido ao estado trivalente. Já o método que envolve o emprego do molibdato apresenta a desvantagem de formar um complexo heteropoliácido-Sb(III) instável em solução aquosa. O método que emprega o vermelho de bromopirogalol apresenta a vantagem de ser rápido e simples, com aplicação também à determinação, após redução prévia, de Sb(V). O método foi aplicado na determinação de Sb(III) e Sb(V) no antimoniato de N-metilglucamina (RATH *et al.*, 1997).

A especiação de antimônio por meio de técnicas eletroquímicas tem sido relatada. Na maioria dos eletrodos de trabalho disponíveis, apenas o Sb(III) é eletroativo. Portanto, métodos voltamétricos, de modo geral, envolvem a quantificação de Sb(III) e Sb total (redução prévia de Sb(V) para Sb(III), com agentes redutores).

A voltametria adsortiva de redissolução tem sido usada na determinação de antimônio através do acúmulo deste, na presença de diferentes agentes complexantes, na superfície do eletrodo de mercúrio (GONZÁLEZ *et al.*, 2007; WAGNER *et al.*, 1996). Muitos são os agentes utilizados na complexação com antimônio, dentre eles estão o pirogalol (GONZÁLEZ *et al.*, 2007), vermelho de pirogalol (GUO *et al.*, 2005), catecol (CAPODAGLIO *et al.*, 1987), trifenilmetano (BRAININA & TCHERNYSHOVA, 1974), rodamina B (TRIVELIN *et al.*, 2006), vermelho de bromopirogalol (RATH, *et al.*, 1997) e ácido cloranílico (WAGNER *et al.*, 1996). Os principais agentes complexantes empregados na determinação de antimônio por diferentes métodos estão apresentados no Quadro 1.3.

Quadro 1.3. Estrutura química dos agentes complexantes empregados na determinação de antimônio por diferentes métodos.

Agente complexante	Formula estrutural
Pirogalol	
Vermelho de Pirogalol	
Catecol	
Trifenilmetano	
Rodamina B	
Vermelho de Bromopirogalol	
Ácido Cloranílico	

Wagner e colaboradores (WAGNER *et al.*, 1996) utilizaram a voltametria adsortiva de redissolução para determinar antimônio em ambos estados de oxidação, utilizando como agente complexante o ácido cloranílico. Os autores relatam que o antimônio trivalente pode ser determinado mediante aplicação de um potencial de deposição de + 0,1 V em pH 3,0 e o antimônio pentavalente em um potencial de deposição de - 0,5 V em pH 1,0.

A importância da especiação do antimônio no fármaco antimoniato de N-metilglucamina é importante, visto que o efeito terapêutico versus toxicidade está intimamente relacionado com o estado de oxidação do elemento. A contaminação do antimoniato de N-metilglucamina por Sb(III) foi relatada por Franco e colaboradores (FRANCO *et al.*, 1995) e Rath e colaboradores (RATH *et al.*, 1997) empregando diversos métodos como a polarografia de pulso diferencial, espectrometria de absorção atômica, espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado e espectrofotometria.

Apenas em 2002, a ANVISA incluiu a monografia para o antimoniato de N-metilglucamina no Fascículo 4 da Parte II, da 4ª Edição da Farmacopéia Brasileira. Nesta monografia, sugere-se o doseamento do antimônio trivalente e pentavalente por espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos em batelada, com atomização em cela de quartzo, sendo que o antimônio pentavalente é previamente reduzido por uma solução redutora de tetraidroborato de sódio (NaBH_4) em meio alcalino (Farmacopéia Brasileira, 2003).

A Tabela 1.1 apresenta um resumo dos diferentes métodos empregados para a determinação de antimônio em diferentes matrizes.

Tabela 1.1. Alguns métodos para a determinação de antimônio, em diferentes matrizes, reportados na literatura no período de 1990 a 2007.

Matriz	Método	Limite de Quantificação (LOQ) / mol L ⁻¹	Limite de Detecção (LOD) / mol L ⁻¹	Referência
Água de oceano e Glucantime®	ASV ^(a)	-	9,44 10 ⁻¹⁰ (Sb(III))	RENEDO & MARTINEZ, 2007
Águas	ET-AAS ^(b)	-	6,6 10 ⁻¹¹ (Sb(III)) 7,55 10 ⁻¹¹ (Sb total)	FAN, 2007
Águas e Glucantime®	DPAdSV ^(c)	-	1,03 10 ⁻¹⁰ (Sb(III)) 9,48 10 ⁻⁹ (Sb(V))	GONZÁLEZ <i>et al.</i> , 2007
Algas	HPLC-HG-AFS ^(d)	4,1 10 ⁻¹⁰ (Sb(III)) 8,2 10 ⁻¹⁰ (Sb(V))	-	DE GREGORI <i>et al.</i> , 2001)
Antimoniato de meglumina	LLE-FA ^(e)	-	2,9 10 ⁻⁵ (Sb(V))	TRIVELIN <i>et al.</i> , 2006
Águas e cabelo humano	AdSV ^(f)	-	1,0 10 ⁻⁹ (Sb(III))	GUO <i>et al.</i> , 2005
Água e Ácido Fosfórico	AdSV ^(f)	-	1,72 10 ⁻⁹ (Sb(III)) 4,6 10 ⁻⁹ (Sb(V))	WAGNER <i>et al.</i> , 1996
Águas de oceano e cabelo humano	DPASV ^(g)	-	4,1 10 ⁻¹⁰ (Sb(III))	KHOO & ZHU, 1998
Soro e Urina	Espectrofotometria	-	4,9 10 ⁻⁸ (Sb(III))	TIWARI <i>et al.</i> , 2006

^(a) ASV: Voltametria de redissolução anódica.

^(b) ET-AAS: Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica.

^(c) DPAdSV: Voltametria adsortiva de redissolução com pulso diferencial.

^(d) HPLC-HG-AFS: Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de fluorescência com geração de hidreto.

^(e) LLE-FA: Extração líquido-líquido em sistema automatizado de análise em fluxo com detecção espectrofotométrica.

^(f) AdSV: Voltametria adsortiva de redissolução.

^(g) DPASV: Voltametria de redissolução anódica por pulso diferencial.

Muitas vezes, os métodos apresentados na literatura carecem de seletividade e requerem separação prévia do antimônio (III) e (V) para a sua diferenciação. Ainda, muitos destes empregam instrumentos sofisticados, reagentes de elevado custo e não são adequados para a análise de rotina. Quanto ao antimoniato de meglumina, não existe padrão analítico e ainda permanecem pontos não esclarecidos quanto à eficácia e composição do medicamento.

Neste trabalho, um método voltamétrico utilizando a voltametria de onda quadrada (SWV) foi desenvolvido para a determinação de antimônio trivalente no fármaco antimoniato de N-metilglucamina. A SWV foi empregada devido a sua simplicidade e por ser uma das técnicas de pulso mais rápidas e sensíveis, além de não existirem na literatura métodos que reportem a utilização da SWV na determinação do Sb(III).

Muitos métodos em literatura determinam o antimônio em apenas um dos estados de oxidação, sendo o outro determinado indiretamente por diferença entre o antimônio total e o previamente determinado. Neste trabalho, para a determinação apenas do antimônio pentavalente no fármaco antimoniato de N-metilglucamina, ao contrário do que é reportado em literatura, foi desenvolvido um método por cromatografia líquida de alta eficiência usando como detector de arranjo de diodos. Este método foi desenvolvido devido a sua alta aplicabilidade em indústrias farmacêuticas no doseamento de antimônio pentavalente (princípio ativo) no fármaco antimoniato de N-metilglucamina.

1.9. Voltametria de Onda Quadrada

A voltametria de onda quadrada (SWV) é uma técnica voltamétrica de pulso onde a forma do pico de corrente resultante é proveniente da sobreposição de pulsos de potencial de altura a (amplitude de pulsos), a uma escada de potenciais de largura ΔE_s (incremento de varredura de potenciais) e duração $2t$ (período). As medidas de corrente são feitas no final dos pulsos diretos e reversos e o sinal obtido, após derivação, é dado como uma intensidade da corrente resultante, apresentando

excelente sensibilidade e alta rejeição a correntes capacitivas. O pico voltamétrico resultante apresenta posição, largura e altura características do tipo de sistema redox avaliado (SOUZA *et al.*, 2004).

Os modelos utilizados no estudo de espécies eletroativas utilizando a SWV foram basicamente desenvolvidos por dois grupos de pesquisas, o grupo de Janet Osteryoung em Nova York, e o grupo de Milivoj Lovric' na Iugoslávia. A utilização de programas computacionais capazes de simular o comportamento químico para sistemas reversíveis, quase-reversíveis e irreversíveis, possibilitou a estes dois grupos desenvolverem toda a teoria da voltametria de onda quadrada, a qual pode ser utilizada no estudo analítico e na obtenção de dados relacionados à cinética e mecanismo de reações químicas sob as mais variadas condições (SOUZA, *et al.*, 2003).

Dentre as importantes vantagens apresentadas pela SWV podem-se destacar: (i) ausência da interferência da corrente capacitiva, já que as medidas de corrente são realizadas ao final do degrau de potencial onde a corrente capacitiva já se tornou mínima, melhorando a resolução dos dados experimentais, a sensibilidade analítica e, ainda possibilitando a realização das análises em altas velocidades de varredura; (ii) a análise dos componentes de corrente direta e reversa possibilita a obtenção de dados mecanísticos semelhantes àqueles obtidos por voltametria cíclica, porém com maior sensibilidade, devido à minimização das correntes capacitivas (SOUZA *et al.*, 2004).

A Tabela 1.2 apresenta um resumo para o comportamento da corrente de pico em função da variação da frequência de aplicação dos pulsos de potencial, para cada um dos sistemas redox considerados.

Tabela 1.2. Relação de corrente de pico e frequência de aplicação dos pulsos de potencial (f), de acordo com cada sistema, sendo k a constante de velocidade da reação (SOUZA *et al.*, 2003).

Sistema	Relação
Irreversível	$I_p = kf$
Reversível	$I_p = kf^{1/2}$
Quase-Reversível	Não linear

1.10. Validação de métodos analíticos

O desenvolvimento do método analítico envolve processo de avaliação que estime sua eficiência na rotina do laboratório. Determinado método é considerado validado se suas características estiverem de acordo com os pré-requisitos estabelecidos. O objetivo da validação consiste em demonstrar que o método analítico é adequado para o seu propósito. A validação do método proposto neste trabalho foi realizada segundo a Resolução nº 899, de 29 de Maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003). A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, a metodologia será considerada validada, desde que sejam avaliados parâmetros como: especificidade (seletividade), faixa linear, linearidade, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão (intra-ensaio e inter-ensaio) e exatidão.

De acordo com a finalidade, os testes a serem realizados para validação de métodos para análise de produtos farmacêuticos são classificados em quatro categorias, conforme é apresentado na Quadro 1.4.

Quadro 1.4. Classificação dos testes, segundo sua finalidade (ANVISA, 2003).

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

Para cada categoria é exigido um conjunto de testes necessários para a validação do método analítico proposto, conforme apresentado na Quadro 1.5.

Quadro 1.5. Ensaios necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade (ANVISA, 2003).

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV	
		Quantitativo	Ensaio limite			
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim	
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não	
Faixa linear	Sim	Sim	*	*	Não	
Precisão	Intra-ensaio	Sim	Sim	Não	Sim	Não
	Inter-ensaio	**	**	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 inter-ensaio.

A seguir são descritos os principais parâmetros de validação, segundo a Resolução nº 899, de 29 de Maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003).

1.10.1. Faixa Linear

A faixa linear é definida como a faixa de concentração onde a sensibilidade do método pode ser mantida constante. Normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método.

1.10.2. Linearidade

A linearidade é a capacidade do método de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro da faixa linear da curva analítica. É recomendado que a linearidade seja determinada pela análise, de no mínimo, cinco concentrações diferentes. Para expressar a linearidade do método é empregado o coeficiente de correlação (r) da curva analítica. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação é $(r) > 0,99$.

1.10.3. Sensibilidade

A sensibilidade é um parâmetro que descreve como a resposta varia em função da variação da concentração do analito. Pode ser expressa pelo coeficiente angular da reta obtida a partir da regressão linear da curva analítica.

1.10.4. Precisão

O parâmetro que avalia a proximidade entre as várias medidas efetuadas na mesma amostra é a precisão do processo analítico. A precisão é considerada em três níveis:

- Repetibilidade (precisão intra-ensaio): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação.
- Precisão intermediária (precisão inter-ensaio): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, sendo recomendado um mínimo de dois dias diferentes.
- Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial): concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos,

geralmente aplicados à padronização de metodologias analíticas (inclusão de metodologia em farmacopéias).

Usualmente, é expressa como a estimativa do desvio padrão (s) ou estimativa do desvio padrão relativo (RSD) ou variância de diversas medidas. O RSD é dado pela Equação 1.1:

$$RSD \% = \frac{s}{Média} \times 100 \quad (1.1)$$

1.10.5. Seletividade

A seletividade é a capacidade do método em diferenciar e quantificar o analito na presença de outros componentes da amostra. Para determinar a seletividade de um método os componentes da matriz, produtos de degradação e impurezas devem ser avaliados com a finalidade de verificar a interferência ou não destes com o sinal analítico. Para análise quantitativa e análise de impurezas, a seletividade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras (fármaco ou medicamento) contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais.

1.10.6. Limite de detecção

O limite de detecção é determinado como a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. A estimativa do limite de detecção pode ser feita conforme é apresentada na Equação 1.2:

$$LOD = \frac{3s_{y/x}}{m} \quad (1.2)$$

onde: $s_{y/x}$ é a estimativa do desvio padrão da curva analítica e m é o coeficiente angular da curva analítica.

1.10.7. Limite de Quantificação

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Este parâmetro é determinado, principalmente para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em fármacos e produtos de degradação em formas farmacêuticas e é expresso como concentração do analito na amostra. A estimativa do limite de quantificação pode ser feita conforme é apresentada na Equação 1.3:

$$LOQ = \frac{10s_{y/x}}{m} \quad (1.3)$$

onde: $s_{y/x}$ é a estimativa do desvio padrão da curva analítica e m é o coeficiente angular da curva analítica.

1.10.8. Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência. Várias metodologias para a determinação da exatidão podem ser empregadas:

➤ **Fármacos**

A exatidão pode ser determinada por aplicar a metodologia analítica proposta na análise de uma substância de pureza conhecida (padrão de referência) ou por comparação dos resultados obtidos com aqueles resultantes de uma segunda metodologia bem caracterizada, cuja exatidão tenha sido estabelecida.

➤ **Impurezas**

A exatidão pode ser determinada pelo método da adição de padrão, no qual são adicionadas quantidades conhecidas de impureza e/ou produtos de degradação ao medicamento ou ao fármaco ou, então, no caso da indisponibilidade de amostras de certas impurezas e/ou produtos de degradação. É aceitável comparar os resultados obtidos com um segundo método bem caracterizado (metodologia farmacopéica ou outro procedimento analítico validado).

A exatidão é calculada como a porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida do intervalo de confiança, conforme apresenta a Equação 1.4:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad (1.4)$$

1.10.9. Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos, indicando confiança durante seu uso normal.

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do trabalho foi o desenvolvimento de métodos para a especificação de antimônio em fármacos estibiados e caracterização do antimoniato de N-metilglumina.

Os objetivos específicos compreenderam:

Sintetizar o antimoniato de N-metilglucamina com a finalidade de avaliar se há conversão do antimônio pentavalente a sua forma mais tóxica (antimônio trivalente) durante a síntese e, também, se há contaminação da matéria-prima por Sb(III), e caracterizar o produto por análise elementar, espectrometria de absorção atômica por chama e métodos analíticos desenvolvidos e validados (voltametria de onda quadrada e cromatografia líquida de alta eficiência).

Caracterizar as espécies em solução no antimoniato de N-metilglumina através da espectrometria de massas em *tandem* e verificar a possibilidade de usar a técnica na especificação dos compostos de antimônio.

Desenvolver e validar métodos voltamétricos para a determinação de antimônio trivalente por voltametria de onda quadrada e antimônio pentavalente por voltametria adsortiva com redissolução catódica, usando o ácido cloranílico como agente complexante.

Desenvolver e validar método para a determinação de antimônio pentavalente por cromatografia líquida de alta eficiência.

3. Experimental

3. EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram de grau de pureza analítica e os solventes orgânicos de grau HPLC. As soluções foram preparadas em água purificada (18,2 M Ω cm) em sistema Milli-Q, modelo Academic (MILLIPORE, EUA). As fases móveis empregadas na cromatografia líquida de alta eficiência foram filtradas em filtros de membrana de 0,45 μ m.

➤ **Solução estoque de Sb(III):** Uma solução de Sb(III) de concentração 2,50 10^{-2} mol L $^{-1}$ foi preparada a partir da dissolução de 1,822 g do óxido Sb $_2$ O $_3$ (BDH, 99%) em HCl 6,0 mol L $^{-1}$ em um balão volumétrico de 500 mL. As soluções de trabalho foram preparadas pela diluição adequada da solução estoque em HCl 2,0 mol L $^{-1}$.

➤ **Solução estoque de Sb(V):** A solução estoque de Sb(V) de concentração 2,50 10^{-2} mol L $^{-1}$ foi preparada pela dissolução de 1,643 g de KSb(OH) $_6$ (Sigma, 99%) em água quente para um balão volumétrico de 250 mL. As soluções de trabalho foram preparadas diariamente pela diluição adequada da solução estoque em água.

➤ **Solução estoque de ácido cloranílico (2,5-dicloro-3,6-diidroxi-p-benzoquinona) (AC):** A solução estoque de ácido cloranílico (BDH, 98%) de concentração 1,0 10^{-2} mol L $^{-1}$ foi preparada a partir da dissolução de 1,045 g do ácido em 500 mL de água. As soluções de trabalho foram obtidas a partir da diluição adequada da solução estoque em água.

➤ **Tampão Universal Britton-Robinson (BR):** A solução de tampão BR foi preparada adicionando 2,30 mL de ácido acético (Synth, 99,7%), 2,473 g de ácido bórico (Merck, 99,8%) e 2,30 mL de ácido fosfórico (Mallinckrodt, 85%) em 1 L de

água. Para o ajuste de pH na faixa de 2 a 11 e da força iônica foi utilizado hidróxido de sódio $0,020 \text{ mol L}^{-1}$ e KCl $0,050 \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente (FRUGONI, 1957).

Soluções estoque dos interferentes avaliados:

- **Solução de N-metilglucamina (NMG):** A solução estoque de N-metilglucamina (Sigma, 99%) $0,0512 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada a partir da dissolução de 1,00 g da mesma em 100 mL de água. As soluções de trabalho foram preparadas pela diluição adequada da solução estoque em água.

- **Solução estoque de As(III):** Uma solução de As(III) de concentração $1,25 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada a partir da dissolução de 0,2473 g do óxido As_2O_3 (Merck, 99,5%) em HCl $6,0 \text{ mol L}^{-1}$ em um balão volumétrico de 100 mL. As soluções de trabalho foram preparadas pela diluição adequada da solução estoque em HCl $2,0 \text{ mol L}^{-1}$.

- **Solução estoque de Pb(II):** Uma solução de Pb(II) de concentração $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada a partir da dissolução de 0,9473 g do sal $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Carlo Erba, 99,5%) em água em um balão volumétrico de 100 mL. As soluções de trabalho foram preparadas pela diluição adequada da solução estoque em água.

- **Solução aquosa de Bi(III):** Uma solução de Bi(III) de concentração $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada a partir da dissolução de 0,7883 g do sal BiCl_3 (Riedel-de-Haën, 98%) em água em um balão volumétrico de 100 mL. As soluções de trabalho foram preparadas pela diluição adequada da solução estoque em água.

- **Solução estoque de Cd(II):** Uma solução de Cd(II) de concentração $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada a partir da dissolução de 0,5483 g do sal $\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (The Coleman & Bell Co, 98%) em água em um balão volumétrico de 100 mL. As soluções de trabalho foram preparadas pela diluição adequada da solução estoque em água.

➤ **Solução estoque de Cu(II):** Uma solução de Cu(II) de concentração $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada a partir da dissolução de 0,604 g do sal $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Merck, 99,5%) em água em um balão volumétrico de 100 mL. As soluções de trabalho foram preparadas pela diluição adequada da solução estoque em água.

3.2. Amostras

As amostras comerciais à base de antimoniato de N-metilglucamina (ANMG) de diferentes marcas e lotes foram obtidas junto a farmácias de Campinas e por doação do Centro de Referência de Doenças Infecciosas e Parasitárias de São Luís do Maranhão. O antimoniato de N-metilglucamina é um medicamento injetável comercializado em ampolas de 5 mL de solução aquosa, contendo 1,50 g de antimoniato de N-metilglucamina. Este valor é equivalente a 81,0 mg de antimônio pentavalente / mL de solução.

3.3. Equipamentos

As medidas voltamétricas foram efetuadas em um potenciostato/galvanostato AUTOLAB® PGSTAT 30 (ECO CHEMIE, Holanda) acoplado a um microcomputador, operando com o programa computacional GPES, versão 4.0 para aquisição de dados. Os eletrodos foram posicionados no Stand METROHM, modelo 663VA. Como eletrodo de trabalho, referência e auxiliar foram usados o eletrodo de gota pendente de mercúrio (HMDE) com $0,52 \text{ mm}^2$ de área; eletrodo de Ag/AgCl, KCl 3 mol L^{-1} e eletrodo de platina, respectivamente.

As análises cromatográficas foram feitas em um cromatógrafo à líquido de alta eficiência (Waters, EUA), equipado com sistema de bombeamento binário modelo 1525, detector de arranjo de fotodiodos - DAD - modelo 2996 e injetor manual modelo 7725 (Rheodyne, EUA) com uma alça de amostragem de $50 \mu\text{L}$. A aquisição dos dados foi realizada pelo programa computacional Millennium 4.0 (WATERS,

EUA). A coluna cromatográfica utilizada foi XTerra® de fase reversa híbrida (C₁₈) de dimensões 250 x 4,6 mm, 5 µm (WATERS, EUA).

Para as medidas espectrofotométricas foi usado um espectrofotômetro UV-VIS, modelo UV – 1601PC (SHIMADZU, Japão).

As medidas para a determinação de antimônio total foram realizadas em um Espectrômetro de Absorção Atômica por Chama Perkin Elmer (SHELTON, EUA), modelo AAnalyst 300. Lâmpada de descarga sem eletrodo (EDL - Electrodeless Discharge Lamp) Perkin Elmer (SHELTON, EUA) operada a 280 mA; 217,6 nm e fenda de 0,20 nm. Vazão dos gases para alimentação da chama: acetileno (3 L min⁻¹) e ar (10 L min⁻¹).

Os espectros de massas para a caracterização dos produtos de síntese e fármaco comercial do antimoniato de N-metilglucamina foram realizados em um espectrômetro de massas híbrido composto por dois analisadores de massas em série: quadrupolo (Q) e tempo de voo (*time of flight*, ToF). A aquisição de dados foi realizada mediante o programa computacional MassLynx (WATERS, EUA).

A análise elementar (C,H,N) foi realizada em um analisador elementar modelo 2400CHN Analyzer (PERKIN ELMER, EUA).

Para medidas de pH foi utilizado um pH-metro modelo DM-20 e um eletrodo de vidro combinado (DIGIMED, Brasil).

Para a desgaseificação da fase móvel foi utilizado um banho de ultra-som modelo USC 700 (UNIQUE THORTON, Brasil).

3.4. Métodos

3.4.1. Determinação de antimônio (III) por Voltametria de Onda Quadrada

A determinação voltamétrica do Sb(III) foi realizada por voltametria de onda quadrada (SWV), usando o eletrodo gota pendente de mercúrio (HMDE) como eletrodo de trabalho e o HCl 2,0 mol L⁻¹ como eletrólito suporte. Na técnica de voltametria de onda quadrada foram avaliados os parâmetros como: frequência de

aplicação dos pulsos de potencial (f) no intervalo de 50 a 350 s^{-1} , amplitude de pulsos (a) no intervalo de 5 a 40 mV e incremento de varredura de potencial (ΔE_s) no intervalo de 1 a 8 mV.

Após a otimização dos parâmetros, a determinação de Sb(III) no medicamento antimoniato de N-metilglucamina injetável foi realizada através do método de adição de padrão. Para tanto, foi adicionado à cela voltamétrica 10,0 mL do eletrólito suporte HCl 2,0 mol L^{-1} . Após a remoção do oxigênio, mediante passagem de N_2 por 10 min, foi registrado o voltamograma no intervalo de potencial de -0,05 a -0,30 V. Ao conteúdo da cela foi adicionado a amostra de antimoniato de N-metilglucamina previamente diluído (para aproximadamente $6,0 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1}) e sucessivas alíquotas de 50 μL da solução de antimônio trivalente $2,50 \cdot 10^{-3}$ mol L^{-1} (faixa linear de $1,25 \cdot 10^{-5}$ a $7,50 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1}). Entre cada adição, o oxigênio foi removido borbulhando N_2 por um período de 60 s e o voltamograma registrado.

3.4.1.1. Validação do método

Uma vez estabelecidas às condições ótimas do método analítico proposto para a determinação de Sb(III), através da voltametria de onda quadrada, foi elaborado o protocolo de validação. Os parâmetros selecionados para a validação do método compreenderam: faixa linear, linearidade, sensibilidade, seletividade, precisão intra-ensaio e inter-ensaio, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão.

Para avaliar a linearidade do método foram construídas curvas analíticas, em duplicata, para o Sb(III) usando seis níveis de concentração na faixa de $1,25 \cdot 10^{-5}$ a $7,5 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} . A curva analítica foi construída da seguinte forma: foi adicionado à cela voltamétrica 10,0 mL do eletrólito suporte HCl 2,0 mol L^{-1} . Após a remoção do oxigênio, mediante passagem de N_2 por 10 min, foi registrado o voltamograma no intervalo de potencial de -0,05 a -0,30 V. Em seguida, foram adicionadas sucessivas alíquotas de 50 μL da solução de antimônio trivalente $2,50 \cdot 10^{-3}$ mol L^{-1} . Entre cada adição, o oxigênio foi removido borbulhando N_2 por um período de 60 s e o

voltamograma registrado. Para expressar a linearidade do método foi empregado o coeficiente de correlação (r) da curva analítica. Foi avaliado também o gráfico de resíduos.

A sensibilidade foi obtida pelo coeficiente angular da reta a partir da regressão linear da curva analítica.

A precisão do método foi estudada com respeito à precisão intra-ensaio e a precisão inter-ensaio. A precisão intra-ensaio foi avaliada para um nível de concentração $6,65 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ pelo método da adição de padrão descrito anteriormente (análise da amostra do fármaco antimoniato de N-metilglucamina) em quintuplicata e a precisão inter-ensaio foi avaliada para o mesmo nível de concentração em três dias diferentes também pelo método da adição de padrão.

Para determinar a seletividade do método, foram avaliados como possíveis interferentes na determinação de Sb(III) os seguintes elementos: NMG, Sb(V), As(III), Cu(II), Cd(II), Pb(II) e Bi(III). A proporção molar interferente:Sb(III) foi mantida em 1:1; exceto para a NMG onde as concentrações foram variadas. O estudo foi realizado em um cela voltamétrica com adição de 10 mL de HCl $2,0 \text{ mol L}^{-1}$. Após a remoção do oxigênio, mediante passagem de N_2 por 10 min, foi registrado o voltamograma no intervalo de potencial de -0,05 a -0,30 V. Em seguida, foi adicionada uma alíquota de 180 μL da solução de antimônio trivalente $2,50 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, o oxigênio foi removido e o voltamograma registrado. Sequencialmente foram adicionados um a um dos interferentes sob estudo na concentração de $4,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Entre cada adição, o oxigênio foi removido borbulhando N_2 por um período de 60 s e o voltamograma registrado. O estudo com a NMG foi realizado conforme o procedimento acima descrito, porém com adições sucessivas de 100 μL de uma solução de NMG $8,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (0 a $41,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).

O limite de detecção (LOD) foi estimado pela seguinte equação 3.1:

$$LOD = \frac{3s_{y/x}}{m} \quad (3.1)$$

onde: $s_{y/x}$ é a estimativa do desvio padrão da curva analítica e m é o coeficiente angular da curva analítica.

O limite de quantificação (LOQ) foi estimado pela seguinte equação 3.2:

$$LOQ = \frac{10s_{y/x}}{m} \quad (3.2)$$

onde: $s_{y/x}$ é a estimativa do desvio padrão da curva analítica e m é o coeficiente angular da curva analítica.

A exatidão do método foi avaliada pela através da diferença obtida na determinação de Sb total por FAAS e Sb(V) por HPLC.

3.4.2. Estudo da reação química entre AC e Sb(V) por espectrofotometria

Para avaliar a reação de formação do complexo, em solução aquosa, entre AC e Sb(V) foi usada a espectrofotometria. A reação foi avaliada em diferentes pH e a cinética de formação do complexo foi avaliada mediante monitoramento da absorbância em função do tempo. Ainda, foi estabelecida a estequiometria do complexo pelo método de Job.

Para o estudo de pH, foram utilizadas soluções de tampão BR na faixa de pH 2 a 11. Para cada solução de pH foi adicionada uma alíquota de 500 μL de solução de Sb(V) $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e 125 μL de solução de AC $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ e o volume foi completado para 25 mL em balão volumétrico com tampão BR. Sendo assim, foi mantida constante a relação molar Sb(V):AC de 1:1. Portanto, a concentração de ambas as espécies nas diferentes soluções de pH foram de $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Além do tampão BR, foi realizado um estudo posterior, empregando, para tanto, solução aquosa de ácido fosfórico na faixa de pH 1 a 3. Sendo assim, foi adicionada uma alíquota de 600 μL de solução Sb(V) $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e 300 μL de solução AC $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ para um balão volumétrico de 25 mL com solução aquosa de ácido fosfórico no intervalo de pH de 1 a 3. O pH das soluções foi ajustado com ácido fosfórico $6,0 \text{ mol L}^{-1}$. Nestas condições, a razão molar de Sb(V):AC foi de 1:2,

correspondendo a concentrações de $6,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de Sb(V) e $1,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de AC.

