



UFSM

Dissertação de Mestrado

**DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES DE ANTIMÔNIO EM ANTIMONIATO
DE MEGLUMINA**

Clarissa Marques Moreira

PPGQ

Santa Maria, RS, Brasil

2008

DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES DE ANTIMÔNIO EM ANTIMONIATO DE MEGLUMINA

por

Clarissa Marques Moreira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, **Área de Química Analítica**, da Universidade Federal de Santa Maria (RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Química**

Santa Maria, RS, Brasil

2008

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química**

A Comissão Examinadora abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES DE ANTIMÔNIO EM ANTIMONIATO DE
MEGLUMINA**

elaborada por

Clarissa Marques Moreira

Como requisito parcial para a obtenção do grau de

Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:

Valderi Luiz Dressler - Orientador (UFSM-RS)

Juliano Smanioto Barin (INMETRO-RJ)

Sergio Roberto Mortari (UNIFRA-RS)

Santa Maria, 04 de agosto de 2008.

Dedico esta dissertação:

Ao meu pai, Édison (*in memoriam*) pelo carinho, exemplo de dedicação a profissão e incentivo aos estudos, obrigado com gratidão e, ao meu irmão, Guilherme (*in memoriam*). Agradeço a vocês, por todos os momentos preciosos.

À minha família, em especial, à minha mãe, Dalana, pela garra e coragem, obrigada pelo carinho, incentivo, ajuda e compreensão, pois um simples obrigado é muito pouco para expressar minha gratidão. Aos meus irmãos, Marcos e Júnior, pelo carinho, incentivo e paciência nos momentos ausentes. Ao meu noivo, Marcos, pelo constante apoio, carinho e compreensão, tanto nas horas difíceis como nos momentos agradáveis.

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável (...), para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer”.

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Maria pela possibilidade de execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Valderi Luiz Dressler, orientador, pela oportunidade de execução deste trabalho, pelos inúmeros ensinamentos, pela amizade, contribuição para o meu crescimento profissional e pelo seu exemplo de dedicação ao ensino e a pesquisa científica.

Ao Prof. Dr. Érico Marlon de Moraes Flores, co-orientador, pela constante ajuda com sugestões que contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho, pela confiança, amizade e exemplo de dedicação ao ensino e a pesquisa científica.

Ao Prof. Dr. Sergio Roberto Mortari, co-orientador, pela amizade, incentivo, confiança e valiosa contribuição para o enriquecimento deste trabalho, pela participação na banca da Prova de Dissertação de Mestrado e oportunidade de crescimento profissional durante o período de graduação e extensivo ao mestrado.

Ao Dr. Juliano S. Barin pela constante ajuda, amizade, sugestões para o aperfeiçoamento deste trabalho e pela participação na banca da Prova de Dissertação de Mestrado.

Ao Prof. Dr. José Neri Gottfried Paniz pela exemplar dedicação a hialotecnica e pela confecção do material para a execução deste trabalho.

Agradeço ao colega e amigo, Fábio A. Duarte pelos ensinamentos e incansável ajuda na realização deste trabalho.

Aos colegas do Setor de Química Industrial e Ambiental, pelo convívio, amizade e colaboração e, em especial, Camila Pilz, Fabiane R. Bartz, Fabiane G. Antes, Gabriela W. Fernandes, Lucélia Hoehne e Paola de Azevedo Mello pelo auxílio direto durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela bolsa de estudo concedida.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Química, Ademir e Valéria, pela disposição demonstrada durante a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	<i>xi</i>
LISTA DE TABELAS.....	<i>xx</i>
LISTA DE ABREVIATURAS.....	<i>xxii</i>
RESUMO.....	<i>xxvi</i>
ABSTRACT.....	<i>xxviii</i>
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1. ANTIMÔNIO (Sb).....	5
2.1.1. Efeito toxicológico do Sb.....	5
2.2. LEISHMANIOSE.....	6
2.3. FÁRMACOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE.....	8
2.3.1. Antimoniato de meglumina.....	8
2.4. ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO.....	13
2.4.1. Análise de especiação de Sb.....	15
2.5. MÉTODOS NÃO CROMATOGRÁFICOS PARA ESPECIAÇÃO.....	17
2.5.1. Geração de hidretos.....	17
2.6. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA ESPECIAÇÃO.....	22

2.6.1. Cromatografia a Líquido.....	22
2.6.1.2. Cromatografia de Íons.....	24
2.6.2. Separação das espécies de Sb empregando CPG-8HQ.....	31
2.7. MÉTODOS DIVERSOS PARA A ESPECIAÇÃO DE Sb EM ANTIMONIATO DE MEGLUMINA.....	32
2.8. TÉCNICAS DE DETECÇÃO.....	35
2.8.1. Espectrometria de absorção atômica.....	35
2.8.2. Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado..	35
3. OBJETIVOS.....	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1. INSTRUMENTAÇÃO.....	39
4.1.1. Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado..	39
4.1.2. Cromatografia a líquido.....	40
4.1.3. Espectrometria de absorção atômica.....	41
4.1.3.1. Espectrometria de absorção atômica com chama.....	41
4.1.3.2. Espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos	41
4.1.4. Sistema de injeção em fluxo.....	41
4.2. REAGENTES.....	43
4.3. MATERIAIS DIVERSOS.....	44
4.4. AMOSTRA.....	45
4.5. ESPECIAÇÃO DE Sb EMPREGANDO LC-ICP-MS.....	46
4.5.1. AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM NA SEPARAÇÃO DAS ESPÉCIES DE Sb.....	46

4.6. DETERMINAÇÃO DE Sb EMPREGANDO FI-HG AAS.....	47
4.6.1. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM NA DETERMINAÇÃO DE Sb(III).....	47
4.7. DETERMINAÇÃO DE Sb EMPREGANDO FI-HG-ICP-MS.....	47
4.8. DETERMINAÇÃO DE Sb POR LC-HG-ICP-MS.....	48
4.9. SEPARAÇÃO DAS ESPÉCIES DE Sb EMPREGANDO CPG-8HQ.	48
4.10. MÉTODOS OFICIAIS DE DETERMINAÇÃO DE Sb(III), Sb(V) E Sb TOTAL EM ANTIMONIATO DE MEGLUMINA.....	49
4.10.1. Determinação da concentração do Sb total por F AAS.....	49
4.10.2. Determinação da concentração de Sb(III) por HG AAS.....	49
4.10.3. Determinação da concentração de Sb(III) por método volumétrico e Sb(V) por método potenciométrico.....	50
4.11. AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS MÉTODOS PROPOSTOS PARA A ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE Sb.....	50
4.12. RESUMO DOS MÉTODOS AVALIADOS PARA A DETERMINAÇÃO DE Sb(III) E Sb(V).....	51
5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	53
5.1. AJUSTE DO SISTEMA LC-ICP-MS.....	54
5.1.1. Ajuste do instrumento de ICP-MS.....	54
5.1.2. Especificação de Sb empregando sistema LC-ICP-MS.....	55
5.1.2.1. Escolha da coluna de troca aniônica.....	55
5.1.2.2. Escolha do tipo e concentração da fase móvel.....	56

5.1.2.3. Escolha da vazão da fase móvel.....	60
5.1.2.4. Escolha do pH da fase móvel.....	62
5.1.2.5. Escolha do modo de eluição da fase móvel.....	64
5.1.2.6. Condicionamento da coluna cromatográfica.....	65
5.1.3. Coluna de troca aniônica PRP-X100.....	68
5.1.4. Separação das espécies de Sb empregando CPG-8HQ.....	72
5.2. DETERMINAÇÃO DE Sb(III) EMPREGANDO SISTEMA LC-HG-ICP-MS.....	80
5.3. EFEITO DO AQUECIMENTO DAS SOLUÇÕES SOBRE A ESTABILIDADE DAS ESPÉCIES DE Sb NO ANTIMONIATO DE MEGLUMINA.....	89
5.4. DETERMINAÇÃO DE Sb(III) EMPREGANDO SISTEMA FI-HG AAS.....	95
5.4.1. Variáveis químicas do sistema FI-HG AAS.....	95
5.4.1.1. Efeito da concentração de NaBH ₄	95
5.4.1.2. Efeito da concentração do ácido cítrico.....	96
5.4.1.3. Efeito da concentração do HCl como carregador da amostra.....	98
5.4.2. Variáveis físicas do sistema FI-HG AAS.....	99
5.4.2.1. Escolha do comprimento do percurso analítico.....	99
5.4.2.2. Escolha do volume da amostra.....	100
5.4.2.3. Escolha da vazão das soluções.....	101
5.4.2.4. Escolha da vazão do gás de arraste.....	102
5.4.2.5. Interferência da concentração do Sb(V) na amostra sobre o Sb(III).....	103
5.5. DETERMINAÇÃO DE Sb(III) EMPREGANDO SISTEMA FI-HG-ICP-MS.....	106
5.6. MÉTODOS OFICIAIS DE DETERMINAÇÃO DE Sb(III), Sb(V) E Sb TOTAL EM ANTIMONIATO DE MEGLUMINA.....	106

5.6.1. Determinação da concentração de Sb total por F AAS.....	106
5.6.2. Determinação da concentração de Sb(III) por HG AAS.....	107
5.6.3. Determinação da concentração de Sb(III) por método volumétrico e Sb(V) por método potenciométrico.....	107
5.7. AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS MÉTODOS PROPOSTOS PARA A ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE Sb.....	109
6. CONCLUSÕES.....	113
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Proposta de mecanismo de ação do antimônio na forma amastigota da Leishmania. Ver significado das indicações de a) até (d) do texto..... 9
- Figura 2.** Dois modelos propostos para o mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes. O modelo (1) envolve a redução de Sb(V) a Sb(III) pelos tióis; o modelo (2) envolve a formação de complexo Sb(V)-ribonucleosídeo..... 10
- Figura 3.** Proposta de estrutura para o antimoniato de meglumina obtida por H-RMN..... 12
- Figura 4.** Estrutura molecular da 8-hidroxiquinolina..... 31
- Figura 5.** Sistema FI-HG AAS. A- amostra; C_A- carregador da amostra; R₁- ácido cítrico; R₂- NaBH₄; B- bomba peristáltica; L_A- alça de amostragem; D- descarte; a- 5 cm; B₁- 300 cm; B₂- 30 cm; x e y- confluências; Ar- gás de arraste (argônio); G/L- separador gás/líquido; QT-AAS- espectrômetro de absorção atômica com tubo de quartzo. As setas indicam o sentido das soluções..... 42
- Figura 6.** Sistema FI-HG-ICP-MS. MS- espectrômetro de massa. Demais parâmetros ver legenda da Figura 9..... 42
- Figura 7.** Sistema LC-ICP-MS. 1- fase móvel; 2- degaseificador a vácuo; 3- bomba de LC; 4- injetor e alça de amostragem; 5- coluna guarda (troca aniônica); 6- coluna de troca aniônica; 7- nebulizador; 8- câmara de nebulização; 9 e 10- ICP-MS..... 46

- Figura 8.** Sistema LC-HG-ICP-MS. Ver legendas das Figuras 5 e 7 para o significado das letras e números..... 48
- Figura 9.** Métodos avaliados para a especiação de Sb em antimoniato de meglumina..... 52
- Figura 10.** Influência da fase móvel na separação das espécies de Sb com coluna IonPac. Cromatogramas obtidos a partir de soluções contendo $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(V) + $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(III) e amostra diluída 2000000x, pH 4,5 da fase móvel. (a) e (a₁) EDTA $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$; (b) e (b₁) ftalato de potássio $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$; (c) e (c₁) EDTA $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ + ftalato de potássio $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$. (a), (b) e (c) soluções de referência e (a₁), (b₁) e (c₁) amostras..... 57
- Figura 11.** Influência da concentração do EDTA na fase móvel (pH 4,5) na separação das espécies de Sb com a coluna IonPac. Cromatogramas obtidos a partir de soluções contendo $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(V) + $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(III) e amostra diluída 2000000x. (a) e (a₁) EDTA $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$; (b) e (b₁) EDTA $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$; (c) e (c₁) EDTA $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$; (d) e (d₁) EDTA $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$; (e) e (e₁) EDTA $8,0 \text{ mmol L}^{-1}$. (a), (b), (c), (d) e (e) soluções de referência e (a₁), (b₁), (c₁), (d₁) e (e₁) amostras..... 59
- Figura 12.** Influência da vazão da fase móvel (EDTA $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 4,5) na separação das espécies de Sb com a coluna IonPac. Cromatogramas de solução referência de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(V) + $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(III) e amostra diluída 2000000x, respectivamente, da fase móvel. (a) e (a₁) vazão da fase móvel de $0,25 \text{ mL min}^{-1}$; (b) e (b₁) $0,50 \text{ mL min}^{-1}$; (c) e (c₁) $1,0 \text{ mL min}^{-1}$; (d) e (d₁) $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ e (e) e (e₁) $1,75 \text{ mL min}^{-1}$ 61
- Figura 13.** Influência do pH da fase móvel (EDTA $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) na separação das espécies de Sb com a coluna IonPac.

Cromatogramas de solução referência de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(V) + $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(III) e amostra diluída 200000x, respectivamente. (a) e (a₁) pH da fase móvel de 3,5; (b) e (b₁) 4,0; (c) e (c₁) 4,5; (d) e (d₁) 5,0; (e) e (e₁) 6,0; (f) e (f₁) 7,0. (a), (b), (c), (d), (e) e (f) soluções de referência e (a₁), (b₁), (c₁), (d₁), (e₁) e (f₁) amostras... 63

Figura 14. Influência do modo de eluição (gradiente) com a coluna IonPac. EDTA (pH 4,5), condição de eluição: $0,5 \text{ mmol L}^{-1}/ 10 \text{ min}$; $10 \text{ mmol L}^{-1}/ 10 \text{ min}$; na separação das espécies de Sb. Cromatograma de solução referência de Sb(V) $5 \mu\text{g L}^{-1}$ + Sb(III) $5 \mu\text{g L}^{-1}$ 65

Figura 15. Cromatogramas obtidos após a otimização das condições para especificação de Sb em antimoniato de meglumina com a coluna IonPac. (a) amostra diluída 200000x; (a₁) idem (a) e ampliação de 10x; (b) sobreposição de amostra diluída 200000x (em azul) e solução referência de $30 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(V) + $30 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(III) (em vermelho); (b₁) idem (b) e ampliação de 10x; (c) amostra + $30 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(III); (c₁) idem (c) e ampliação de 10x; (d) amostra + $30 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(V); (d₁) idem (d) e ampliação de 5x..... 67

Figura 16. Cromatogramas obtidos empregando a coluna PRP-X100 para especificação de Sb em antimoniato de meglumina. (a) amostra diluída 400000x; (a₁) idem (a) e ampliação de 3x na escala de tempo; (b) amostra + $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(III); (b₁) idem(b) e ampliação de 10x. (a) amostra diluída 400000x; (a₁) idem (a) e ampliação de 10x; (c) amostra + $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(V); (c₁) idem (c) e ampliação de 10x; (d) sobreposição de amostra diluída 400000x (em azul)-ampliação de 15x e solução referência de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(V) + $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(III) (em vermelho) e ampliação de 15x e o mesmo cromatograma com ampliação de 120x..... 70

- Figura 17.** Cromatogramas obtidos com coluna PRP-X100 após tratamento das soluções de referência e amostra com a CPG-8HQ. (a) resíduo da coluna obtido da solução amostra diluída 400000x após submetida na CPG-8HQ; (b) sobreposição da amostra (azul) + resíduo da coluna obtido da solução amostra submetida na CPG-8HQ (vermelho); (c) resíduo da coluna obtido da solução de referência de Sb(V) + Sb(III) submetida na CPG-8HQ e ampliação de 83x; (d) eluato (coluna CPG-8HQ) da solução referência de Sb(V) + Sb(III) e ampliação de 83x; (e) solução referência de Sb(III) + NMG diluída 200000x injetada direto no cromatógrafo; (f) resíduo da coluna obtido da solução referência de Sb(III) + NMG diluída 200000x após submetida na CPG-8HQ; (g) eluato da coluna obtido da solução referência de Sb(III) + NMG diluída 200000x após submetida na CPG-8HQ; (h) sobreposição de solução referência de Sb(III) + NMG diluída 200000x (azul) com aquecimento e injetada direto no cromatógrafo e solução referência de Sb(III) + NMG diluída 200000x (verde) sem aquecimento e após submetida na CPG-8HQ e ampliação de 40x..... 74
- Figura 18.** Cromatogramas obtidos com a coluna PRP-X100 e a CPG-8HQ. (a) Sb(V) + NMG; (b) resíduo da coluna obtido da solução Sb(V) + NMG submetida na CPG-8HQ; (c) eluato da mistura Sb(V) + NMG submetida na CPG-8HQ..... 77
- Figura 19.** Cromatogramas obtidos com coluna PRP-X100 e a CPG-8HQ. (a) Sb(V) + Sb(III) + NMG, e ampliação de 10x; (b) resíduo da coluna obtido da solução Sb(V) + Sb(III) + NMG submetida na CPG-8HQ e ampliação de 10x; (c) sobreposição do (Sb(V) + Sb(III) + NMG, em azul) e (Sb(V) + Sb(III) + NMG, em vermelho) após submetida na CPG-8HQ e ampliação de 10x..... 78

Figura 20. Cromatogramas obtidos com a coluna PRP-X100 e a CPG-8HQ. (a) sobreposição de Sb(V) + Sb(III) + NMG (azul) e amostra diluída 400000x (vermelho) e ampliação de 66x; (b) sobreposição do resíduo da coluna obtido da mistura Sb(V) + Sb(III) + NMG após submetida na CPG-8HQ (azul) e amostra diluída 400000x e ampliação de 100x; (c) sobreposição de resíduo da coluna obtido da mistura Sb(V) + Sb(III) + NMG (azul) após submetida na CPG-8HQ e amostra diluída 400000x e ampliação de 100x; (d) sobreposição do resíduo da coluna obtido da amostra + solução referência de Sb(V) + Sb(III) + NMG (azul) e resíduo da coluna obtido da amostra 400000x diluída, submetida na CPG-8HQ e ampliação de 100x..... 79