Em seguida, foi avaliada a reação de formação do complexo em solução de HClO_4 $0,010 \text{ mol L}^{-1}$, monitorando a absorvância em um comprimento de onda de 310 nm em função do tempo (0,5 a 30 min). Para este estudo, foi adicionado o agente complexante AC ($1,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e Sb(V) ($8,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em um balão volumétrico de 25 mL com HClO_4 $0,010 \text{ mol L}^{-1}$.

A estequiometria do complexo $[\text{Sb(V)(AC)}]$ foi avaliada utilizando a espectrofotometria e o método de Job conhecido também como método das variações contínuas (HARRIS, 2003). Para realizar o método de Job, as soluções de Sb(V) e do AC de concentrações analíticas idênticas foram misturadas de forma que o volume total e a quantidade de matéria total em cada mistura fossem constantes e a razão molar variada. Foram preparados onze balões com a adição de alíquotas de soluções de AC ($2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e Sb(V) ($2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em água. As alíquotas tomadas de AC e Sb(V) para cada respectivo balão volumétrico estão apresentadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Condições experimentais para a realização do método das variações contínuas.

Balão Volumétrico	Volume de Sb(V) mL	Volume de AC mL	Razão molar AC:Sb(V)	$X_{\text{Sb(V)}}^*$
1	1	9	9:1	0,10
2	2	8	4:1	0,20
3	2,5	7,5	3:1	0,250
4	3,35	6,65	1,98:1	0,335
5	4	6	1,5:1	0,4
6	5	5	1:1	0,5
7	6	4	1:1,5	0,6
8	6,65	3,35	1:1,98	0,665
9	7,5	2,5	1:3	0,750
10	8	2	1:4	0,80
11	9	1	1:9	0,90

* $X_{\text{Sb(V)}}$ é a fração molar de Sb(V); $X_{\text{Sb(V)}} = \frac{\text{quantidade de matéria de Sb(V)}}{(\text{quantidade de matéria de Sb(V)} + \text{quantidade de matéria de AC})}$

3.4.3. Determinação de antimônio (V) por Voltametria Adsorptiva com Redissolução Catódica por Onda Quadrada

O estudo do comportamento eletroquímico do complexo [Sb(V)(AC)] foi realizado utilizando como eletrodo de trabalho o de gota pendente de mercúrio e as voltametrias cíclica (CV) e adsorptiva com redissolução catódica por onda quadrada (SWAdSV).

Para o desenvolvimento e otimização do método foram avaliados os seguintes parâmetros: frequência de aplicação dos pulsos (f) no intervalo de 20 a 280 s^{-1} , amplitude (a) no intervalo de 5 a 35 mV, incremento de varredura (ΔE_s) no intervalo de 1 a 5 mV, potencial de deposição (E_d) no intervalo de 0 a -0,70 V (vs Ag/AgCl, KCl 3,0 mol L^{-1}), tempo de deposição (t_d) no intervalo de 10 a 300 s e tempo de reação da formação do complexo, antes de iniciar o processo de deposição, no intervalo de 0 a 1200 s.

Além dos parâmetros da técnica SWAdSV, outro parâmetro avaliado foi a composição do eletrólito suporte: ácido sulfúrico 0,010 mol L^{-1} , ácido clorídrico 0,010 mol L^{-1} , tampão fosfato pH 2 e ácido perclórico 0,010 mol L^{-1} , assim como a concentração do mesmo: 0,10; 0,010 e 0,0050 mol L^{-1} .

Para avaliar a influência do AC sobre a formação do complexo em solução e o comportamento eletroquímico do mesmo foi realizado um estudo, no qual foi mantida constante a concentração de Sb(V) $5,0 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} e variado a concentração de AC na faixa de $1,92 \cdot 10^{-5}$ a $31,1 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} .

Para determinar a faixa linear do método proposto foram construídas curvas analíticas para o antimônio pentavalente usando sete níveis de concentração na faixa de $6,13 \cdot 10^{-6}$ a $42,1 \cdot 10^{-6}$ mol L^{-1} . A concentração de AC foi mantida constante em $2,0 \cdot 10^{-4}$ mol L^{-1} e o tempo de reação entre AC e Sb(V) foi de 5 min. O potencial e o tempo de deposição foram de -0,50 V e 30 s, respectivamente. A deposição foi realizada sob agitação e o tempo de equilíbrio foi de 5 s. Os voltamogramas foram registrados de 0 a -0,60 V, usando a técnica de SWAdSV.

O método desenvolvido foi, então, aplicado para a quantificação de antimônio pentavalente em medicamentos contendo antimonato de N-metilglucamina. Assim,

foi empregado o método de adição de padrão. Para tanto, foi adicionado a célula voltamétrica 10 mL de eletrólito suporte HClO_4 $0,010 \text{ mol L}^{-1}$. Após remoção do oxigênio, mediante passagem de nitrogênio por 10 min, foi registrada a curva de corrente vs potencial de 0 a $-0,60 \text{ V}$. Ao conteúdo da célula foi adicionado $200 \mu\text{L}$ de AC $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ sendo, então, registrado o voltamograma. Em seguida, foi adicionada à célula a amostra de ANMG, previamente diluída ($1,30 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), e alíquotas sucessivas de $50 \mu\text{L}$ de solução de Sb(V) $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Entre cada adição, um tempo mínimo de 5 min, com passagem de nitrogênio, foi esperado para que a reação de complexação entre Sb(V) e AC fosse completada.

3.4.4. Desenvolvimento do método de cromatografia líquida de alta eficiência

Os estudos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) usando um detector de arranjo de diodos (DAD) visaram à determinação de Sb(V) através do complexo $[\text{Sb(V)}(\text{AC})]$. Para tanto, como fase estacionária, foi utilizada uma coluna octadecil de fase reversa híbrida XTerra[®].

Foram estudados diferentes composições da fase móvel e modo de eluição (isocrático e gradiente). As fases aquosas da fase móvel testadas foram: tampão fosfato $0,010 \text{ mol L}^{-1}$, pH 2, solução aquosa de ácido fosfórico, pH 2 e solução aquosa de ácido perclórico, pH 2; e as fases orgânicas testadas foram acetonitrila e metanol.

Um cromatograma característico com a descrição das medidas que compõem os cálculos dos parâmetros cromatográficos está apresentado na Figura 3.1, onde t_M indica o tempo que as moléculas do analito ficam na fase móvel; t_R representa o tempo gasto desde a injeção do analito no sistema cromatográfico até a saída do ponto máximo do pico referente ao mesmo; W_b é a largura da base do pico cromatográfico; W_{50} é a largura do pico cromatográfico a meia altura.

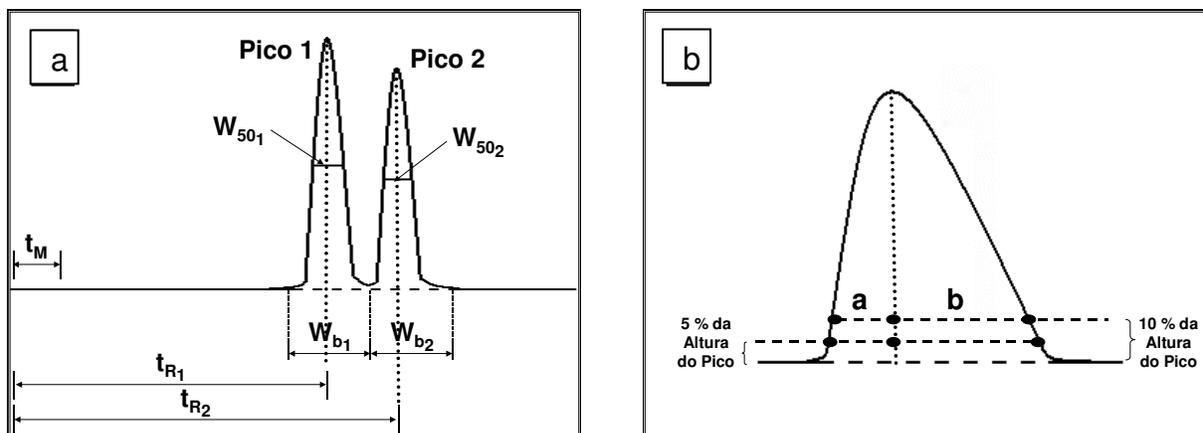


Figura 3.1. Medidas relacionadas à determinação dos parâmetros cromatográficos: a) fatores de capacidade e de separação, resolução e número de pratos; b) fatores de assimetria e de alargamento (PASCHOAL, no prelo)

A partir das medidas de t_M e t_R , é possível obter o tempo de retenção relativo (t'_R) que representa o tempo que o analito fica na fase estacionária (Equação 3.3):

$$t'_R = t_R - t_M \quad (3.3)$$

Como critério para seleção das melhores condições de separação do complexo [Sb(V)(AC)] foram avaliados os seguintes parâmetros cromatográficos conforme as respectivas faixas de valores preconizadas como adequadas: fator de assimetria (A_s): $A_s \leq 2$, número de pratos (N): $N > 2000$ e resolução ($R_s > 1,5$). A seguir, são descritas as respectivas equações para os parâmetros cromatográficos avaliados (COLLINS, *et al.*, 2005).

➤ O Fator de assimetria (A_s) mede a simetria e as distorções frontais ou posteriores (caudas) de um pico cromatográfico, sendo A_s calculado a 10% da altura do mesmo (Equação 3.4):

$$A_s = \frac{a}{b} \quad (3.4)$$

➤ O número de pratos (N) determina a eficiência de uma coluna, dimensionando a capacidade de interação da sua fase estacionária com cada um dos componentes de uma mistura que estejam eluindo através da mesma; é calculada para cada pico cromatográfico a partir do seu tempo de retenção e da largura do pico na linha de base (W_b) ou à meia altura do pico (W_{50}) (Equação 3.5):

$$N = 16 \frac{t_R^2}{W_b^2} = 5,545 \left(\frac{t_R}{W_{50}} \right)^2 \quad (3.5)$$

➤ A resolução (R_s) é um parâmetro de separação de dois componentes consecutivos em um cromatograma, calculada a partir da distância que separa os pontos máximos dos picos e da média das larguras de suas respectivas bases, ou das larguras na meia altura (Equação 3.6):

$$R_s = 2 \left(\frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{W_{b_2} + W_{b_1}} \right) = 1,18 \left(\frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{W_{(50)_2} + W_{(50)_1}} \right) \quad (3.6)$$

Maiores valores de resolução indicam melhor separação. Uma resolução de 1,5 indica separação completa.

O método cromatográfico proposto visa à determinação de Sb(V) usando como agente complexante o AC. Portanto, para o desenvolvimento do método, a concentração de AC foi avaliada, com a finalidade de obter uma concentração em que todo Sb(V) presente fosse complexado. Para tanto, foi realizado um estudo, em meio de solução aquosa de ácido fosfórico pH 2, no qual foi variada a concentração do agente complexante AC (de 15 até 219 $\mu\text{g mL}^{-1}$) sendo mantida constante a concentração de Sb(V) ($18,24 \mu\text{g mL}^{-1}$).

3.4.4.1. Análise de amostras

Para a quantificação do antimônio pentavalente em amostras de ANMG por cromatografia líquida de alta eficiência foi construída uma curva analítica em seis níveis de concentração na faixa de 3,0 a 18,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A concentração de AC foi mantida constante em 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As amostras do fármaco comercial e produtos de síntese do ANMG foram diluídas para aproximadamente 8,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e analisadas em quintuplicata.

Todas as soluções das amostras de antimoniato de N-metilglucamina estudadas foram preparadas em solução aquosa de ácido fosfórico pH 2 e analisadas após 30 min nas seguintes condições cromatográficas: fase estacionária octadecil, fase móvel sendo uma solução aquosa de ácido fosfórico pH 2 como fase aquosa (FA) e metanol como fase orgânica (FO), a eluição foi realizada por gradiente nas condições de 100% FA e 0% FO de 0 a 6 min; sendo mudado para 65% FA e 35% FO de 6 a 12 min; voltando à proporção inicial de 12 a 20 min com uma vazão de 1 mL min^{-1} com detecção em 310 nm.

3.4.4.2. Validação do método

Uma vez estabelecidas às condições ótimas do método analítico proposto para a determinação de Sb(V), através da cromatografia líquida de alta eficiência usando o ácido clorânico como agente complexante, foi elaborado o protocolo de validação. Os parâmetros selecionados para a validação do método compreenderam: faixa linear, linearidade, sensibilidade, seletividade, precisão intra-ensaio e inter-ensaio, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão.

Para avaliar a linearidade do método foram construídas curvas analíticas, em triplicata, para o antimônio pentavalente usando seis níveis de concentração na faixa de 3,0 a 18,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em solução aquosa de ácido fosfórico pH 2. A concentração de AC foi mantida fixa em 150,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e o tempo de reação química entre AC e Sb(V) foi fixado em 30 min e as condições experimentais estão apresentadas no item

3.4.4.1 (pág. 40). Para expressar a linearidade do método foi empregado o coeficiente de correlação (r) da curva analítica. Foi avaliado também o gráfico de resíduos.

A sensibilidade foi obtida pelo coeficiente angular da reta a partir da regressão linear da curva analítica.

A precisão do método foi estudada com respeito à precisão intra-ensaio e a precisão inter-ensaio. A precisão intra-ensaio foi avaliada para um nível de concentração aproximadamente $8,5 \cdot 10^{-6} \mu\text{g mL}^{-1}$ conforme apresentado no item 3.4.4.1 (análise da amostra do fármaco antimoniato de N-metilglucamina) em quintuplicata e a precisão inter-ensaio foi avaliada para o mesmo nível de concentração em três dias diferentes (item 3.4.4.1).

Para determinar a seletividade do método, foram avaliados como possíveis interferentes na determinação de Sb(V) os seguintes elementos: Sb(III), As(III), Cu(II), Cd(II), Pb(II), Bi(III) e NMG já que esta está presente no fármaco comercial ANMG. Primeiramente foi avaliada a influência da NMG na formação do complexo [Sb(V)(AC)]. Para tanto, diferentes concentrações de NMG, compreendendo a faixa de 0 a $117,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, foram adicionadas a uma quantidade fixa de Sb(V) ($18,24 \mu\text{g mL}^{-1}$) e AC ($150,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) em solução aquosa de ácido fosfórico pH 2. Para avaliar a seletividade do método frente à presença de Sb(III), As(III), Pb(II), Cu(II), Cd(II) e Bi(III) os elementos foram adicionados a uma solução de AC $150,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e Sb(V) $9,12 \mu\text{g mL}^{-1}$ na proporção de 10% em relação a concentração de Sb(V); o que corresponde a uma concentração de $0,912 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos respectivos elementos em cada solução analisada. As análises foram realizadas conforme condições cromatográficas descritas no item 3.4.4.1.

Os limites de detecção e quantificação foram estimados conforme anteriormente descritos no item 3.4.1.1 (pág. 33).

A exatidão do método foi avaliada mediante análise de amostras de ANMG de fármacos comercial e obtidas a partir de síntese pelo método cromatográfico desenvolvido e por um método alternativo (absorção atômica por chama (FAAS) e voltametria de onda quadrada (SWV). Lembrando que o método alternativo determina a quantidade de Sb(V) pela diferença entre Sb total obtido por FAAS e

Sb(III) obtido por SWV. A exatidão foi avaliada para três amostras de ANMG (duas comerciais de um mesmo fabricante de lotes diferentes e uma amostra obtida por síntese). A análise para cada amostra foi realizada em quintuplicata conforme procedimento descrito no item 3.4.4.1 (pág. 40, HPLC), no item 3.4.1 (pág. 32, SWV) e item 3.4.5 (pág. 42, FAAS).

3.4.5. Determinação de antimônio total por Espectrometria de Absorção Atômica por Chama

A determinação de antimônio total nas amostras de ANMG foi realizada mediante calibração externa por espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS). As curvas analíticas para o antimônio foram obtidas para seis níveis de concentração no intervalo de 5 a 30 mg L⁻¹ em HCl 0,2% (v/v). As amostras de ANMG comercial e amostra de síntese foram preparadas pela diluição em HCl 0,2% (v/v). A linha de absorção atômica empregada foi de 217,6 nm.

3.5. Sínteses

3.5.1. Antimoniato de N-metilglucamina

A síntese do antimoniato de N-metilglucamina foi realizada conforme literatura (DEMICHELI *et al.*, 2003) com algumas alterações. Uma quantidade equivalente a 0,020 mol de N-metilglucamina foi dissolvida em aproximadamente 10 mL de água e o pH da solução foi ajustado para 7 com ácido clorídrico 2,0 mol L⁻¹. A solução, sob constante agitação, foi aquecida até 60-70 °C quando foi adicionado lentamente 0,0080 mol de KSb(OH)₆ (antimônio pentavalente). A reação foi conduzida por 2 horas até dissolução completa dos reagentes. Após resfriar, foi adicionado lentamente 100 mL de acetona gelada. O precipitado formado foi filtrado á vácuo e estocado em dessecador sob sílica gel. O produto foi caracterizado por espectrometria de massas (item 3.61) e análise elementar.

3.5.2. Reação entre o Sb_2O_3 e N-metilglucamina

Em um béquer, 0,0040 mol de Sb_2O_3 (óxido de antimônio trivalente) foi dissolvido em 15 mL de ácido clorídrico 6,0 mol L^{-1} . O pH desta solução foi ajustado para aproximadamente 9 com hidróxido de sódio 3 mol L^{-1} . A solução foi aquecida até 60-70 °C em chapa de aquecimento. Em seguida, foi adicionado 0,020 mol de N-metilglucamina previamente dissolvida em aproximadamente 10 mL de água. O pH da solução foi ajustado para 7 com HCl 2 mol L^{-1} . A reação foi conduzida por 2 horas. Após esfriar, foi adicionado lentamente 100 mL de acetona gelada. Com esse procedimento houve a formação de um precipitado o qual foi filtrado a vácuo e guardado em dessecador sob sílica gel. O produto foi caracterizado por espectrometria de massas (item 3.61).

3.6. Caracterização dos produtos de síntese

3.6.1. Espectrometria de Massas

A técnica de espectrometria de massas em *tandem* foi utilizada para a caracterização dos antimoniais (fármacos comerciais e produtos das sínteses). A concentração das amostras para a análise foi de 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A amostra foi diluída em uma solução metanol/água (1:1 v/v) e ácido fórmico 0,1% (v/v). As condições experimentais para as análises foram: *electrospray* no modo positivo, voltagem do cone 60 V, temperatura de dessolvatação 400 °C, temperatura da fonte 140 °C, voltagem do capilar 4000 V e energia de colisão 10 V.

4. Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Método para a determinação de antimônio (III) por Voltametria de Onda Quadrada

O antimônio trivalente é eletroativo no eletrodo de mercúrio e diversos métodos têm sido reportados ao longo dos anos para a determinação deste elemento por polarografia, usando as técnicas de pulso diferencial (FRANCO *et al.*, 1995 REYES-SALAS *et al.*, 2002). No entanto, não existem descritos métodos empregando a voltametria de onda quadrada (SWV) para a determinação deste elemento. Por ser uma das técnicas voltamétricas de pulso mais rápidas e sensíveis devido à minimização da contribuição da corrente capacitiva (SOUZA *et al.*, 2004), foi avaliado, neste trabalho, o uso da SWV para a determinação de antimônio trivalente em amostras de antimoniato de N-metilglucamina. Como eletrólito suporte foi escolhido o HCl 2,0 mol L⁻¹, que foi recomendado por Franco e colaboradores (FRANCO *et al.*, 1995).

Sendo a SWV uma técnica de pulso, as correntes elétricas são medidas ao final dos pulsos diretos e reversos e o sinal é obtido como uma intensidade da corrente resultante (SOUZA *et al.*, 2003). A Figura 4.1 apresenta um voltamograma característico obtido pela técnica de SWV, onde estão representadas as correntes direta, reversa e resultante. O Sb(III) apresenta em HCl 2,0 mol L⁻¹ um pico de redução em -0,14 V, com características de processo reversível nas condições estudadas.

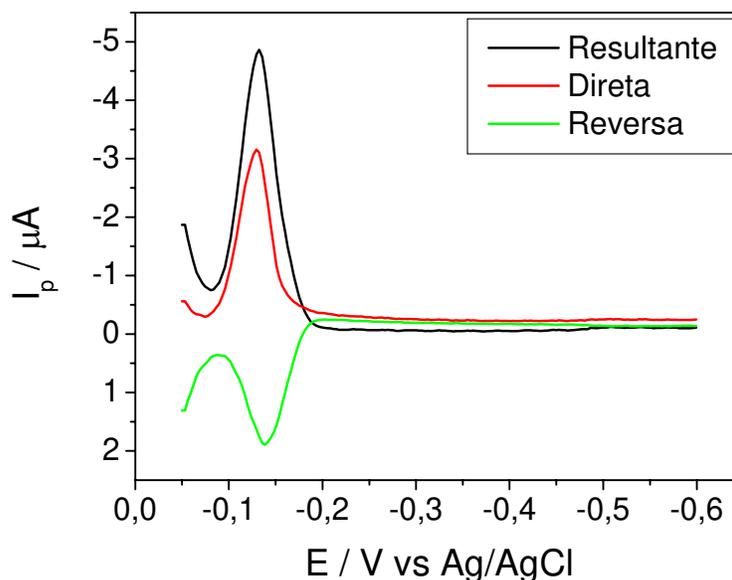


Figura 4.1. Voltamograma de onda quadrada para o Sb(III) $6,25 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Eletrólito suporte HCl $2,0 \text{ mol L}^{-1}$; $f = 200 \text{ s}^{-1}$; $a = 25 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$.

Para o desenvolvimento do método os seguintes parâmetros foram otimizados: frequência de aplicação dos pulsos de potencial, amplitude do pulso de potencial e incremento de varredura de potencial.

A frequência é uma das variáveis mais importantes na voltametria de onda quadrada, pois ela determina a intensidade dos sinais e também a sensibilidade do método.

Foi verificado, a partir dos voltamogramas obtidos (Figura 4.2a), um aumento proporcional no valor da intensidade da corrente de pico para o Sb(III) em função do aumento da frequência sem, no entanto, haver um deslocamento do potencial de pico. A Figura 4.2b mostra que a intensidade de corrente de pico varia linearmente com a frequência da onda quadrada, no intervalo de 50 a 200 s^{-1} , indicando que a redução do Sb(III) no eletrodo de mercúrio é um processo controlado por adsorção.

No entanto, pode ser observado que para frequências acima de 200 s^{-1} a relação entre corrente e frequência sofre um desvio da linearidade. Para os estudos subsequentes foi selecionada uma frequência de 200 s^{-1} , uma vez que com essa

freqüência foi obtida uma relação sinal ruído satisfatória, assim como um perfil de voltamograma adequado para quantificação.

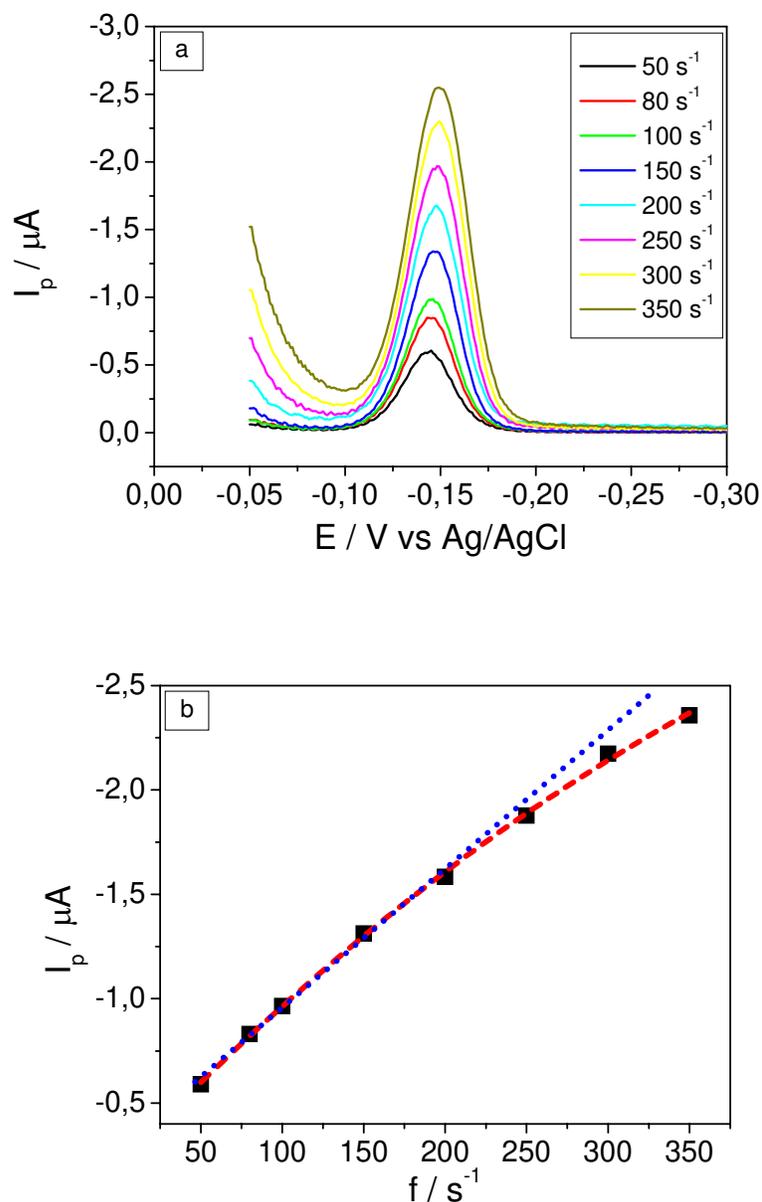


Figura 4.2. (a) Voltamogramas registrados para diferentes freqüências da onda quadrada. (b) Dependência da corrente de pico com a freqüência da onda quadrada. Eletrólito suporte HCl 2,0 mol L⁻¹, concentração de Sb(III) 7,50 10⁻⁵ mol L⁻¹, $a = 5$ mV, $\Delta E_s = 1$ mV.

Em seguida, foi avaliada a influência da amplitude de pulso da onda quadrada no intervalo de 5 a 40 mV. Na figura 4.3 estão apresentados os voltamogramas para o Sb(III) em função da variação da amplitude. Os voltamogramas mostram que para amplitudes acima de 25 mV, o potencial de pico é deslocado para potenciais menos negativos além de ocorrer uma deformação no pico. Para valores de amplitude menores que 25 mV, o aumento da intensidade de corrente de pico é linear com a amplitude (Figura 4.3b). Sendo assim, para estudos subseqüentes foi escolhido a amplitude de 25 mV.

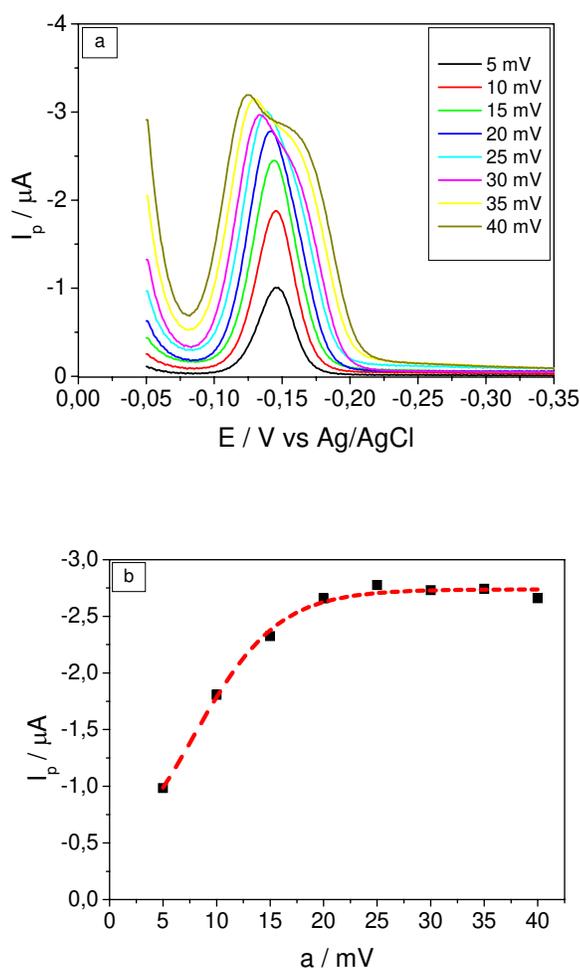


Figura 4.3. (a) Voltamogramas registrados em diferentes amplitudes de pulso da onda quadrada. (b) Dependência da corrente de pico com a amplitude de pulso. Eletrólito suporte HCl 2,0 mol L⁻¹, concentração de Sb(III) 7,50 10⁻⁵ mol L⁻¹, f = 100 s⁻¹, ΔE_s = 1 mV.

A Figura 4.4 apresenta voltamogramas para o Sb(III) obtidos para diferentes incrementos de varredura.

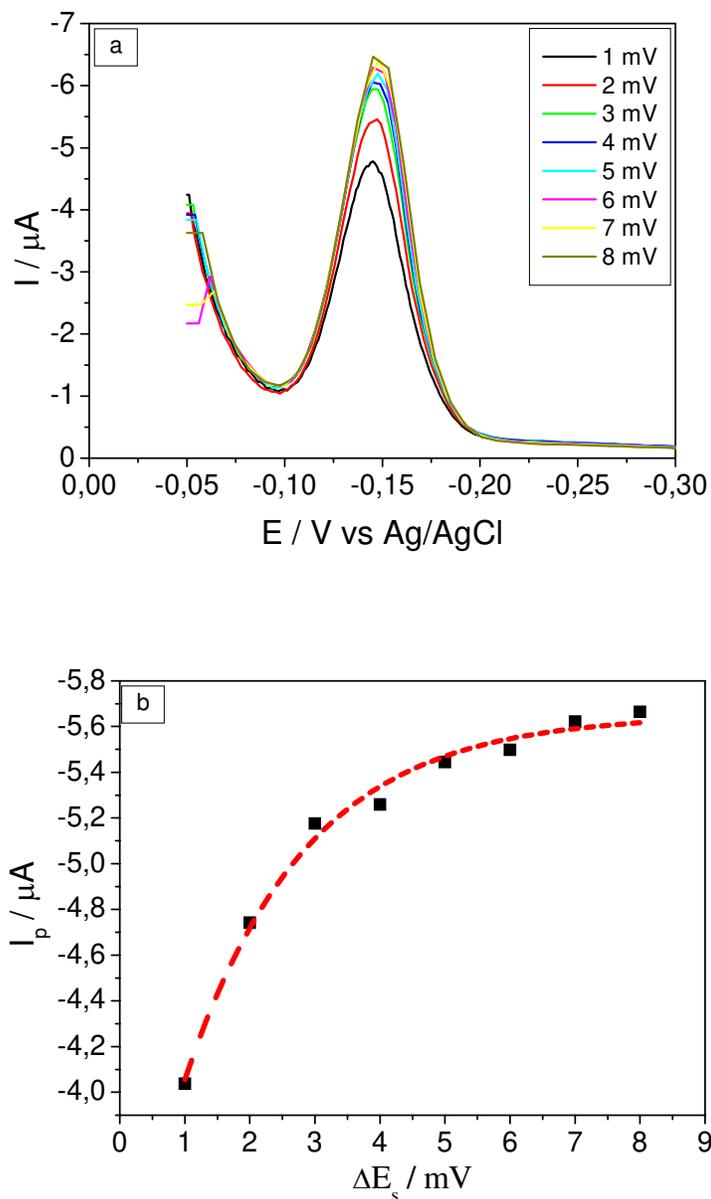


Figura 4.4. (a) Voltamogramas registrados em diferentes incrementos de varredura de potencial da onda quadrada. (b) Dependência da corrente de pico com o incremento de varredura da onda quadrada. Eletrólito suporte HCl 2,0 mol L⁻¹, concentração de Sb(III) 7,50 10⁻⁵ mol L⁻¹, $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 5 \text{ mV}$.