Figura 21. Cromatogramas obtidos por LC-HG-ICP-MS com a coluna IonPac. (a) amostra diluída 10000x; (b) amostra diluída 10000x + 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(III); (c) amostra diluída 10000x + 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(V); (d) amostra diluída; (e) Sb(V) 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ + Sb(III) 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, sem ácido cítrico; (f) amostra diluída 100000x, sem ácido cítrico e ampliação de 16x; (g) 800 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(V) com ácido cítrico 10% e (h) 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(III) com ácido cítrico 10%..... 81

Figura 22. Cromatogramas obtidos por LC-HG-ICP-MS com coluna IonPac. (a) sobreposição da amostra diluída 10000x (azul) e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(V) + 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(III) (vermelho); (b) idem (a) e ampliação de 2,5x; (c) sobreposição da amostra diluída 10000x (azul) e solução referência de 800 $\mu\text{g L}^{-1}$ Sb(V) (vermelho) e ampliação de 8x; (d) sobreposição de resíduo da coluna obtido da amostra diluída 10000x (azul) após submetida na CPG-8HQ e da amostra diluída 10000x (vermelho); (e) sobreposição da amostra diluída 100000x (azul) e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(V) + 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(III) (vermelho) na ausência de ácido cítrico 10% na HG e ampliação de 10x; (f) sobreposição da amostra diluída 100000x (azul) na ausência de ácido cítrico na HG e amostra diluída 100000x

- (vermelho) na presença de ácido cítrico 10%..... 83
- Figura 23.** Cromatogramas obtidos por LC-HG-ICP-MS com coluna IonPac após submeter as soluções da amostra na CPG-8HQ. (a) resíduo da coluna obtido da amostra diluída 10000x submetida na CPG-8HQ; (b) eluato obtido da amostra diluída 10000x adicionada de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(III) submetida na CPG-8HQ; (c) solução referência de Sb(V) $50 \mu\text{g L}^{-1}$ + Sb(III) $50 \mu\text{g L}^{-1}$ submetida na CPG-8HQ..... 85
- Figura 24.** Cromatogramas obtidos por LC-HG-ICP-MS com a coluna PRP-X100. (a) amostra diluída 4000x; (b) $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(V) + $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(III); (c) amostra diluída 4000x + $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(III); (d) amostra diluída 4000x + $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(V); (e) $800 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(V); (f) amostra; (g) sobreposição da amostra diluída 4000x (azul) e $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(V) + $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(III) (vermelho); (h) cromatograma (g) e ampliação de 4x..... 87
- Figura 25.** Cromatogramas obtidos por LC-ICP-MS com a coluna PRP-X100 nos testes de aquecimento da amostra. (a) amostra diluída 400000x (sem aquecimento); (b) idem (a), mas com aquecimento; (c) sobreposição da amostra (sem aquecimento) + amostra (com aquecimento)..... 89
- Figura 26.** Cromatogramas obtidos por LC-ICP-MS com a coluna PRP-X100 nos testes de aquecimento das soluções. (a) amostra diluída 400000x + Sb(III) $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (com aquecimento); (b) idem (a), mas sem aquecimento; (c) sobreposição da amostra diluída 400000x + Sb(III) $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (com aquecimento) (vermelho) e amostra diluída 400000x (sem aquecimento) (azul); (d) cromatograma (c) e ampliação de 26x; (e) sobreposição da amostra diluída 400000x + Sb(III) $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (com aquecimento) (vermelho) e amostra diluída 400000x + Sb(III) $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (sem aquecimento) (azul); (f)

cromatograma (e) e ampliação de 26x; (g) sobreposição da amostra diluída 400000x (com aquecimento) (azul) e amostra diluída 400000x + Sb(III) 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (com aquecimento) (vermelho); h) cromatograma (g) e ampliação de 26x..... 91

Figura 27. Cromatogramas obtidos por LC-ICP-MS com a coluna PRP-X100 nos testes de aquecimento das soluções. (a) amostra diluída 400000x + Sb(V) 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (com aquecimento); (b) idem (a), mas sem aquecimento); (c) sobreposição da amostra diluída 400000x + Sb(V) 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (com aquecimento) (vermelho) e amostra diluída 400000x (sem aquecimento) (azul); (c₁) cromatograma (c) e ampliação de 26x; (d) sobreposição da amostra diluída 400000x + Sb(V) 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (com aquecimento) (vermelho) e amostra diluída 400000x + Sb(V) 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (sem aquecimento) (azul); (d₁) cromatograma (d) e ampliação de 4x; (e) sobreposição da amostra diluída 400000x (com aquecimento) (azul) e amostra diluída 400000x + Sb(V) 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (com aquecimento) (vermelho); (e₁) cromatograma (e) e ampliação de 2,6x..... 93

Figura 28. Influência da concentração de NaBH₄ na determinação do Sb(III) e Sb(V) por FI-HG AAS. Ácido cítrico: 20% (m/v); carregador da amostra: HCl 1 mol L⁻¹; vazões do ácido cítrico, amostra e NaBH₄: 2,0 mL min⁻¹; vazão do carregador da amostra: 4,5 mL min⁻¹; volume da amostra: 100 μL ; percurso analítico 300 cm; vazão do gás de arraste: 0,4 L min⁻¹..... 96

Figura 29. Influência da concentração de ácido cítrico na geração de hidretos de Sb(III) e Sb(V) por FI-HG AAS. NaBH₄: 0,1% (m/v); carregador da amostra: HCl 1 mol L⁻¹; vazões do ácido cítrico, amostra e NaBH₄: 2,0 mL min⁻¹; vazão do carregador da amostra: 4,5 mL min⁻¹; volume de amostra: 100 μL ; percurso analítico: 300 cm; vazão do gás de arraste: 0,4 L min⁻¹..... 97

- Figura 30.** Influência da concentração de HCl como carregador da amostra na determinação do Sb(III) e Sb(V). Ácido cítrico: 10% (m/v); vazões do ácido cítrico, amostra e NaBH₄: 2,0 mL min⁻¹; vazão do carregador da amostra: 4,5 mL min⁻¹; volume de amostra: 100 µL; percurso analítico: 300 cm; vazão do gás de purga: 0,4 L min⁻¹ 99
- Figura 31.** Influência do comprimento do percurso analítico sobre a intensidade do sinal do Sb(V). NaBH₄: 0,1% (m/v); ácido cítrico: 10% (m/v); carregador da amostra: água (4,5 mL min⁻¹); vazões do ácido cítrico, amostra e NaBH₄: 2,0 mL min⁻¹; volume de amostra: 100 µL; vazão do gás de purga: 0,4 L min⁻¹ 100
- Figura 32.** Influência do volume de amostra sobre a intensidade do sinal do Sb(V) e Sb(III). NaBH₄: 0,1% (m/v); ácido cítrico: 10% (m/v); vazões do ácido cítrico, amostra e NaBH₄: 2,0 mL min⁻¹; vazão do carregador da amostra: 4,5 mL min⁻¹; percurso analítico: 300 cm; vazão do gás de purga: 0,4 L min⁻¹ 101
- Figura 33.** Influência da vazão total do sistema sobre a intensidade do sinal do Sb(V) e Sb(III). NaBH₄: 0,1% (m/v); ácido cítrico: 10% (m/v); volume de amostra: 100 µL; percurso analítico: 300 cm; vazão do gás de purga: 0,4 L min⁻¹ 102
- Figura 34.** Influência da vazão do gás de arraste sobre a intensidade do sinal do Sb(III). NaBH₄: 0,1% (m/v); ácido cítrico: 10% (m/v); vazões do ácido cítrico, amostra e NaBH₄: 2,5 mL min⁻¹; vazão do carregador da amostra: 4,5 mL min⁻¹; volume de amostra: 100 µL; percurso analítico: 300 cm 103

- Figura 35.** Efeito da concentração de Sb(V) sobre a intensidade do sinal. NaBH₄: 0,1% (m/v); ácido cítrico: 10% (m/v); vazões do ácido cítrico, amostra e NaBH₄: 2,5 mL min⁻¹; vazão do carregador da amostra: 4,5 mL min⁻¹; volume de amostra: 100 µL; percurso analítico: 300 cm; vazão do gás de arraste: 0,4 L min⁻¹ 104
- Figura 36.** Perfil dos sinais para Sb obtidos pelo sistema FI-HG AAS proposto. NaBH₄: 0,1% (m/v); ácido cítrico: 10% (m/v); vazões do ácido cítrico, amostra e NaBH₄: 2,0 mL min⁻¹; vazão do carregador da amostra: 4,5 mL min⁻¹; volume de amostra: 100 µL; percurso analítico: 300 cm; vazão do gás de arraste: 0,4 L min⁻¹ 105
- Figura 37.** Fotos da solução de antimoniato de meglumina para determinação de Sb(III) pelo método oficial da Farmacopéia Britânica. (a) 2 mL da amostra + 15 mL de HCl + 30 mL de água + indicador alaranjado de metila, antes da titulação; (b) 2 mL da amostra + 15 mL de HCl + 30 mL de água + indicador alaranjado de metila, após a titulação..... 108
- Figura 38.** Curva de titulação potenciométrica obtida na determinação de Sb(V) em antimoniato de meglumina..... 109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Resumo dos principais trabalhos sobre a determinação de espécies de antimônio em antimoniato de meglumina.....	34
Tabela 2.	Parâmetros operacionais do instrumento de ICP-MS.....	39
Tabela 3.	Parâmetros operacionais para o instrumento de LC, empregando coluna de troca aniônica IonPac.....	66
Tabela 4.	Parâmetros operacionais para o instrumento de LC, empregando coluna de troca aniônica PRP-X100.....	69
Tabela 5.	Condições utilizadas para a separação de Sb(III) empregando a CPG-8HQ.....	73
Tabela 6.	Parâmetros operacionais utilizados para o sistema FI-HG AAS para a determinação seletiva de Sb(III) na presença de Sb(V).....	104
Tabela 7.	Concentrações de Sb total (mg mL^{-1}) obtidas por F AAS e LC-ICP-MS (coluna IonPac e PRP-X100) em antimoniato de meglumina. Os resultados correspondem a média e desvio padrão de 5 replicatas.....	110
Tabela 8.	Concentrações de Sb(V) (mg mL^{-1}) obtidas por LC-ICP-MS (coluna IonPac e PRP-X100) em antimoniato de meglumina. Os resultados correspondem a média e desvio padrão de 5 replicatas.....	110
Tabela 9.	Concentrações de Sb(III) (mg mL^{-1}) inorgânico obtidas por HG AAS, FI-HG AAS, FI-HG-ICP-MS e LC-HG-ICP-MS (coluna PRP-	

X100 e IonPac) em antimoniato de meglumina. Os resultados correspondem a média e desvio padrão de 5 replicatas..... 113

LISTA DE ABREVIATURAS

1. AAS, espectrometria de absorção atômica, do inglês *atomic absorption spectrometry*.
2. AFS, espectrometria de fluorescência atômica, do inglês *atomic fluorescence spectrometry*.
3. ATP, trifosfato de adenosina.
4. BPR, bromopirogalol.
5. CE, eletroforese capilar, do inglês *capillary electrophoresis*.
6. CPG-8HQ, 8-hidroxiquinolina imobilizada em vidro de porosidade controlada, do inglês *8-hydroxyquinoline immobilized on controlled pore glass*.
7. d.i., diâmetro interno.
8. DNA, ácido desoxirribonucléico.
9. EDTA, ácido etilendiaminotetracético sal dissódico.
10. ET AAS, espectrometria de absorção atômica com aquecimento eletrotérmico, do inglês *electrothermal atomic absorption spectrometry*.
11. F AAS, espectrometria de absorção atômica com chama, do inglês *flame atomic absorption spectrometry*.
12. FI, injeção em fluxo, do inglês *flow injection*.
13. FI-HG AAS, injeção em fluxo com geração de hidretos acoplada à espectrometria de absorção atômica, do inglês *flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry*.
14. FI-HG-FTIR, injeção em fluxo com geração de hidretos acoplada a espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier, do inglês *flow injection hydride generation Fourier transform infrared spectrometry*.

15. FI-HG-ICP-MS, injeção em fluxo com geração de hidretos acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês *flow injection hydride generation inductively coupled plasma mass spectrometry*.
16. FI-LLE, injeção em fluxo com extração líquido-líquido, do inglês *flow injection liquid-liquid extraction*.
17. FI-SPE-F AAS, injeção em fluxo com extração em fase sólida acoplada à espectrometria de absorção atômica com chama, do inglês *flow injection solid phase extraction flame atomic absorption spectrometry*.
18. FTIR, espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier, do inglês *Fourier transform infrared spectrometry*.
19. GC, cromatografia a gás, do inglês *gas chromatography*.
20. GSH, glutationa.
21. HG, geração de hidretos, do inglês *hydride generation*.
22. HG AAS, espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos, do inglês *hydride generation atomic absorption spectrometry*.
23. HG-ICP OES, geração de hidretos acoplada à espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês *hydride generation inductively coupled plasma optical emission spectrometry*.
24. HPLC-HG AAS, cromatografia a líquido de alta eficiência com geração de hidretos acoplada à espectrometria de absorção atômica, do inglês *high performance liquid chromatography hydride generation atomic absorption spectrometry*.
25. HPLC-HG-AFS, cromatografia a líquido de alta eficiência com geração de hidretos acoplada à espectrometria de fluorescência atômica, do inglês *high performance liquid chromatography hydride generation atomic fluorescence spectrometry*.
26. HPLC-ICP-MS, cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês *high performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry*.

27. IC, cromatografia de íons, do inglês *ion chromatography*.
28. ICP, plasma indutivamente acoplado, do inglês *inductively coupled plasma*.
29. IC-ICP-MS, cromatografia de íons acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês *ion chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry*.
30. ICP-MS, espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês *inductively coupled plasma mass spectrometry*.
31. ICP OES, espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*.
32. IUPAC, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*.
33. LC, cromatografia a líquido, do inglês *liquid chromatography*.
34. LC-HG-ICP-MS, cromatografia a líquido com geração de hidretos acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês *liquid chromatography hydride generation inductively coupled plasma mass spectrometry*.
35. LC-ICP-MS, cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês *liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry*.
36. LD, limite de detecção, do inglês *detection limit*.
37. LED, diodo emissor de luz, do inglês *light emission diode*.
38. LTA, leishmaniose tegumentar americana.
39. m/m, massa por massa.
40. m/v, massa por volume.
41. m/z, massa/carga.
42. NMG, *N*-metilglucamina.
43. OMS, Organização Mundial da Saúde, do inglês *World Health Organization*.
44. PDCA, ácido piridina 2,6-dicarboxílico.
45. PEEK, polieteretercetona.

46. PSDVB, poliestireno-divinil benzeno.
47. QTA-AAS, espectrometria de absorção atômica com atomização em tubo de quartzo, do inglês *quartz tube atomizer atomic absorption spectrometry*.
48. RMN, ressonância magnética nuclear.
49. RSD, desvio padrão relativo, do inglês *relative standard deviation*.
50. SFC, cromatografia a fluido supercrítico, do inglês *supercritical fluid chromatography*.
51. TMAH, hidróxido de tetrametilamônio.
52. t_R , tempo de retenção.
53. TR, tripanotona redutase.
54. T(SH)₂, tripanotona.
55. T(S-S), tripanotona dissulfeto.
56. US EPA, Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, do inglês *U. S. Environmental Protection Agency*.
57. v/v, volume por volume.
58. 8-HQ, 8-hidroxiquinolina.

RESUMO

Neste trabalho foram avaliados diferentes métodos para a análise de especiação de Sb(III) e Sb(V) em antimoniato de meglumina (NMG). Cromatografia a líquido (LC) combinada, ou não, com a técnica de geração de hidretos (HG) foi investigada para a separação de espécies de Sb. A espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) foi empregada como detector. Um sistema de injeção em fluxo (FI) em conjunto com HG (FI-HG) e acoplado à espectrometria de absorção atômica (AAS) foi também empregado para a determinação seletiva de Sb(III) na presença de Sb(V). Duas colunas de troca aniônica (Dionex, IonPacAS14 e Hamilton, PRP-X100) foram avaliadas para separar as espécies de Sb por LC. Parâmetros relacionados com a fase móvel, tais como tipo (EDTA, ftalato de potássio e EDTA + ftalato de potássio), concentração (0,5 a 10 mmol L⁻¹), pH (3,5 a 7,0), vazão (0,25 a 1,75 mL min⁻¹) e o modo de eluição (isocrático e gradiente) foram estudados. O volume de amostra injetada no cromatógrafo foi fixado em 200 µL. Para a separação cromatográfica, a fase móvel que levou a melhores separações de Sb(III) e Sb(V) foi o EDTA nas concentrações de 0,5 mmol L⁻¹ e 1,0 mmol L⁻¹, para as colunas IonPac e PRP-X100, respectivamente. Os parâmetros relacionados com o sistema FI-HG mais adequados foram também avaliados e escolhidos, tais como o redutor do Sb(III) (NaBH₄ 0,1%, m/v), complexante do Sb(V) (ácido cítrico 10%, m/v), a água como carregador da amostra, o percurso analítico (300 cm), volume de amostra (100 µL), a vazão total das soluções (8,5 mL min⁻¹) e a vazão do gás de arraste (0,4 mL min⁻¹). Para a identificação e/ou quantificação das espécies de Sb presentes no NMG, as amostras foram somente diluídas em água. Com o emprego de LC-ICP-MS foi possível quantificar somente o Sb(V), não sendo detectada a presença da espécie Sb(III). A determinação de Sb(III) foi somente possível mediante as técnicas FI-HG AAS, FI-HG-ICP-MS e LC-HG-ICP-MS (esta mediante combinação das condições ajustadas para LC e FI-HG individualmente). Resultados concordantes para Sb(III) foram obtidos mediante as técnicas FI-HG AAS e FI-HG-ICP-MS. Desta forma, foi possível quantificar Sb(III) e Sb(V) livres, enquanto que possíveis compostos de Sb(III) e/ou Sb(V) ligados ao NMG foram observados mas não puderam ser identificados e quantificados, principalmente por causa da falta de

soluções de referência e dificuldade de separação das possíveis espécies de Sb observadas. A precisão dos métodos de determinação de Sb(III) e Sb(V) (expressa como desvio padrão relativo para 5 medições consecutivas) foi cerca de 9% e 3%, respectivamente. Como não havia materiais de referência certificados para avaliar a exatidão dos métodos desenvolvidos, foram feitos testes de recuperação de Sb(III) e Sb(V), sendo que as mesmas ficaram na faixa de 96 a 101% para o Sb(V) e de 85 a 104% para o Sb(III). Além disso, os resultados obtidos foram comparados com aqueles obtidos por métodos oficiais para a quantificação Sb(III), Sb(V) e Sb total no antimoniato de meglumina.