A velocidade de varredura na voltametria de onda quadrada é o produto da frequência pelo incremento de varredura. Deste modo, um incremento de varredura elevado pode aumentar o sinal obtido e, assim, melhorar a sensibilidade do método. A partir da Figura 4.4 pode ser observado que a intensidade da corrente de pico aumenta com o aumento do incremento de varredura. Para valores de incrementos acima de 3 mV a intensidade da corrente de pico não sofre um aumento significativo. Portanto, para os estudos subseqüentes foi escolhido um incremento de varredura de 3 mV.

Em resumo, as condições ótimas para a determinação de Sb(III) são: frequência de aplicação de pulsos de potencial: 200 s⁻¹, amplitude de pulso: 25 mV e incremento de varredura de potencial: 3 mV.

4.1.1. Seletividade: avaliação do método para a determinação de Sb(III) no antimoniato de N-metilglucamina

Com os parâmetros do método otimizados, a próxima etapa foi avaliar a seletividade do método. Para tanto, foram avaliados: NMG, Sb(V), As(III), Cu(II), Cd(II), Pb(II) e Bi(III). A proporção do possível interferente em relação a Sb(III) foi mantida em 1:1, exceto para a NMG onde as concentrações foram variadas. A NMG e Sb(V) não são eletroativos no eletrodo de mercúrio e no domínio de eletroatividade avaliado e, portanto, não afetam a seletividade do método. Além disso, adições sucessivas de NMG na faixa de 0 a 41,2 10⁻⁵ mol L⁻¹ sobre Sb(III) na célula não afetou significativamente o sinal analítico, conforme pode ser observado na Figura 4.5a. Os íons As(III), Cu(II), Cd(II), Pb(II) sofrem redução em potenciais mais negativos do que o Sb(III) nas condições experimentais empregadas e, portanto, não afetam o sinal analítico do Sb(III) (Figura 4.5b). O Bi(III) sofre redução em -0,10 V (Figura 4.5b), ou seja, muito próximo da redução do Sb(III) (-0,12 V) o que inviabiliza a determinação de Sb(III) na presença deste. Em literatura, foram verificadas contaminações do fármaco por arsênio e chumbo (KEPPLER *et al.*, 2001), porém

não há relatos na literatura da presença de bismuto no fármaco antimonialato de N-metilglucamina.

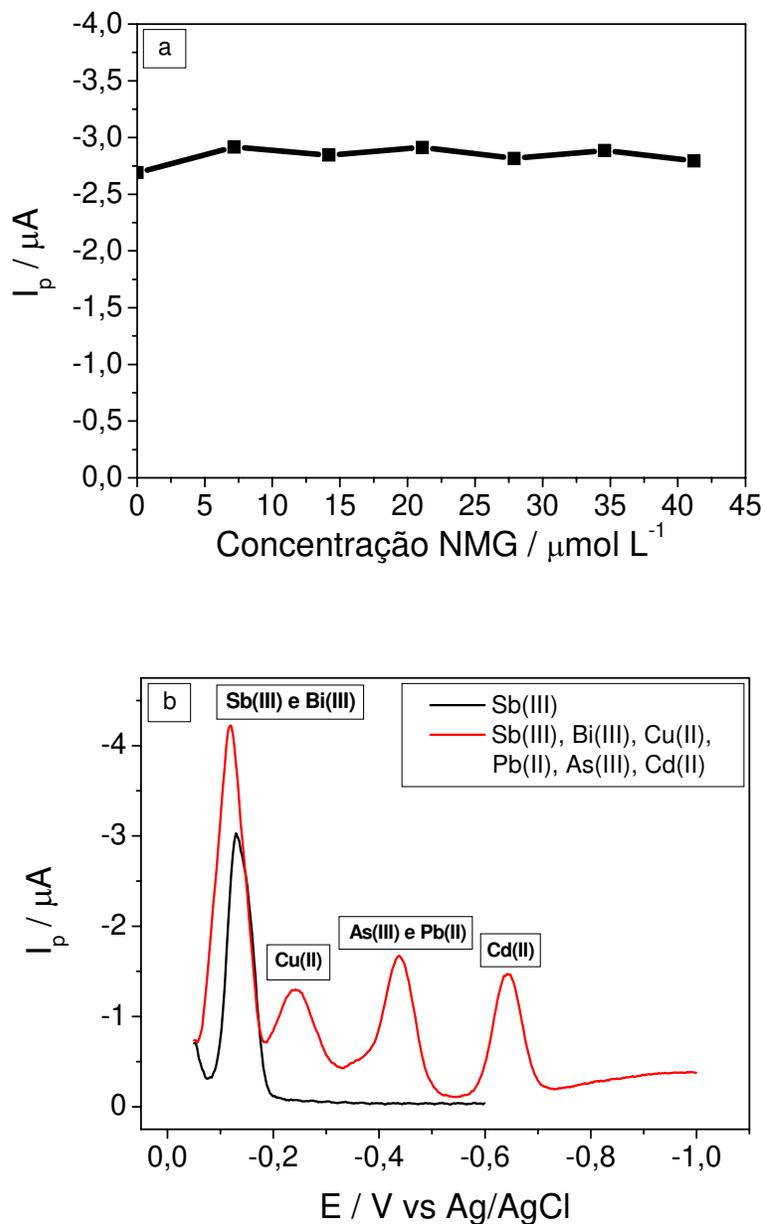


Figura 4.5. (a) Influência da concentração de NMG na intensidade da corrente de pico para o Sb(III). Concentração de Sb(III) $2,75 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. (b) Voltamogramas para o antimônio trivalente na presença dos íons Sb(V), As(III), Pb(II), Cu(II), Cd(II) e Bi(III) ($4,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Eletrólito suporte HCl $2,0 \text{ mol L}^{-1}$, concentração de Sb(III) $4,50 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $f = 200 \text{ s}^{-1}$, $a = 25 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$.

4.1.2. Parâmetros de validação

Depois de estabelecidas às condições voltamétricas para a quantificação de Sb(III) por SWV, o método desenvolvido foi validado com base na Resolução nº 899, de 29 de Maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003) para a análise de ANMG (comercial e produto de síntese), mediante avaliação dos seguintes parâmetros: faixa linear, linearidade, sensibilidade, seletividade, precisão intra-ensaio e inter-ensaio, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão.

A faixa linear, linearidade e sensibilidade foram obtidas a partir da curva analítica que foi construída, em duplicata, para seis níveis de concentração, no intervalo de $1,25 \cdot 10^{-5}$ a $7,5 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹. A curva analítica obtida, cuja equação da reta é $-I_p = 0,1568 + 0,05217 C$, onde I_p é a corrente de pico em μA e C é a concentração de Sb(III) em $\mu\text{mol L}^{-1}$, está apresentada na Figura 4.6a. O gráfico de resíduos é fundamental para podermos avaliar o grau de ajuste de um modelo aos dados I_p e concentração de Sb(III) (Figura 4.6b). A linearidade, que é o coeficiente de correlação linear obtido da regressão por mínimos quadrados foi de 0,999 e está de acordo com o critério recomendado pela ANVISA ($r > 0,99$). Em adição, o gráfico de resíduos mostra que os desvios estão aleatoriamente distribuídos, o que indica que o modelo teve um ajuste adequado.

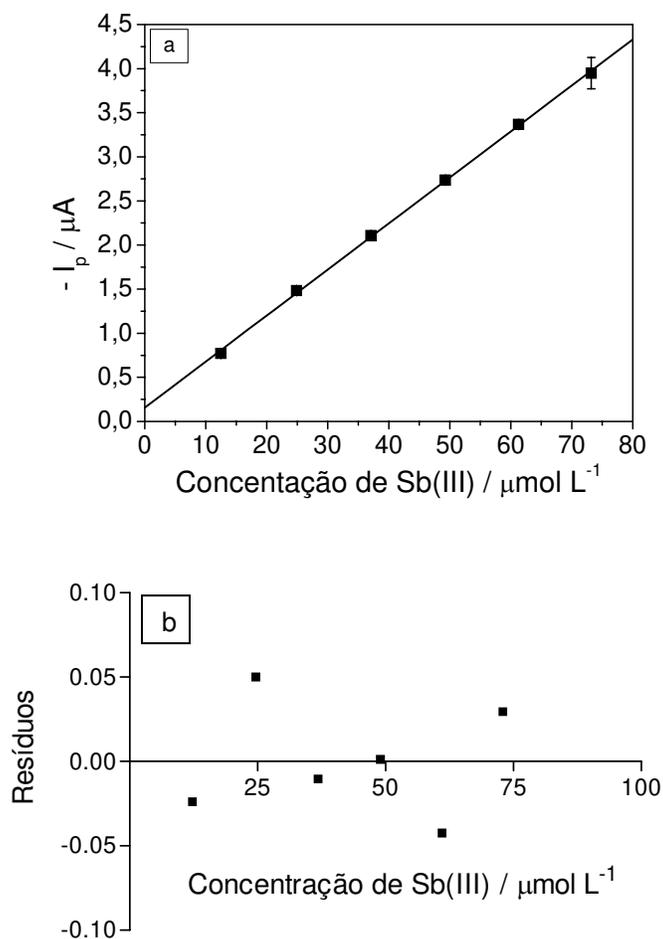


Figura 4.6. (a) Curva analítica obtida para o Sb(III) por SWV. (b) Gráfico dos resíduos. Eletrólito suporte HCl 2,0 mol L⁻¹; $f = 200 \text{ s}^{-1}$; $a = 25 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$.

A sensibilidade do método é expressa através do coeficiente angular da curva analítica e o valor está apresentado na Tabela 4.1.

A seletividade é a capacidade que o método possui de medir exatamente a concentração de um composto na presença de outros componentes (impurezas, componentes da matriz e/ou produtos de degradação). Neste trabalho foram avaliados como possíveis interferentes NMG, Sb(V), As(III), Pb(II), Cu(II), Cd(II) e Bi(III). Foi verificado que os elementos NMG, Sb(V), As(III), Pb(II), Cu(II) e Cd(II) não interferem na determinação de Sb(III). Portanto, o método é seletivo frente a esses elementos, conforme apresentado e discutido no item 4.1.1 (pág. 50). Porém o

método não é seletivo para uma razão molar 1Sb(III):1Bi(III), pois o elemento Bi(III) apresenta um pico de redução próximo ao pico de redução do Sb(III), conforme apresentado e discutido no item 4.1.1.

A precisão do método foi avaliada em termos de repetibilidade (precisão intra-ensaio) e intermediária (precisão inter-ensaio) conforme procedimento descrito no item 3.4.1.1 (pág. 33). A precisão intra-ensaio foi avaliada para um nível de concentração (análise da amostra do fármaco comercial) em quintuplicata e a precisão inter-ensaio foi avaliada para o mesmo nível de concentração em três dias diferentes. Todos os resultados foram expressos como a estimativa do desvio padrão relativo e estão apresentados na Tabela 4.1. Os valores encontrados para a precisão foram menores do que 4% e, portanto, estão de acordo com o preconizado pela ANVISA (RSD < 5%).

Os limites de detecção e de quantificação do método foram calculados a partir da curva analítica conforme equação apresentada no item 3.4.1.1 e os valores expressos em quantidade de antimônio por volume da amostra do medicamento (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Parâmetros de validação do método de determinação de antimônio trivalente em antimoniato de N-metilglucamina usando voltametria de onda quadrada.

Parâmetros		Sb(III)
	Faixa linear do método (mg mL ⁻¹)	1,5 a 9,1
	Sensibilidade (A/mol L ⁻¹)	0,05217
	Linearidade	0,999
Precisão	Intra-Ensaio (n=5, RSD ^(a) %)	4,0
	Inter-Ensaio (n=11, RSD ^(a) %)	2,0
	Detectabilidade ^(b) (mol L ⁻¹)	1,65 10 ⁻⁶
	Limite de detecção do método (LOD, mg mL ⁻¹)	0,2
	Limite de quantificação do método (LOQ, mg mL ⁻¹)	0,7

^(a) RSD: estimativa do desvio padrão relativo.

^(b) Limite de detecção na célula voltamétrica.

A exatidão do método foi avaliada através da diferença obtida na determinação de Sb total por FAAS e Sb(V) por HPLC. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.2.

O método desenvolvido foi aplicado na determinação de Sb(III) no ANMG (fármaco comercial e produto de síntese). Para tanto, foi empregado o método de adição de padrão, conforme descrito no item 3.4.1 (pág. 32) e cada amostra de antimoniato de N-metilglucamina foi analisada em quintuplicata. As amostras também foram analisadas por FAAS e HPLC. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Concentrações de antimônio trivalente obtidas para o antimoniato de N-metilglucamina pelo método proposto (SWV) e FAAS (antimônio total) e HPLC (Sb(V)).

Amostras	Teor médio \pm (ts/ \sqrt{n}) ^(a) de Sb(III) Diferença entre FAAS ^(b) e HPLC ^(c)	Teor médio \pm (ts/ \sqrt{n}) ^(a) de Sb(III) por SWV ^(d)
A1 ^(e)	7,5 \pm 0,4 mg mL ⁻¹	7,1 \pm 0,4 mg mL ⁻¹
A2 ^(e)	6,0 \pm 0,6 mg mL ⁻¹	6,3 \pm 0,4 mg mL ⁻¹
A7 ^(f)	0,80 \pm 0,03% (m/m)	0,80 \pm 0,02% (m/m)

^(a) Intervalo de confiança (P=0,05); s: estimativa do desvio padrão (n=5).

^(b) FAAS: Espectrometria de Absorção Atômica por Chama.

^(c) HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

^(d) SWV: Voltametria de Onda Quadrada.

^(e) Fármacos Comerciais: valor nominal para Sb(V): 81,0 mg mL⁻¹.

^(f) Produto de síntese partindo de Sb(V) e NMG.

Através do teste *t* pareado pode ser verificado que não existe diferença significativa, a um nível de confiança de 95%, entre as concentrações de antimônio trivalente determinados pelos métodos FAAS e HPLC e o método proposto.

Foi verificado que duas amostras do fármaco comercial analisadas contêm antimônio trivalente como contaminante, corroborando resultados reportados por Franco e colaboradores (FRANCO *et al.*, 1995) e Rath e colaboradores (RATH *et al.*, 2003; RATH *et al.*, 1997). Considerando que os fármacos A1 e A2 tem uma concentração de antimônio pentavalente nominal de 81,0 mg mL⁻¹, o teor de Sb(III) determinado corresponde a aproximadamente 8% do teor de Sb(V). Embora tenha se verificado também a presença de Sb(III) no produto de síntese obtido a partir do antimônio pentavalente, essa concentração é menor (2,5%) do que àquela encontrada no produto comercial, o que sugere que a maior parte de contaminação é a própria matéria-prima empregada.

4.2. Métodos para a determinação de antimônio pentavalente

O antimônio pentavalente não é eletroativo no domínio de eletroatividade do eletrodo de mercúrio e, portanto, não pode ser determinado diretamente por voltametria. Uma das possibilidades de realizar a determinação de Sb(V) por voltametria é através da formação de complexos, usando a voltametria adsortiva. Neste sentido, foi avaliado neste trabalho o uso do ácido cloranílico para a determinação de Sb(V), usando o eletrodo de gota pendente de mercúrio e a técnica de voltametria adsortiva com redissolução catódica por onda quadrada. Além da voltametria, também foi verificado o emprego da cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de Sb(V) através da formação do complexo entre o Sb(V) e o ácido cloranílico.

Anterior ao desenvolvimento dos métodos analíticos foi avaliada a reação química entre o AC e o Sb(V), usando, para tanto, a espectrofotometria.

4.2.1. Estudo da reação química entre AC e Sb(V) por espectrofotometria

O ácido cloranílico (AC) é um composto da classe das benzoquinonas e utilizado como agente complexante para estudos espectrofotométricos (Figura 4.7).

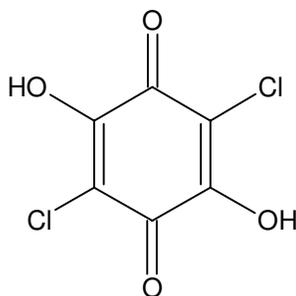


Figura 4.7. Estrutura química do ácido cloranílico.

O AC reage com o Sb(V) formando um complexo, denominado neste trabalho sempre como [Sb(V)(AC)] independente da estequiometria envolvida. A reação de formação do complexo foi avaliada por espectrofotometria.

Em solução aquosa de HClO_4 $0,010 \text{ mol L}^{-1}$, o AC apresenta uma absorção máxima em 310 nm. O complexo [Sb(V)(AC)] não apresenta banda característica na faixa de 200 a 800 nm, porém ao adicionar Sb(V) em AC ocorre uma diminuição no valor da absorbância do AC neste comprimento de onda (Figura 4.8), sendo esta diminuição proporcional à concentração de Sb(V) presente.

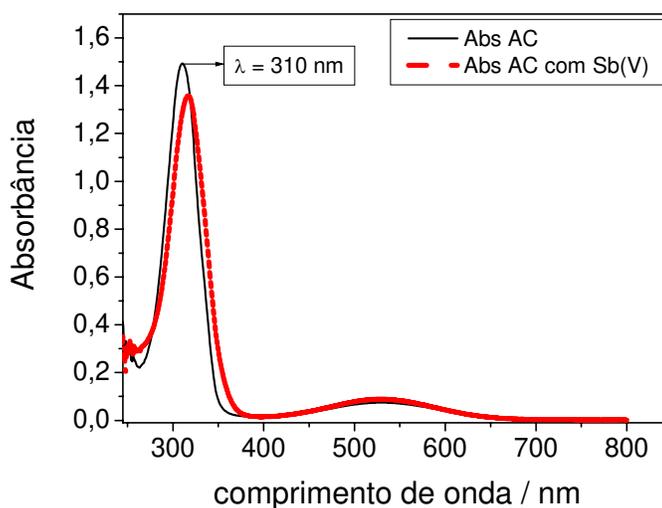


Figura 4.8. Espectro de absorção do AC e do complexo formado entre AC e Sb(V). Concentração de AC $1,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e Sb(V) $8,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de solução aquosa de HClO_4 $0,010 \text{ mol L}^{-1}$.

Para avaliar a influência do pH sobre a formação do complexo [Sb(V)(AC)] foi empregado o tampão BR na faixa de pH entre 2 a 11. A relação molar Sb(V):AC foi de 1:1, sendo, portanto, a concentração de ambas as espécies $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. A Figura 4.9 apresenta os resultados obtidos para a dependência do pH na reação de formação do complexo. Com pode ser observado, a melhor condição para a formação do complexo [Sb(V)(AC)] é em meio ácido. E, como a adição de Sb(V) na solução contendo AC provoca diminuição na absorbância do AC em 310 nm, é observado também que esta variação é maior em pH 2.

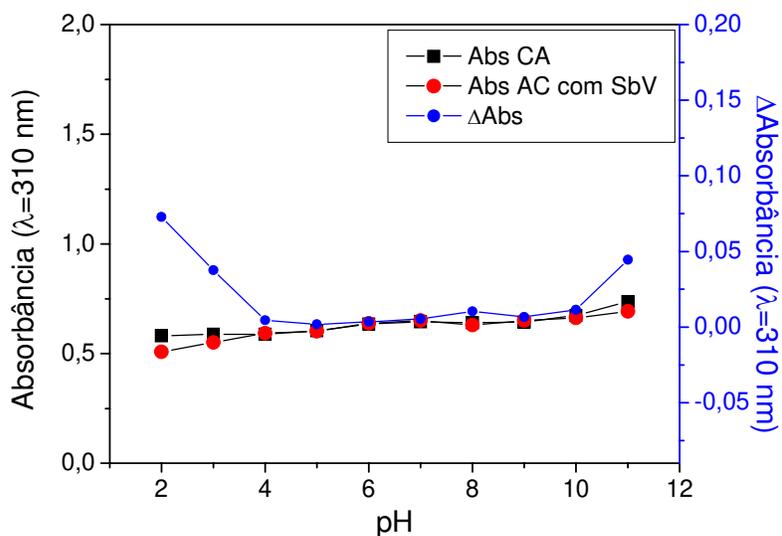


Figura 4.9. Absorbância do AC, do AC com adição de Sb(V) e do delta de absorbância em função do pH. Concentração de AC e Sb(V) $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio tampão BR na faixa de pH 2 a 11.

Ainda, foram avaliados soluções aquosas de ácido fosfórico pH 1, 2 e 3. Nestas condições, a razão molar de Sb(V):AC foi 1:2, correspondendo a concentrações, respectivamente, de $6,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Como pode ser observado na Figura 4.10, a maior diminuição da absorbância ocorre em pH 2 e em um comprimento de onda de 310 nm, o que indica que neste meio a reação entre AC e Sb(V) é favorecida.

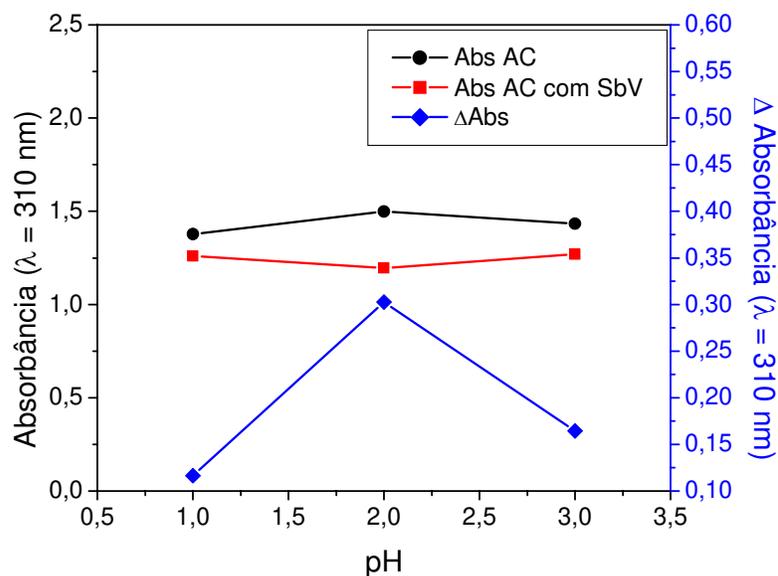


Figura 4.10. Absorvância do AC, do AC com adição de Sb(V) e do delta de absorvância em função do pH. A concentração de AC e Sb(V) foram, respectivamente, de $6,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de solução aquosa de ácido fosfórico.

Em seguida, foi avaliada a reação de formação do complexo em solução de HClO_4 $0,010 \text{ mol L}^{-1}$, através do monitoramento da absorvância em um comprimento de onda de 310 nm em função do tempo (0,5 a 30 min). Foi verificado que a variação da absorvância atinge um máximo após 5 min de reação e, após esse tempo, se mantém constante (Figura 4.11), o que indica que o complexo uma vez formado é estável por um tempo de, no mínimo, 30 min.

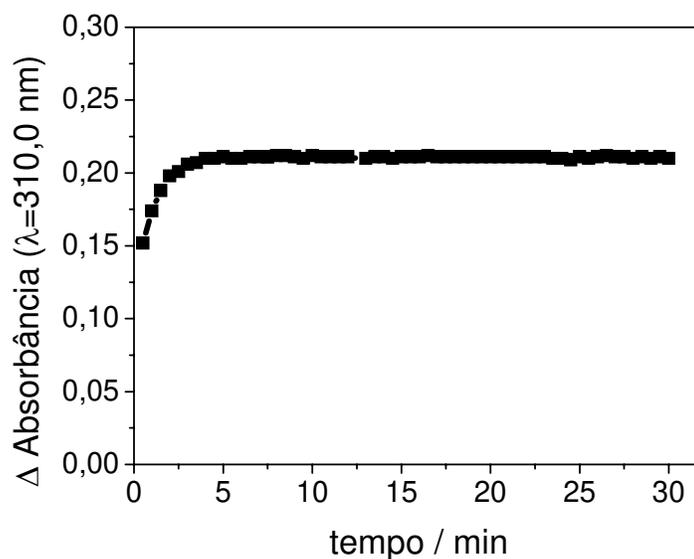


Figura 4.11. Variação da absorvância (310 nm) em função do tempo. Concentração de AC $1,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e Sb(V) $8,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de solução aquosa de HClO_4 $0,010 \text{ mol L}^{-1}$.

Para determinar a estequiometria do complexo foi utilizado a espectrofotometria e o método de Job (HARRIS, 2003). O procedimento clássico considera a mistura de alíquotas equimolares, no caso de Sb(V) e AC, tal que a concentração total de Sb(V) e AC permaneçam constantes. De acordo com a Figura 4.12, foi obtido, por extrapolação tangencial das retas, uma fração molar máxima de 0,335 a qual corresponde a uma estequiometria de 1 mol de Sb(V) para 2 mols de AC. Portanto, os resultados obtidos indicam um complexo de razão molar de 1Sb(V):2AC.

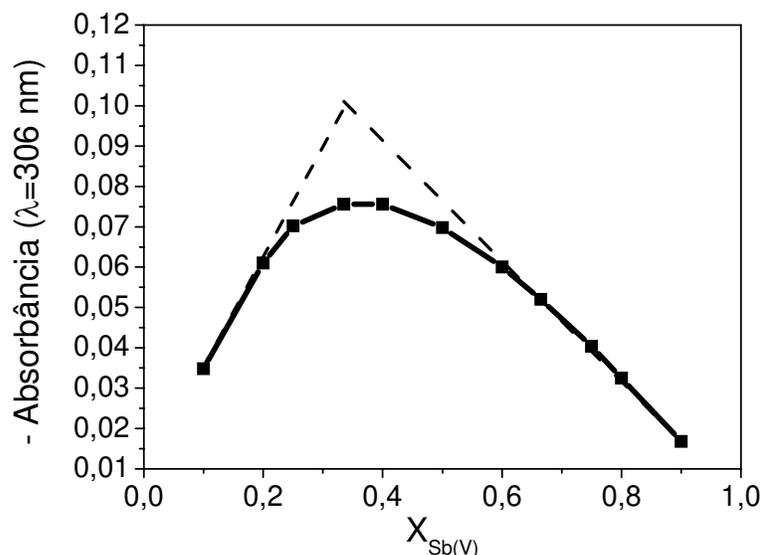


Figura 4.12. Influência da fração molar entre Sb(V) e AC na absorvância do complexo formado. Sendo $X_{Sb(V)} = \frac{\text{quantidade de matéria de Sb(V)}}{(\text{quantidade de matéria de Sb(V)} + \text{quantidade de matéria de AC})}$

4.2.2. Desenvolvimento de método para a determinação de antimônio (V) por Voltametria Adsorviva com Redissolução Catódica por Onda Quadrada

O antimônio pentavalente não é eletroativo no eletrodo de mercúrio, assim como sob outros materiais eletródicos (WAGNER *et al.*, 1996). Uma estratégia para possibilitar a determinação de Sb(V) por técnicas voltamétricas é através da adsorção de complexos de antimônio na superfície do eletrodo. Como agentes complexantes têm sido empregados pirogalol, vermelho de pirogalol, catecol, trifenilmetano, rodamina B, vermelho de bromopirogalol, ácido cloranílico, entre outros.

Wagner e colaboradores (WAGNER *et al.*, 1996) desenvolveram um método de especificação de antimônio em águas e ácido fosfórico utilizando voltametria adsorviva de redissolução por pulso diferencial e usando como agente complexante o

ácido cloranílico (AC). Neste estudo, os autores concluíram que o Sb(III) pode ser determinado em meio de HCl, pH 3,0 usando um potencial de deposição + 0,1 V, enquanto o Sb(V) pode ser determinado em meio HCl, pH 1,0 usando um potencial de deposição de -0,5 V. No entanto, os autores não descreveram as reações e o processo eletroquímico envolvido. Uma vez que os autores indicam que o método permite a especiação de antimônio pelo controle de pH do eletrólito suporte, foi avaliado se o método poderia ser empregado também na determinação de Sb(V) no antimoniato de N-metilglucamina. Para o desenvolvimento do método foi empregada a voltametria adsortiva com redissolução catódica por onda quadrada (SWAdSV).

O comportamento eletroquímico do complexo formado por Sb(V) na presença de AC foi avaliado inicialmente por voltametria cíclica. O AC não apresenta pico definido em solução de HClO₄ 0,010 mol L⁻¹ no domínio de eletroatividade estudado. Contudo, ao adicionar Sb(V) na célula contendo o AC, aparece um pico catódico em torno de -0,3 V com características de processo irreversível, uma vez que não apresenta pico na varredura reversa, conforme pode ser observado na Figura 4.13.

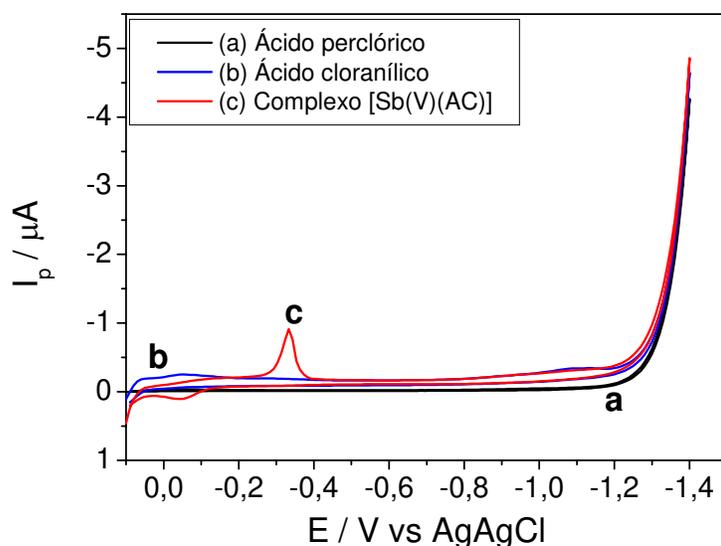


Figura 4.13. Voltamogramas cíclicos obtidos para o AC e complexo [Sb(V)(AC)]. Eletrólito suporte HClO₄ 0,010 mol L⁻¹, concentração de AC 2,0 10⁻⁴ mol L⁻¹ e Sb(V) 4,0 10⁻⁵ mol L⁻¹, potencial de deposição = -0,5 V, tempo de deposição = 30 s, tempo de reação igual a 5 min e velocidade de varredura de 150 mV s⁻¹.

Para avaliar a influência da composição do eletrólito suporte sobre o comportamento eletroquímico do complexo foram testados diferentes eletrólitos: ácido sulfúrico $0,010 \text{ mol L}^{-1}$, ácido clorídrico $0,010 \text{ mol L}^{-1}$, tampão fosfato, pH 2,0 e ácido perclórico $0,010 \text{ mol L}^{-1}$, assim como a concentração do mesmo: 0,10; 0,010 e $0,0050 \text{ mol L}^{-1}$. A concentração foi fixada em $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ (equivalente a pH 2) uma vez que foi verificado por espectrofotometria que essa concentração favoreceu a formação do complexo. Dentre os diferentes tipos de eletrólitos suporte analisados, o ácido perclórico $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ apresentou os melhores resultados, tanto quanto ao perfil voltamétrico, sem deslocamento do potencial de pico quanto à sensibilidade.

4.2.2.1. Otimização dos parâmetros da SWAdSV

A adsorção do complexo na superfície do eletrodo depende, dentre outros fatores, do potencial de deposição (E_d) e tempo de deposição (t_d).

Foi verificado que a intensidade de pico registrado na varredura catódica depende do potencial de deposição entre 0 a $-0,7 \text{ V}$. No entanto, a intensidade de corrente atinge um máximo entre $-0,3$ e $-0,6 \text{ V}$ (Figura 4.14), o que indica que a carga na superfície do eletrodo neste intervalo de potencial favoreceu a adsorção do complexo formado em solução. Sendo assim, o potencial selecionado para depositar o complexo $[\text{Sb(V)(AC)}]$ na superfície do mercúrio foi de $-0,5 \text{ V}$.

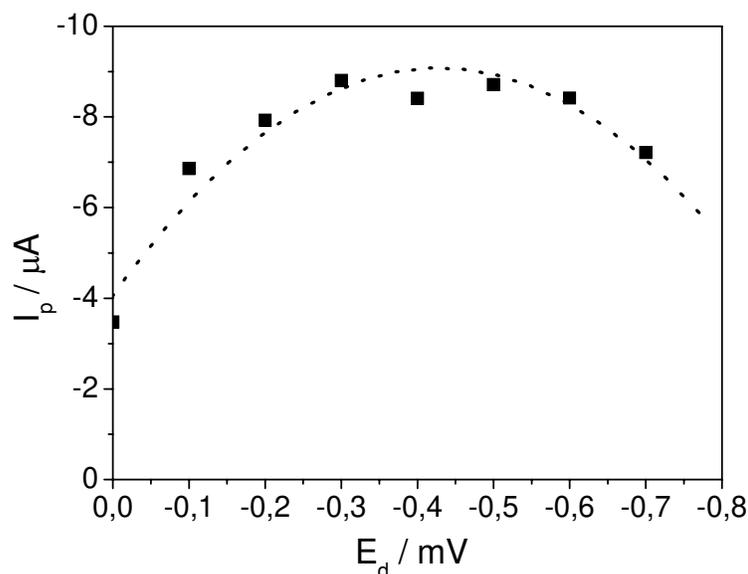


Figura 4.14. Influência do potencial de deposição sobre a intensidade de corrente de pico do complexo $[\text{Sb(V)(AC)}]$ por SWAdSV. Eletrólito suporte HClO_4 $0,010 \text{ mol L}^{-1}$, concentração de AC $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, Sb(V) $3,57 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $f = 200 \text{ s}^{-1}$, $a = 15 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$, $t_d = 30 \text{ s}$, tempo de equilíbrio = 5 s e tempo de reação química entre AC e Sb(V) igual a 5 min .

Em relação ao tempo de deposição, foi verificado que para uma concentração de Sb(V) e AC de $3,6 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente, a intensidade da corrente de pico passou a independender do tempo de deposição para tempos maiores que 50 s e menores do que 150 s (Figura 4.15), ou seja, a partir deste tempo ocorre saturação da superfície do eletrodo de mercúrio. Para tempos de deposição maiores do que 150 s ocorre uma diminuição da corrente de pico, o que pode ser decorrente da formação de filmes sucessivos do composto sobre a superfície do eletrodo, dificultando a transferência de carga. Portanto, para os estudos subsequentes foi selecionado um tempo de deposição de 30 s .

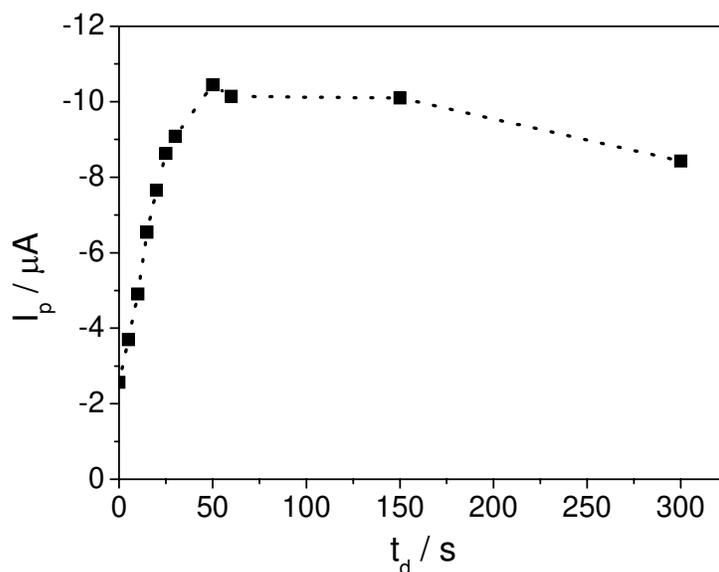


Figura 4.15. Influência do tempo de deposição sobre a intensidade de corrente de pico do complexo $[\text{Sb(V)(AC)}]$ por SWAdSV. Eletrólito suporte HClO_4 $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ AC $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, Sb(V) $3,57 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $E_d = -0,5 \text{ V}$, $f = 200 \text{ s}^{-1}$, $a = 15 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$, tempo de equilíbrio = 5 s e tempo de reação química entre AC e Sb(V) igual a 5 min.

Usando um potencial de $-0,5 \text{ V}$ para a deposição foi verificado que a intensidade da corrente de pico varia linearmente com a frequência de onda quadrada (processo controlado por adsorção) e o potencial de pico é deslocado para potenciais mais negativos (característico de processos irreversíveis) (Figura 4.16). Portanto, para estudos subseqüentes, a frequência de 200 s^{-1} foi escolhida devido à relação sinal ruído ser satisfatória.

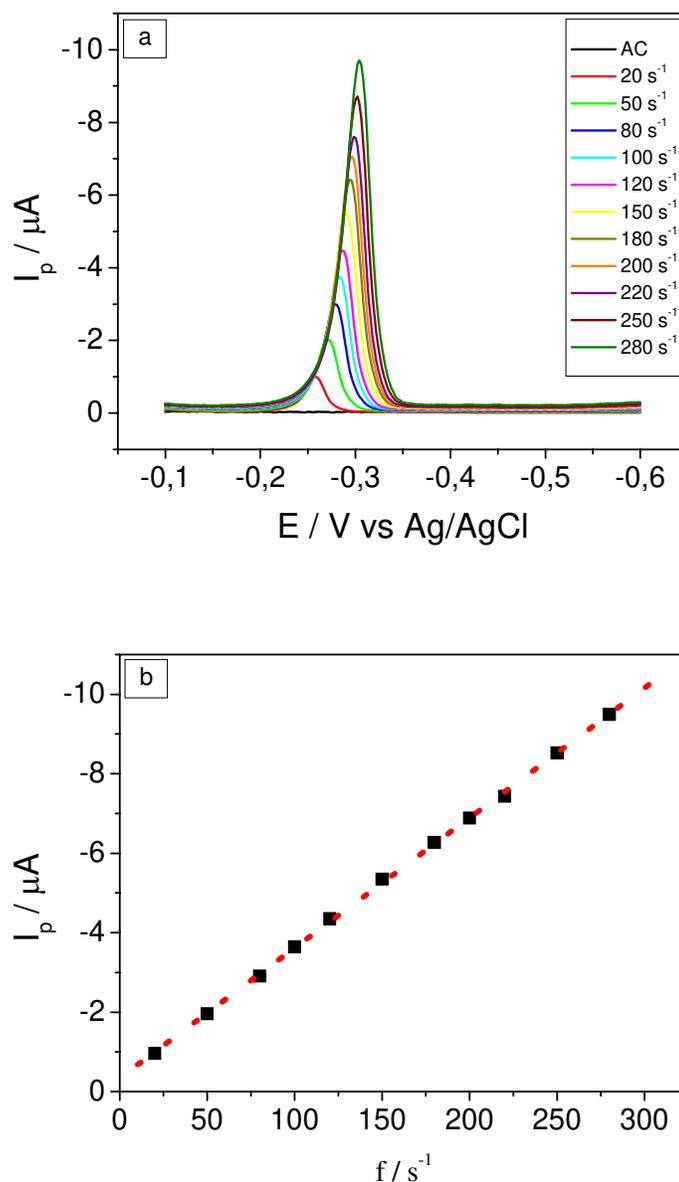


Figura 4.16. (a) Voltamogramas em função da freqüência da onda quadrada, (b) Dependência da corrente de pico do complexo $[\text{Sb}(\text{V})(\text{AC})]$ com a freqüência da onda quadrada. Eletrólito suporte HClO_4 $0,010 \text{ mol L}^{-1}$, concentração de AC e $\text{Sb}(\text{V})$ de $2,50 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $3,57 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $t_d = 30 \text{ s}$, $E_d = -0,5 \text{ V}$, tempo de equilíbrio igual 5 s e tempo de reação química entre AC e $\text{Sb}(\text{V})$ igual a 5 min .

A Figura 4.17a apresenta os voltamogramas obtidos para a redução do complexo em função da variação da amplitude de pulso da onda quadrada.

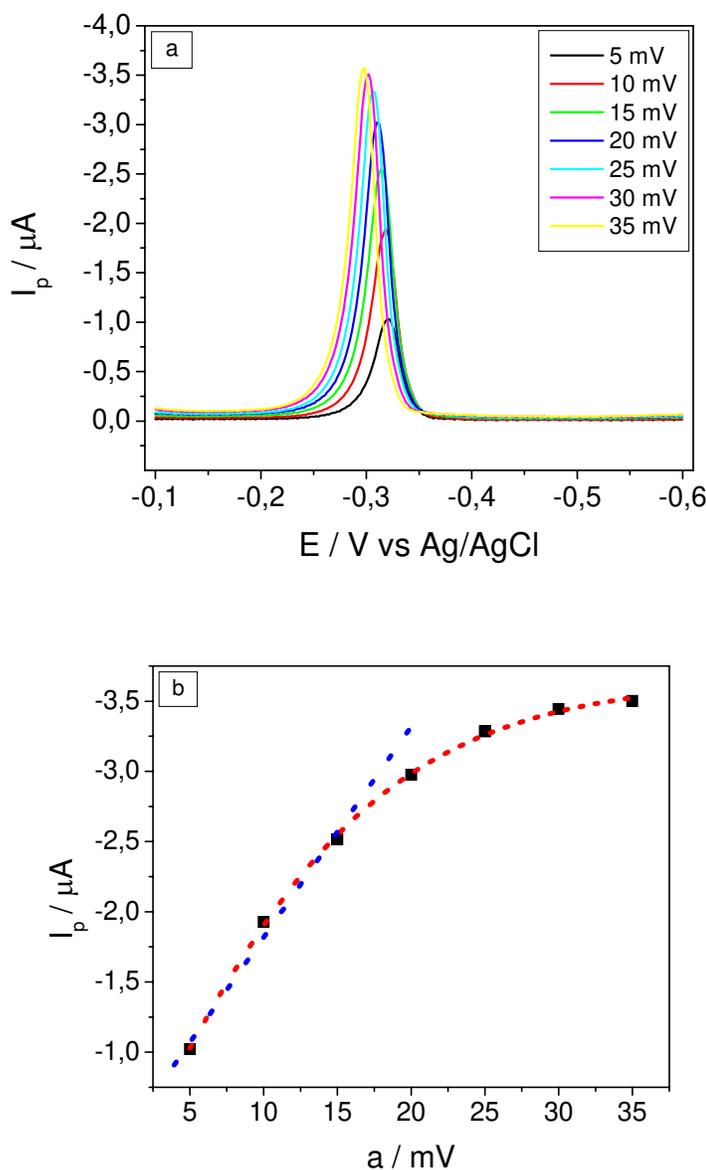


Figura 4.17. (a) Voltamogramas em função da amplitude de pulso da onda quadrada, (b) Dependência da corrente de pico do complexo $[\text{Sb(V)(AC)}]$ com a amplitude de pulso. Eletrólito suporte HClO_4 $0,010 \text{ mol L}^{-1}$, concentração de AC e Sb(V) de $2,50 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $3,57 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente, $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $t_d = 30 \text{ s}$, $E_d = -0,5 \text{ V}$ e tempo de equilíbrio igual a 5 s e tempo de reação química entre AC e Sb(V) para formação do complexo igual a 5 min .

Como pode ser observado na Figura 4.17b, valores acima de 15 mV não influenciam de maneira significativa na intensidade do sinal e para valores acima deste ocorre deslocamento para potenciais menos negativo. Desta forma, a amplitude de 15 mV foi escolhida para os estudos subseqüentes.

Foi verificado, também, que a intensidade do sinal analítico aumenta com o aumento do incremento de varredura causando um pequeno deslocamento de potencial de pico para valores mais negativos (Figura 4.18). Portanto, o valor do incremento de varredura selecionado foi de 3 mV, uma vez que a relação sinal ruído e simetria do pico foram satisfatórias nestas condições.

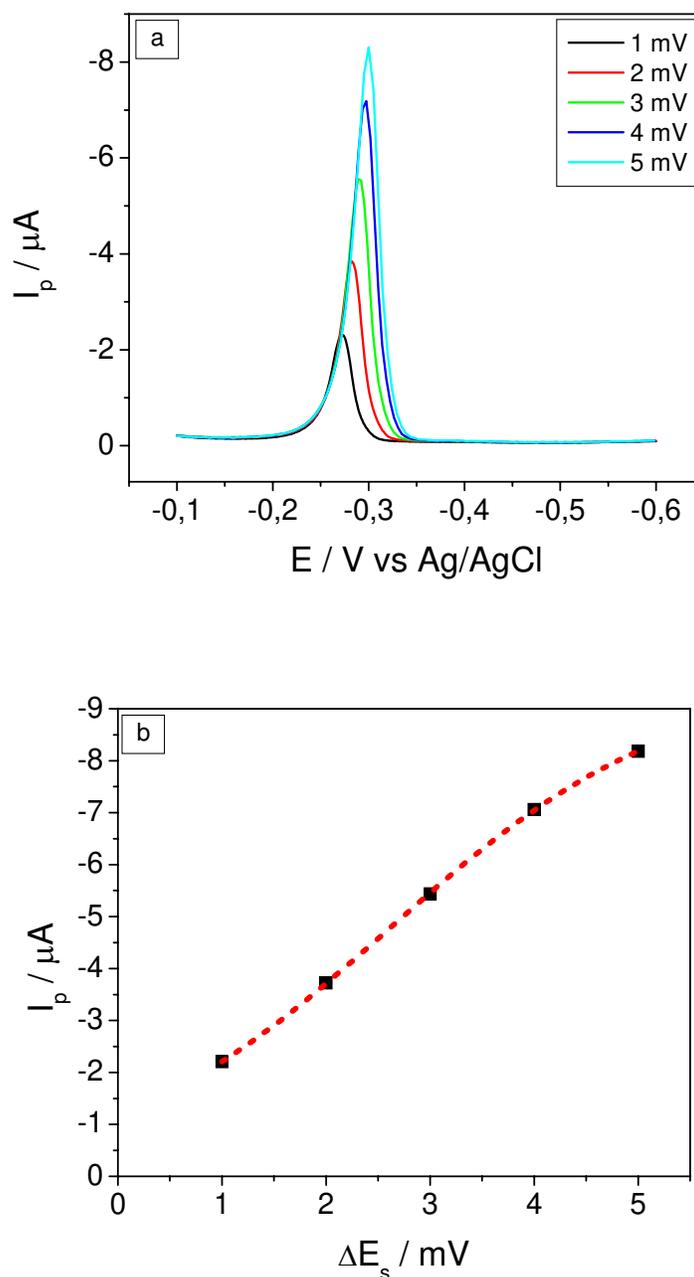


Figura 4.18. (a) Voltamogramas em função do incremento de varredura de potencial da onda quadrada, (b) Dependência da corrente de pico do complexo $[\text{Sb}(\text{V})(\text{AC})]$ com o incremento de varredura de potencial. Eletrólito suporte HClO_4 $0,010 \text{ mol L}^{-1}$, concentração de AC e $\text{Sb}(\text{V})$ de $2,50 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $3,57 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente, $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$, $t_d = 30 \text{ s}$, $E_d = -0,5 \text{ V}$ e tempo de equilíbrio igual a 5 s e tempo de reação química entre AC e $\text{Sb}(\text{V})$ igual a 5 min.

Outro estudo realizado pela técnica SWAdSV foi o tempo de reação para a formação quantitativa do complexo entre AC e Sb(V). Como pode ser observado na Figura 4.19, o máximo da formação do complexo ocorre a partir de 5 min, confirmando o resultado obtido por espectrofotometria (item 4.2.1, pág. 56). Uma vez formado o complexo esse permanece estável no meio por um período de no mínimo 20 min, no tempo estudado.

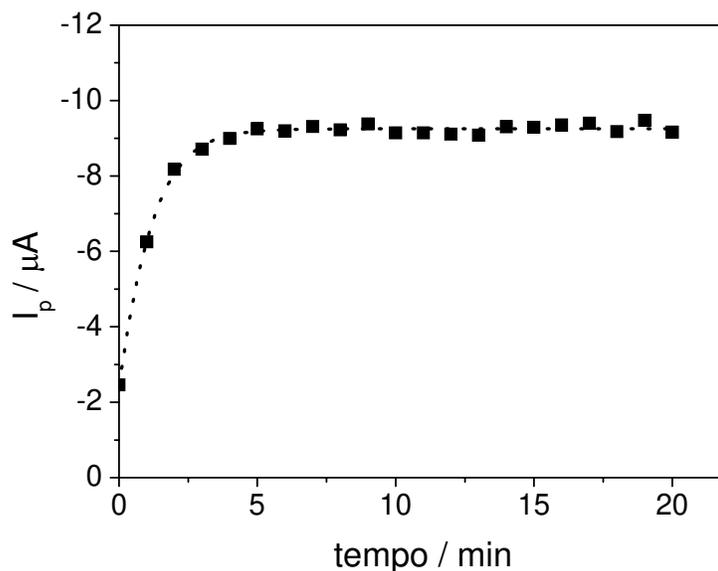


Figura 4.19. Reação de formação do complexo $[Sb(V)(AC)]$ por SWAdSV. Eletrólito suporte $HClO_4$ $0,010 \text{ mol L}^{-1}$, concentração de AC $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e Sb(V) $3,57 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $f = 200 \text{ s}^{-1}$, $a = 15 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$, $E_d = -0,5 \text{ V}$, $t_d = 30 \text{ s}$ e tempo de equilíbrio = 5 s.

As condições otimizadas para a determinação de antimônio pentavalente através do complexo formado com AC por SWAdSV foram: eletrólito suporte $HClO_4$ $0,010 \text{ mol L}^{-1}$, potencial de deposição $-0,5 \text{ V}$, tempo de deposição 30 s, frequência 200 s^{-1} , amplitude 15 mV e incremento de varredura 3 mV. Observando que, antes de qualquer medida voltamétrica, um tempo de 5 min, com passagem de N_2 , foi esperado para a reação entre AC e Sb(V) fosse completada.

4.2.2.2. Influência da concentração de AC no comportamento eletroquímico do complexo [Sb(V)(AC)]

Para avaliar a influência do AC sobre a formação do complexo em solução e o comportamento eletroquímico do mesmo foi realizado um estudo, no qual foi mantida constante a concentração de Sb(V) ($5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e variado a concentração de AC na faixa de $1,92 \cdot 10^{-5}$ a $31,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Os resultados obtidos para este estudo mostram que a intensidade de corrente de pico atinge um máximo para uma concentração de AC de aproximadamente $10,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, o que representa uma relação molar de Sb(V):AC de 1:2 (Figura 4.20). Esses resultados confirmam os anteriormente obtidos na espectrofotometria e no método de Job. No entanto, é importante observar que quando o AC está em excesso ocorre uma diminuição da corrente de pico, no entanto, sem provocar um deslocamento do potencial de pico, o que indica que o AC também adsorve na superfície do eletrodo, competindo com a superfície ativa do eletrodo.

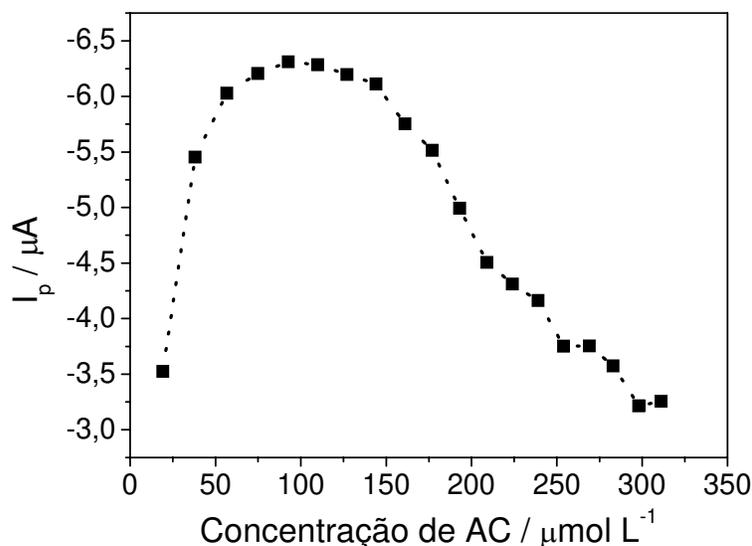


Figura 4.20. Influência da concentração do AC na formação do complexo [Sb(V)(AC)]. Eletrólito suporte HClO_4 $0,010 \text{ mol L}^{-1}$, concentração de Sb(V) $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $E_d = -0,5 \text{ V}$, $t_d = 30 \text{ s}$, $f = 200 \text{ s}^{-1}$, $a = 15 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$, e tempo de equilíbrio = 5 s e tempo de reação química entre AC e Sb(V) igual a 5 min.

4.2.2.3. Dependência da corrente de pico em função das concentrações de Sb(V) e ácido cloranílico

Os resultados anteriormente obtidos confirmam que a estequiometria do complexo [Sb(V)(AC)] é de 1:2. Sendo assim, para a construção da curva analítica é necessário garantir que para o último nível de concentração de Sb(V) se tenha um excesso de AC. Por outro lado, como o AC acaba adsorvendo na superfície do eletrodo, a concentração de AC deve ser suficiente para garantir a formação do complexo e menor possível para evitar sua adsorção na forma livre no eletrodo. Para avaliar melhor esse efeito, foram construídas curvas analíticas nas seguintes condições: Sb(V) $6,0 \cdot 10^{-6}$ a $4,0 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹ para diferentes concentrações de AC ($1,0 \cdot 10^{-4}$, $2,0 \cdot 10^{-4}$ e $3 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Resultados obtidos para sensibilidade obtida a partir de curvas analíticas na faixa de concentração de Sb(V) de $6,0 \cdot 10^{-6}$ a $4,0 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹, empregando diferentes concentrações de AC.

Concentração de AC mol L ⁻¹	Faixa linear para a concentração de Sb(V) / mol L ⁻¹	Sensibilidade A / mol L ⁻¹
$1,0 \cdot 10^{-4}$	$6,20 \cdot 10^{-6}$ a $42,1 \cdot 10^{-6}$	0,200
$2,0 \cdot 10^{-4}$	$6,13 \cdot 10^{-6}$ a $42,0 \cdot 10^{-6}$	0,127
$3,0 \cdot 10^{-4}$	$6,10 \cdot 10^{-6}$ a $41,3 \cdot 10^{-6}$	0,104

Embora, tenha se obtido uma maior sensibilidade para a menor concentração do AC, foi verificado que a curva analítica não passou pela origem e a faixa linear foi menor do que a obtida para as demais concentrações de AC, conforme apresentado na Figura 4.21. Tendo como compromisso faixa linear e sensibilidade foi selecionada a concentração de $2,0 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹ de AC para construção da curva analítica.

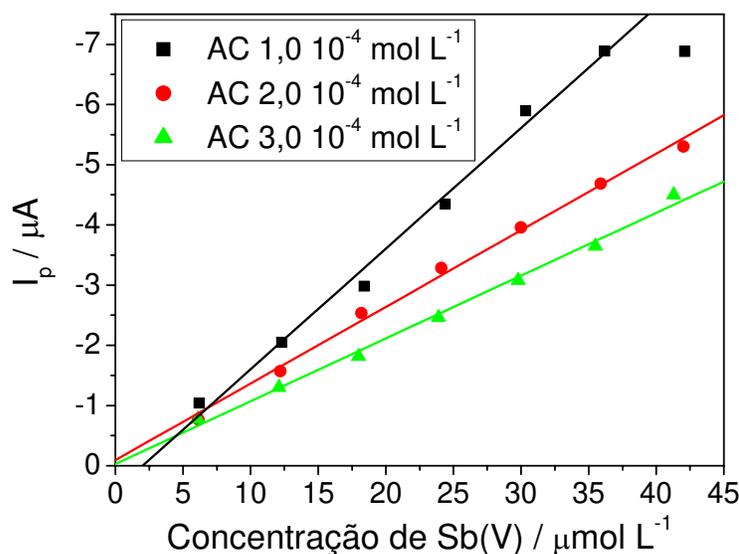


Figura 4.21. Dependência da corrente de pico em função das diferentes concentrações de ácido cloranílico. Eletrólito suporte HClO_4 $0,010 \text{ mol L}^{-1}$, concentração de Sb(V) na faixa de $6,10 \cdot 10^{-6}$ a $42,1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $f = 200 \text{ s}^{-1}$, $a = 15 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$, $E_d = -0,5 \text{ V}$, $t_d = 30 \text{ s}$ e tempo de equilíbrio = 5 s e tempo de reação química entre AC e Sb(V) = 5 min .

Com as condições estudadas e otimizadas para o método SWAdSV, sendo estas: eletrólito suporte HClO_4 $0,010 \text{ mol L}^{-1}$, tempo de reação entre AC e Sb(V) como 5 min , $E_d = -0,5 \text{ V}$, $t_d = 30 \text{ s}$, $f = 200 \text{ s}^{-1}$, $a = 15 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ e concentração de AC de $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; foi construída uma curva analítica, em triplicata, para 7 níveis de concentração, no intervalo de $6,13 \cdot 10^{-6}$ a $42,1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. A curva analítica obtida, cuja equação da reta é $-I_p = 0,07375 + 0,129 C$, onde I_p é a corrente de pico em μA e C é a concentração de Sb(V) em $\mu\text{mol L}^{-1}$, está apresentada na Figura 4.22a. O gráfico de resíduos está apresentado na Figura 4.22b. A linearidade, que é o coeficiente de correlação linear obtido da regressão por mínimos quadrados é de $0,998$ e está de acordo com o critério recomendado pela ANVISA ($r > 0,99$). A sensibilidade do método, expresso através do coeficiente angular da curva, foi de $0,129 \text{ A} / \text{mol L}^{-1}$.

Em adição, o gráfico de resíduos mostra que os desvios estão aleatoriamente distribuídos, o que indica que o modelo teve um ajuste adequado.

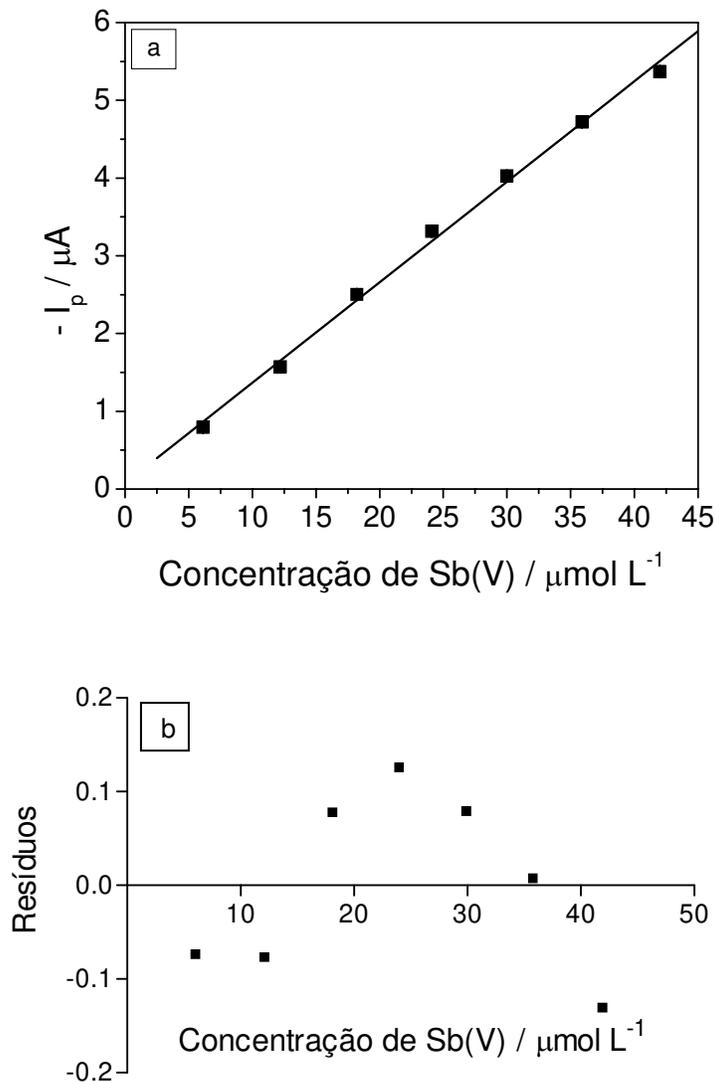


Figura 4.22. (a) Curva analítica obtida para o Sb(V) por SWAdSV, (b) Gráfico dos resíduos. Eletrólito suporte $HClO_4$ $0,010 mol L^{-1}$, concentração de AC $2,0 \cdot 10^{-4} mol L^{-1}$, $f = 200 s^{-1}$, $a = 15 mV$, $\Delta E_s = 3 mV$, $E_d = -0,5 V$, $t_d = 30 s$ e tempo de equilíbrio = $5 s$ e tempo de reação química entre AC e Sb(V) = $5 min$.