ABSTRACT

In this study different methods for speciation of Sb(III) and Sb(V) in meglumine antimoniate (NMG) were evaluated. Liquid chromatography (LC) combined or not with hydride generation (HG) was investigated for separation of Sb(III) and Sb(V). Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) was used as detector. A flow injection system together with hydride generation (FI-HG) coupled with atomic absorption spectrometry (AAS) was also employed for the selective determination of Sb(III) in presence of Sb(V). Two anion-exchange columns (Dionex, IonPacAS14 and Hamilton, PRP-X100) were evaluated for Sb(III) and Sb(V) separation by LC. Parameters related to the mobile phase, such as type (EDTA, potassium phthalate, and potassium phthalate + EDTA), concentration (0.5 to 10 mmol L⁻¹), pH (3.5 to 7.0), flow rate (0.25 to 1.75 mL min⁻¹) and elution mode (isocratic and gradient) were studied. The volume of sample injected into the chromatograph was set at 200 µL. For the chromatographic separation, the mobile phase which led to improved separations of Sb(III) and Sb(V) was the EDTA in concentrations of 0.5 mmol L⁻¹ and 1.0 mmol L⁻¹ for the IonPac and PRP-X100 columns, respectively. The most appropriate parameters related to the FI-HG system were also evaluated and set, such as reductant of Sb(III) (NaBH₄ 0.1%, m/v), complexant of Sb(V) (10% m/v citric acid), water as the sample carrier, analytical path (300 cm), volume of sample (100 µL), total flow rate of solutions (8.5 mL min⁻¹) and flow rate of carrier gas (0.4 mL min⁻¹). In order to identify and/or quantify the species of Sb present in the NMG, the samples were diluted in water only. Through the use of LC-ICP-MS it was only possible to quantify the Sb(V), whereas the presence of Sb(III) was not detected. The determination of Sb(III) was only possible through FI-HG AAS, FI-HG-ICP-MS and LC-HG-ICP-MS (by combination of conditions set for LC and FI-HG individually). Similar results for Sb(III) were obtained through the techniques FI-HG AAS and HG-ICP-MS. Thus, it was possible to quantify free Sb(III) and Sb(V), while probable compounds of Sb(III) and/or Sb(V) bound to NMG were observed but could not be identified and quantified, mainly because of lack of reference solutions and difficulty in separating the observed Sb species. The precision of methods for determination of Sb(III) and Sb(V) (expressed as relative standard deviation for 5 consecutive

measurements) was about 9% and 3% respectively. As there were no certified reference materials to evaluate the accuracy of the developed methods, recovery tests of Sb(III) and Sb(V) were made, where they were in the range 96 to 101% for Sb(V) and 85 to 104% for Sb(III). Moreover, the results were compared with those obtained by official methods to quantify Sb(III), Sb(V) and Sb total in meglumine antimoniate.

1. INTRODUÇÃO

Os benefícios causados pelo antimônio, com fins medicinais, são conhecidos desde o século XVI, onde foi observado que os seus compostos possuíam efeito terapêutico.^{1,2} Dentre os compostos de antimônio, destaca-se o antimoniato de meglumina, fármaco de primeira escolha no tratamento da leishmaniose, doença causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), esta enfermidade atinge mais de 88 países com registro anual de cerca de dois milhões de novos casos da doença por ano.³⁻⁶ Para o tratamento da leishmaniose são necessárias doses elevadas do fármaco aplicado em regime contínuo de forma a garantir uma concentração elevada de antimônio nos tecidos e, assim, obter a resposta clínica satisfatória.⁷ Apesar do antimoniato de meglumina ser utilizado no tratamento da leishmaniose por mais de 60 anos, a estrutura e a composição do composto ainda não foram completamente elucidadas, sendo crítico o seu uso experimental e clínico devido à ação e toxicidade diferenciada das diferentes espécies de Sb. Considerando os estados de oxidação do Sb, a espécie Sb(III) exerce uma toxicidade, aproximadamente, dez vezes maior do que a espécie Sb(V) e, geralmente, espécies inorgânicas são mais tóxicas que as orgânicas.⁸ A maior toxicidade do Sb(III) pode estar relacionada com a afinidade pelos grupos químicos existentes nas células, pois o efeito da toxicidade do Sb resulta de ligações estáveis de enzimas contendo grupos sulfidril.⁹ Neste caso, o Sb(III) tem maior afinidade por estes grupos e, conseqüentemente, esta forma química contribui para a maior citotoxicidade.⁶ Ao contrário, o Sb(V) permanece livre no plasma e é excretado mais rapidamente do organismo.¹⁰ Em geral, somente informações limitadas estão disponíveis para avaliação do impacto de Sb na saúde humana. Esta limitação, em parte, deve-se à dificuldade de identificar e quantificar as espécies de Sb presentes no antimoniato de meglumina.⁹ A maioria dos métodos

analíticos reportados na literatura para a avaliação de antimônio baseia-se na determinação de antimônio total¹¹ ou permite, apenas, a determinação de Sb em um dos estados de oxidação [Sb(III) ou Sb(V)], sendo o outro determinado por diferença entre o antimônio total e a espécie previamente determinada.¹²⁻¹⁵ Contudo, o impacto causado pela toxicidade do antimônio não pode ser aceito somente pela determinação da sua concentração total, pois os riscos biológicos dependem, principalmente, da sua forma química.¹¹ Sendo assim, são relevantes os estudos de análise de especiação de Sb, pois pode-se obter o maior conhecimento das espécies do elemento em relação a composição real do antimoniato de meglumina, a sua estabilidade, seu ciclo biológico, suas transformações e as possíveis interações das espécies com o organismo. No entanto, nem sempre é possível conseguir todas as informações de interesse, por isto devem ser escolhidos quais os objetivos mais importantes que se quer obter nos estudos de especiação química. Neste sentido, a maioria dos métodos existentes permite separar e quantificar somente as espécies Sb(III), Sb(V) e alguns organoantimoniais.¹⁶⁻²⁰ Porém, há relativamente pouca informação sobre as espécies de Sb, principalmente os complexos presentes no antimoniato de meglumina.

A maioria dos estudos de especiação baseia-se no uso de duas técnicas acopladas, uma com alta capacidade de separação das espécies de interesse e a outra de detecção com alta sensibilidade. Nos sistemas em linha (*on-line*), é feito o acoplamento direto do sistema de separação ao detector, sendo a maior rapidez no processamento das amostras, menor risco de contaminação e perdas do analito as principais vantagens destes sistemas.²¹ Neste sentido, a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) tem se tornado uma das técnicas de preferência para associação com sistemas de separação cromatográfica, pois tem como características a especificidade, ampla linearidade, baixos limites de detecção e facilidade de acoplamento, quando comparada a outras técnicas de detecção.²²⁻²⁶

Devido às inúmeras questões relacionadas ao processo de oxi-redução do Sb e a probabilidade de haver várias espécies de Sb presentes e não identificadas no antimoniato de meglumina, assim como sua ação terapêutica e tóxica, a especiação de Sb no antimoniato de meglumina é de suma importância.²⁷ Entretanto, a maior dificuldade está na separação, quantificação e identificação das espécies de Sb presentes no fármaco.

Dessa forma, neste trabalho foram estudados vários métodos e técnicas para a especiação de antimônio em antimoniato de meglumina. Os métodos propostos envolvem a separação e quantificação de Sb(III) através das técnicas de cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (LC-ICP-MS), cromatografia a líquido com geração de hidretos acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (LC-HG-ICP-MS), injeção em fluxo (FI) com geração de hidretos (HG) acoplada à espectrometria de absorção atômica (AAS) e injeção em fluxo com geração de hidretos acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (FI-HG-ICP-MS). A separação de espécies de Sb baseada na complexação seletiva do Sb com a 8-hidroxiquinolina imobilizada em vidro de porosidade controlada (CPG-8HQ) também foi avaliada. O Sb total foi determinado pelo método oficial por geração de hidretos acoplada à espectrometria de absorção atômica (HG AAS),²⁸ bem como os resultados obtidos pelas metodologias propostas foram comparados com aqueles obtidos por métodos oficiais.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A revisão da literatura está dividida em três partes principais. Na primeira parte, são abordados os aspectos gerais sobre as características do Sb, assim como seus aspectos toxicológicos, sendo este último relacionado com os antimoniais para fins medicinais. Na segunda parte é abordada a doença leishmaniose com o fármaco antimoniato de meglumina no tratamento da mesma e os aspectos sobre os prováveis mecanismos de ação, toxicidade e estrutura molecular do fármaco. Na terceira parte, são apresentados os assuntos relacionados com a análise de especiação de Sb, abordando os métodos cromatográficos e não-cromatográficos de separação, assim como as técnicas de detecção para especiação de Sb. Maior ênfase é dada aos métodos de separação não-cromatográficos e cromatográficos relacionados com a amostra utilizada neste trabalho.

2.1. ANTIMÔNIO (Sb)

O Sb é um metalóide pertencente ao grupo 15 da classificação periódica dos elementos, número atômico 51, massa atômica 121,76 u, configuração eletrônica [Kr] 4d¹⁰ 5s² 5p³, podendo existir nos estados de oxidação (-III, 0, III e V). Porém, nos sistemas biológicos e ambientais é usualmente encontrado somente na forma de Sb(V) ou Sb(III).^{20,29-31}

2.1.1. Efeito toxicológico do Sb

O efeito toxicológico e biológico que um elemento exerce no ser humano depende da sua forma química (espécie) e da concentração. O Sb, em particular, é considerado um elemento não essencial ao ser humano, sendo considerado tóxico em determinadas concentrações, bem como, em função da sua forma química.^{32,33}

Considerando os estados de oxidação do Sb, a espécie Sb(III) exerce uma toxicidade aproximadamente dez vezes maior que a espécie Sb(V) e, geralmente, espécies inorgânicas são mais tóxicas do que as orgânicas.⁸ A maior toxicidade do Sb(III) pode estar relacionada com a afinidade pelos grupos químicos existentes nas células⁹, pois o efeito de toxicidade do Sb resulta da ligação irreversível de enzimas contendo grupos sulfidrilas, sendo que o Sb(III) apresenta maior afinidade por estes grupos. Ao contrário, o Sb(V) permanece livre no plasma e é excretado mais rapidamente.¹⁰

O Sb é considerado um agente clastogênico (provoca a perda de fragmentos de cromossomos), mas não é mutagênico (não altera o DNA celular) no seu estado trivalente. Ainda não foi comprovada a carcinogenicidade do antimônio em humanos, embora o Sb₂O₃ seja classificado, pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC), como possível carcinógeno humano.³⁴ Por outro lado, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA) e a Comunidade de Pesquisa Alemã listaram o Sb como um poluente de prioridade, mas não foi classificado como carcinogênico.^{35,36}

Leonard e Gerber³⁷ relataram que a mutagenicidade, carcinogenicidade e teratogenicidade de compostos de antimônio são baseadas em evidências insuficientes e, particularmente, não são relevantes.

Entretanto, os benefícios causados pelo antimônio, com fins medicinais, são conhecidos desde séc. XVI, pois compostos de antimônio apresentavam ampla aplicação para fins cosméticos e terapêuticos. No entanto, no século seguinte, foi verificado que os compostos de Sb possuem efeitos tóxicos e foram excluídos da área médica. No Brasil, somente a partir da década de 1940, os compostos de antimônio pentavalente foram empregados com eficiência comprovada como fármaco para o tratamento da leishmaniose.³⁸

2.2. LEISHMANIOSE

A leishmaniose é uma doença infecciosa, não-contagiosa, causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*.⁴ A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) tem ampla distribuição mundial e constitui um problema de saúde pública em 88 países, distribuídos nas Américas, Europa, África e Ásia, com registro anual de 2 milhões de novos casos da doença, sendo de 1 a 1,5 milhões de casos de leishmaniose cutânea e 500 mil de leishmaniose visceral. É estimado que 350 milhões de pessoas do mundo vivam em áreas de risco de infecção, sendo considerada pela OMS como a segunda doença parasitária em importância, depois da malária.

No Brasil, a LTA é uma doença com diversidade de agentes, hospedeiros parasitados e vetores, apresentando diferentes padrões de transmissão e um conhecimento ainda limitado sobre alguns aspectos, tornando difícil o controle e englobando um espectro de diversidades clínicas e epidemiológicas. Além disso, apresenta uma ampla distribuição com registro de casos em todas as regiões brasileiras. As regiões Norte e Nordeste tem o maior número de casos, sendo encontrados numa vasta área da Amazônia à Bahia.³

A principal forma de transmissão da doença é pela picada do inseto flebotomíneo fêmea (vetor), protozoário do gênero *Phlebotomus*. A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas, ao sugarem o sangue de mamíferos infectados, ingerem macrófagos parasitados na forma amastigotas da *Leishmania*. No trato digestivo do hospedeiro flebotomíneo ocorre o rompimento dos macrófagos liberando as formas amastigotas. Reproduzem-se por divisão binária e diferenciam-se rapidamente em formas flageladas denominadas de promastigotas, que também se reproduzem por

processos sucessivos de divisão binária. As formas promastigotas transformam-se em paramastigotas as quais colonizam o esôfago e a faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo, quando se diferenciam em formas infectantes-promastigotas metacíclicas. O ciclo do vetor se completa em torno de 72 h. Após este período, as fêmeas infectantes ao realizarem um novo repasto sangüíneo em um hospedeiro vertebrado liberam as formas promastigotas metacíclicas juntamente com a saliva do inseto. Na epiderme do hospedeiro, estas formas são fagocitadas por células dos sistemas mononucleares fagocitários. No interior dos macrófagos, no vacúolo parasitóforo, diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se intensamente até o rompimento dos mesmos, ocorrendo à liberação destas formas que serão fagocitadas por novos macrófagos num processo contínuo, ocorrendo então a disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea. Enquanto a forma promastigota é flagelada e extracelular, a forma amastigota é intracelular e sem movimento. No homem, a doença acomete pele e mucosas apresentando quatro formas clínicas principais: cutânea, mucocutânea, difusa e visceral.³⁵

Outras formas de transmissão também são descritas, tal como transmissão congênita, transfusional sangüínea e por seringa contaminada entre usuários de substâncias entorpecentes de uso intravenoso, caracterizando o ciclo antroponótico (pessoa infectada transmite a doença a outra pessoa).⁴⁰

As formas mais comuns de leishmania tegumentar no Brasil são as causadas por *L. amazonensis*, *L. brasiliensis* e a *L. guyanensis*. Todas estas espécies podem produzir a lesão na pele (forma cutânea) e pode curar espontaneamente, após alguns meses ou semanas, mas pode deixar marcas permanentes. A forma mucocutânea, inicia com úlceras simples de pele, mas pode evoluir para metástases na região oronasal, causando destruição tecidual, em alguns casos extremamente mutilantes. A forma difusa produz lesões crônicas e disseminadas, as quais se assemelham às da lepra e são mais difíceis de curar. A forma visceral ocasiona hipertrofia no fígado e baço e, se não tratada pode desenvolver infecções secundárias, freqüentemente provocando a morte.⁴¹

2.3. FÁRMACOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE

O uso de compostos de antimônio para diversos fins terapêuticos⁴² é conhecido desde a antiguidade, mas somente em 1912, Gaspar de Oliveira Vianna, pesquisador pioneiro em doença de Chagas e leishmaniose, relatou a eficácia do tartarato de potássio e antimônio (complexo Sb(III)-tártaro emético) no tratamento da leishmaniose.⁴¹ No entanto, o uso clínico deste composto foi interrompido por causa de seus efeitos colaterais e da descoberta de novos fármacos menos tóxicos, fazendo com que os antimoniais trivalentes fossem substituídos por compostos pentavalentes de Sb.⁴³ A partir da década de 1940, complexos de antimônio pentavalente começaram a ser utilizados na terapêutica da leishmaniose, sendo o estibogluconato de sódio (comercializado como Pentostan[®], é utilizado nos Estados Unidos e outros países) e o antimoniato de meglumina (comercializado como Glucantime[®], é utilizado no Brasil, França e outros países), os principais antimoniais atualmente utilizados.⁴⁴

2.3.1. Antimoniato de meglumina

No Brasil o antimoniato de meglumina é o medicamento de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose. Este fármaco requer administração cautelosa, sob acompanhamento clínico e laboratorial, por ser cardiotoxico, hepatotóxico e nefrotóxico. O composto é obtido sinteticamente através de mistura e reação, a partir do KSb(OH)_6 ou do SbCl_5 e da *N*-metilglucamina, em água deionizada, pH neutro e temperatura de 60 °C.⁴⁵ Após esta etapa, o antimoniato de meglumina formado precipita na presença de acetona. O composto, de fórmula estrutural ainda não completamente identificada, é solúvel em água e praticamente insolúvel em etanol, éter etílico e clorofórmio.²⁸ O antimoniato de meglumina é especialmente eficaz no tratamento de leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral, provocando regressão rápida das manifestações clínicas e hematológicas da doença, bem como provoca a destruição do parasita.⁴⁶ A OMS preconiza que as doses de antimoniais não devem ultrapassar 20 mg/kg/dia, não ultrapassando o limite de 850 mg de antimônio, devido à sua elevada toxicidade.³

A forma de apresentação do antimoníato de meglumina é em solução injetável com ampolas de 5 mL de solução aquosa a 300 mg mL^{-1} , contendo 405 mg de Sb(V), correspondendo a 81 mg mL^{-1} de Sb(V). A administração é feita por via parenteral, intravenosa ou intramuscular.⁴⁷

Após a administração, o antimoníato de meglumina é rapidamente absorvido e, praticamente, 80% do antimônio é excretado nas primeiras 24 h pela urina na forma inalterada.⁴⁷ Em conseqüência, faz-se necessária a administração de doses elevadas do fármaco, em regime contínuo, para garantir um elevado teor de antimônio nos tecidos e, assim, obter a eficácia do tratamento. Reações adversas como dores musculares, nefrites, distúrbios gastrintestinais, cardiovasculares e respiratórios têm sido observados.⁷

Antimoniais pentavalentes são, geralmente, 10 vezes menos tóxicos quando comparados aos antimoniais trivalentes, utilizados primeiramente por Gaspar Vianna em 1912. Em determinados casos, além de destruir o parasita, o medicamento acaba por levar o paciente a óbito.^{48,49} Apesar do emprego do antimoníato de meglumina no tratamento da leishmaniose por mais de 60 anos, a estrutura e a composição do composto ainda permanecem indeterminados.^{7,50} O mecanismo de ação ainda é desconhecido porque é limitada a informação sobre o metabolismo intracelular do antimônio e os genes que regulam este processo.^{31,51-54} O que se sabe é que o seu uso experimental e clínico é bastante crítico. Na Figura 1 é mostrada as rotas de ação do antimônio na célula da leishmania.⁵

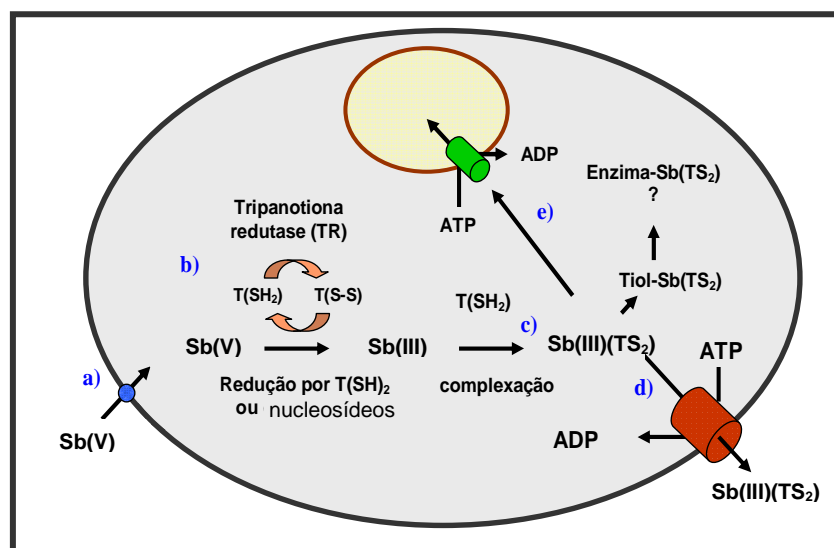


Figura 1. Proposta de mecanismo de ação do antimônio na forma amastigota da Leishmania. Ver significado das indicações de a) até d) no texto.⁵⁵

Conforme mostrado na Figura 1, o Sb(V) é transportado para o interior da célula, mediante ligação com o ferro presente nas proteínas lactoferrina, sendo que somente o Sb(V) tem afinidade com esta proteína. O mecanismo proposto para o metabolismo do Sb na célula pode ser resumido como: a) o antimônio atravessa a membrana da célula mediante auxílio da lactoferrina; b) ocorre a redução intracelular do Sb(V) para Sb(III) pela interação com a tripanotona $[T(SH)_2]$ ou também pela interação do Sb(V) com nucleosídeos (bases do DNA) representados pela tripanotona dissulfeto $[T(S-S)]$, reduzindo o Sb(V) para Sb(III) através da enzima tripanotona redutase (TR) em pH 5,0; c) ocorre a complexação do Sb(III) pela $[T(SH)_2]$ para formar $Tiol-Sb(TS_2)$ e atingir as proteínas pela substituição do grupo tiol por enzimas; d) o complexo $Sb(III)(TS_2)$ pode ser bombeado para fora da célula ao se ligar ao trifosfato de adenosina (ATP), evidenciando a resistência do parasita aos antimoniais pentavalente; ou e) atingir o núcleo da célula Leishmania, destruindo a mesma.⁵⁵

Estudos relatam que o Sb(V) possa ser uma pró-droga, sendo convertido por grupos tíóis presentes na biomolécula glutationa (GSH) à Sb(III) após sua administração, como mostrado na Figura 2 (modelo 1). Este pode interferir no processo de β -oxidação de ácidos graxos e glicólise do parasita, levando a uma depleção dos níveis de ATP intracelular.⁴⁸

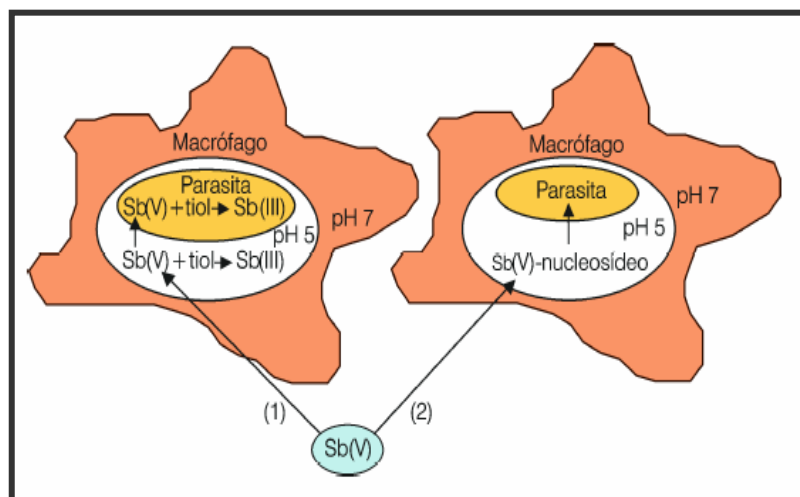


Figura 2. Dois modelos propostos para o mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes. O modelo (1) envolve a redução de Sb(V) à Sb(III) pelos tíóis; o modelo (2) envolve a formação de complexo Sb(V)-ribonucleosídeo.⁵⁸

Por outro lado, foi demonstrado que a GSH promove a redução do Sb(V) para Sb(III) *in vivo*, mas a redução somente acontece em pH ácido, diferente do pH do citosol onde a glutatona é encontrada. Assim, a redução do Sb(V) é lenta comparada com a habilidade de complexação do antimoniato de meglumina com a GSH, protegendo o Sb(V) da redução.^{56,57}

Há indícios de que o Sb(III) possui maior atividade do que o Sb(V) contra as formas promastigotas e amastigotas de pelo menos três espécies de *Leishmania*. Essas características reforçam a hipótese de uma conversão metabólica intramacrofágica do Sb(V) para Sb(III), sendo neste caso, o Sb(III) a espécie tóxica às leishmanias no estado intracelular.^{46,51} Além disso, há a hipótese de que o Sb(V) não é tóxico para a *Leishmania*, mas é reduzido enzimaticamente, provavelmente pelo macrófago, para Sb(III).^{49,59} Por outro lado, há relatos de que o Sb(V) é diretamente tóxico para amastigotas, portanto não havendo a necessidade da redução do Sb(V) por macrófagos, já que também foi demonstrado que o Sb(V) forma complexos com nucleosídeos (Figura 2, modelo 2) e que essa interação poderia ter implicações no mecanismo de ação dos antimoniais. Entretanto, estes dados, implicam a possível redução intracelular do Sb(V) para Sb(III) e assim o Sb(III) é diretamente tóxico para amastigotas, ou que ambos os estados de oxidação de antimônio são ativos contra amastigotas da *Leishmania*.⁵¹

Miekeley *et al.*⁶⁰ verificaram que, após administração intramuscular de antimoniato de meglumina em pacientes com leishmaniose, ocorre a biorredução metabólica *in vivo* do Sb(V) para Sb(III), corroborando outros estudos que evidenciam o mesmo, ou seja, a provável toxicidade e atividade terapêutica do fármaco causado pelo Sb(III).

Vários autores apresentaram estudos sobre a tentativa de caracterização do antimoniato de meglumina.^{60,61} Roberts *et al.*⁴⁹ reportaram a razão molar média de Sb:NMG, como sendo de 1:1,37 e que vários complexos entre o Sb e NMG coexistem em solução. Demicheli *et al.*⁶² sintetizaram o antimoniato de meglumina e sugeriram, através de estudos empregando ressonância magnética nuclear (H-RMN) de próton, que há duas formas distintas para Sb-NMG. E estas duas moléculas de Sb-NMG são coordenadas com um átomo de Sb de carga positiva. Na Figura 3 é mostrada uma das possíveis estruturas do antimoniato de meglumina.⁶²

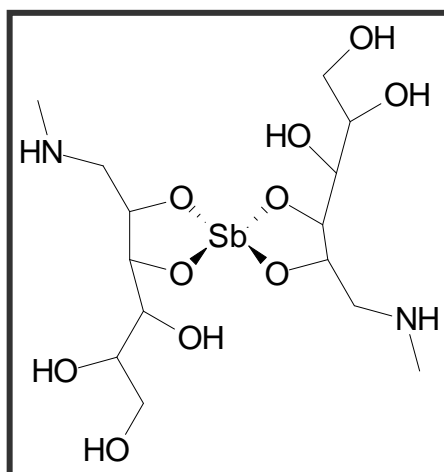


Figura 3. Proposta de estrutura para o antimoniato de meglumina obtida por H-RMN.⁶²

Embora este modelo de estrutura seja atualmente aceito, ainda existem vários dados contraditórios na literatura, pois a predominância de espécies 1:2 Sb:NMG não é condizente com a razão molar na faixa de 1,4:1 Sb:NMG encontrada no antimoniato de meglumina. Além disso, através da medida da osmolaridade de solução altamente concentrada de antimoniato de meglumina (85 g L^{-1}) pode ser concluído que há uma razão molar média de aproximadamente 1,4 a 2,0 átomos de Sb por partícula. Além disso, a estrutura proposta de espécies catiônicas com uma massa molar de 507 Da, não está de acordo com os resultados obtidos com titulação potenciométrica na síntese do antimoniato de meglumina, o qual indica a existência de dois prótons dissociados, um atribuído ao grupo amino ($\text{pK}_a = 10,3$) e o outro ao antimoniato ($\text{pK}_a = 2,1$).^{62,63}

A predominância de complexos de antimônio com o grupo antimoniato de meglumina de carga negativa (desprotonado) e o grupo amino de carga positiva (protonado) foram propostos a partir de medições de condutividade, indicando o comportamento do antimoniato de meglumina como um eletrólito fraco. Os complexos de antimoniato de meglumina, quando predomina a razão molar de 1:1 Sb:NMG são *zwitterion* (composto neutro apresentando grupos funcionais de cargas opostas), principalmente em pH fisiológico (na faixa de 5,5 a 7,5).⁴⁸

Estudos relatam que o antimoniato de meglumina consiste de uma mistura de compostos com diversas fórmulas $(\text{Sb-NMG})_n\text{-NMG}$ (compostos maiores; peso molecular = 507, 820, 1132 e 1144) e $(\text{Sb-NMG})_n$ (compostos menores; peso molecular = 314 e 627).⁴⁸ Em outro estudo⁶² foi utilizada a espectrometria de massa com ionização por *electrospray* (ESI-MS) e foi identificado o íon com carga negativa

de Sb:NMG, apresentando quatro espécies de complexos de Sb:NMG, como 1:1 (m/z 364) 1:2 (m/z 541), 2:2 (m/z 765), 3:2 (m/z 881). Além disso, de acordo com a estrutura proposta por estes autores (Figura 3), o composto com razão média de 1:2 Sb:NMG consiste de um grupo antimoniato de carga negativa (desprotonado) e de dois grupos amino de carga positiva (protonados). O complexo identificado na razão média de 1:1 (Sb:NMG) são espécies de m/z 314, as quais consistem de um grupo amino de carga positiva (protonado) e um grupo antimoniato de carga negativa (desprotonado). Contudo, o peso molecular das espécies de m/z 314 estão de acordo com o complexo de Sb(III), mas não com o complexo de Sb(V). A presença de Sb(III) residual no antimoniato de meglumina foi determinada em níveis inferiores a 0,1% (m/m), sendo considerado como fragmento devido as condições utilizadas na determinação destas espécies, como a aplicação de alta diferença de potencial, resultando na alta intensidade para esta espécie. Com estes dados, os autores reportaram a existência de razão molar média de 1:1 Sb:NMG com o íon Sb de carga negativa e a mesma proporção de razão molar média Sb:NMG, porém com o íon Sb de carga positiva. Além disso, os valores de pK_a estavam de acordo com o que foi reportado por Robert *et al.*⁴⁸, ou seja, a presença de um grupo amino e um grupo antimoniato, predominando a forma *zwitterion* em pH fisiológico. Dessa forma, esses dados indicam a importância de uma reavaliação das estruturas e composição deste fármaco, pois o conhecimento das diferentes características poderá contribuir para uma melhor compreensão da ação farmacológica e toxicidade.

2.4. ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO

A análise de especiação tem como objetivo principal a obtenção de maior conhecimento de um elemento em relação a sua composição, sua massa, sua estabilidade, seu ciclo biológico e ambiental, suas transformações e as possíveis interações das espécies com os seres vivos. No entanto, nem sempre é possível conseguir todas as informações de interesse, por isto devem ser escolhidas quais as mais importantes conclusões que se quer obter nos estudos de especiação química.⁶⁴⁻⁶⁷

A *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC)⁶⁸ preconiza o uso correto de terminologias comum em química, para facilitar a comunicação entre

cientistas de diferentes áreas e evitar interpretação errônea. Segundo a IUPAC o termo “espeiação” é definido como sendo a distribuição de diferentes espécies químicas de um elemento em uma amostra, enquanto que o termo “análise de espeiação” é definido como um processo que conduz à identificação e determinação de diferentes formas químicas e físicas de um elemento existente em uma amostra.⁶⁹ Quando se refere às transformações que ocorrem com elementos químicos durante um ciclo, a IUPAC recomenda o uso do termo “transformação de espécies”. O termo “espécie química” refere-se a uma forma específica de um elemento, definido como um estado de oxidação ou estrutura nuclear, complexo ou molecular.⁶⁸

Dessa forma, a análise de espeiação possui aplicações em diversas áreas, tais como:^{31,69, 70}

- ✓ estudos de ciclos biogeoquímicos dos elementos;
- ✓ avaliação da toxicidade e ecotoxicidade relativa de elementos específicos;
- ✓ controle de qualidade de produtos alimentícios;
- ✓ controle de medicamentos e produtos farmacêuticos;
- ✓ controle de processos tecnológicos;
- ✓ estudo de exposição ocupacional;
- ✓ análises clínicas.