4.2.2.4. Seletividade: avaliação do método para a determinação de Sb(V) no antimoniato de N-metilglucamina

O método desenvolvido para Sb(V) com ácido cloranílico foi então avaliado para ser aplicado na determinação de Sb(V) no ANMG. A diferença é que na amostra do medicamento o Sb(V) se encontra complexado com a NMG. Segundo Roberts e colaboradores (ROBERTS *et al.*, 1998) coexistem várias espécies de Sb-NMG em solução. Essas espécies, de fórmula geral Sb_nNMG_{n+1} e Sb_nNMG_n , foram confirmadas neste trabalho por espectrometria de massas (item 4.2.5.2, pág. 95). Sendo assim, para que o método voltamétrico desenvolvido possa ser aplicado nesta matriz é necessário que o Sb(V) forme um complexo mais estável com o AC do que com a NMG e que a NMG não interfira na adsorção do complexo eletroativo na superfície do eletrodo.

Para avaliar o comportamento eletroquímico do complexo $[Sb(V)(AC)]$ na presença de NMG foi realizado um estudo no qual foram mantidas constantes a concentração de Sb(V) ($4,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e a de AC ($20,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e a concentração de NMG foi variada de 0 a $160 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, correspondendo uma relação Sb(V):AC 1:5 e Sb(V):NMG no máximo 1:4. Essa relação foi selecionada uma vez que no medicamento, teoricamente, a relação molar entre Sb(V):NMG é de 1:2.

Como pode ser observado na Figura 4.23b, a NMG influencia o comportamento eletroquímico do complexo $[Sb(V)(AC)]$, pois a intensidade de corrente de pico diminui com a adição de NMG na célula. Foi verificada uma diminuição do sinal analítico de 55% para uma relação molar de Sb(V):NMG de 1:4 que corresponde a uma concentração de $160 \mu\text{mol L}^{-1}$ para a NMG. Além disso, é observado na Figura 4.23a que há uma possível formação de uma segunda espécie que adsorve na superfície do eletrodo e que apresenta um pico catódico em -0,5 V. A corrente de pico para este novo composto formado aumenta com a adição da NMG.

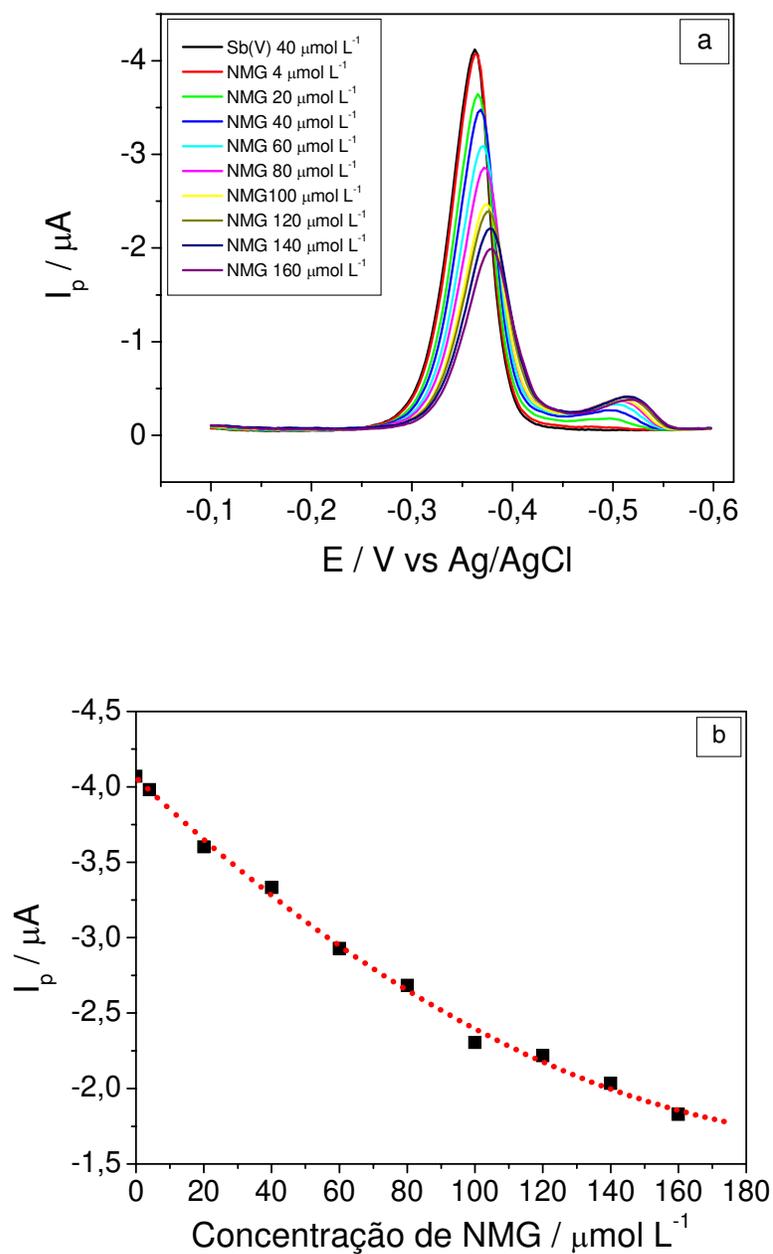


Figura 4.23. (a) Voltamograma da variação da concentração da NMG, (b) Influência da concentração de NMG na determinação de Sb(V) por SWAdSV usando AC como agente complexante. Eletrólito suporte HClO_4 $0,010 \text{ mol L}^{-1}$, concentração de AC $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e Sb(V) $4,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $f = 200 \text{ s}^{-1}$, $a = 15 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$, $E_d = -0,5 \text{ V}$, $t_d = 30 \text{ s}$ e tempo de equilíbrio = 5 s e tempo de reação química entre AC e Sb(V) = 5 min .

Além da NMG, o antimônio trivalente também foi avaliado no processo já que a presença deste íon foi verificada no fármaco antimoniato de N-metilglucamina. O Sb(III) foi adicionado à solução de Sb(V) $1,07 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em uma proporção molar Sb(V):Sb(III) de 1:0,1; o que corresponde a uma concentração de $1,07 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ do íon na solução analisada. Esta proporção estudada é equivalente a contaminação de 10% de Sb(III) encontrada no antimoniato de N-metilglucamina como descrito por Franco e colaboradores (FRANCO *et al.*, 1995) e também verificada neste trabalho.

A Figura 4.24 apresenta os resultados obtidos para a análise do complexo na presença de Sb(III).

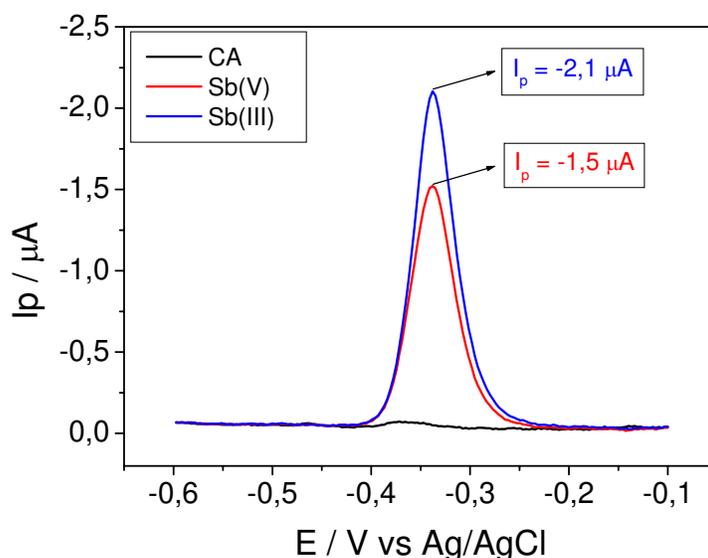


Figura 4.24. Voltamograma da influência de Sb(III) na determinação de antimônio pentavalente por SWAdSV usando AC como agente complexante. Eletrólito suporte HClO_4 $0,010 \text{ mol L}^{-1}$, concentração de AC $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e Sb(V) $1,07 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e, Sb(III) $1,07 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $f = 200 \text{ s}^{-1}$, $a = 15 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$, $E_d = -0,5 \text{ V}$, $t_d = 30 \text{ s}$ e tempo de equilíbrio = 5 s e tempo de reação química entre AC e Sb(V) = 5 min .

Como pode ser observado na Figura 4.24 a presença de antimônio trivalente, em uma concentração dez vezes menor do que a de Sb(V), aumenta a corrente de pico do complexo de Sb(V) em 40%. Esses resultados sugerem que o Sb(III) também complexa com o AC, neste meio, e que o complexo adsorve no mesmo potencial de

deposição. Sendo assim, o Sb(III) é um interferente em potencial e a presença deste não permite alcançar a seletividade requerida para fins quantitativos.

Com base nos resultados obtidos durante a avaliação da seletividade do método, e considerando que a NMG e o Sb(III) estão presentes nas amostras do fármaco em questão, não é viável aplicar o método voltamétrico para a quantificação de Sb(V) diretamente na amostra. A quantificação somente pode ser realizada após um tratamento prévio da amostra, no qual devem ser eliminados os interferentes. A maneira mais simples seria empregar uma digestão com ácido nítrico/ácido clorídrico. Embora, nestas condições, ocorreria a destruição da matéria orgânica e da NMG, o Sb(III) seria oxidado para o Sb(V) e a quantificação pelo método desenvolvido seria em base ao antimônio total na amostra. Contudo, a concentração de antimônio trivalente pode ser determinada diretamente por métodos voltamétricos já que este elemento é eletroativo no eletrodo de mercúrio assim como em outros tipos de eletrodo (GUO *et al.*, 2005). Deste modo, a concentração de Sb(V) pode ser determinada pela diferença.

No entanto, como uma das propostas era desenvolver um método analítico para a especiação de Sb(V) no ANMG e isso não seria viável pelo procedimento voltamétrico desenvolvido, foi avaliada a possibilidade de separar os compostos formados entre as espécies de antimônio com ácido cloranílico e a NMG por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), usando uma coluna de fase reversa octadecil. Cabe destacar, que a literatura não contempla métodos cromatográficos que visam à determinação de Sb(V) por HPLC. O desenvolvimento do método cromatográfico está descrito a seguir.

4.2.3. Desenvolvimento de método para a determinação de antimônio (V) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Uma vez que o AC forma um complexo estável com o Sb(V) foi avaliada a possibilidade de empregar esse complexo para a quantificação do Sb(V) por HPLC, usando uma coluna de fase reversa octadecil. Estudos iniciais evidenciaram que é

possível promover a separação do complexo [Sb(V)(AC)] do AC livre nesta fase estacionária e que existe uma relação linear entre a concentração de Sb(V) e área no tempo de retenção do complexo que pode ser empregada para fins quantitativos.

Estudos preliminares foram conduzidos para estabelecer uma composição de fase móvel que permitisse uma separação adequada do AC do complexo. Para tanto, foram avaliadas as seguintes fases móveis: solução aquosa de H₃PO₄, pH 2 (FA) e acetonitrila (FO); solução aquosa de H₃PO₄, pH 2 (FA) e metanol (FO); solução aquosa de HClO₄, pH 2 (FA) e metanol (FO) e tampão fosfato 0,010 mol L⁻¹, pH 2 (FA) e metanol (FO). A eluição foi realizada por gradiente: 100% FA e 0% FO de 0 a 6 min; sendo mudado para 65% FA e 35% FO de 6 a 12 min; voltando à proporção inicial de 12 a 20 min a uma vazão de 1,0 mL min⁻¹. Foram usados como critérios para a seleção das melhores condições de separação do complexo [Sb(V)(AC)] os parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico, dentre eles: fator de assimetria (As): $As \leq 2$, número de pratos (N): $N > 2000$ e resolução ($R_s > 1,5$), os quais estão apresentados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4. Parâmetros avaliados para diferentes fases móveis.

Fase móvel	Fator de Assimetria (As)	Números de Pratos (N)	Resolução R_s
Solução aquosa de H ₃ PO ₄ , pH 2 e acetonitrila	1,07	3,84 10 ³	6,33
Solução aquosa de HClO ₄ , pH 2 e metanol	1,09	4,6810 ³	3,46
Tampão fosfato 0,010 mol L ⁻¹ , pH 2 e metanol	1,10	8,40 10 ³	6,56
Solução aquosa de H ₃ PO ₄ , pH 2 e metanol	1,24	8,80 10 ³	7,35

Como pode ser observado na Tabela 4.4, as melhores condições de separação, levando em consideração os parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico, foram alcançados com uma fase móvel composta de solução aquosa de H₃PO₄, pH 2 e metanol ou tampão fosfato 0,010 mol L⁻¹, pH 2 e metanol. Uma vez que não houve muita diferença entre os resultados obtidos mediante uso destas duas fases móveis, foi selecionada para os estudos subseqüentes a fase móvel composta

de solução aquosa de H_3PO_4 , pH 2 e metanol. No intuito de prolongar o tempo de vida da coluna analítica e do sistema cromatográfico é recomendável que se evite usar soluções tampão com elevadas concentrações de sais.

O cromatograma e o respectivo espectro de absorção de cada pico ([Sb(V)(AC)] e AC) estão apresentados na Figura 4.25.

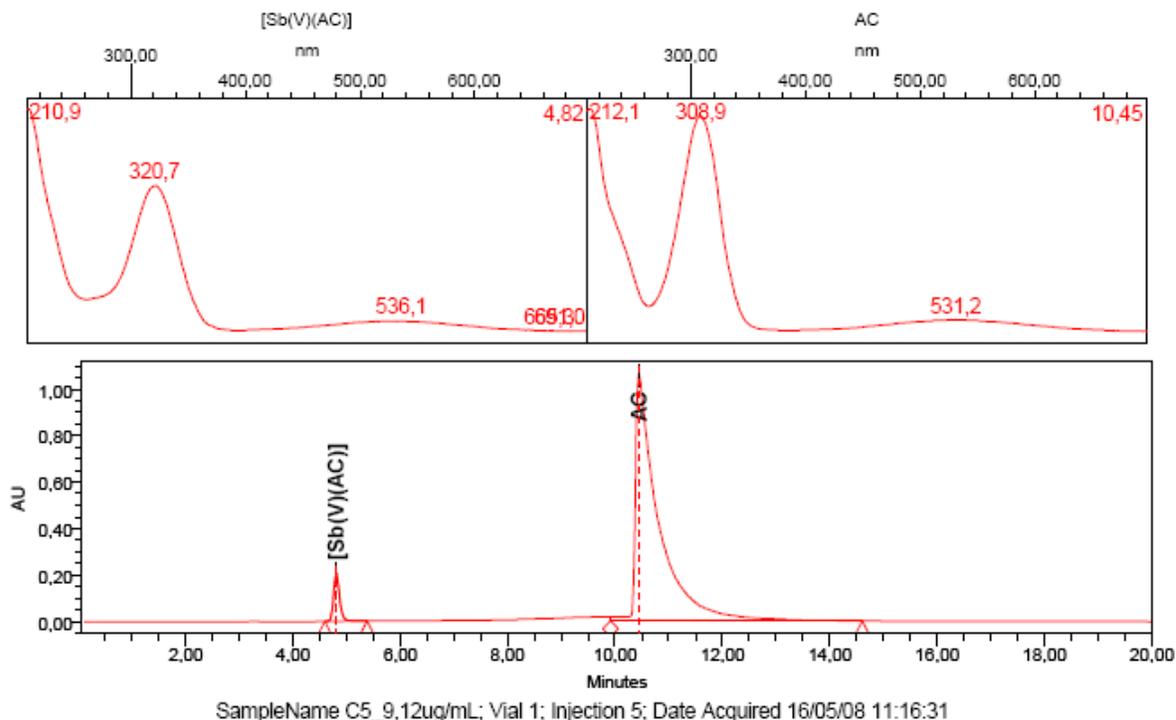


Figura 4.25. Cromatograma e o espectro de absorção para cada pico. Concentração de Sb(V) $9,12 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($7,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e AC $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($7,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Fase estacionária: octadecil. Fase móvel: FA ($\text{H}_2\text{O}-\text{H}_3\text{PO}_4$, pH 2), FO (metanol). Eluição por gradiente: 100% FA e 0% FO de 0 a 6 min; sendo mudado para 65% FA e 35% FO de 6 a 12 min; voltando à proporção inicial de 12 a 20 min. Vazão de 1 mL min^{-1} . Detecção em 310 nm.

Para os estudos subseqüentes para a quantificação de Sb(V) através do complexo [Sb(V)(AC)] foi selecionado o comprimento de onda de 310 nm.

A Figura 4.26 apresenta um gráfico em três dimensões (área x tempo x comprimento de onda) para complexo [Sb(V)(AC)] formado entre o AC e o Sb(V).

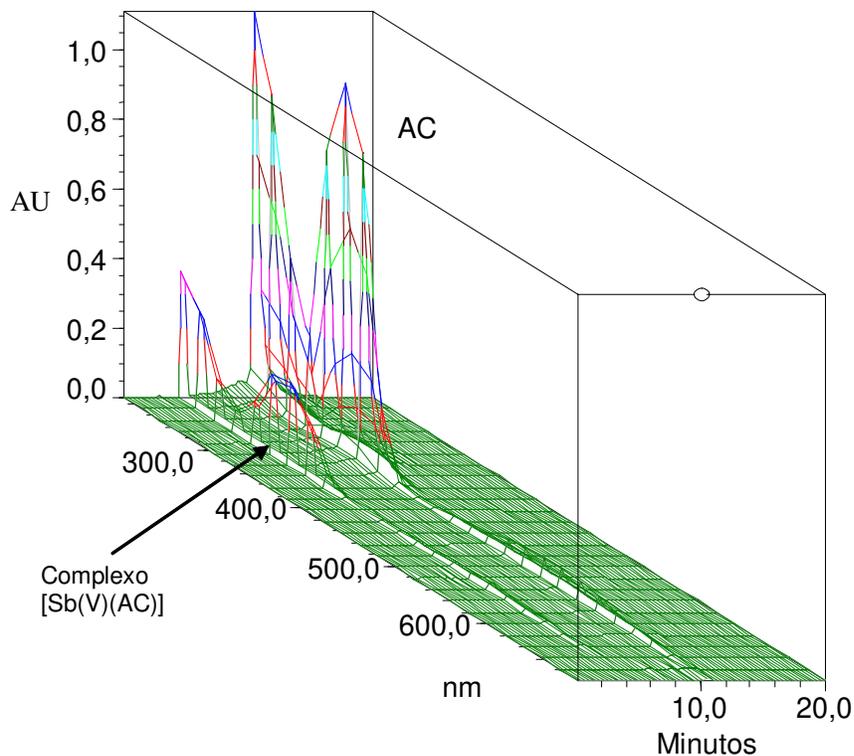


Figura 4.26. Cromatograma em três dimensões (3D) para o complexo $[Sb(V)(AC)]$. Concentração de $Sb(V)$ $9,12 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($7,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e AC $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($7,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Fase estacionária: octadecil. Fase móvel: FA ($\text{H}_2\text{O}-\text{H}_3\text{PO}_4$, pH 2), FO (metanol). Eluição por gradiente: 100% FA e 0% FO de 0 a 6 min; sendo mudado para 65% FA e 35% FO de 6 a 12 min; voltando à proporção inicial de 12 a 20 min. Vazão de 1 mL min^{-1} . Detecção em 310 nm .

A Figura 4.27 apresenta um cromatograma característico nas condições otimizadas (fase móvel, modo de eluição e detecção em 310 nm) para o AC e para o complexo $[Sb(V)(AC)]$ formado na reação química entre AC e $Sb(V)$.

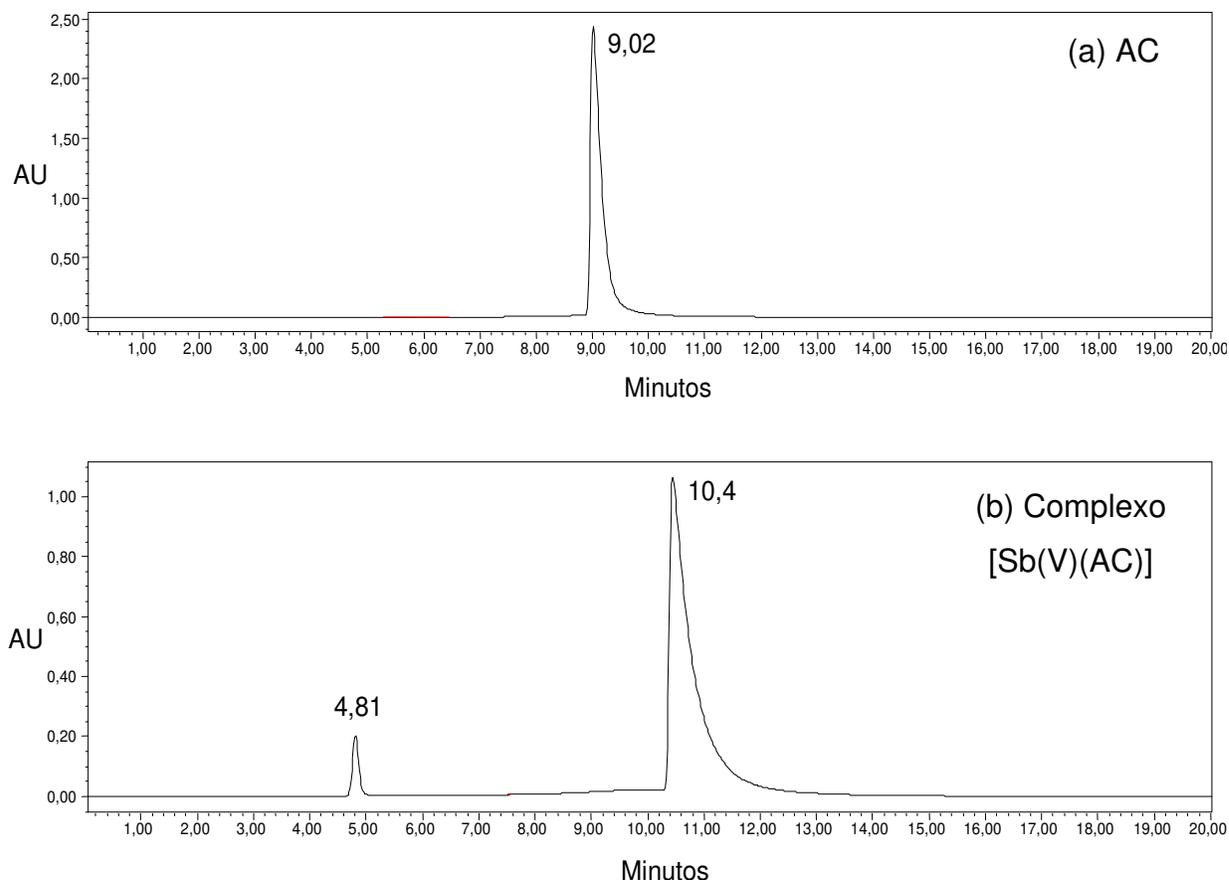


Figura 4.27. (a) Cromatograma para o AC $150,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($7,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$); (b) Cromatograma para o complexo [Sb(V)(AC)]. Concentração de Sb(V) $9,12 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($7,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e AC $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($7,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Fase estacionária: octadecil. Fase móvel: FA ($\text{H}_2\text{O}-\text{H}_3\text{PO}_4$, pH 2), FO (metanol). Eluição por gradiente: 100% FA e 0% FO de 0 a 6 min; sendo mudado para 65% FA e 35% FO de 6 a 12 min; voltando à proporção inicial de 12 a 20 min. Vazão de 1 mL min^{-1} . Detecção em 310 nm.

A Figura 4.28 apresenta um cromatograma característico nas condições otimizadas (fase móvel, modo de eluição e detecção em 310 nm) para as amostras de síntese do ANMG e do fármaco comercial ANMG.

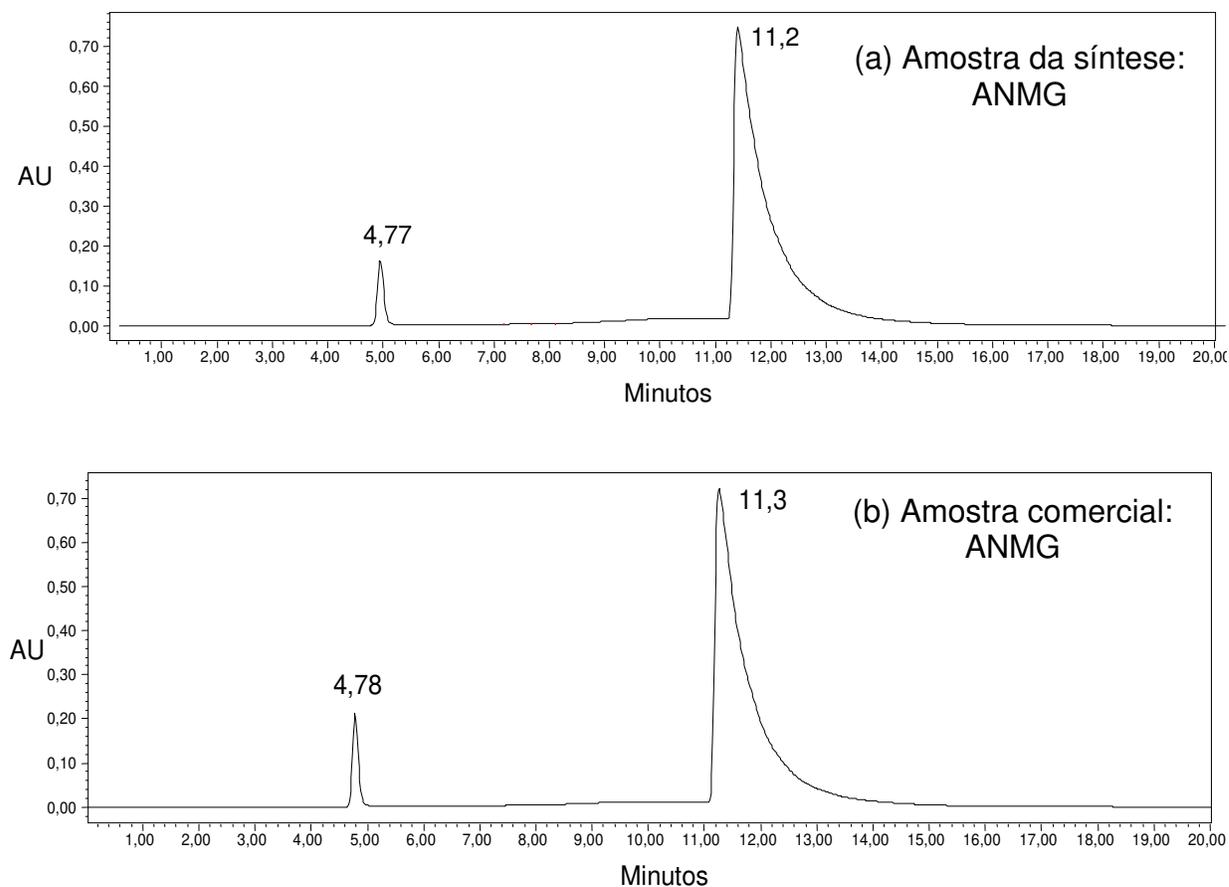


Figura 4.28. (a) Cromatograma da amostra de síntese do ANMG e (b) Cromatograma da amostra do fármaco comercial ANMG. Fase estacionária: octadecil. Fase móvel: FA (H₂O-H₃PO₄, pH 2), FO (metanol). Eluição por gradiente: 100% FA e 0% FO de 0 a 6 min; sendo mudado para 65% FA e 35% FO de 6 a 12 min; voltando à proporção inicial de 12 a 20 min. Vazão de 1 mL min⁻¹. Detecção em 310 nm.

O complexo [Sb(V)(AC)] apresenta um tempo de retenção (t_R) de 4,8 min e o AC livre de 9,0 min, nas condições estudadas. Verifica-se que o AC apresenta um pico largo com cauda nestas condições. Uma vez que os dois compostos apresentam propriedades físico-químicas distintas e é necessário respeitar as condições ótimas para formação do complexo é difícil encontrar uma condição cromatográfica ótima para os dois compostos. Em pH 2, o AC encontra-se na forma ionizada o que justifica em parte o formato do pico. Para minimizar essa ionização

seria necessário reduzir o pH da fase móvel, o que não é recomendado para esse tipo de fase estacionária. No entanto, cabe ressaltar que, o único inconveniente do formato não adequado do pico do AC é que isso implica em um tempo maior de análise.

É importante observar que o AC necessita estar em excesso em relação à concentração de Sb(V), no mínimo por um fator de 2. Para definir a concentração ótima de AC foi realizado um estudo no qual foi variada a concentração do agente complexante (de 15 até 219 $\mu\text{g mL}^{-1}$) sendo mantida constante a concentração de Sb(V) (18,24 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Foi verificado que a partir de uma relação de Sb(V):AC de 1:2 não ocorre mais variação da área referente ao complexo [Sb(V)(AC)] ($t_R = 4,8$ min), o que corrobora os resultados obtidos por espectrofotometria e voltametria (Figura 4.29).