Deve-se salientar que em análise de espeiação, o equilíbrio químico estabelecido entre as formas existentes na amostra de um elemento de interesse tem que se manter inalterado desde a coleta até a análise propriamente dita. Dessa forma, para se obter sucesso em estudos de espeiação, a metodologia empregada precisa garantir a preservação da integridade das espécies de interesse na amostra durante todos os passos analíticos, ou seja, durante a amostragem, armazenagem, pré-tratamento e determinação das espécies.^{24,71}

Na maioria dos estudos de espeiação são utilizadas duas técnicas acopladas, uma com alta capacidade de separação das espécies de interesse e a outra de detecção com alta sensibilidade e seletividade. Nos sistemas em linha é feito o acoplamento direto dos sistemas de separação ao detector. Geralmente, entre as principais vantagens destes sistemas em linha, pode ser citada a maior rapidez no processamento das amostras e menor risco de contaminação e perdas do analito.²¹ Neste sentido, a ICP-MS tem se tornado a técnica de preferência para

associação com sistemas de separação cromatográfica, pois tem como características a especificidade, linearidade, baixos limites de detecção e a facilidade de acoplamento, quando comparada a outras técnicas de detecção.²²⁻²⁶

2.4.1. Análise de especiação de Sb

A análise de especiação de Sb tem se tornado indispensável em estudos biogeoquímicos, industriais, nutricionais e farmacêuticos para avaliação dos efeitos benéficos e tóxicos dos elementos. Diversas metodologias analíticas têm sido desenvolvidas com técnicas hífenadas que envolvem o acoplamento de separações seletivas com detectores elementares e sensíveis.¹⁶⁻²⁰ Entretanto, a especiação do antimônio em outras matrizes é fundamental, visto que a toxicidade e o comportamento biológico são dependentes do estado de oxidação.⁵

A maioria dos métodos reportados na literatura permite apenas a determinação de Sb em um dos estados de oxidação, sendo o outro determinado indiretamente, por diferença entre o antimônio total e a espécie previamente determinada. Entretanto, a maioria das técnicas hífenadas permite, simultaneamente, separar e quantificar as espécies Sb(III), Sb(V) e organoantimoniais diminuindo, assim, a possibilidade de ocorrer erros, que podem acontecer na determinação por diferença. O uso de técnicas hífenadas representa uma tendência atual no desenvolvimento de metodologias analíticas, entre as quais se destacam a cromatografia a líquido de alta eficiência com geração de hidretos acoplada à espectrometria de fluorescência atômica (HPLC-HG-AFS), cromatografia a líquido de alta eficiência com geração de hidretos acoplada à espectrometria de absorção atômica (HPLC-HG-AAS) e cromatografia a líquido de alta eficiência com espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (HPLC-ICP-MS).^{9,14,15}

Embora existam mais de 3000 compostos orgânicos de Sb relatados na literatura, somente duas formas inorgânicas [Sb(III) e Sb(V)], e duas espécies orgânicas (ácido metilestibônico e ácido dimetilestibônico) têm sido detectado em águas naturais.¹⁰

Também, pouco se conhece sobre a estabilidade dos compostos de antimônio em soluções.²⁰ Ainda não há consenso a respeito da forma química dos compostos orgânicos de antimônio em água. Além disso, há limitações referentes

aos dados de especificação existentes na literatura, principalmente devido à inexistência de materiais de referência certificados, necessários para a validação de novos métodos analíticos.¹⁶

Devido às inúmeras questões relacionadas ao processo de oxidação e à probabilidade de haver várias espécies presentes e não identificadas no antimoniato de meglumina, assim como sua ação terapêutica e tóxica, são necessárias investigações mais detalhadas. Neste contexto, a especificação de Sb neste fármaco é de suma importância, principalmente no sentido de elucidar as formas de Sb que estão sendo administradas no paciente. Conseqüentemente, estudos mais precisos deverão ser feitos empregando espécies específicas de Sb para avaliar o seu efeito no tratamento da Leishmaniose. As espécies presentes no antimoniato de meglumina podem ser procedentes da matéria-prima, da síntese, de possível degradação durante a armazenagem, transporte e manuseio inadequado do produto.²⁷

Metodologias analíticas reportadas na literatura para a determinação de antimônio em fármacos recomendam, principalmente, métodos volumétricos e/ou potenciométricos. Os métodos volumétricos são baseados na redução do Sb(V) para Sb(III), geralmente iodeto em meio ácido, sendo o Sb(III) determinado por iodometria. Essa metodologia não é a mais adequada, visto que permite apenas a determinação de Sb(III) e depois total. Além disso, está sujeita a erros decorrentes da eliminação incompleta do iodo formado anteriormente à determinação do Sb(III).⁵

Entretanto, nos últimos anos, a geração de hidretos tem sido empregada para a geração seletiva de espécies de antimônio em amostras de águas naturais, tecidos de fígado, sangue e fármacos injetáveis.⁷²⁻⁷⁷ A espécie volátil de Sb gerado pode ser quantificada por uma técnica adequada, como a AAS, ICP-MS e entre outras.

Outra alternativa para a determinação de espécies de Sb em diferentes matrizes envolvem separações cromatográficas, geralmente com detecção por ICP-MS.⁷⁸

Entretanto, a separação simultânea de espécies inorgânicas e orgânicas, ainda é um grande desafio. O principal problema está relacionado com a dificuldade de encontrar um método cromatográfico simples que possa separar eficientemente as espécies de Sb, pois geralmente há variações na estrutura química, carga e, conseqüentemente, alterações nos tempos de retenção das espécies.⁷⁹

2.5. MÉTODOS NÃO CROMATOGRÁFICOS PARA ESPECIAÇÃO

O emprego de métodos não cromatográficos para especiação se restringe basicamente, na diferenciação de diferentes estados de oxidação. Entre as técnicas não cromatográficas mais utilizadas na espectrometria atômica, destaca-se a geração de hidretos.¹⁶

2.5.1. Geração de hidretos

A técnica de geração de hidretos é um processo de derivatização química que produz hidretos de um determinado elemento pelo tratamento da amostra com um agente redutor, em meio ácido. Caso o hidreto formado seja volátil, este pode ser conduzido do frasco de reação até uma técnica capaz de detectar o elemento ou a espécie do elemento.^{80,81}

Entre as principais características da geração de hidretos pode-se citar:^{10,80,81}

- ✓ separação do analito da matriz da amostra,
- ✓ relativamente livre de interferências, em virtude da separação do analito da amostra,
- ✓ possibilidade de pré-concentração pelo uso de trapeamento do analito em microcolunas ou outros procedimentos,
- ✓ permite a determinação seletiva de espécies de um elemento pelo controle de pH,
- ✓ elevada eficiência de introdução da amostra, podendo chegar a 100%, conseqüentemente, podem ser alcançados limites de detecção (LD) de cerca de 100 vezes melhores aos obtidos em técnicas que empregam a nebulização pneumática.

A espectrometria de absorção atômica com atomização em tubo de quartzo (QT-AAS), espectrometria de absorção atômica com vaporização eletrotérmica (ET AAS), espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), espectrometria de fluorescência atômica (AFS) e ICP-MS são as técnicas mais empregadas como detectores na HG.⁸²⁻⁸⁴ A grande maioria das metodologias citadas na literatura utiliza a HG acoplada à espectrometria de absorção atômica, sendo uma das técnicas analíticas mais utilizadas para a

determinação de Sb total.^{10,78} Atualmente, devido ao desenvolvimento de métodos analíticos e o surgimento de diversas técnicas instrumentais, vários sistemas de atomização vêm sendo amplamente utilizados.^{72,74}

De um modo geral, na temperatura ambiente os hidretos encontram-se na forma gasosa, após a etapa de geração estes são conduzidos por um fluxo de gás até o atomizador que, normalmente, é uma cela de quartzo aquecida, sendo decompostos no atomizador para a formação do vapor atômico e a obtenção do sinal analítico. Esta técnica tem sido utilizada para a determinação de elementos como As, Bi, Ge, Pb, Se, Sn, Sb e Te.⁸⁰

A HG também pode ser usada para a geração seletiva de espécies de antimônio, através de ajuste de pH da solução amostra, gerando estibina (SbH_3) a partir de Sb(III) e Sb(V).^{10,85-89} Em meios com acidez alta ($\text{pH} \leq 2,0$), converte-se tanto a espécie Sb(III) como a Sb(V) em SbH_3 . Por outro lado, o Sb(III) é seletivamente reduzido a SbH_3 na presença de Sb(V) em meio ácido cítrico a $\text{pH} \geq 2$ ou em meio de ácido tartárico a $\text{pH} \geq 4$ ou ainda em tampão de borato em pH entre 7 e 8.^{88,90}

Devido a cinética de formação da estibina geralmente é necessário o uso de um agente pré-redutor para converter todo Sb(V) para Sb(III) antes de determinação por HG. Com agente redutor, o tetraidroborato de sódio (NaBH_4) é o mais utilizado, devido a sua cinética de reação favorável, boa reprodutibilidade das determinações e a eficiência de geração de hidretos é de, aproximadamente, 90% em uma ampla faixa de pH, tanto para sistemas em fluxo quanto para sistemas em batelada, independente do sistema de detecção empregado.^{10,80} Também, pode-se utilizar ácido cítrico devido a sua propriedade complexante seletiva para Sb(V), como meio para estudos de especiação na determinação de Sb(III) e Sb(V) por HG AAS.^{10,91}

Cabe ressaltar que além de diferentes estados de oxidação, os elementos formadores de hidretos podem existir ligados a diferentes radicais orgânicos, seja em amostras ambientais ou biológicas. Como estas diferentes formas podem apresentar distintas cinéticas de redução e mesmo formação de hidretos, faz-se necessário liberar o analito completamente destes radicais para a determinação do seu conteúdo total.⁹²

Espécies orgânicas de antimônio também podem ser convertidas em espécies gasosas por reação de geração de hidretos. Entretanto, há evidências experimentais de que a espécie $(\text{CH}_3)_3\text{Sb}$ permite reações de perda de metila

(desmetilação) durante o processo de geração de hidretos, formando, assim os hidretos SbH_3 , CH_3SbH_2 , $(\text{CH}_3)_2\text{SbH}$.^{12, 93}

Para se obter uma eficiência adequada na geração de hidreto de antimônio, não depende somente das condições experimentais mas, também, do sistema de geração empregado. Isso pode ser mostrado pelas diferenças na seletividade reportados na literatura, mesmo quando as mesmas condições de reação são empregadas.¹⁰ Apesar das vantagens conhecidas da HG, essa é afetada por diferentes tipos de interferências na etapa da reação de geração de vapor. Para solucionar este problema, as condições físicas e químicas para geração de hidretos devem ser criteriosamente avaliadas.¹⁶ Além disso, muitos dos procedimentos são baseados na determinação do antimônio total e Sb(III) , enquanto que o Sb(V) é calculado pela diferença entre o Sb total e Sb(III) , sendo que este procedimento pode ser uma fonte de erro.^{9,10}

Para melhorar a sensibilidade do sistema, o acoplamento HG e ICP-MS, possibilita a introdução direta de espécies voláteis no plasma, apresentando uma alta eficiência no transporte do analito e minimiza a perda do analito e interferências.^{94,95}

No sistema de injeção em fluxo (FI), a amostra é injetada em um fluxo contínuo de uma solução denominado carregador. Uma ou mais soluções contendo reagentes podem confluir continuamente ou de forma intermitente com o carregador. A zona de amostra injetada sofre dispersão, sendo misturada com as soluções carregadora e reagentes. Geralmente, as soluções são transportadas por tubulações de pequeno diâmetro (d.i. < 1 mm) com o auxílio de bomba peristáltica que atua como propulsora das soluções. A dispersão ou a diluição da zona da amostra pode ser controlada ou adaptada às análises requeridas pela otimização de vários fatores, tais como volume de amostra injetado, as vazões do carregador e dos reagentes e o comprimento da bobina de reação.⁹⁶ Estes sistemas são amplamente usados para gerar hidretos voláteis, os quais podem ser separados da solução utilizando um separador G/L.⁹⁷ Estes sistemas possuem como características a facilidade de misturar reagentes e amostra em ambiente fechado (dentro das tubulações), minimizar problemas com perdas do analito e contaminação, serem menos tolerantes a interferências se comparado à HG em batelada, tornando a técnica mais seletiva. Isto pode levar a obtenção de menores limites de detecção do que os obtidos em batelada.¹⁰

Quando o sistema FI-HG é acoplado ao instrumento de AAS pode apresentar algumas vantagens, tais como maior eficiência de geração do hidreto, redução do efeito dos interferentes (uma vez que o tempo de contato entre amostra e reagente é relativamente pequeno e, assim, por exemplo, os elementos formadores de hidretos são convertidos às suas espécies voláteis antes que os metais de transição possam reagir com o agente redutor). Além disso, também, apresenta a simplicidade de operação, elevada frequência de análise, menor risco de contaminação e menor consumo de reagentes e amostras.⁹⁸⁻¹⁰¹

Como na espectrometria de absorção atômica, os sistemas FI-HG podem ser facilmente acoplados a outras técnicas, tais como a ICP-MS podendo oferecer as mesmas vantagens citadas para FI-HG AAS.⁹⁵

Um procedimento automatizado para extração e especiação de Sb por FI-HG AAS em tecidos biológicos de bovinos e ratos infectados pelo parasita *L. garganhami*, tratados com antimoniato de meglumina foi proposto por Petit de Peña *et al.*⁷³ Utilizaram ácido sulfúrico ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) e ácido acético ($1,5 \text{ mol L}^{-1}$) para extração de Sb(V) e Sb(III), respectivamente. A L-cisteína foi empregada para a redução do Sb(V) para Sb(III). O LD obtido foi de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ para Sb(III) e $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para Sb(V). A concentração do Sb total foi obtida pela soma da concentração do Sb(V) e Sb(III) e comparada com a concentração obtida por ET AAS.

Flores *et al.*¹⁰² desenvolveram um sistema FI-HG AAS para a determinação seletiva de Sb(III) em antimoniato de meglumina. As condições de análise utilizadas foram as seguintes: ácido cítrico 20% (m/v), NaBH_4 2,0% (m/v), 180 cm de percurso analítico e 125 μL de volume de amostra. O LD para Sb(III) foi de 0,95 ng e a massa característica (m_0) de 55 pg. Com o sistema foi possível quantificar o Sb(III) em antimoniato de meglumina, sendo o Sb total determinado por F AAS e o Sb(V) por diferença entre o Sb total e o Sb(III).

Gallignani *et al.*¹⁰³ propuseram um sistema de injeção em fluxo com geração de hidretos acoplada à espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier (FI-HG-FTIR) para determinação de Sb total em antimoniato de meglumina. O método baseia-se na mineralização/oxidação em linha de antimoniais orgânicos presentes na amostra e pré-redução do Sb(V) para Sb(III) com $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ e KI, respectivamente. Após, é feita a geração de SbH_3 , sendo este separado da solução no separador G/L e transportado pelo gás de arraste (nitrogênio) até o detector, onde é adquirido espectro por infravermelho com transformada de Fourier

(FTIR). A região de 1893 cm^{-1} foi utilizada para a quantificação de Sb. O LD estabelecido foi de $0,9\text{ mg L}^{-1}$ para o Sb total.

Figueiredo *et al.*¹⁰⁴ propuseram um procedimento espectrofotométrico com injeção em fluxo para a determinação de Sb total e Sb(III) em fármacos. As espécies voláteis formadas (SbH_3) são separadas e transportadas até o detector com auxílio de ar. Então, a solução de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ em meio ácido é adicionada no sistema, permitindo a redução de Cr(VI) para Cr(III). A determinação indireta de Sb foi feita em 610 nm . A faixa linear é de 200 a 1000 mg L^{-1} de Sb, o limite de quantificação (LQ) de 70 mg L^{-1} e frequência de análise de 40 h^{-1} . A exatidão do método para Sb(III) foi determinada através de testes de recuperação do analito, a qual ficou na faixa de 96 a 105% . Para o Sb total, os resultados foram comparados com aqueles obtidos por espectrometria de absorção atômica com chama. Os fármacos foram analisados e a média da concentração obtida foi de $5,39\text{ mg mL}^{-1}$ para o Sb(III) e 110 mg mL^{-1} para o Sb total.

Lima *et al.*¹⁰⁵ desenvolveram um método espectrofotométrico com um sistema com zonas coalescentes para a determinação de Sb(III) e Sb(V) em fármacos utilizados para o tratamento da leishmaniose. O procedimento baseia-se na reação seletiva entre Sb(III) e vermelho de bromopirogalol (BPR) em meio contendo Triton X-100 em pH $6,8$. Há a diminuição da absorvância em 555 nm após a formação do complexo Sb(III)-BPR. A concentração de Sb(V) foi calculada por diferença após determinação de Sb total por F AAS. A concentração de Sb total para três amostras de antimoniato de meglumina foi de $78,5 \pm 1,9$ a $95,5 \pm 3,5$, Sb(V) $76,7 \pm 3,2$ a $92,6 \pm 4,9\text{ mg mL}^{-1}$. A concentração de Sb(III) determinada nestas amostras foi na faixa de $2,30 \pm 0,11$ a $2,95 \pm 0,10\text{ mg mL}^{-1}$.

Almeida *et al.*¹⁰⁶ propuseram um sistema de injeção em fluxo com detecção por espectrofotometria (UV-VIS) para a determinação de Sb(III) e Sb total em fármacos para tratamento da leishmaniose. O método está baseado na reação seletiva entre o Sb(III) e o vermelho de bromopirogalol com detecção em 555 nm . A concentração de Sb total foi determinada após redução de Sb(V) para Sb(III) com iodeto de potássio e ácido ascórbico. Triton X-100 foi utilizado para aumentar a sensibilidade. Sob condições otimizadas até 63 amostras poderiam ser processadas por hora com LD de 29 ng mL^{-1} . Os valores encontrados para 3 lotes do fármaco foram de $2,23 \pm 0,05\text{ mg mL}^{-1}$ a $3,01 \pm 0,08\text{ mg mL}^{-1}$ para Sb(III), $75,2 \pm 3,5\text{ mg mL}^{-1}$

a $84,0 \pm 3,2 \text{ mg mL}^{-1}$ para Sb(V) e $78,1 \pm 2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ a $86,3 \pm 3,6 \text{ mg mL}^{-1}$ para Sb total.

2.6. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA ESPECIAÇÃO

As técnicas de separação são fundamentais na análise de especiação, sendo desejável uma boa resolução entre as espécies. Entre as técnicas mais empregadas na análise de especiação estão a cromatografia a gás (GC), LC, eletroforese capilar (CE) e cromatografia a fluido supercrítico (SFC). Entretanto a LC é uma das técnicas mais utilizadas para análise de especiação, principalmente devido ao bom poder de separação das espécies de muitos dos elementos de interesse e devido à possibilidade de separar espécies pouco voláteis e compostos termolábeis, haja vista que a GC apresenta diversos inconvenientes para a análise de amostras contendo estes tipos de compostos.