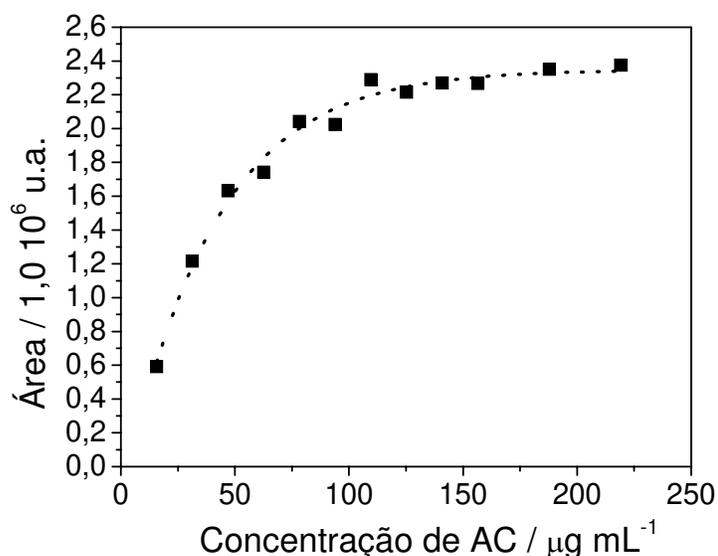


Figura 4.29. Influência da concentração de AC na formação do complexo. Concentração de Sb(V) 18,24 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Fase estacionária: octadecil. Fase móvel: FA ($\text{H}_2\text{O}-\text{H}_3\text{PO}_4$, pH 2), FO (metanol). Eluição por gradiente: 100% FA e 0% FO de 0 a 6 min; sendo mudado para 65% FA e 35% FO de 6 a 12 min; voltando à proporção inicial de 12 a 20 min. Vazão de 1 mL min^{-1} . Detecção em 310 nm.

Deste modo, para manter um excesso de AC na reação com o antimônio pentavalente e, assim, garantir a formação do complexo, foi escolhida uma concentração de AC de $150,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ para todos os estudos subseqüentes.

Estabelecida à concentração de AC, um estudo referente ao acompanhamento da reação de formação do complexo foi realizado nas condições cromatográficas pré-estabelecidas. Sendo assim, foi mantida a concentração de AC em $150,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e Sb(V) em $9,12 \mu\text{g mL}^{-1}$, monitorando a área do pico cromatográfico num tempo de 15 a 300 min. Como pode ser observado na Figura 4.30, o complexo é estável por um tempo de 120 min. Após esse tempo ocorre uma diminuição da área do pico, o que indica a degradação do produto. Sendo assim, as soluções preparadas precisam ser analisadas até um máximo de 120 min após iniciada a reação.

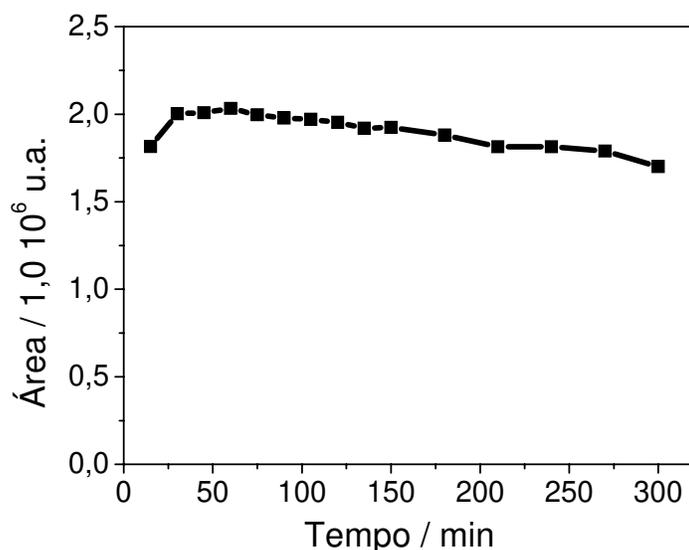


Figura 4.30. Acompanhamento da interação da reação entre Sb(V) e AC. Concentração de Sb(V) $9,12 \mu\text{g mL}^{-1}$ e AC $150 \mu\text{g mL}^{-1}$. Fase estacionária: octadecil. Fase móvel: FA ($\text{H}_2\text{O}-\text{H}_3\text{PO}_4$, pH 2), FO (metanol). Eluição por gradiente: 100% FA e 0% FO de 0 a 6 min; sendo mudado para 65% FA e 35% FO de 6 a 12 min; voltando à proporção de inicial de 12 a 20 min. Vazão de 1 mL min^{-1} . Detecção em 310 nm .

4.2.3.1. Seletividade: avaliação do método para a determinação de Sb(V) no antimoniato de N-metilglucamina

Nesta etapa do trabalho, foi avaliada a seletividade do método. Para tanto foram avaliados como possíveis interferentes a NMG, Sb(III), As(III), Pb(II), Cu(II), Cd(II) e Bi(III).

O primeiro composto avaliado foi a NMG. Para tanto, diferentes concentrações de NMG compreendendo a faixa de 0 a 117,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram adicionadas a uma quantidade fixa de Sb(V) (18,24 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e AC (150,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de tal forma que a relação máxima fosse de 1:4 (Sb(V):NMG) (Figura 4.31). Essa proporção entre Sb(V) e NMG foi selecionada, uma vez que no fármaco, teoricamente a relação molar do Sb(V):NMG é de 1:2 e com a proporção de 1:4 está se garantindo um excesso de NMG. Para esse estudo, cujas condições experimentais estão descritas no item 3.4.4.2 (pág. 40) foi monitorada a área do pico no tempo de retenção de 4,8 min. A Figura 4.31 apresenta o perfil dos cromatogramas para este estudo.

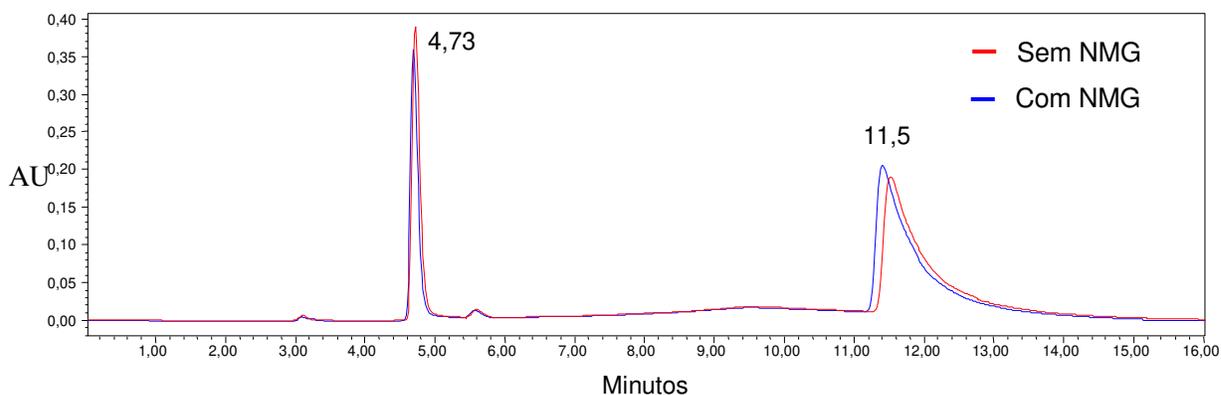


Figura 4.31. Cromatograma mostrando a influência da concentração de NMG na formação do complexo [Sb(V)(AC)]. Concentração de Sb(V) 18,24 $\mu\text{g mL}^{-1}$, AC 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e NMG 102,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Fase estacionária: octadecil. Fase móvel: FA ($\text{H}_2\text{O}-\text{H}_3\text{PO}_4$, pH 2), FO (metanol). Eluição por gradiente: 100% FA e 0% FO de 0 a 6 min; sendo mudado para 65% FA e 35% FO de 6 a 12 min; voltando à proporção inicial de 12 a 16 min. Vazão de 1 mL min^{-1} . Detecção em 310 nm.

O gráfico da variação da área em função da concentração de NMG está apresentado na Figura 4.32.

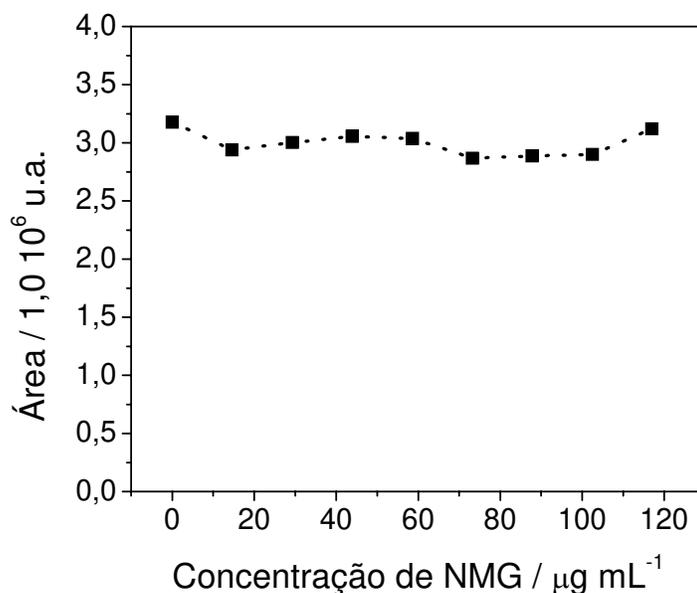


Figura 4.32. Influência da concentração de NMG na formação do complexo. Concentração de Sb(V) $18,24 \mu\text{g mL}^{-1}$ e AC $150 \mu\text{g mL}^{-1}$. Fase estacionária: octadecil. Fase móvel: FA ($\text{H}_2\text{O}-\text{H}_3\text{PO}_4$, pH 2), FO (metanol). Eluição por gradiente: 100 % FA e 0% FO de 0 a 6 min; sendo mudado para 65 % FA e 35 % FO de 6 a 12 min; voltando à proporção inicial de 12 a 20 min. Vazão de 1 mL min^{-1} . Detecção em 310 nm.

Conforme pode ser observado na Figura 4.32, a concentração de NMG não interfere na formação do complexo $[\text{Sb(V)}(\text{AC})]$, pois na faixa de concentração estudada a área do pico do complexo variou apenas 2% em torno do valor médio com a presença da NMG.

Além da NMG, outros elementos como Sb(III), As(III), Pb(II), Cu(II), Cd(II) e Bi(III) foram avaliados. Estes elementos foram adicionados a uma solução de AC $150,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e Sb(V) $9,12 \mu\text{g mL}^{-1}$ na proporção de 10% em relação a concentração de Sb(V); o que corresponde a uma concentração de $0,912 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos respectivos elementos em cada solução analisada. Os resultados obtidos mostram que não há interferência significativa destes elementos na determinação de antimônio

pentavalente pelo método proposto em uma proporção de 10%, já que as áreas correspondentes a cada adição dos elementos em estudo não variou dentro de um intervalo de 5% da média correspondente à área do pico do complexo [Sb(V)(AC)].

O perfil dos cromatogramas individuais de cada elemento analisado como possível interferente - Sb(III), As(III), Pb(II), Cu(II), Cd(II) e Bi(III) -, além do cromatograma do Sb(V) estão apresentados no Anexo A.

O antimônio trivalente por ser um contaminante indesejado no fármaco antimoniato de N-metilglucamina também foi avaliado na proporção molar Sb(V):Sb(III) em 1:1, sendo assim, a concentração de AC foi de $150,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e a concentração de Sb (III) e (V) foi mantida em $9,12 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os resultados obtidos apresentados na Figura 4.33 mostraram que a área do pico do complexo [Sb(V)(AC)] na presença de Sb(III) (1598319 u.a.) não diminuiu significativamente com relação a área correspondente apenas ao complexo [Sb(V)(AC)] (1613352 u.a.). Portanto, a presença de Sb(III) em uma razão molar de 1:1 com Sb(V) não interfere na determinação de Sb(V) por HPLC usando o ácido cloranílico como agente complexante.

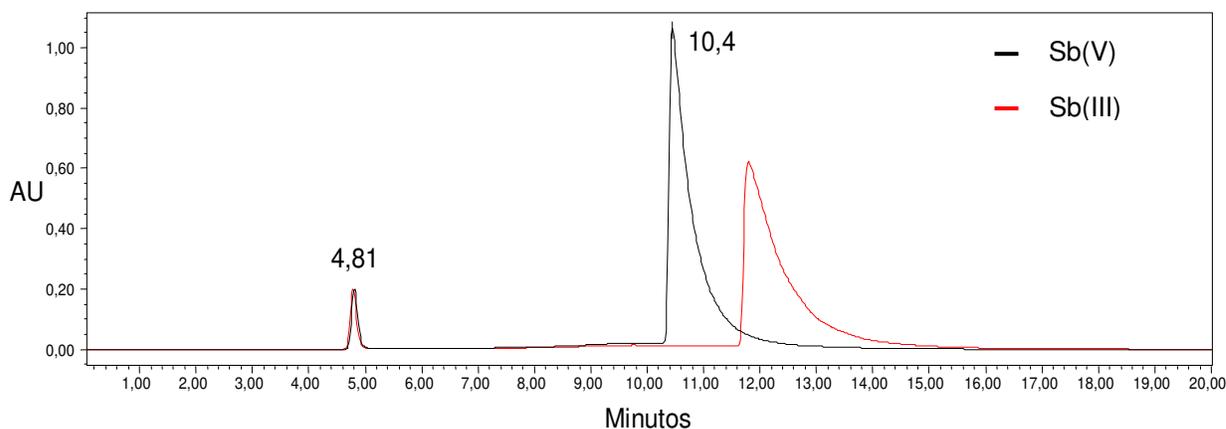


Figura 4.33. Cromatograma do Sb(V) na presença do íon Sb(III) (relação Sb(V):Sb(III) em 1:1, sendo a concentração de Sb (III) e (V) $9,12 \mu\text{g mL}^{-1}$ e de AC $150,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Fase estacionária: octadecil. Fase móvel: FA ($\text{H}_2\text{O}-\text{H}_3\text{PO}_4$, pH 2), FO (metanol). Eluição por gradiente: 100% FA e 0% FO de 0 a 6 min; sendo mudado para 65% FA e 35% FO de 6 a 12 min; voltando à proporção inicial de 12 a 20 min. Vazão de 1 mL min^{-1} . Detecção em 310 nm .

4.2.3.2. Parâmetros de validação

Depois de estabelecidas as condições cromatográficas para a quantificação de Sb(V) mediante o complexo $[\text{Sb(V)(AC)}]$ por HPLC, o método desenvolvido foi validado mediante avaliação dos seguintes parâmetros: faixa linear, linearidade, sensibilidade, seletividade, precisão intra-ensaio e inter-ensaio, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão.

A faixa linear, linearidade e sensibilidade foram obtidas a partir da curva analítica que foi construída, em triplicata, para seis níveis de concentração, no intervalo de $3,0 \cdot 10$ a $18,2 \cdot 10 \mu\text{g mL}^{-1}$. A curva analítica, cuja equação da reta é $\text{Área} = 77470 + 195200 C$, onde C é a concentração de Sb(V) em $\mu\text{g mL}^{-1}$ está apresentada na Figura 4.34a e o respectivo gráfico de resíduos na Figura 4.34b.

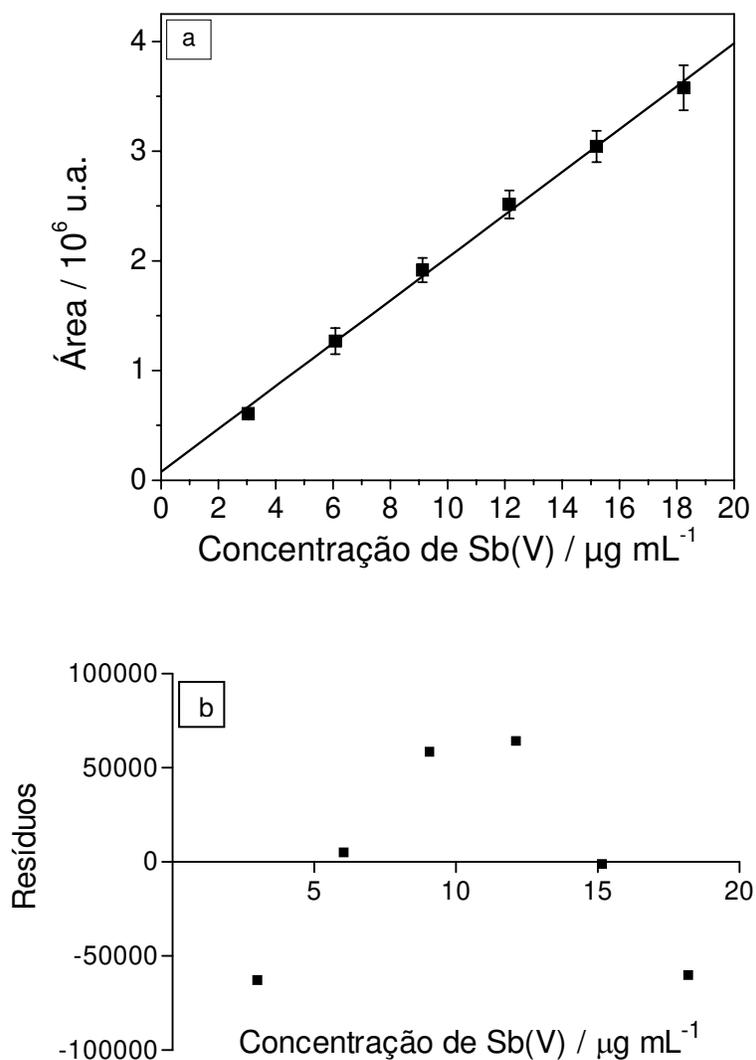


Figura 4.34. (a) Curva analítica obtida para o Sb(V) por HPLC. (b) Gráfico dos resíduos. Concentração de AC 150,0 µg mL⁻¹. Fase estacionária: octadecil. Fase móvel: FA (H₂O-H₃PO₄, pH 2), FO (metanol). Eluição por gradiente: 100% FA e 0% FO de 0 a 6 min; sendo mudado para 65% FA e 35% FO de 6 a 12 min; voltando à proporção inicial de 12 a 20 min. Vazão de 1 mL min⁻¹. Detecção em 310 nm.

A linearidade, que é o coeficiente de correlação linear obtido da regressão por mínimos quadrados é de 0,993 e está de acordo com o critério recomendado pela ANVISA ($r > 0,99$). Em adição, o gráfico de resíduos mostra que os desvios estão aleatoriamente distribuídos, o que indica que o modelo teve um ajuste adequado.

A sensibilidade do método é expressa através do coeficiente angular da curva e o valor está apresentado na Tabela 4.5.

A seletividade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto na presença de outros componentes (impurezas, componentes da matriz e/ou produtos de degradação). Neste trabalho foram avaliados como possíveis interferentes NMG, Sb(III), As(III), Pb(II), Cu(II), Cd(II) e Bi(III). Foi verificado que nenhum dos elementos originou um composto na presença de AC que eluisse próximo ao tempo de retenção do complexo [Sb(V)(AC)] ou mesmo no tempo de análise da corrida cromatográfica (20 min) (Anexo A). Portanto, o método é seletivo frente a esses elementos, conforme apresentado discutido no item 4.2.3.1 (pág. 86).

A precisão do método foi avaliada em termos de repetibilidade (precisão intra-ensaio) e intermediária (precisão inter-ensaio) conforme procedimento descrito no item 3.4.4.2 (pág. 40). A precisão intra-ensaio foi avaliada para um nível de concentração (análise da amostra do fármaco) em quintuplicata e a precisão inter-ensaio foi avaliada para o mesmo nível de concentração em três dias diferentes. Todos os resultados foram expressos como a estimativa do desvio padrão relativo e estão apresentados na Tabela 4.5. Os valores encontrados para a precisão do método foram menores do que 4% e, portanto, estão de acordo com o preconizado pela ANVISA (RSD < 5%).

Os limites de detecção e de quantificação do método foram calculados de acordo com as equações 3.1 e 3.2, respectivamente. Os valores estimados estão apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5. Parâmetros de validação do método de determinação de antimônio pentavalente em antimoniato de N-metilglucamina usando ácido cloranílico como agente complexante por HPLC.

Parâmetros		Sb(V)
Faixa linear do método (mg mL ⁻¹)		30 a 182
Sensibilidade (u.a./μg mL ⁻¹)		195200
Linearidade		0,993
Precisão	Intra-Ensaio (n=5, RSD ^(a) %)	4,0
	Inter-Ensaio (n=11, RSD ^(a) %)	2,0
Detectabilidade ^(b) (μg mL ⁻¹)		0,9
Limite de detecção do método(LOD, mg mL ⁻¹)		9
Limite de quantificação do método (LOQ, mg mL ⁻¹)		30
Exatidão (%)	Amostra A1	100 ± 5
	Amostra A2	100 ± 2
	Amostra A7	100 ± 3

^(a) RSD: estimativa do desvio padrão relativo.

^(b) Limite de detecção do instrumento.

Cabe destacar que não existe disponível um padrão de identidade e qualidade do medicamento, bem como material de referência adequado. O método oficial da 4^a Edição da Farmacopéia Brasileira sugere o doseamento do antimônio trivalente e pentavalente por espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos em batelada, com atomização em cela de quartzo, sendo que o antimônio pentavalente é previamente reduzido por uma solução redutora de tetraidroborato de sódio em meio alcalino (Farmacopéia Brasileira, 2003). Esse método não foi empregado neste trabalho, uma vez que não se tinha disponível as condições experimentais para isso.

A exatidão foi, então, avaliada mediante comparação de resultados obtidos na análise de medicamentos pelo método proposto com os obtidos por FAAS e SWV. Cabe destacar, que mediante o emprego do FAAS apenas foi possível à determinação de antimônio total e, portanto, a SWV foi empregada para determinação de Sb(III). Lembrando que o Sb(V) não é eletroativo no eletrodo de mercúrio. A diferença entre o antimônio total e o Sb(III) forneceu o valor do Sb(V) presente nas amostras de ANMG do fármaco comercial e produto de síntese e, foram utilizadas na validação do método cromatográfico proposto. A exatidão foi avaliada para três amostras do fármaco (duas comerciais de um mesmo fabricante

de lotes diferentes e uma amostra obtida por síntese). Cada análise foi realizada em quintuplicata conforme procedimento descrito no item 3.4.4.1 (pág. 40) e os resultados estão apresentados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6. Concentrações de antimônio pentavalente obtidas para o antimoniato de N-metilglucamina pelo método proposto (HPLC usando o ácido cloranílico como agente complexante) e FAAS (antimônio total) e SWV (Sb(III)).

Amostra	Teor médio \pm (ts/ \sqrt{n}) ^(a) de Sb(V) Diferença entre FAAS ^(b) e SWV ^(c)	Teor médio \pm (ts/ \sqrt{n}) ^(a) de Sb(V) HPLC ^(d)
A1 ^(e)	78 \pm 0,4 mg mL ⁻¹	78 \pm 4 mg mL ⁻¹
A2 ^(e)	72 \pm 0,6 mg mL ⁻¹	72 \pm 1 mg mL ⁻¹
A7 ^(f)	24 \pm 0,2% (m/m)	24 \pm 0,4% (m/m)

(a) Intervalo de confiança (P=0,05); s: estimativa do desvio padrão (n=5).

(b) FAAS: Espectrometria de Absorção Atômica por Chama.

(c) SWV: Voltametria de Onda Quadrada.

(d) HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

(e) Fármacos Comerciais: valor nominal para Sb(V): 81,0 mg mL⁻¹.

(f) Produto de síntese partindo de Sb(V) e NMG

Através do teste *t* pareado pode ser verificado que não existe diferença significativa, a um nível de confiança de 95%, entre as concentrações de antimônio pentavalente determinados pelos métodos FAAS e SWV e o método proposto.

4.2.4. Síntese do Antimoniato de N-metilglucamina

O antimoniato de N-metilglucamina tem sido empregado há mais de 60 anos no tratamento de leishmaniose. O fármaco não possui estrutura definida, assim como seu mecanismo de ação ainda não foi completamente elucidado. Estudos indicam que ocorre a bio-redução do Sb(V) para a sua forma trivalente. Durante muitos anos verificamos em trabalhos realizados no nosso grupo de pesquisa que o medicamento usado no tratamento da leishmaniose no Brasil apresenta contaminação por Sb(III). O antimônio trivalente foi usado no passado para o tratamento da leishmaniose e, portanto, não existe dúvida que também esse elemento é ativo contra as leishmanias *in vivo*. O fato é que o Sb(III) é cerca de dez vezes mais tóxico que o Sb(V). Sendo

assim, o Sb(III) é um contaminante indesejável nesse medicamento. Neste sentido para possibilitar a obtenção do antimoniato de meglumina sem a presença de Sb(III) é importante esclarecer como ocorre a contaminação no mesmo. Duas hipóteses podem ser assumidas: contaminação da matéria prima empregada na síntese ou conversão do Sb(V) para Sb(III) no meio reacional. Para avaliar essas hipóteses faz-se necessário que métodos analíticos sejam desenvolvidos que permitam a especificação do antimônio. Verificamos em trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa (dados não publicados) que a espectrometria de massas em *tandem* pode fornecer informações a respeito do estado de oxidação do antimônio nos diferentes complexos que co-existem em solução.

Inicialmente a síntese do antimoniato de N-metilglucamina foi conduzida conforme procedimento descrito por Demicheli e colaboradores (DEMICHELI *et al.*, 2003). Porém, algumas modificações nesta rota de síntese foram introduzidas, como a quantidade de reagentes utilizados, a ordem de adição dos reagentes, temperatura e tempo de reação.

Empregando as condições de síntese descritas no item 3.5.1. foi possível à obtenção de um precipitado branco, solúvel em água e insolúvel em álcool etílico e acetona. O produto foi caracterizado por análise elementar e espectrometria de massas em *tandem* e os espectros e resultados comparados com aqueles obtidos para um fármaco comercial.

Em uma nova síntese o Sb(V) foi substituído pelo Sb(III) com a finalidade de caracterizar o produto que se forma nesta reação e avaliar se é este composto o contaminante verificado na síntese do antimoniato de N-metilglucamina obtido a partir do Sb(V). Empregando as condições descritas no item 3.5.2. foi possível obter um precipitado branco amorfo, solúvel em água e insolúvel em acetona. O produto foi caracterizado por espectrometria de massas em *tandem*.

4.2.5. Caracterização

4.2.5.1. Análise Elementar

A síntese realizada conforme item 3.5.1. foi analisada por análise elementar (CHN), sendo o antimônio total determinado por absorção atômica e o oxigênio pela diferença. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.7.

Tabela 4.7. Resultados obtidos para a análise elementar do produto de síntese do antimoniato de N-metilglucamina.

Amostra	C (%)	H (%)	N (%)	Sb (%)	O (%)
A7	25,87	5,59	4,04	24,43	40,07

Dados da literatura (ROBERTS *et al.*, 1998) comprovam por espectrometria de massas que diversas formas complexas do antimônio-N-metilglucamina coexistem em solução, assim como os dados apresentados no item 4.2.5.2 deste trabalho. Sendo assim, não é possível definir uma estrutura única para o composto. No entanto, os resultados obtidos estão muito próximos daqueles relatados na literatura (DEMICHELI *et al.*, 1999). Os resultados encontrados por Demicheli e colaboradores para a análise elementar (CHN) e absorção atômica (Sb) para o produto de síntese foi: C 20,45%, H 5,57%, N 3,56% e Sb 28,9%, sendo que o oxigênio não foi calculado pelos autores.

4.2.5.2. Espectrometria de Massas

Dados mais recentes sobre a caracterização do antimoniato de N-metilglucamina por espectroscopia de massa sugerem que o antimoniato de N-metilglucamina é uma mistura de complexos do antimônio(V)-N-metilglucamina (ROBERTS *et al.*, 1998).

Os espectros de massa obtidos usando ionização por electrospray (ESI-MS) mostraram um grande número de espécies ionizadas, tanto no antimoniato de N-

metilglucamina comercial como àquele obtido por síntese. Os espectros obtidos para amostras comerciais estão apresentados nas Figuras 4.35A, 4.35B, 4.36C, 4.36D e 4.37E. O espectro referente ao produto obtido na síntese partindo de $\text{KSb}(\text{OH})_6$ está apresentado na Figura 4.37F. Em solução, as macromoléculas que contêm antimônio são identificadas pelo seu padrão isotópico, sendo a proporção de 57:43, para os isótopos de massa 121 e 123, respectivamente. As espécies determinadas por ESI-MS estão de acordo com outros resultados reportados na literatura (ROBERTS *et al.*, 1998). A técnica mais indicada para amostras oligoméricas é a ionização por eletrospray e posterior fragmentação individual das espécies pela técnica MS-MS, a fim de elucidar a estrutura das mesmas.