2.6.1. Cromatografia a líquido

A cromatografia a líquido possui boa capacidade de separar estruturas complexas de compostos orgânicos e inorgânicos, compostos iônicos, substâncias de baixa e alta massa molar, sem apresentar problemas de decomposição térmica ou química, além da possibilidade de automação.^{18, 64}

Os estudos para o acoplamento de técnicas cromatográficas com detectores elementares foram iniciados por Suzuki e Van Loon.^{107,108} Durante muito tempo a F AAS foi amplamente usada como uma técnica robusta para análise elementar total em níveis de concentração na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ a mg L^{-1} para muitos elementos. Também, a LC foi uma técnica consolidada somente no final da década de 70, originando assim o primeiro acoplamento LC com F AAS para estudos de especiação.¹⁰⁷ O acoplamento destas técnicas é relativamente simples, sendo a conexão direta da saída da coluna do LC ao sistema de nebulização do equipamento de AAS. Entretanto, o LD não é suficientemente baixo para muitas aplicações. Portanto, muitos pesquisadores focalizaram seus estudos para melhorar a eficiência de introdução da amostra desenvolvendo sistemas de pré-

concentração¹⁰⁹ e geração de hidretos em linha.^{110,111} Melhores LDs foram obtidos quando a LC foi acoplada à espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). No entanto, devido à baixa eficiência no transporte da amostra até o plasma (< 5%) os LDs também eram relativamente elevados. Com o intuito de melhorar os LDs, diferentes nebulizadores foram desenvolvidos (por exemplo, nebulizadores ultrassônicos),¹¹² bem como a geração de espécies voláteis¹¹³ para posterior introdução no plasma.

Entretanto, o acoplamento da LC à técnica de ICP-MS foi possível bem mais tarde. A ICP-MS, além da capacidade multielementar de análise, possui alta sensibilidade, permitindo alcançar LDs da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1} para a maioria dos elementos e fornece informações isotópicas, que podem ser utilizadas para identificação e quantificação das espécies.^{18,83,114}

Entre as principais características da LC-ICP-MS, pode-se citar a simples conexão da saída da coluna cromatográfica ao nebulizador, vazão compatível da fase móvel com o sistema de nebulização e baixos LDs.¹¹⁵ Contudo, a viabilidade do acoplamento LC-ICP-MS muitas vezes pode ser afetada pela composição da fase móvel usada na separação cromatográfica, pois a presença de solventes orgânicos, sais e a composição das soluções tampão podem ocasionar entupimento do cone de amostragem e *skimmer*, causando instabilidade do plasma e diminuindo a sensibilidade.^{19,23,116,117}

Devido as características, a LC-ICP-MS tem apresentado uma ampla aplicação para determinações qualitativas e quantitativas de espécies químicas em diferentes tipos de amostra, principalmente devido a sua boa capacidade para separar as espécies e os baixos LDs.¹¹⁸⁻¹²⁰

A LC-ICP-MS tem sido empregada para a análise de especiação de diversos elementos, entre eles pode-se destacar a especiação de Sb, principalmente de Sb(III), Sb(V) e espécies metiladas, em diferentes tipos de amostra.^{15,95,121-123}

2.6.1.2. Cromatografia de íons

A cromatografia de íons (IC) é uma das técnicas amplamente usadas para separar espécies químicas facilmente ionizáveis, tanto para especiação de íons organometálicos e inorgânicos.²³ Isto tem tornado esta técnica como uma das melhores para especiação, principalmente quando acoplada à ICP-MS.

A IC é, freqüentemente, subdividida em cromatografia de troca aniônica e cromatografia de troca catiônica, dependendo do grupo funcional presente na fase estacionária, sendo que as resinas do tipo divinilbenzeno-poliestireno contendo grupos funcionais amina quartenária (troca aniônica) ou sulfonado (troca catiônica) são as mais empregadas.¹²⁴ A troca iônica baseia-se na atração eletrostática entre cargas (positivas ou negativas) do sítio iônico presente na superfície da fase estacionária, que deve ser de carga oposta à carga do analito (ânion ou cátion). Íons de carga oposta na fase móvel mantêm a neutralidade eletrostática na coluna cromatográfica. De maneira geral, o tempo de retenção de um analito aumenta com o aumento da força eletrostática com a fase estacionária. Os mecanismos de separação são altamente dependentes do pH, da força iônica, da fase móvel e da natureza do trocador iônico.^{18,125,126} Geralmente, a fase móvel utilizada na cromatografia por troca iônica envolve o uso de soluções aquosas de sais inorgânicos ou agentes complexantes.^{64,127}

Diferentes procedimentos têm sido publicados para análise de especiação de antimônio em amostras ambientais (águas, sedimentos, material particulado, biota) e biomédicas (urina e plasma) baseados no emprego de colunas iônicas. Também, cada vez mais a IC está sendo utilizada com detectores multielementares e de alta sensibilidade analítica, como o ICP-MS.¹⁸

Em soluções aquosas, geralmente o Sb(V) está presente na forma aniônica com carga -1, ou seja $[\text{Sb}(\text{OH})_6]^-$. O Sb(III) (como tartarato) também se encontra na forma aniônica, porém com carga -2, $[\text{Sb}_2(\text{C}_4\text{O}_6\text{H}_2)_2]^{2-}$. O Sb também forma diversas espécies organometálicas, dentre elas a espécie trimetilada, que está presente em soluções aquosas na forma catiônica, $[\text{TMSbOH}]^+$. Dessa forma, devido ao comportamento de muitas espécies de Sb em soluções aquosas ser iônica, a cromatografia de íons é geralmente utilizada na especiação desse elemento.^{8-10,120,121}

Para a especiação de Sb, especialmente a separação de Sb(V) e Sb(III), empregando coluna de troca aniônica é necessária a conversão em uma espécie com carga negativa.^{14,27,63,94,121} A reação entre o Sb(III) e agentes complexantes, tais como o EDTA, ácido ftálico ou ácido tartárico, converte a espécie em um complexo aniônico. Entretanto, a separação é relativamente difícil devido à irreversibilidade da interação do Sb(III) com a fase estacionária, aumentando o tempo de retenção e tornando o pico mais alargado.^{94,121} Isto ocorre, provavelmente, devido à influência da carga dupla das espécies aniônicas formadas, as quais têm grande afinidade pela fase estacionária.¹²¹ Assim, o uso de um agente complexante como fase móvel tem sido proposto como alternativa para amenizar os problemas associados à eluição do Sb(III).¹²⁸ Além disso, o Sb(V) e o EDTA também formam complexo com características semelhantes. Dessa forma, a escolha do agente complexante é de fundamental importância para a separação de Sb(III) e Sb(V) em coluna aniônica.^{9,90} Além disso, a eluição por gradiente deve ser evitada, já que misturando os complexos de Sb com agentes complexantes, outros ânions também podem ser formados durante a separação cromatográfica.¹²⁸

Colunas de troca catiônica e de fase reversa para a separação de compostos inorgânicos e orgânicos de Sb também têm sido utilizadas. No entanto, compostos orgânicos de Sb não são separados em colunas de troca catiônica. Colunas de fase reversa, somente podem ser utilizadas em condições alcalinas e, dessa forma, os compostos orgânicos interagem fracamente com a coluna, eluindo próximo do volume morto.¹²¹ Devido as possíveis alterações dos compostos de Sb na presença da fase móvel e por estes apresentarem um equilíbrio de partição bastante complexo, a separação de compostos orgânicos e inorgânicos de Sb ainda representa um grande desafio, principalmente, devido a variações na estrutura química e carga, afetando, conseqüentemente, o tempo de retenção destas espécies.^{9,120,129}

Outro problema para especiação de Sb, é a falta de materiais certificados de compostos orgânicos de Sb para avaliar a exatidão do método. Somente o trimetilantimônio está disponível comercialmente. Além disso, ainda não foi possível sintetizar compostos solúveis mono e dimetilados de Sb, devido à tendência destes compostos polimerizarem após a solubilização e não serem estáveis à temperatura ambiente, os quais poderiam ser usados nos estudos de especiação.⁹

O acoplamento LC com HG-AAS foi empregado por Smichowski *et al.*⁹⁴ para a determinação de espécies inorgânicas de Sb. O método proposto foi aplicado para a determinação das espécies de Sb em água, sendo feitos testes de recuperação dos analitos e comparação com LC-ICP-MS para avaliar o seu desempenho. Os LDs foram de 5,0 e 0,6 ng de Sb(III) e Sb(V), respectivamente, injeção de 100 µL de amostra. Para melhorar os LDs foi utilizada a LC-HG-ICP-MS. Assim, os limites de detecção foram de 0,004 e 0,008 ng para o Sb(III) e Sb(V), respectivamente. Apesar dos baixos LDs, o método não permitiu a determinação de Sb em águas naturais, sendo aplicado somente para a determinação de Sb em águas contaminadas.

Lintschinger *et al.*¹²¹ desenvolveram um método para a determinação de Sb(III) e Sb(V) utilizando IC com troca aniônica acoplada à F AAS ou ICP-MS. Para a separação de Sb(III) e Sb(V) dos compostos organo-antimônio, como o $(\text{CH}_3)_3\text{SbCl}_2$ e o $(\text{CH}_3)_3\text{Sb}(\text{OH})_2$, foram testadas colunas de troca aniônica, catiônica e de fase reversa e diferentes fases móveis como: $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,5 a 5,0 mol L⁻¹ em pH 5,0 a 8,0, $\text{KHCO}_3/\text{K}_2\text{CO}_3$ 1 a 50 mmol L⁻¹ em pH 7,8 a 10,8, KOH 1 a 10 mmol L⁻¹, KHP/ $\text{KC}_8\text{H}_5\text{O}_4$ 1 a 5 mmol L⁻¹ em pH 5,0. Os autores observaram que em solução aquosa (pH 2,7 a 10,4), o Sb(V) apresenta uma carga negativa $[\text{Sb}(\text{OH})_6]^-$ e o Sb(III) é neutro, sendo, portanto, facilmente separados neste tipo de coluna, com eluição de Sb(III) na frente do solvente e Sb(V) retido mais fortemente na coluna e eluído posteriormente. No entanto, na prática observaram a eluição do Sb(V) na frente do solvente com retenção de Sb(III) na coluna, para todos os eluentes testados. A razão é que o Sb(III) reage com ftalato da fase móvel formando um complexo de carga negativa. Boa separação foi obtida para as espécies orgânicas $[\text{SbMe}_3\text{SbCl}_2, \text{MeSb}(\text{OH})_2]$ e Sb(V), usando hidróxido de potássio como fase móvel ou solução tampão de carbonato. Além disso, os autores observaram que não houve nenhuma diferença significativa nos tempos de retenção entre as espécies orgânicas. Como as espécies orgânicas eluíram na frente do solvente, os autores concluíram que em solução aquosa as espécies são catiônicas ou neutras. Utilizando as mesmas condições cromatográficas, testaram o EDTA (5 a 50 mmol L⁻¹ em pH 4,3 a 7,0) e ácido piridina 2,6 dicarboxílico (PDCA) (5 a 20 mmol L⁻¹ em pH 5,0) como fase móvel, ambos complexantes para cátions di e trivalentes. Era esperado que ocorresse a formação de complexos solúveis com uma carga negativa. No entanto, quando utilizaram PDCA como fase móvel, o Sb(III) [como SbCl_3 ou tartarato de Sb(III)] não foi eluído da coluna. Quando utilizaram EDTA 5

mmol L⁻¹ como fase móvel, o Sb(III) foi eluído, mas com picos alargados e assimétricos. Melhor separação foi obtida quando adicionaram ftalato de potássio ao EDTA, com pH na faixa de 4,3 a 5,0. Dessa forma, a melhor separação entre Sb(III) e Sb(V) é obtida com fase móvel contendo EDTA 20 mmol L⁻¹ e ftalato de potássio 2 mmol L⁻¹. Não encontraram, também, diferenças na separação entre cloreto de Sb(III) e tartarato de Sb(III), indicando que Sb(III) é preferencialmente complexado pelo EDTA, mesmo na presença de outro ligante, como o tartarato. Melhores condições de separação foram obtidas com a coluna de troca aniônica em meio alcalino. Troca catiônica e fase reversa não foram adequadas para a separação dos compostos.

Lintschinger *et al.*¹³⁰ fizeram modificações no método anterior¹²¹ e compararam o desempenho das colunas de troca aniônica IonPacAS4A-SC utilizando como fase móvel o hidróxido de tetrametil amônio (TMAH) 3 mmol L⁻¹ e PRP-X100 com fase móvel TMAH 12 mmol L⁻¹ para a separação cromatográfica de Sb(V) e TMSbCl₂. Para as duas colunas observaram um alargamento do pico do Sb(V) em função do aumento da concentração de NaCl na fase móvel de 0,1% a 0,5%. A mudança do comportamento cromatográfico de Sb(V) deve-se, provavelmente, ao grau de saturação da coluna por íons cloreto.

Ulrich *et al.*¹³¹ propuseram um método em linha para determinação de Sb(III), Sb(V) e TMSbO. Para a separação foi utilizada a IC com coluna aniônica PRP-X100. O volume de amostra injetado foi de 100 µL e a fase móvel composta de ácido ftálico 2 mmol L⁻¹ em 2% de acetona a pH 5,0 e vazão de 1 mL min⁻¹. Os LDs obtidos foram de 51 pg para Sb(V), 59 pg para TMSbO e 311 pg para Sb(III).

Ulrich *et al.*²⁷ desenvolveram um método para a separação e quantificação de Sb(III) e Sb(V) usando IC-ICP-MS em extratos celulares de *Leishmania donovani*, a qual foi incubada com o Sb(III) e Sb(V) para avaliar o metabolismo destas espécies nas células de Leishmania. As condições otimizadas para a separação de espécies de Sb foram estabelecidas com a fase móvel ácido nítrico 15 mmol L⁻¹, pH 6,0 e coluna de troca aniônica (PRP-X100). O LD para Sb(V) foi de 0,06 µg L⁻¹ e 0,29 µg L⁻¹ para Sb(III). Também avaliaram a influência do pH sobre o Sb(III)-tartarato, não sendo separado do Sb(V). Em pH entre 3,0 e 7,0 o Sb(III) forma complexo de carga dupla, possivelmente, um átomo de Sb coordenando com duas moléculas de tartarato. Em meio alcalino (pH > 7,0) forma moléculas carregadas e *clusters* que são difíceis de serem eluídos da coluna. Assim, os autores recomendam trabalhar

na faixa de pH entre 3,0 e 7,0, sendo a mais apropriada para separar espécies de antimônio por IC.

Zheng *et al.*¹³² estudaram a especiação de Sb(III) e Sb(V) em material particulado do ar utilizando IC-ICP-MS e coluna de troca aniônica (Synchropack Q-300), usando como fase móvel uma mistura de 2 mmol L⁻¹ de ácido ftálico e 5 mmol L⁻¹ de EDTA a pH 4,5. Os LDs obtidos foram de 10 e 30 pg para Sb(V) e Sb(III), respectivamente, injetando 100 µL de amostra. O efeito do pH na separação das espécies de antimônio foi avaliado na faixa de 2,1 a 9,0, empregando soluções aquosas de Sb(III) e Sb(V). Nesta faixa de pH a espécie Sb(V) não apresentou mudanças no tempo de retenção e na área integrada. Para a espécie Sb(III), o tempo de retenção permaneceu constante na faixa de pH de 2,0 a 7,0, enquanto que em pH 9,0, ocorreu uma alteração considerável no tempo de retenção, bem como uma diminuição de cerca de 10% na área do pico. Segundo os autores, este efeito foi causado por uma possível oxidação do Sb(III) para Sb(V).

Krachler *et al.*¹² utilizaram a associação entre IC e ICP-MS para a determinação de espécies de antimônio em urina, sem a necessidade de qualquer etapa de tratamento da amostra. A alta concentração de cloreto na urina impossibilitou a separação de Sb(III) e Sb(V) em coluna de troca aniônica (IonPacAS14) caracterizado por mudanças no tempo de retenção, alargamento do pico e supressão do sinal. Este fato foi atribuído à formação preferencial do complexo entre antimônio e cloreto em substituição ao complexo formado entre antimônio e EDTA (presente na fase móvel). A substituição por uma coluna de troca aniônica (PRP-X100), o aumento na concentração de EDTA e a introdução de um gerador de hidretos (em substituição ao nebulizador ultra-sônico), permitiu a separação eficiente das espécies de Sb. Sendo assim, dois métodos cromatográficos foram propostos para a separação de Sb(V) e Sb(III) utilizando coluna de troca aniônica (PRP-X100) e EDTA 20 mmol L⁻¹, como fase móvel, e separação entre TMSbCl₂ e Sb(V) utilizando a coluna ION-120 e uma mistura de NH₄CO₃ 2 mmol L⁻¹ e ácido tartárico 1 mmol L⁻¹ como fase móvel. A coluna PRP-X100 apresentou melhor desempenho, pois tolerou concentrações de NaCl de 0,1 a 0,5%. Nos sistemas mencionados, compostos trimetilados de Sb apresentam tempos de retenção bastante similares ao volume morto da coluna, provavelmente, devido à formação de espécies neutras ou positivamente carregadas na presença das fases móveis. Este fator provoca interferência na determinação das espécies em

matrizes de urina e plasma, onde o sódio está presente em altas concentrações e elui no mesmo tempo de retenção do analito, o que não é desejável para separações cromatográficas. A concentração de Sb(V) foi de 20 ng L⁻¹, para TMSbCl₂ foi de 12 ng L⁻¹ e para Sb(III) foi de 8 ng L⁻¹ em urina. O procedimento proposto por IC-HG-ICP-MS foi aplicado para a determinação de espécies de Sb em urina de pessoas expostas e não expostas ocupacionalmente. Somente concentrações muito baixas (µg L⁻¹) de Sb(III) foram detectados e a concentração de Sb(V), Sb(III) e TMSbCl₂ em amostras de urina foi na faixa de 51 a 78% do Sb total.

Krachler *et al.*¹⁴ desenvolveram metodologia utilizando LC-HG-AAS para determinar as formas orgânicas e inorgânicas de antimônio. Testaram cinco colunas de troca aniônica e obtiveram melhores resultados com a coluna IonPacAS14 para a separação de Sb(V) e Sb(III) usando como eluente EDTA 1,25 mmol L⁻¹ a pH 4,7 e coluna de troca aniônica (ION-120) para separar TMSbCl₂ e Sb(V), usando como eluente NH₄CO₃ 2 mmol L⁻¹ e ácido tartárico 1 mmol L⁻¹ a pH 8,5. O LD obtido foi de 1,0 µg L⁻¹, 0,7 µg L⁻¹ e 0,4 µg L⁻¹ para Sb(III), Sb(V) e TMSbCl₂, respectivamente.

Em trabalho posterior, Krachler *et al.*¹⁵ utilizaram as mesmas condições otimizadas no trabalho anterior¹⁴. No entanto, a técnica utilizada foi ICP-MS com nebulização ultra-sônica. O uso deste nebulizador de alta eficiência melhorou o LD para 14, 12 e 9 ng L⁻¹ para Sb(III), Sb(V) e TMSbCl₂, respectivamente.

Morita *et al.*¹³³ propuseram um método para especiação simultânea de arsênio e antimônio por LC-ICP-MS usando coluna de troca aniônica em água e peixes, sendo que as espécies Sb(III) e Sb(V) foram separadas com fase móvel de tartarato de amônio 50 mmol L⁻¹, ajustado a pH 2,5 com ácido sulfúrico. O LD para cada espécie de Sb foi de 0,5 ng mL⁻¹.

Miekeley *et al.*⁶⁰ desenvolveram um método para especiação de antimônio em pacientes com leishmaniose tratados com antimoniato de meglumina, relatando indícios de que ocorre a biorredução do Sb(V) para Sb(III). No entanto, ainda não se tem informações sobre o mecanismo de desintoxicação em seres humanos, porém a biometilação é uma das hipóteses a ser considerada. Neste trabalho foi utilizada coluna de troca aniônica (PRP-X100) e como fase móvel o EDTA (2 ou 20 mmol L⁻¹, pH 4,7). A técnica de IC-ICP-MS permitiu a separação e detecção das espécies trivalente e pentavalente de antimônio em urina, plasma sangüíneo e no antimoniato de meglumina. A concentração obtida para Sb total no fármaco foi de 72,6 ± 1,5 g L⁻¹ e a fração de Sb(V) foi de 6,4 ± 0,5%. A presença de Sb(III) só foi detectada por HG-

ICP-MS, sendo inferior a 1% em relação ao Sb total. Porém, esta fração de Sb(III) em relação ao Sb total pode ser formada na reação de redução do Sb(V) pelo NaBH_4 .

Nash *et al.*¹²⁰ utilizaram IC-ICP-MS usando diferentes colunas de troca aniônica com grupos amônio quartenário como a Phenomenex-SAX-SB e Altec-HAAX. Investigaram uma série de eluentes para a separação das espécies Sb(III), Sb(V) e a espécie orgânica TMSbCl_2 em soluções sintéticas. As condições analíticas para a separação das espécies foram avaliadas injetando 200 μL de solução, fase móvel de tartarato de amônio em pH controlado. O modo de eluição isocrático favoreceu a boa separação entre as espécies inorgânicas. No entanto, para a separação das espécies inorgânicas e espécie orgânica, foi necessário utilizar o modo de eluição por gradiente. A melhor resolução de pico obtida para as espécies Sb(V), Sb(III) e TMSb foi utilizando a coluna HAAX a 20 °C e fase móvel tartarato de amônio a 100 mmol L^{-1} com eluição por gradiente de pH, ou seja, variando o pH da solução de 3,0 para pH 1,2, embora nestas condições, foi observado a co-eluição do TMSb, não sendo possível a determinação desta espécie. Além disso, os autores verificaram que a ordem de eluição das espécies Sb(V), Sb(III) e TMSb invertia quando a temperatura da coluna HAAX foi aumentada de 20 para 60 °C. Dessa forma, utilizaram outra condição de eluição por gradiente de pH começando em 2,3 para 1,5, obtendo boa separação das espécies de Sb, evitando a co-eluição da espécie TMSb e favorecendo a quantificação da espécie orgânica de Sb. Compararam as duas colunas e obtiveram uma boa resolução das espécies Sb(V) e Sb(III) na separação por eluição isocrática. No entanto, o Sb(III) tem maior afinidade pelas fases estacionárias das HAAX e SAX-SB do que o Sb(V). Provavelmente a menor afinidade do Sb(V) pela fase estacionária é devida à formação do íon $[\text{Sb}(\text{OH})_6]^-$. O Sb(III) tem maior afinidade pela fase estacionária possivelmente devido à formação ânion Sb(III)-tartarato hidratado com carga negativa. As características de retenção para o Sb(V) e Sb(III) são provavelmente influenciadas, em parte, por mecanismos de troca de carga negativa, embora mecanismos de complexação também possam contribuir na retenção devido à alta concentração do tartarato presente na fase móvel. Isto possibilita, a formação de complexos na superfície da fase estacionária. O ajuste das condições de separação da espécie orgânica, TMSb, foi mais difícil, pois os mecanismos de troca aniônica para esta espécie são improváveis e, ainda desconhecidos, dificultando a explicação do tempo de retenção observado para esta

espécie. Possivelmente isto possa ser devido à formação de espécie catiônica ou neutra. O método proposto apresentou melhor separação das espécies inorgânicas e orgânicas de Sb, favorecendo a quantificação destas por eluição gradiente de pH e fase móvel tartarato de amônio a 100 mmol L^{-1} com a utilização da coluna HAAX, podendo ser empregado para diferentes amostras ambientais, como águas contaminadas, solos lixiviados e água de rio.

2.6.2. Separação das espécies de Sb empregando CPG-8HQ

A 8-hidroxiquinolina (8-HQ) reage com mais de 60 íons metálicos, através da complexação dos íons metálicos pela formação de um complexo entre o nitrogênio básico do anel e o grupo fenólico. A estrutura da 8-HQ é mostrado na Figura 4.^{134,135}

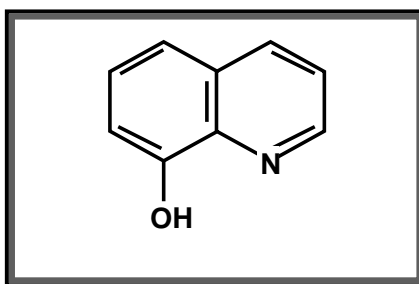


Figura 4. Estrutura molecular da 8-hidroxiquinolina.

A 8-HQ possui algumas características para ser usada como agente quelante. Pode ser usada para pré-concentração (principalmente quando imobilizado sobre vidro de porosidade controlada-CPG), tais como:

- ✓ boa estabilidade em meio ácido.
- ✓ alta constante de estabilidade para quelatos metálicos, aumentando a especificidade para diversos metais.
- ✓ rápida cinética de complexação, permitindo o uso de altas vazões das soluções durante a etapa de pré-concentração, sem perda da eficiência da coluna.¹³⁶⁻¹³⁸

Santos¹³⁹ desenvolveu um método para a determinação de Sb(III) com extração em fase sólida e determinação por injeção em fluxo acoplada à espectrometria de absorção atômica com chama (FI-SPE-F AAS). A espécie de interesse [Sb(III)] foi retida em CPG-8HQ. Os principais parâmetros experimentais

estabelecidos foram: pH de complexação (5,8); HCl (2 mol L⁻¹) como eluente. O LD foi de 0,1 mg L⁻¹ e a frequência de determinação de 9 h⁻¹. As determinações de Sb(III) foram feitas em dois lotes de antimoniato de meglumina, cujas concentrações variaram de 2,65 a 2,97 mg mL⁻¹, o que corresponde a aproximadamente a 3,5% de Sb(III) com relação à concentração total de antimônio.

2.7. MÉTODOS DIVERSOS PARA ESPECIAÇÃO DE Sb EM ANTIMONIATO DE MEGLUMINA

Petit de Peña *et al.*¹⁴⁰ desenvolveram um método para a determinação de Sb(V) e Sb(III) por HG AAS em amostras de soro sanguíneo e urina de pacientes com leishmaniose que foram tratados com antimoniato de meglumina. A determinação seletiva de ambas as espécies foi baseada na dependência da acidez para a formação dos hidretos, sendo utilizado ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹ para a determinação de Sb total e ácido cítrico 2 mol L⁻¹ para a determinação de Sb(III). Pré-reduziram o Sb(V) foi pré-reduzido para Sb(III) com KI 10% em meio H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹, permitindo assim a determinação de Sb total. A concentração da espécie pentavalente foi obtida pela diferença entre o Sb total e o Sb(III). O LD do método foi de 0,15 µg L⁻¹ e 0,10 µg L⁻¹ para Sb(III) e Sb total respectivamente.

Rath *et al.*¹⁴¹ desenvolveram método espectrofotométrico para a determinação seletiva de Sb(III) e Sb(V) em fármacos para leishmaniose. O método é baseado na reação do Sb(III) com vermelho de bromopirogalol (BPR) em solução neutra. O complexo Sb-BPR formado absorve em 560 nm, cuja intensidade diminui proporcionalmente com o aumento da concentração de Sb(III) na solução. O Sb(V) foi determinado após redução do Sb(III) por iodeto. A concentração do Sb total foi determinada em antimoniato de meglumina, sendo encontradas na faixa de 85,91 ± 1,07 a 99,50 ± 0,31 mg mL⁻¹, enquanto a concentração de Sb(V) foi de 75,40 ± 0,97 a 94,47 ± 1,0 mg mL⁻¹. A concentração de Sb(III) foi na faixa de 5,19 ± 0,16 a 10,52 ± 0,15 mg mL⁻¹.

Figueiredo *et al.*¹⁴² desenvolveram um atomizador de hidreto metálico para espectrometria de absorção atômica, para avaliar o desempenho na atomização de hidretos. Para este propósito a estibina era usada como modelo de composto volátil e a determinação de antimônio em água de rio, sedimento de lago e em antimoniato

de meglumina. A concentração de Sb total no fármaco foi de 92 ± 3 a 108 ± 4 mg mL⁻¹.

Flores *et al.*⁷⁴ propuseram um método para a especiação de Sb por HG AAS. O procedimento foi baseado na geração seletiva de hidreto de Sb(III) na presença de ácido cítrico. O ácido cítrico inibe a formação de hidreto a partir do Sb(V). Após otimização das condições, o LD do método foi de 1,5 ng de antimônio e a concentração de Sb total, determinado por F AAS, foi de 83,5 a 110,3 mg mL⁻¹.

Cabral *et al.*¹⁴³ utilizaram geração de hidretos acoplada à espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado para a determinação de Sb(III) e ICP OES para a determinação do Sb total em oito formulações diferentes de antimoniato de meglumina. Para determinar seletivamente o Sb(III), após ajuste das condições, utilizaram ácido cítrico (30%, m/v) como agente complexante do Sb(V) e NaBH₄ (2%, m/v) como redutor do Sb(III). A formulação escolhida foi a proporção de 20:80 propilenoglicol/água, respectivamente. E, esta formulação tem a concentração de $77,1 \pm 1,3$ mg mL⁻¹ de Sb total e $1,57 \pm 0,16$ mg mL⁻¹ de Sb(III), sendo que a concentração de Sb(V) foi obtida pela diferença da concentração de Sb total pelo Sb(III).

Trivelin *et al.*¹⁴⁴ utilizaram um sistema de FI com extração líquido-líquido (FI-LLE) com detecção espectrométrica para a determinação de Sb(V) em antimoniato de meglumina. O Sb(III) foi determinado por polarografia e o Sb total por ICP OES. A concentração de Sb(V), após extração, foi comparada com o resultado da diferença da concentração de Sb total pelo Sb(III). A concentração do Sb(V) foi de 85 ± 4 a 109 ± 6 mg mL⁻¹, obtida por diferença de Sb total por ICP OES e Sb(III) por polarografia, a concentração de Sb(V) obtida por FI-LLE foi de 89 ± 1 a 112 ± 1 mg mL⁻¹, a concentração do Sb(III) foi < 10 mg mL⁻¹ por polarografia e a concentração do Sb total por ICP OES foi de 89 a 110 mg mL⁻¹.

Na Tabela 1 pode ser observado o resumo dos diferentes trabalhos de determinação de Sb total, Sb(V) e Sb(III) em antimoniato de meglumina.^{60,74,102,104,105,106,139,141,142,143-144}

Tabela 1. Resumo dos principais trabalhos sobre a determinação de espécies de antimônio em antimoniato de meglumina.

Autores	Técnicas	Sb total (mg mL⁻¹)	Sb(V) (mg mL⁻¹)	Sb(III) (mg mL⁻¹)
Rath <i>et al.</i> ¹⁴¹ (1997)	FI-UV-VIS	86 ± 1 a 99,5 ± 0,3	75 ± 1 a 94 ± 1	5,2 ± 0,2 a 10,5 ± 0,1
Flores <i>et al.</i> ⁷⁴ (2002)	HG AAS		Sb total - Sb(III)	1,7 ± 0,1 a 3,1 ± 0,4
	F AAS	83 ± 2 a 110 ± 2		
Miekeley <i>et al.</i> ⁶⁰ (2002)	IC-ICP-MS	73 ± 1	5	
	HG-ICP-MS			0,72
Flores <i>et al.</i> ¹⁰² (2003)	FI-HG AAS		Sb total - Sb(III)	1,5 ± 0,1 a 3,0 ± 0,1
	F AAS	82 ± 1 a 103 ± 3		
Figueiredo <i>et al.</i> ¹⁰⁴ (2005)	FI-UV-VIS		Sb total - Sb(III)	5,4
	F AAS	110		
Lima <i>et al.</i> ¹⁰⁵ (2006)	FI-UV-VIS		Sb total - Sb(III)	2,3 ± 0,1 a 2,9 ± 0,1
	F AAS	78 ± 2 a 95 ± 3		
Santos, E. P. ¹³⁹ (2006)	FI-SPE-F AAS	---	---	2,6 ± 0,2 a 3,0 ± 0,2
Trivelin <i>et al.</i> ¹⁴⁴ (2006)	Polarografia			< 10
	FI-LLE-UV-VIS		89 ± 1 a 112 ± 1	
	ICP OES	89 a 110		
Almeida <i>et al.</i> ¹⁰⁶ (2007)	FI-UV-VIS	78 ± 2 a 86 ± 4	Sb total - Sb(III)	2,23 ± 0,05 a 3,0 ± 0,1
Figueiredo <i>et al.</i> ¹⁴² (2007)	F AAS	92 ± 3 a 108 ± 4	---	---
Cabral <i>et al.</i> ¹⁴³ (2008)	HG-ICP OES		Sb total - Sb(III)	1,6 ± 0,2 a 3,0 ± 0,3
	ICP OES	77 ± 2 a 79 ± 1		

2.8. TÉCNICAS DE DETECÇÃO

Dentre as técnicas de detecção mais utilizadas na análise de especiação inorgânica estão a espectrometria de absorção atômica e a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado. Entretanto, na análise de especiação de compostos de antimônio é mais comum o uso da ICP-MS, principalmente devido aos melhores limites de detecção obtidos e a possibilidade de monitorar os isótopos de antimônio.^{57,78,127}

2.8.1. Espectrometria de absorção atômica

A AAS já é uma técnica bem consolidada e de uso difundido, pois é utilizada para a determinação de diferentes elementos em uma ampla faixa de concentração. As técnicas F AAS e GF AAS são as mais aplicadas, podendo ser empregadas para a determinação de mais de 50 elementos. Já a HG AAS é limitada à determinação de elementos que formam hidretos voláteis, tais como As, Bi, Ge, In, Pb, Sb, Se, Sn e Te, enquanto a CV AAS é empregada apenas para a determinação de mercúrio.¹⁴⁵ No entanto, a sensibilidade da técnica convencional de F AAS é limitada por fatores como a dispersão dos átomos dos analitos gerados na chama, que passam rápida e continuamente através da região analítica durante a aspiração da amostra e a baixa eficiência do sistema de nebulização pneumático que é de, no máximo, 10%.¹⁴⁶

2.8.2. Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado

A ICP-MS é uma técnica muito sensível e seletiva para análise elementar e isotópica. A partir de 1980, quando surgiram os primeiros instrumentos comerciais, expandiu-se rapidamente, tanto em relação ao número de usuários e aplicações, quanto aos fabricantes e modelos, sendo hoje considerada uma técnica de rotina.¹⁴⁷

Em geral, o instrumento é constituído de um sistema de introdução de amostra, o plasma indutivamente acoplado (ICP), operando em temperaturas de 6000 a 9000 K e mantido por um gerador de radiofrequência de 27 ou 40 MHz, a interface, o separador de massas, o detector e um sistema de aquisição de dados.⁹⁵

O princípio da técnica de ICP-MS baseia-se na alta eficiência do ICP como fonte de ionização, gerando preferencialmente íons positivamente carregados (M^+), os quais são separados no espectrômetro de massa. A amostra, geralmente na forma líquida, é introduzida no plasma após ser nebulizada. Os íons M^+ gerados no plasma são amostrados pela interface por diferença de pressão. A interface é constituída pelo cone de amostragem e pelo *skimmer*. Após o *skimmer* os íons são conduzidos, através da lente iônica, ao espectrômetro de massa, pela aplicação de potenciais elétricos adequados. No separador de massa, os íons são separados de acordo com a sua razão massa/carga (m/z) e conduzidos até o detector.^{95,148}

A técnica de ICP-MS é de grande aplicação em diferentes áreas e tem sido introduzido na pesquisa farmacêutica para a determinação quantitativa de diversos elementos em fármacos.¹⁴⁸ Entre as principais características da técnica de ICP-MS na área farmacêutica podem-se citar a melhor sensibilidade, capacidade multielementar de análise, relativamente livre de interferências, baixos limites de detecção e boa precisão se comparado aos métodos convencionais estabelecidos nos compêndios oficiais. Além disso, requer pequenas quantidades de amostra para análise.^{150,151} Desta forma, esta técnica foi sugerida para testes limites de metais pesados em substâncias ativas e matérias-primas de fármacos, ao invés de métodos descritos nas farmacopéias, como a Farmacopéia Americana, Britânica e Européia.¹⁴⁹

3. OBJETIVOS

No Brasil, o antimoniato de meglumina (Sb ligado à NMG) é o fármaco de primeira escolha no tratamento da leishmaniose. Porém, é conhecido que a toxicidade e ação das espécies de Sb presentes neste fármaco são diferenciadas. Portanto, é necessário dispor de metodologia analítica para identificar e quantificar as espécies de Sb presentes no fármaco. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver metodologia para identificação e quantificação das diferentes espécies de Sb em antimoniato de meglumina. Foi avaliado o uso de cromatografia a líquido, empregando colunas de troca aniônica, combinada ou não com a técnica de geração de hidretos (HG) para separar e gerar seletivamente hidretos das espécies de Sb. A técnica de HG, como meio de gerar estibina a partir do Sb(III) na presença de elevadas concentrações de Sb(V) também foi avaliada. Além disso, foi investigada a separação das espécies de Sb(III) de Sb(V) por complexação com 8-hidroxiquinolina imobilizada sobre vidro de porosidade controlada. As determinações de Sb foram feitas por espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (HG AAS) e por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), tanto de forma *on-line* como *off-line*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são descritos os equipamentos, reagentes e amostras utilizadas para o desenvolvimento deste trabalho. A seguir são descritas as metodologias empregadas para a análise de especiação de Sb empregando FI-HG AAS, FI-HG-ICP-MS, LC-ICP-MS, LC-HG-ICP-MS e a separação do Sb(III) do Sb(V) empregando a CPG-8HQ.