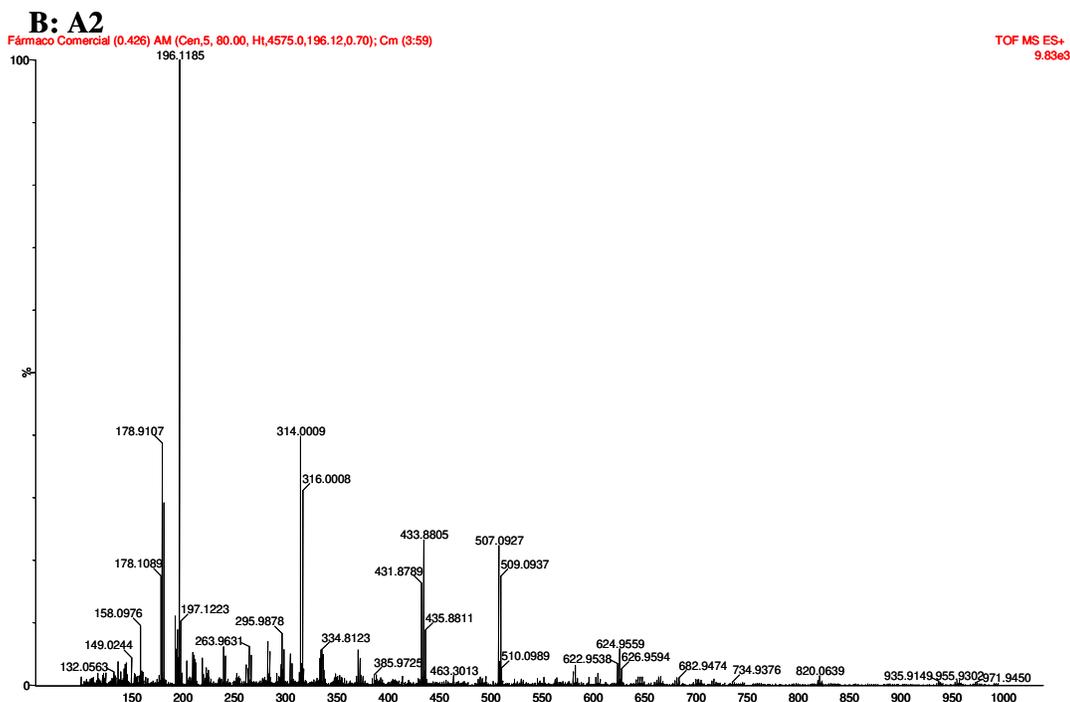
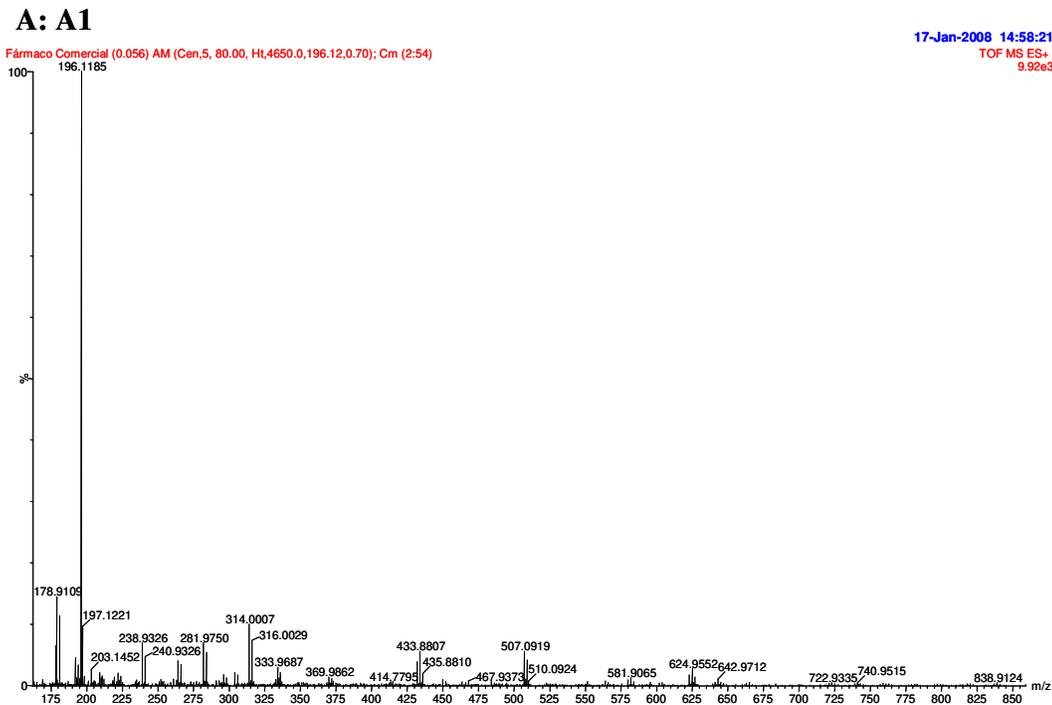


Figura 4.35. A) Espectro de massas do fármaco comercial ANMG (A1); B) espectro de massas do fármaco comercial ANMG (A2). *Electrospray* no modo positivo, voltagem do cone 60 V, temperatura de desolvatação 400 °C, temperatura da fonte 140 °C, voltagem do capilar 4000 V e energia de colisão de 10 V.

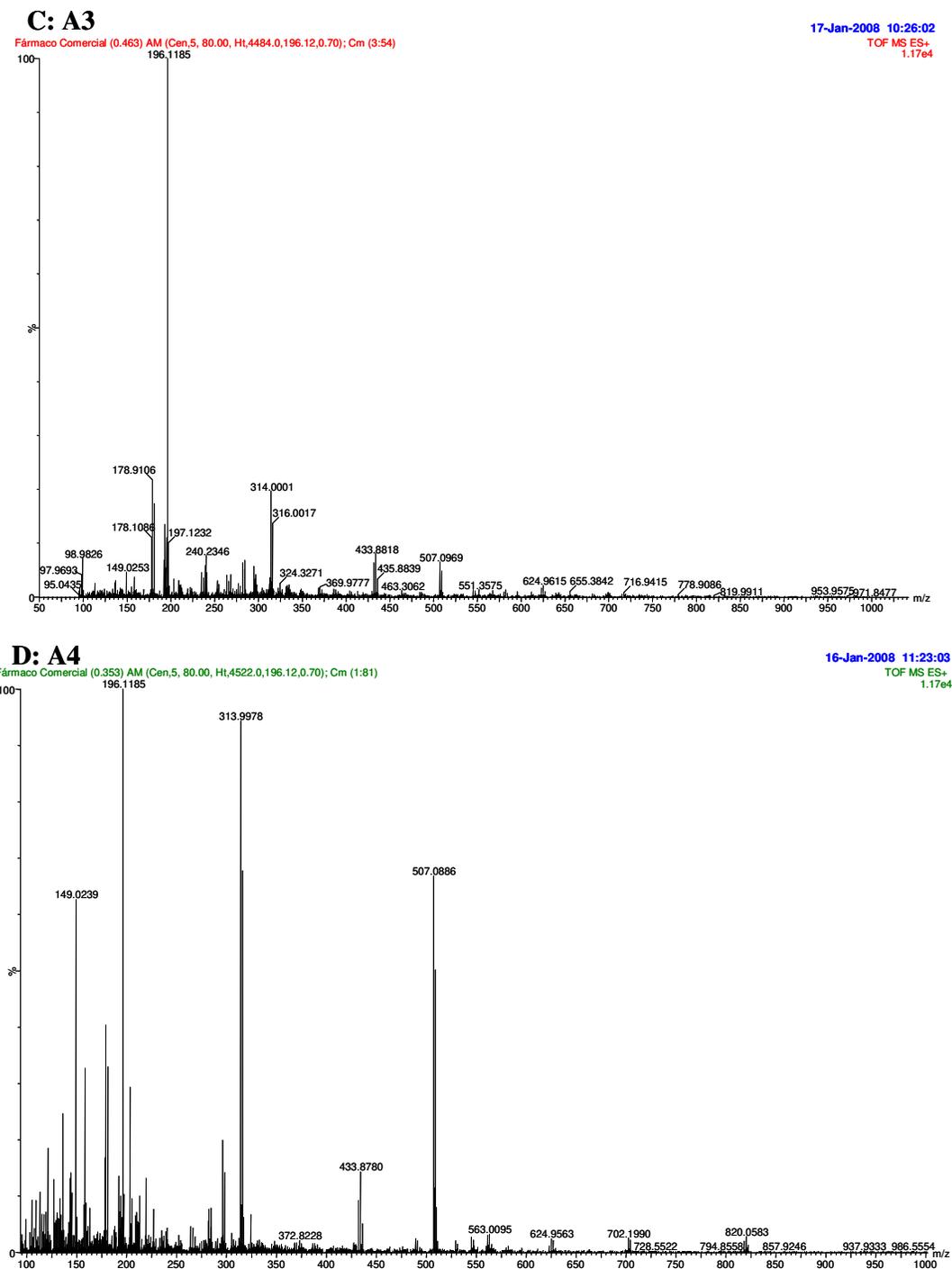


Figura 4.36. C) Espectro de massas do fármaco comercial ANMG (A3); D) espectro de massas do fármaco comercial ANMG (A4). *Electrospray* no modo positivo, voltagem do cone 60 V, temperatura de desolvatação 400 °C, temperatura da fonte 140 °C, voltagem do capilar 4000 V e energia de colisão de 10 V.

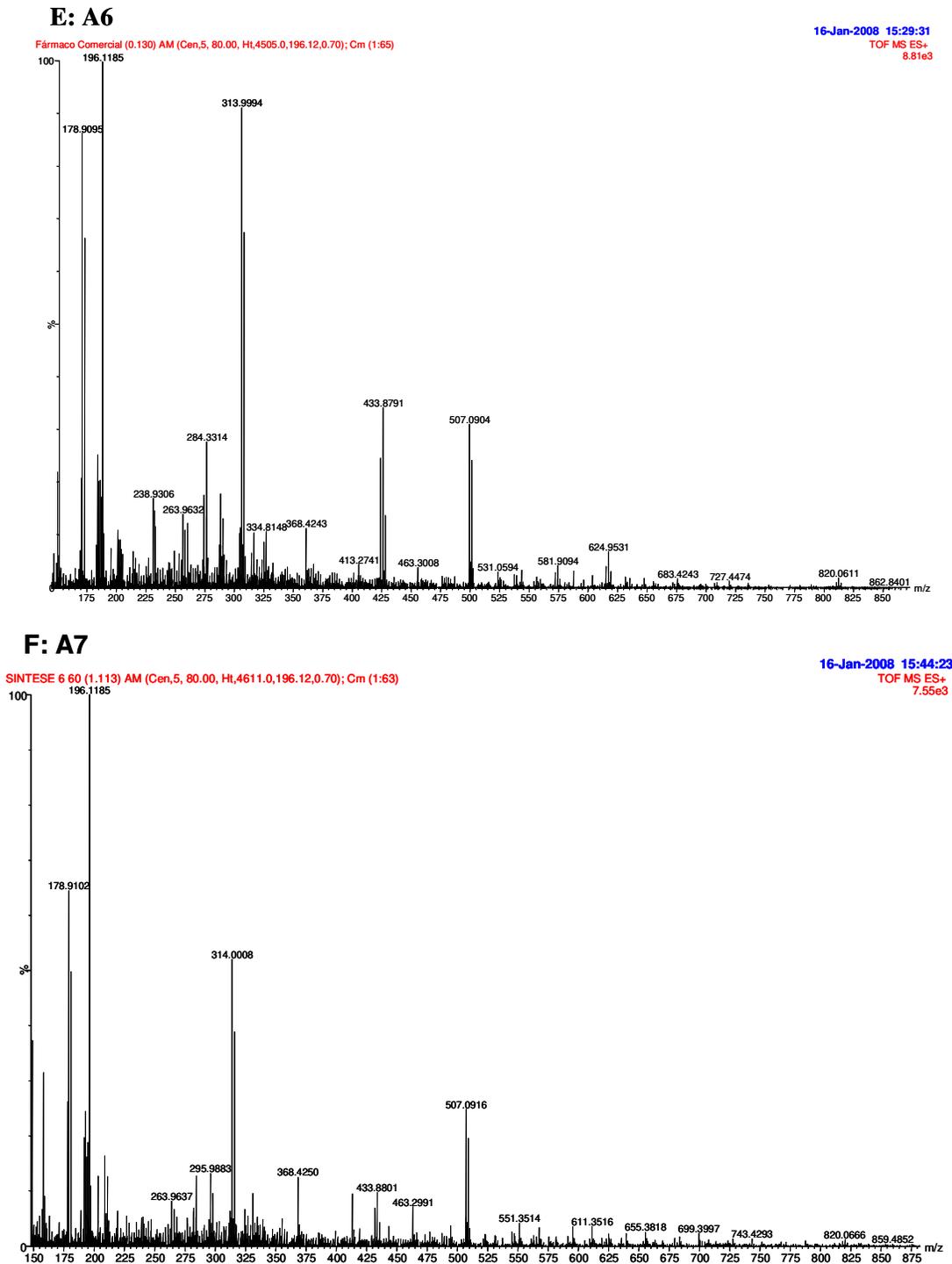


Figura 4.37. E) Espectro de massas do fármaco comercial ANMG (A6); F) espectro de massas do produto de síntese (A7). *Electrospray* no modo positivo, voltagem do cone 60 V, temperatura de desolvatação 400 °C, temperatura da fonte 140 °C, voltagem do capilar 4000 V e energia de colisão de 10 V.

O íon de maior intensidade observado em todas as amostras analisadas é o de m/z 196 que corresponde a N-metilglucamina protonada e, portanto, sem a presença de antimônio.

Foram observados vários oligômeros em solução, o que confirma que o antimoniato de N-metilglucamina consiste de uma mistura de componentes com a fórmula geral de Sb_nNMG_{n+1} e Sb_nNMG_n . Comparando-se os espectros do produto obtido por síntese e dos medicamentos comerciais, verifica-se que, os íons primários são os mesmos, porém com intensidades diferentes.

Segundo Roberts e colaboradores (ROBERTS *et al.*, 1998), o antimônio se liga através de quatro grupos hidroxilas de duas moléculas NMG (C-2 e C-3 de uma molécula NMG e C-4 e C-5 da outra molécula NMG).

A Tabela 4.8 apresenta os valores das intensidades relativas de cada íon encontrado nas amostras.

Tabela 4.8. Íons identificados e intensidade relativa dos mesmos para as amostras de antimoniato de N-metilglucamina por espectrometria de massas.

Amostras	Intensidade Relativa m/z (%)				
	196 $C_7H_{18}O_5N^{(c)}$	314 $[(SbC_7H_{15}O_5N)]$	434 $[Sb_2(C_7H_{12}O_5N)]$	507 $[Sb(C_{14}H_{30}O_{10}N_2)]$	820 $[Sb_2(C_{21}H_{42}O_{15}N_3)]$
A1 ^(a)	100	10,1	5,4	5,4	-
A2 ^(a)	100	40	23	22	1,5
A3 ^(a)	100	20	8	6,3	-
A4 ^(a)	100	95	14,5	67	3
A6 ^(a)	100	92	35	30	2,3
A7 ^(b)	100	52	9,6	25,2	0,74

^(a) Amostra do fármaco Comercial.

^(b) Amostra do produto de Síntese partindo de $KSb(OH)_6$.

^(c) N-metilglucamina protonada.

O espectro MS-MS do íon de m/z 820 mostra que este se fragmenta nos íons m/z 627 e 434 (Figura 4.38C). Neste processo ocorre a perda de um fragmento de massa 193 uma. O fragmento principal do íon m/z 507 é a espécie m/z 314, o que corresponde a uma perda de m/z 193 uma (Figura 4.38 A e B).

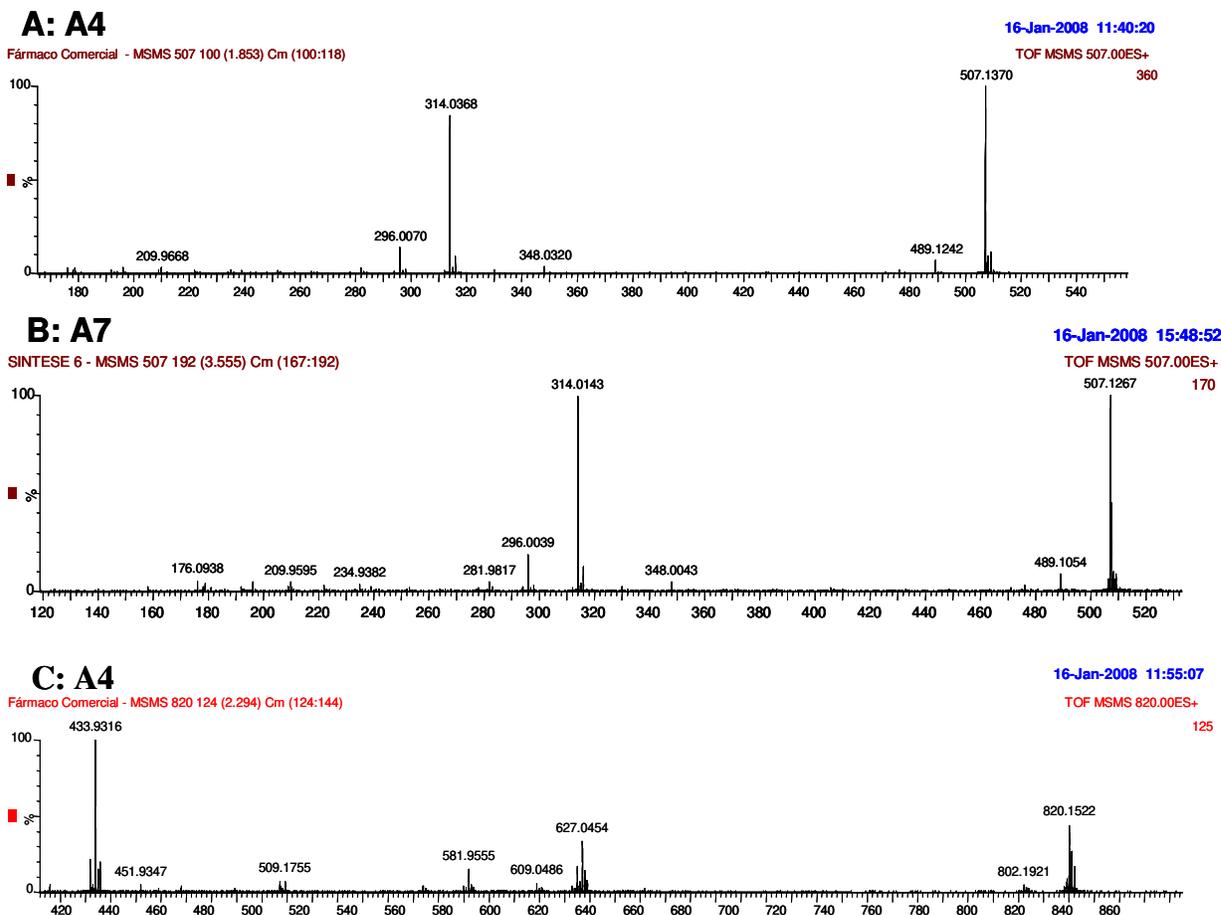


Figura 4.38. A) Espectro MS-MS do íon m/z 507 do fármaco comercial ANMG (A4); B) espectro MS-MS do íon m/z 507 do produto de síntese (A7) e C) espectro MS-MS do íon m/z 820 do fármaco comercial ANMG (A4). *Electrospray* no modo positivo, voltagem do cone 60 V, temperatura de desolvatação 400 °C, temperatura da fonte 140 °C, voltagem do capilar 4000 V e energia de colisão de 20 V, sendo que para o item C a energia de colisão foi de 30 V.

Para que o íon m/z 314 seja estável eletronicamente, tem que ocorrer uma redução do antimônio, conforme mostra a Figura 4.39, caso contrário o antimônio teria que suportar duas cargas negativas, tendo em vista que não existem contra íons no ambiente de análise.

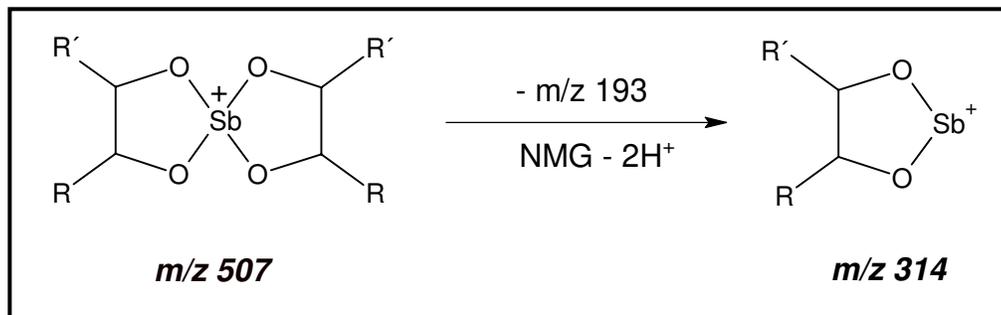


Figura 4.39. Proposta para as estruturas dos íons m/z 507 e 314, com perda de um fragmento de m/z de 193.

Sendo assim, o íon m/z 314 que aparece nos espectros de massa das amostras de ANMG analisadas sugere que as amostras contêm antimônio trivalente e, portanto, esse íon pode ser empregado para fins de identificação da presença do contaminante.

Analisando o espectro de massas do produto obtido da reação entre Sb_2O_3 (antimônio trivalente) e NMG (Figura 4.40), pode ser observada a formação de várias espécies. Pode ser observado também que há uma perda de um fragmento correspondente a m/z 58 de uma forma para outra. Além disso, não há a presença dos íons característicos do fármaco comercial antimoniato de N-metilglucamina, somente aparece um íon de m/z 314 semelhante ao do fármaco comercial.

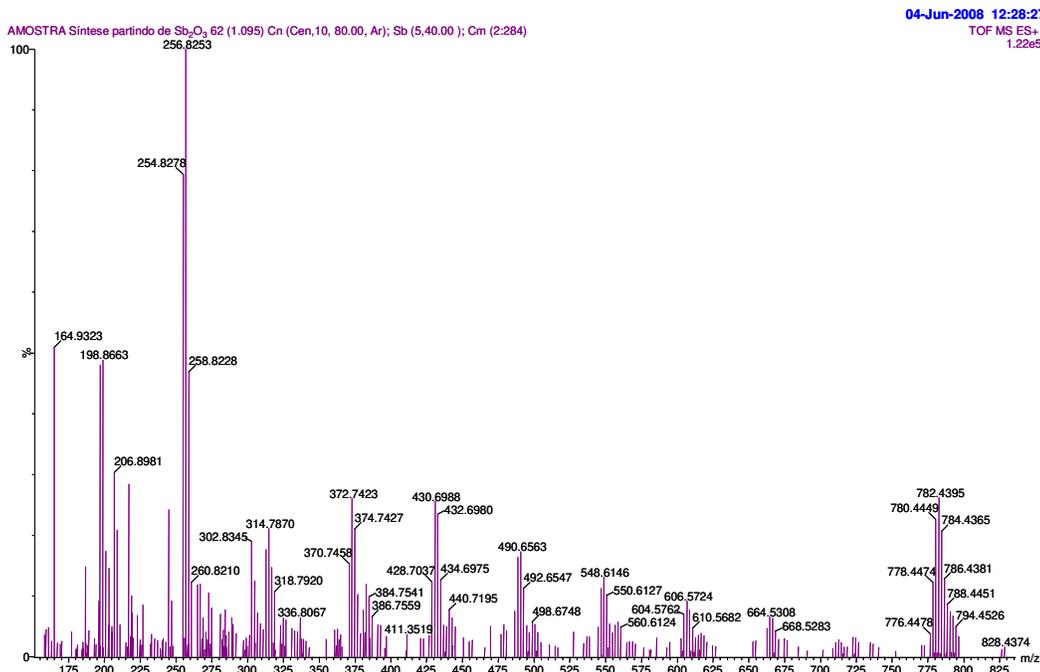


Figura 4.40. Espectro de massas do produto da reação entre Sb_2O_3 e NMG (A8). *Electrospray* no modo positivo, voltagem do cone 60 V, temperatura de desolvatação 300 °C, temperatura da fonte 120 °C, voltagem do capilar 3500 V e energia de colisão de 5 V.

Um espectro MS-MS foi realizado para verificar se o íon m/z 314 presente no espectro de massa do produto de síntese obtido a partir do antimônio trivalente com NMG é o mesmo composto do que àquele verificado no espectro de massas do ANMG comercial ou obtido a partir da síntese do antimônio pentavalente com NMG. A Figura 4.41 apresenta os espectros MS-MS do íon m/z 314 das amostras A1 (ANMG), A7 (síntese do ANMG partindo de $KSb(OH)_6$) e A8 (produto da reação entre Sb_2O_3 e NMG).

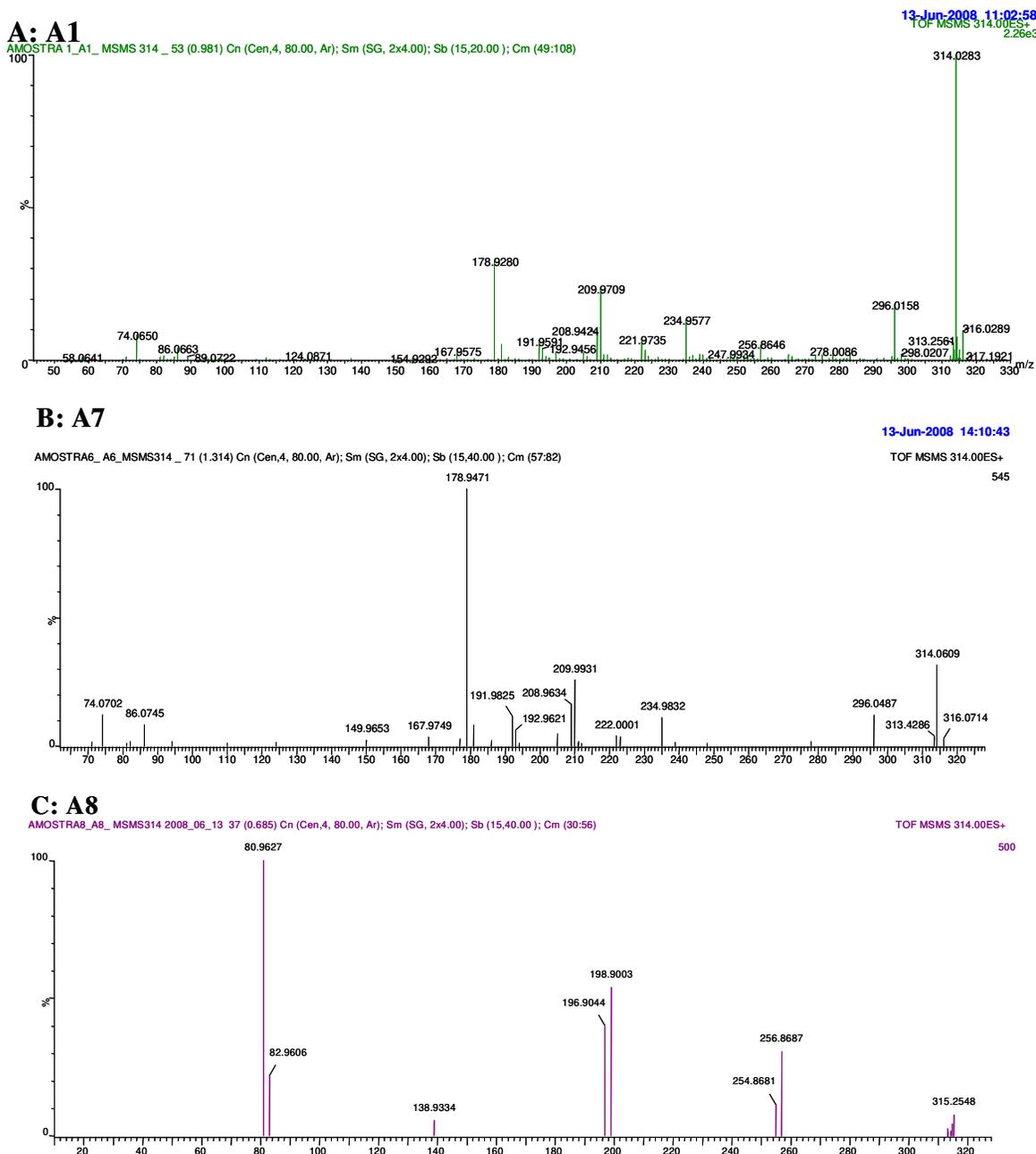


Figura 4.41. A) Espectro MS-MS do íon m/z 314 do fármaco comercial ANMG (A1), voltagem do capilar 4000 V e energia de colisão de 15 V; B) espectro MS-MS do íon m/z 314 do produto de síntese (A7), voltagem do capilar 2800 V e energia de colisão de 20 V e C) espectro MS-MS do íon m/z 314 do produto de reação entre Sb_2O_3 e NMG, voltagem do capilar 3500 V e energia de colisão de 10 V. *Electrospray* no modo positivo, voltagem do cone 60 V, temperatura de desolvatação 300 °C, temperatura da fonte 120 °C.

É observado na Figura 4.41 que os fragmentos do íon m/z 314 da síntese do antimoniato de N-metilglucamina e do fármaco comercial apresentam os mesmos fragmentos, porém com intensidades diferentes. No caso do espectro da amostra A8, os fragmentos do íon m/z 314 não são semelhantes aos fragmentos do íon m/z 314 das amostras de síntese do ANMG e do fármaco comercial, mostrando que o composto formado na reação do Sb(III) com NMG não é o mesmo do que aquele contido no fármaco comercial.

Com os dados obtidos pela espectrometria de massas em *tandem*, pode ser sugerido que a contaminação do fármaco antimoniato de N-metilglucamina por antimônio trivalente é proveniente da matéria prima empregada na síntese. No entanto, não se deve descartar a hipótese de uma redução do antimônio pentavalente a sua forma trivalente (tóxica) durante a rota sintética.

5. Conclusões

5. CONCLUSÕES

O produto formado na reação química entre o antimônio pentavalente e ácido cloranílico pode ser usado para a quantificação de Sb(V), usando a voltametria adsortiva de redissolução ou cromatografia líquida de alta eficiência.

O ácido cloranílico forma um complexo com o Sb(V) em solução aquosa ácida (pH 2) de estequiometria 1:2. A reação de formação do complexo se completa após 5 minutos e o complexo é estável durante um período de 120 minutos nas condições experimentais empregadas (meio de ácido perclórico, pH 2).

➤ *Voltametria*

O complexo formado entre o ácido cloranílico e Sb(V) adsorve na superfície do eletrodo de mercúrio em -0,5 V. Na varredura catódica, usando a voltametria de onda quadrada, o complexo adsorvido sofre redução em -0,3 V, cuja intensidade de corrente de pico é proporcional à concentração de Sb(V) em solução. A N-metilglucamina altera o comportamento eletroquímico do complexo formado entre o ácido cloranílico e Sb(V), inviabilizando a quantificação direta do Sb(V) no fármaco de antimoniato de N-metilglucamina. Ainda, o método não apresentou seletividade para a determinação de Sb(V) na presença de Sb(III). Para que o método possa ser aplicado na determinação de Sb(V) no antimoniato de N-metilglucamina faz-se necessário realizar um preparo de amostras que vise à separação do Sb(V) deste interferente.

O método desenvolvido para a determinação de Sb(III) por voltametria de onda quadrada apresentou todos os parâmetros de validação adequados para que possa ser aplicado no controle de qualidade deste contaminante no antimoniato de N-metilglucamina.

➤ *Cromatografia Líquida de Alta Eficiência*

A cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos e uma coluna octadecil híbrida de fase reversa mostrou-se adequada para a quantificação de Sb(V) através do complexo formado entre Sb(V) e ácido cloranílico.

O método desenvolvido foi validado para a quantificação de Sb(V) no antimoniato de N-metilglucamina, apresentando todos os parâmetros de validação em conformidade com os critérios de aceitação preconizados pela ANVISA. O método apresentou seletividade frente à presença de interferentes em potencial como Sb(III), N-metilglucamina, Pb(II) e As(III). O método é simples e pode ser empregado no controle de qualidade do fármaco.

➤ *Síntese e caracterização do antimoniato de N-metilglucamina*

A obtenção do antimoniato de N-metilglucamina foi possível a partir da reação de KSb(OH)_6 e NMG em meio aquoso pH 7. O produto foi caracterizado por análise elementar e espectrometria de massas em tandem. Os resultados comprovam que o produto obtido por síntese é o antimoniato de N-metilglucamina com as mesmas características do fármaco comercial. Os espectros de massa para o antimoniato de N-metilglucamina evidenciam a formação de vários complexos em solução entre o antimônio e a molécula de NMG. Além disso, os estudos indicam que é possível determinar a presença de antimônio trivalente por espectrometria de massas em *tandem*. Essas informações são relevantes uma vez que o Sb(III) é um contaminante indesejado. Os resultados obtidos por esta técnica permitiu sugerir que a contaminação do fármaco por Sb(III) era proveniente da matéria prima empregada para sua síntese, porém não se descarta a hipótese de uma conversão do Sb(V) para o Sb(III) durante a síntese. Estes resultados serão mais conclusivos estudando cada etapa do processo de síntese.

6. Referência Bibliográfica

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03.htm. Publicado em: maio de 2003. Acesso em: maio de 2008.

BALAÑA-FOUCE, R.; REGUERA, R.M.; CUBRÍA, J.C.; ORDÓÑEZ, D. The Pharmacology of Leishmaniasis. *General Pharmacology*, v. 30, p. 435-443, 1998.

BERMAN, J.D. Chemotherapy for Leishmaniasis: Biochemical Mechanism, Clinical Efficacy and Future Strategies. *Reviews of Infectious Diseases*, v. 10, p. 560-686, 1988.

BOND, A.M.; KRATZIS, S.; NEWMAN, M.O. Determination of antimony (III) and antimony (V) in copper plant electrolyte by anodic stripping voltammetry. *Electroanalysis*, v. 9, p. 681-684, 1997.

BRAININA, K.H. Z.; TCHERNYSHOVA, A.B. Inverse voltammetry of antimony with triphenylmethane dyes. *Talanta*, v. 21, p. 287-293, 1974.

BURNS, D.T.; CHIMPALLE, D.; DULLICK, H.J. Spectrophotometric determination of antimony after extractions of brilliant green hexachloroantimoniate (V) with microcrystalline 1,4-dichlorobenzene. *Analytica Chimica Acta*, v. 284, p. 195-198, 1993.

CAPODAGLIO, G.; VANDENBERG, C.M.G.; SCARPONI, G. Determination of antimony in seawater by cathodic stripping voltammetry. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 235, p. 275-286, 1987.

COLLINS, H.C.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Fundamentos de Cromatografia. Editora Unicamp, cap. 1, p. 17-42, 2005.

CVE ^(a), Centro de Vigilância Epidemiológica no Estado de São Paulo, Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa26_lva.htm. Publicada em: fevereiro de 2006. Acesso em: fevereiro de 2007.

CVE ^(b), Centro de Vigilância Epidemiológica no Estado de São Paulo, Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa6_lva.htm. Publicado em: junho de 2004. Acesso em: fevereiro de 2007.

CVE ^(c), Centro de Vigilância Epidemiológica no Estado de São Paulo, Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa39_lva.htm. Publicado em: março de 2007. Acesso em: abril de 2007.

DEMICHELI, C.; OCHOA, R.; LULA, I.S.; GOZZO, F.C.; EBERLIN, M.N.; FRÉZARD, F. Pentavalent organoantimonial derivatives: two simple and efficient synthetic

methods for meglumina antimoniate. *Applied Organometallic Chemistry*, v. 17, p. 226-231, 2003.

DEMICHELI, C.; FIGUEIREDO, T.L.; CARVALHO, S.; SINESTERRA, R.D.; LOPES, J.C.D.; FREZARD, F. *Physico-chemical characterization of meglumine antimoniate. BioMetals*, v. 12, p. 63-66, 1999.

DE GREGORI, I.; QUIROZ, W.; PINOCHET, H.; PANNIER, F.; GAUTIER-POTIN, M. Speciation analysis of antimony in marine biota by HPLC-(UV)-HG-AFS: Extraction procedures and stability of antimony species. *Talanta*, v. 73, p. 458-465, 2007.

DE GREGORI, I.; PINOCHET, H.; FUENTES, E.; POTIN-GAUTIER, M. Determination of antimony in soils and vegetables by hydride generation atomic fluorescence spectrometry and electrothermal atomic absorption spectrometry. Optimization and comparison of both analytical techniques. *Journal Analytical Atomic Spectrometry*, v. 16, p. 172-178, 2001.

FAN, Z. Determination of antimony (III) and total antimony by single-drop microextraction combined with electrothermal atomic adsorption spectrometry. *Analytical Chimica Acta*, v. 585, p. 300-304, 2007.

Farmacopéia Brasileira, Fascículo IV, parte II, ed. 4^a, 2003.

FIOCRUZ ^(a), Fundação Oswaldo Cruz, Disponível em: <http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/hist_rico.htm>. Acesso em: abril de 2008.

FIOCRUZ ^(b), Fundação Oswaldo Cruz, Disponível em: <<http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/vetores.htm>>. Acesso em: abril de 2008.

FIOCRUZ ^(c), Fundação Oswaldo Cruz, Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=353&sid=6>>. Acesso em: abril de 2008.

FRANCO, A.; BARBOSA, A.C.; RATH, S.; DÓREA, J.G. Antimony oxidation states in antileishmanial drugs. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 52, p. 435-437, 1995.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; FERREIRA, C.S.; COSTA, M.A.P. Glutathione-Induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, p. 913-916, 2001.

FRUGONI, J.A.C. Tampone universale di Britton e Robinson a forza ionica costante. *Gazzetta Chimica Italiana*, v. 87, p. 403-407, 1957.

GEBEL, T. Arsenic and antimony: comparative approach on mechanistic toxicology. *Chemico-Biological Interactions*, v. 107, p. 131-144, 1997.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. v. 7, p. 338-349, 2004.

GONZÁLEZ, M.J.G.; RENEDO, O.D.; MARTÍNEZ, M.J.A. Speciation of antimony by adsorptive stripping voltammetry using pyrogallol. *Talanta*, v. 71, p. 691-698, 2007.

GRIMALDI, G.; TESH, A.B.; McMAHON, P.D. A review of the geographic-distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new-world. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 41, p. 687-725, 1989.

GUO, H.; LI, Y.; CHEN, X.; NIE, L.; HE, N. Determination of trace antimony (III) by adsorption voltammetry at carbon paste electrode. *Sensors*, v. 5, p. 284-292, 2005.

HARRIS, D.C. Análise Química Quantitativa, editora LTC, ed. 6ª, cap. 19, p. 431-432, 2003.

HUDAK, A.; KOSTURIK, A.; LELUCH, P.; REIFFOVA, K. Spectrophotometric determination of low amounts of antimony with crystal violet in metals, alloys and some reagents. *Ckemicke Listy*, v. 91, p. 702-703, 1997.

Informe SNVS/ANVISA/GFARM nº 9, 5 de setembro de 2007. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/farmacovigilancia/informes/2007/informe_9.htm>. Acesso em: fevereiro de 2008.

KEPPLER, A.F.; IMBRUNITO, T.R.; JESÚS, M.N.; TRIVELIN, L.A.; BARONE, J.S.; BUENO, M.I.M.S.; TEMPONE, G.; ANDRADE JR., H.F.; RATH, S. Antileishmanial drugs: speciation of antimony and identification of toxic contaminants. *I. Simpósio Brasileiro de Química Medicinal*, Caxambu, MG, 11 a 16 de Novembro de 2001.

KHOO, S.B.; ZHU, J. Poly(pyrogallol) film glassy carbon electrode for selective preconcentration and stripping voltammetric determination of Sb(III). *Analytical Chimica Acta*, v. 373, p. 15-27, 1998.

LAINZ, K.E.; SHIEH, G.M.; WAI, C.M. Simultaneous determination of arsenic and antimony species in environmental samples using bis(trifluoroethyl)dithiocarbamate chelation and supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography Science*, v. 30, p. 120-121, 1992.

LIMONGI, J.P.; CORBETT, C.E. Em Farmacodinâmica. Editora Livraria Artes Médicas, ed. 4ª, cap. 61, p. 845-850, 1973.

LINTSCHINGER, J.; KOCH, I.; SERVES, S.; FELDMANN, J.; CULLEN, W.R. Determination of antimony species with high-performance liquid chromatography

using element specific detection. *Fresenius Journal Analytical Chemistry*, v. 359, p. 484-491, 1997.

MAREN, T.H. Colorimetric microdetermination of antimony with rhodamine-B. *Analytical Chemistry*, v. 19, p. 487-491, 1996.

MARSDEN, P.D. Pentavalent antimonials: old drugs for new diseases. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 18, p. 187-198, 1985.

MIEKELEY, N.; MORTARI, S.R.; SCHUBACH, A.O. Monitoring of antimony and its species by ICP-MS and on-line ion chromatography in biological samples from patients treated for leishmaniasis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 372, p. 495-502, 2002.

Ministério da Saúde ^(a), Disponível em:
<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_leish_viscerar2006.pdf>. Acesso em março de 2008.

Ministério da Saúde ^(b), Disponível em:
<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_Ita_2ed.pdf>. Acesso em maio de 2008.

MOSTAFA, G.A.E. Development and characterization of ion selective electrode for the assay of antimony. *Talanta*, v. 71, p. 1449-1454, 2007.

PASCHOAL, J.A.R.; RATH, S.; AIROLDI, F.P.S.; REYES, F.G.R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. *Química Nova*, Disponível em:
<<http://quimicanova.sbq.org.br/qn/No%20Prelo/RV/RV07157.pdf>>

RATH, S.; TRIVELIN, L.A.; IMBRUNITO, T.R.; TOMAZELA, D.M.; JESÚS. M.N.; MARZAL, P.M. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Química Nova*, v. 26, p. 550-555, 2003.

RATH, S.; JARDIM, W.F.; DÓREA, J.G. A simple spectrophotometric procedure for the determination of antimony (III) and (V) in antileishmanial drugs. *Fresenius Journal Analytical Chemistry*, v. 358, p. 548-550, 1997.

RENEDO, O.D.; MARTÍNEZ, M.J.A. Anodic stripping voltammetry of antimony using gold nanoparticle-modified carbon screen-printed electrodes. *Analytical Chimica Acta*, v. 589, p. 255-260, 2007.

REYES-SALAS, E.O.; DOSAL-GOMEZ, M.A.; BARCELO-QUINTAL, M.H.; MANZANILLA-CANO, J.A. Simultaneous determination of nickel, cobalt, antimony, and arsenic in an aqueous sample by differential pulse polarography. *Analytical Letters*, v. 35, p. 123-133, 2002.

ROBERTS, W.L.; MCMURRAY, W.J.; RAINEY, P.M. Characterization of the antimonial antileishmanial agent meglumine antimoniate (Glucantime®). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 42, p. 1076-1082, 1998.

SEILER, H.G.; SIGEL, H. Handbook on Toxicity of Inorganic Compounds, cap. 17, p. 67-76, 1988.

SERENO, D.; CAVALEYRA, M.; ZEMZOUMI, K.; MAQUAIRE, S.; QUAISSI, A.; LEMESRE, J.L. Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 42, p. 3097-3102, 1998.

SOUZA, D.de; CODOGNOTO, L.; MALAGUTTI, A.R.; TOLEDO, R.A.; PEDROSA, V.A.; OLIVEIRA, R.T.S.; MAZO, L.H; AVACA, L.A.; MACHADO, S.A.S. Voltametria de onda quadrada. Segunda parte: Aplicações. *Química Nova*, v. 27, p. 590-797, 2004.

SOUZA, D.de; MACHADO, S.A.S.; AVACA, L.A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos. *Química Nova*, v. 26, p. 81-89, 2003.

SUCEN ^(a), Superintendência de Controle de Endemias. Disponível em: <<http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/index.htm>>. Acesso em: abril de 2008. Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo, 2006.

SUCEN ^(b), Superintendência de Controle de Endemias. Disponível em: <http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/leish_teg/texto_leishmaniose_tegumentar_americana.htm>. Acesso em: abril de 2008.

SUCEN ^(c), Superintendência de Controle de Endemias. Disponível em: <http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/leish_visc/texto_leishmaniose_visceral_americana.htm>. Acesso em: abril de 2008.

TIWARI, K.K.; MUNDHARA, G.L.; RAI, M.K.; GUPTA, V.K. A simple and sensitive analytical method for the determination of antimony in environmental and biological samples. *Analytical Sciences*, v. 22, p. 259-262, 2006.

TRIVELIN, L.A.; ROHWEDDER, J.J.R.; RATH, S. Determination of pentavalent antimony in antileishmaniotic drugs using an automated system for liquid-liquid extraction with on-line detection. *Talanta*, v. 68, p. 1536-1543, 2006.

VIANNA, G. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar por injeções intravenosas de tártaro emético. *Anais do 7º Congresso Brasileiro de Medicina e Cirurgia*, v. 4, p. 426-428, 1912.

WAGNER, W.; SANDER, S.; HENZE, G. Trace analysis of antimony (III) and antimony (V) by adsorptive voltammetry. *Fresenius Journal Analytical Chemistry*, v. 354, p. 11-15, 1996.

WHO ^(a), World Health Organization, Disponível em:
<<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>>. Acesso em: abril de 2008.

WHO ^(b), World Health Organization, Disponível em:
<<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/default.htm>>. Acesso em: maio 2007.

WIFLADT, A.M.; WIBETOE, G.; LUND, W. Determination of antimony in wine by hydride generation graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Fresenius Journal Analytical Chemistry*, v. 357, p. 92-96, 1997.

ZANINI, A.C.; BASILE, A.C.; FOLLADOR, W.; OGA, S. Guia de Medicamentos. Editora IPEX, ed. 2^a, p. 456-457, 1997/1998.

ZHENG, J.; IJIMA, A.; FURUTA, M. Complexation effect of antimony compounds with citric acid and its application of antimony (III) and (V) using HPLC-ICP-MS. *Journal Analytical Atomic Spectrometry*, v. 16, p. 812-818, 2001.

ANEXO A

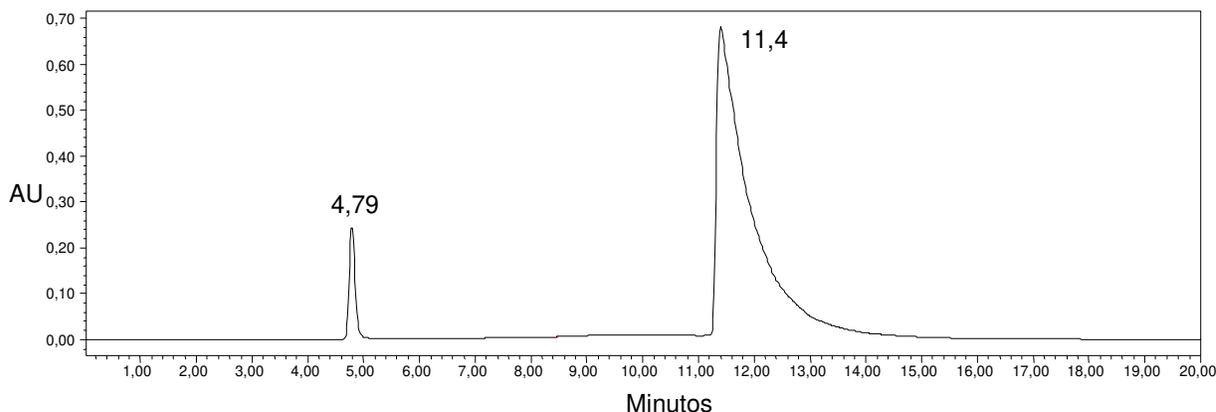


Figura A.1. Cromatograma para o complexo [Sb(V)(AC)]. Concentração de Sb(V) $9,12 \mu\text{g mL}^{-1}$ e de AC $150,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Fase estacionária: octadecil. Fase móvel: FA ($\text{H}_2\text{O}-\text{H}_3\text{PO}_4$, pH 2), FO (metanol). Eluição por gradiente: 100% FA e 0% FO de 0 a 6 min; sendo mudado para 65% FA e 35% FO de 6 a 12 min; voltando à proporção inicial de 12 a 20 min. Vazão de 1 mL min^{-1} . Detecção em 310 nm.

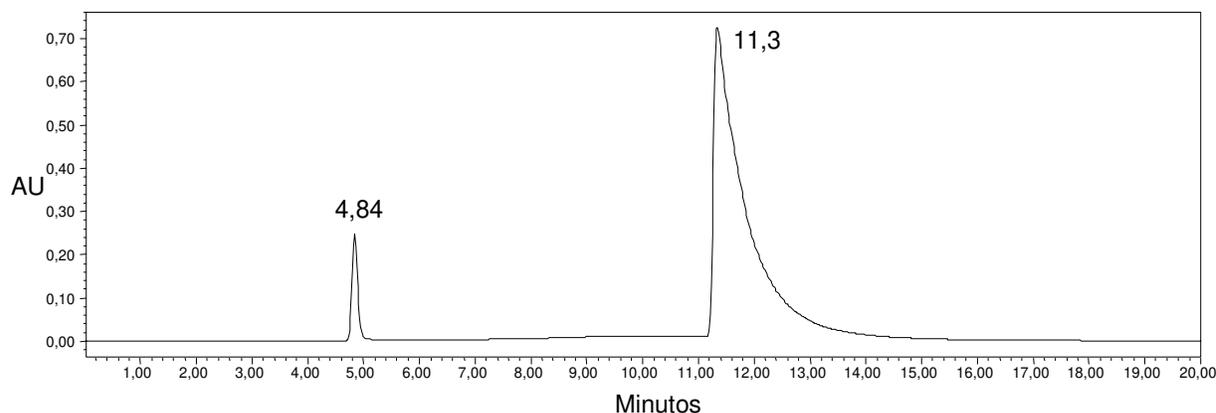


Figura A.2. Cromatograma para o Sb(V) na presença de Sb(III) (relação Sb(V):Sb(III) de 1:0,1, sendo a concentração de Sb(III) $0,912 \mu\text{g mL}^{-1}$, Sb(V) $9,12 \mu\text{g mL}^{-1}$ e de AC $150,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Fase estacionária: octadecil. Fase móvel: FA ($\text{H}_2\text{O}-\text{H}_3\text{PO}_4$, pH 2), FO (metanol). Eluição por gradiente: 100% FA e 0% FO de 0 a 6 min; sendo mudado para 65% FA e 35% FO de 6 a 12 min; voltando à proporção inicial de 12 a 20 min. Vazão de 1 mL min^{-1} . Detecção em 310 nm.

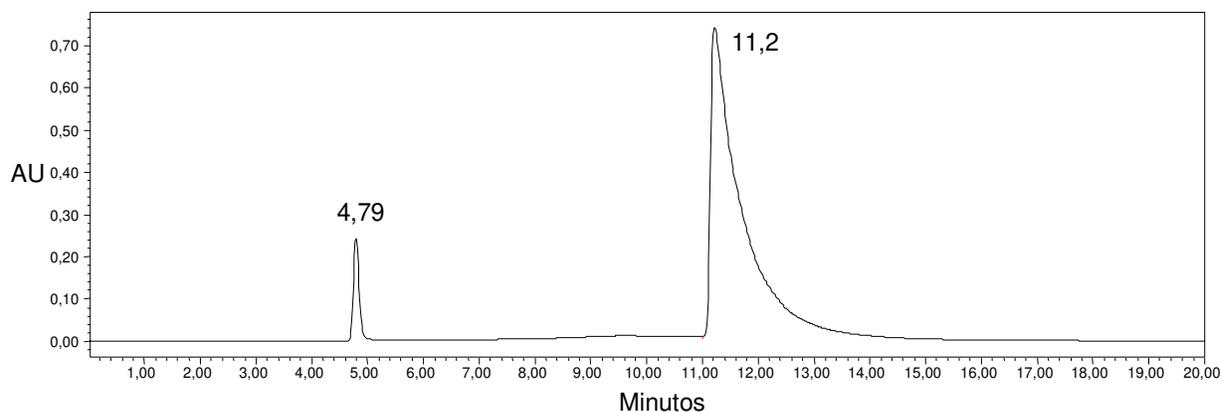


Figura A.3. Cromatograma para o Sb(V) na presença de As(III) (relação Sb(V):As(III) de 1:0,1, sendo a concentração de As(III) $0,912 \mu\text{g mL}^{-1}$, Sb(V) $9,12 \mu\text{g mL}^{-1}$ e de AC $150,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Fase estacionária: octadecil. Fase móvel: FA ($\text{H}_2\text{O}-\text{H}_3\text{PO}_4$, pH 2), FO (metanol). Eluição por gradiente: 100% FA e 0% FO de 0 a 6 min; sendo mudado para 65% FA e 35% FO de 6 a 12 min; voltando à proporção inicial de 12 a 20 min. Vazão de 1 mL min^{-1} . Detecção em 310 nm.

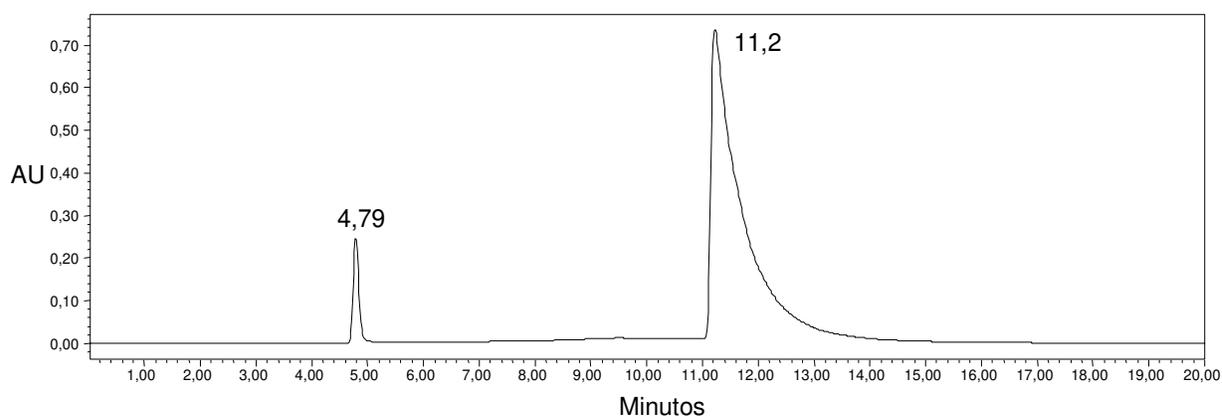


Figura A.4. Cromatograma para o Sb(V) na presença de Pb(II) (relação Sb(V):Pb(II) de 1:0,1, sendo a concentração de Pb(II) $0,912 \mu\text{g mL}^{-1}$, Sb(V) $9,12 \mu\text{g mL}^{-1}$ e de AC $150,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Fase estacionária: octadecil. Fase móvel: FA ($\text{H}_2\text{O}-\text{H}_3\text{PO}_4$, pH 2), FO (metanol). Eluição por gradiente: 100% FA e 0% FO de 0 a 6 min; sendo mudado para 65% FA e 35% FO de 6 a 12 min; voltando à proporção inicial de 12 a 20 min. Vazão de 1 mL min^{-1} . Detecção em 310 nm.

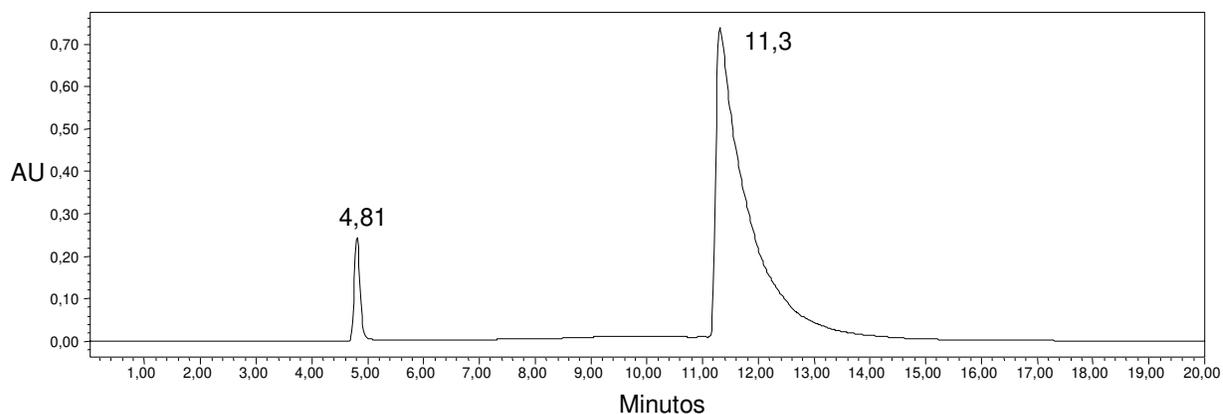


Figura A.5. Cromatograma para o Sb(V) na presença de Cu(II) (relação Sb(V):Cu(II) de 1:0,1, sendo a concentração de Cu(II) $0,912 \mu\text{g mL}^{-1}$, Sb(V) $9,12 \mu\text{g mL}^{-1}$ e de AC $150,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Fase estacionária: octadecil. Fase móvel: FA ($\text{H}_2\text{O}-\text{H}_3\text{PO}_4$, pH 2), FO (metanol). Eluição por gradiente: 100% FA e 0% FO de 0 a 6 min; sendo mudado para 65% FA e 35% FO de 6 a 12 min; voltando à proporção inicial de 12 a 20 min. Vazão de 1 mL min^{-1} . Detecção em 310 nm.

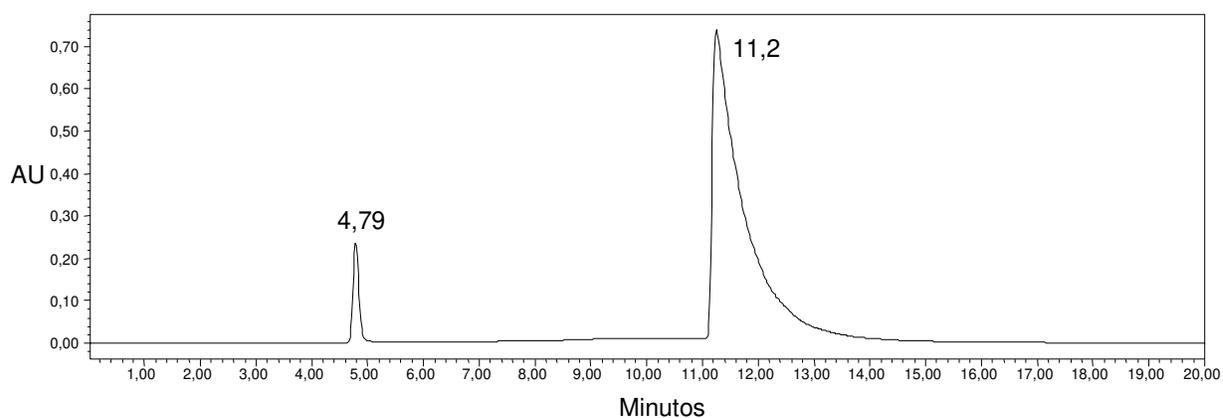


Figura A.6. Cromatograma para o Sb(V) na presença de Cd(II) (relação Sb(V):Cd(II) de 1:0,1, sendo a concentração de Cd(II) $0,912 \mu\text{g mL}^{-1}$, Sb(V) $9,12 \mu\text{g mL}^{-1}$ e de AC $150,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Fase estacionária: octadecil. Fase móvel: FA ($\text{H}_2\text{O}-\text{H}_3\text{PO}_4$, pH 2), FO (metanol). Eluição por gradiente: 100% FA e 0% FO de 0 a 6 min; sendo mudado para 65% FA e 35% FO de 6 a 12 min; voltando à proporção inicial de 12 a 20 min. Vazão de 1 mL min^{-1} . Detecção em 310 nm.

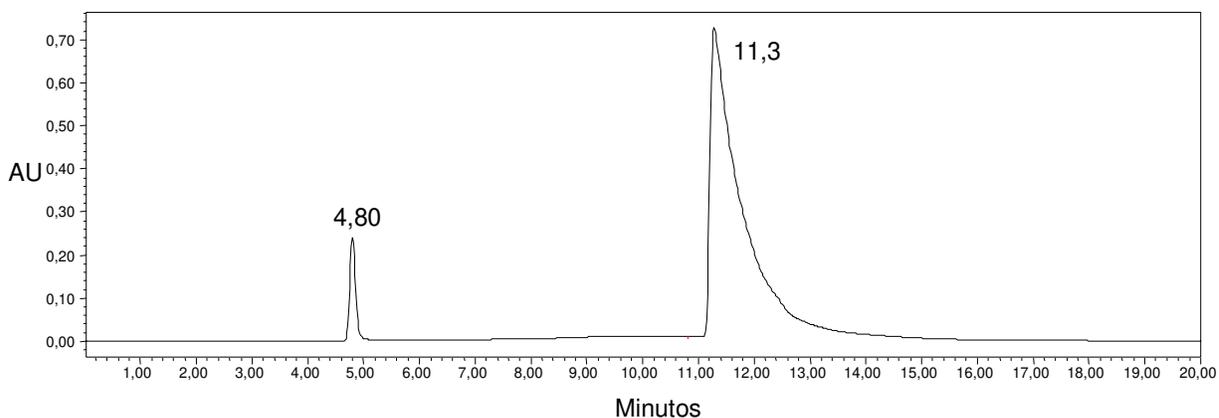


Figura A.7. Cromatograma para o Sb(V) na presença de Bi(III) (relação Sb(V):Bi(III) de 1:0,1, sendo a concentração de Bi(III) $0,912 \mu\text{g mL}^{-1}$, Sb(V) $9,12 \mu\text{g mL}^{-1}$ e de AC $150,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Fase estacionária: octadecil. Fase móvel: FA ($\text{H}_2\text{O}-\text{H}_3\text{PO}_4$, pH 2), FO (metanol). Eluição por gradiente: 100% FA e 0% FO de 0 a 6 min; sendo mudado para 65% FA e 35% FO de 6 a 12 min; voltando à proporção inicial de 12 a 20 min. Vazão de 1 mL min^{-1} . Detecção em 310 nm.