4.1. INSTRUMENTAÇÃO

4.1.1. Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado

Para as determinações por ICP-MS foi empregado um espectrômetro de massa PerkinElmer SCIEX (ELAN[®] DRC II, <http://www.perkinelmer.com>, EUA), equipado com nebulizador pneumático Meinhard[®] (tipo A, <http://www.meinhard.com>, EUA) com câmara de nebulização ciclônica Glass Expansion (Inc., <http://www.geicp.com>, Austrália) e tocha com tubo injetor de quartzo de 2 mm de diâmetro interno. O plasma foi gerado a partir de argônio (99,998% de pureza, *White Martins*, <http://www.whitemartins.com.br>, Brasil). Na Tabela 2 são mostrados os parâmetros operacionais utilizados.

Tabela 2. Parâmetros operacionais do instrumento de ICP-MS.

<i>ICP-MS</i>	
<i>Parâmetros</i>	<i>Condições</i>
Potência RF, W	1300
Vazão de Ar, L min ⁻¹ : principal	12
intermediário	1,20
nebulizador	1,10
Cone de amostragem e “ <i>Skimmer</i> ”	Pt
Resolução, u	0,7
m/z monitorado	121
Varreduras/leitura (Sweeps/reading)	1
Leituras/replicata	1
“Dwell time”, ms	250
Replicatas	7114
Lente iônica	“ <i>Auto lens off</i> ”
Modo de medida	“ <i>Peak hopping</i> ”
Modo de operação do detector	“ <i>Dual</i> ”

A avaliação e os ajustes das principais condições de operação do equipamento de ICP-MS foram feitos diariamente. Para tanto, foi monitorada a intensidade do sinal obtido para ¹¹⁵In⁺ (o qual deve ser superior a 30.000 contagens

s⁻¹, cps), a menor formação de óxidos, monitorada pela intensidade da espécie poliatômica ¹⁵⁵LaO⁺ (que deve ser inferior a 3% da intensidade obtida para o íon ¹³⁹La⁺) e a menor intensidade para o íon ¹³⁸Ba⁺⁺ (menor do que 3% em relação ao ¹³⁸Ba⁺) segundo recomendação do fabricante. Esta avaliação foi feita com uma solução contendo 1 µg L⁻¹ de In e La e 10 µg L⁻¹ de Ba. Além disso, o ruído do instrumento deve ser inferior a 2 cps em *m/z* 8,5 e *m/z* 220.¹⁵² Outros ajustes como, calibração do detector e calibração do quadrupolo (calibração de massa), por exemplo, são feitos com menor frequência, mas também foram feitas quando necessário, de acordo com as recomendações do fabricante.¹⁵²

4.1.2. Cromatografia a líquido

Para a separação das espécies de antimônio, utilizou-se um sistema cromatográfico composto por uma bomba quartenária (PerkinElmer, modelo Series 200 LC Pump), um degaseificador a vácuo (PerkinElmer, modelo Series 200 Vacuum Degasser), uma válvula injetora manual com uma alça de amostragem de polieteretercetona (PEEK) de 200 µL e coluna de troca aniônica. Duas colunas foram avaliadas quanto à separação de espécies de Sb. Inicialmente uma coluna de troca aniônica Dionex (IonPacAS14, 250 x 4 mm d.i., 9 µm de diâmetro de partícula, <http://www.dionex.com>, EUA) e uma coluna guarda Dionex (IonPacAG14, 50 x 4 mm d.i., 9 µm de diâmetro de partícula) preenchidas com resina de poliestireno divinil benzeno (PSDVB) contendo grupos funcionais amônio quartenário foi empregada. Posteriormente, avaliou-se uma coluna de troca aniônica de maior “força iônica” (Hamilton, PRP-X100, 250 x 4,1 mm d.i., 10 µm de diâmetro de partícula, <http://www.hamiltoncompany.com>, EUA), preenchida com resina de PSDVB com grupos funcionais trimetilamônio. A saída da coluna cromatográfica foi acoplada diretamente ao nebulizador pneumático do ICP-MS. Na Figura 7 está mostrado o sistema LC-ICP-MS empregado neste trabalho. A injeção das soluções na alça de amostragem do cromatógrafo foi feita com uma seringa (Henke-Sass Wolf GmbH, <http://www.henkesasswolf.de>, Alemanha) com capacidade para 1 mL. Foram utilizados tubos de PEEK (Upchurch Scientific, <http://www.upchurch.com>, EUA) com 0,007 mm de d.i. para interconectar a coluna cromatográfica com a bomba do LC e o nebulizador do instrumento de ICP-MS.

4.1.3. Espectrometria de absorção atômica

4.1.3.1. Espectrometria de absorção atômica com chama

Para a determinação de Sb total foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica (Analytik Jena, mod. Vario 6, www.analytik-jena.com, Alemanha) equipado com queimador do tipo monofenda (10 cm de comprimento) para chama ar+acetileno. O ajuste do instrumento foi feito de forma a obter a maior razão sinal/ruído para Sb. Acetileno comercial com 99,95% de pureza (White Martins) foi utilizado.

4.1.3.2. Espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos

O mesmo modelo de instrumento citado no item 4.1.3.1 foi utilizado, porém equipado com uma cela de quartzo em forma de “T” (L = 16 cm e d.i. = 1 cm) aquecida eletrotermicamente a 900 °C. Como fonte de radiação específica para o antimônio foi utilizada uma lâmpada de cátodo oco (comprimento de onda: 217,6 nm; corrente da lâmpada: 9,0 mA) e fenda espectral de 0,2 nm. A correção de fundo foi feita empregando-se lâmpada de deutério. Argônio (99,996%, White Martins) foi utilizado como gás de arraste. As medições para estabelecer as condições de trabalho do sistema foram feitas em área e altura de sinal. Entretanto, para a quantificação das espécies de Sb, as medições foram feitas em área.

4.1.4. Sistema de injeção em fluxo

O sistema FI, desenvolvido no próprio laboratório, consiste de uma bomba peristáltica de oito canais (Gilson, MiniPlus 3, <http://www.gilson.com>, França) para a propulsão das soluções, tubos de Tygon de diversos diâmetros e tubos de polietileno (d.i. 0,8 mm) para conduzir as soluções, um separador G/L do tipo em “U” (L = 10 cm; d.i. = 1,5 cm) e um injetor-comutador (feito de acrílico) para a injeção da amostra. O sistema FI foi acoplado à técnica de HG AAS e também à técnica de

ICP-MS para avaliar a possibilidade de determinar seletivamente o Sb(III). Os sistemas estudados estão demonstrados nas Figuras 5 e 6.

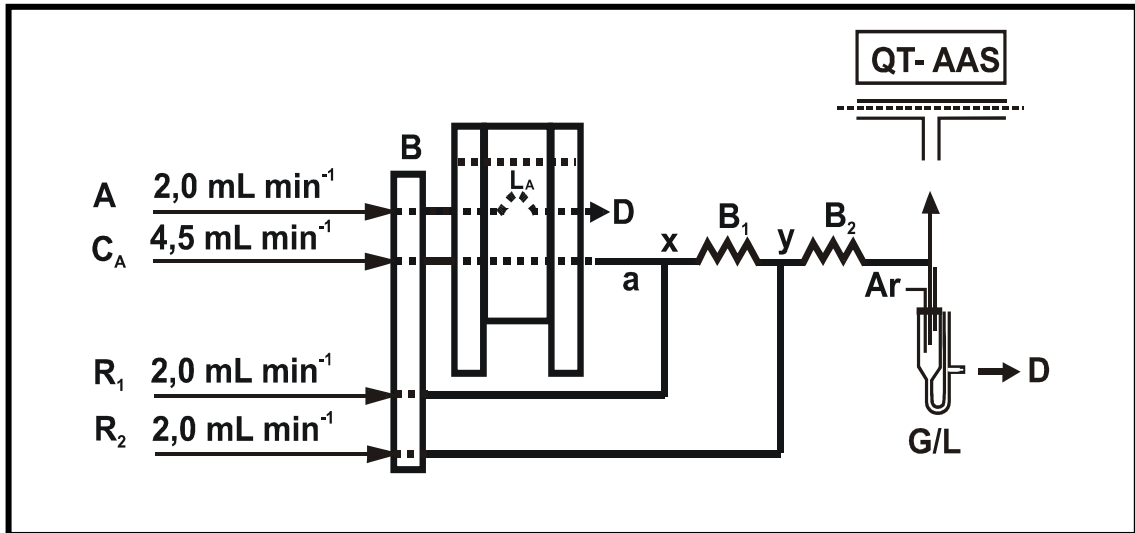


Figura 5. Sistema FI-HG AAS. A- amostra; C_A- carregador da amostra; R₁- ácido cítrico; R₂- NaBH₄; B- bomba peristáltica; L_A- alça de amostragem; D- descarte; a- 5 cm; B₁- 300 cm; B₂- 30 cm; x e y- confluências; Ar- gás de arraste (argônio); G/L- separador gás/líquido; QT-AAS- espectrômetro de absorção atômica com tubo de quartzo. As setas indicam o sentido das soluções.

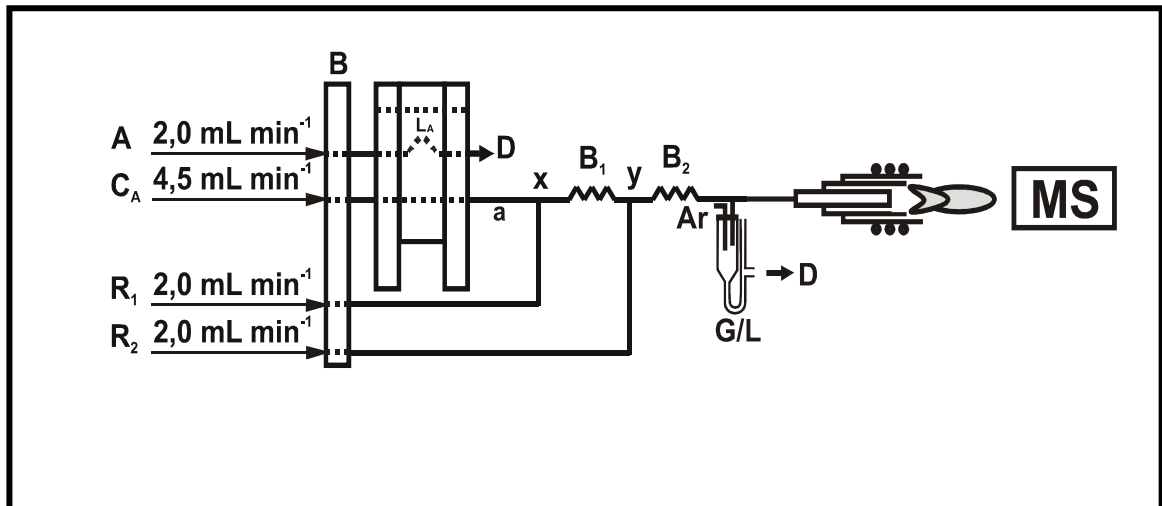


Figura 6. Sistema FI-HG-ICP-MS. MS- espectrômetro de massa. Demais parâmetros ver legenda da Figura 5.

4.2. REAGENTES

A água utilizada foi previamente destilada e deionizada em uma coluna de troca iônica convencional e posteriormente purificada em sistema Milli-Q[®] (Millipore, <http://www.millipore.com>, EUA), produzindo água com resistividade mínima de 18,2 MΩ cm.

As soluções de referência para a determinação de Sb total foram preparadas a partir de solução de calibração multielementar (SCP 33 MS, PlasmaCAL, EUA) em HNO₃ 5% (v/v) contendo 10 mg L⁻¹ de Sb. As soluções de calibração foram feitas na faixa de 1 µg L⁻¹ até 20 µg L⁻¹ por ICP-MS.

Soluções estoque individuais com 1000 mg L⁻¹ de Sb(III) e Sb(V) foram preparadas a partir de C₄H₄KO₇Sb.0,5H₂O e K[Sb(OH)₆], respectivamente, ambas em água. Estas foram armazenadas (por no máximo 3 meses) sob refrigeração e protegidas da luz. Para preparar soluções de calibração, foram feitas diluições adequadas destas soluções estoque em água.

A fase móvel foi preparada diariamente a partir da dissolução de ácido etilenodiaminotetracético sal-dissódico (C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈.2H₂O), (Merck, p.a, Titriplex III, <http://www.merck.com.br>, Alemanha) ou de ftalato ácido de potássio (C₈H₅KO₇), (Merck, p.a), dissolvidos em água. O pH da fase móvel foi ajustado com ácido clorídrico concentrado destilado (Carlo Erba, <http://www.carloerbareagenti.com>, Itália), o qual foi previamente bidestilado em sistema de sub-ebulição Milestone (modelo duoPUR[®] 2.01 E, <http://www.milestonesci.com>, Itália) ou hidróxido de amônio a 25% m/m (Merck, p.a). Para a calibração do potenciômetro foram utilizadas soluções tampão (CertiPUR, Merck) com valores de pH 4,00 ± 0,02 (20 °C) e 7,00 ± 0,02 (20 °C).

Solução de tetraidroborato de sódio (NaBH₄) 0,1% m/v (Vetec, <http://www.vetecquimica.com.br>, Brasil) foi preparada diariamente em solução de hidróxido de sódio (NaOH, Vetec) 0,05% m/v.

Solução de ácido cítrico 10% (m/v) foi preparada a partir de ácido cítrico anidro (C₆H₈O₇, p.a., Synth, <http://www.labsynth.com.br>, Brasil), em água. A solução de sulfato ferroso amoniacal [Fe(NH₄)₂(SO₄)₂.6H₂O] (Vetec) utilizada como titulante para a determinação de Sb(V) por titulação potenciométrica, foi preparada em água na concentração de 0,05 mol L⁻¹.

Solução de ácido sulfúrico 98% m/m (H_2SO_4 , Vetec), utilizada na preparação do titulante para a determinação de Sb(V) por titulação potenciométrica, foi preparada em água na concentração de 50% (m/v).

Ácido orto-fosfórico (H_3PO_4) 85% m/m (Merck, p.a) foi utilizado na titulação potenciométrica para determinação de Sb(V).

A solução de bromato de potássio (KBrO_3 , Vetec), foi preparada em água e usada como titulante para determinação de Sb(III) por titulação volumétrica, na concentração de $0,00833 \text{ mol L}^{-1}$.

O indicador utilizado para titulação volumétrica de Sb(III) foi o alaranjado de metila ($\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_3\text{SNa}$, Merck, p.a).

4.3. MATERIAIS DIVERSOS

O separador G/L utilizado foi feito no Laboratório de Hialotecnica do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria.

Toda vidraria utilizada neste trabalho foi descontaminada por imersão em $\text{HCl } 6,0 \text{ mol L}^{-1}$ por um período de 48 h e, posteriormente, enxaguada com água.

Para a diluição e armazenamento das amostras foram utilizados frascos de polipropileno (Sarstedt, <http://www.sarstedt.com>, Alemanha) com capacidade máxima de 50 mL.

O pH das soluções foi determinado em potenciômetro digital (Metrohm, modelo 781 pH/Ion Meter, <http://www.metrohm.com>, Suíça), com resolução de 0,01 unidades de pH, equipado com eletrodo de vidro combinado (Metrohm, modelo 6.0258.010) e com sensor de temperatura.

Todas as pesagens foram feitas em uma balança digital Shimadzu, com resolução de 0,0001 g e capacidade de 220 g (modelo AY 220, <http://www.shimadzu.com>, Japão).

Para a determinação de Sb(V) por titulação potenciométrica, foi utilizado um titulador automático (modelo 836 Titrando, Metrohm) equipado com módulo de agitação magnética (modelo 803 Ti Stand, Metrohm) e eletrodo de platina (modelo 8.109.1306, Metrohm).

O controle da vazão do gás de arraste foi feito com um fluxômetro da *Key Instruments* (2A13, <http://www.keyinstruments.com>, EUA).

Para a quantificação da área dos picos cromatográficos foi utilizado o software *WINFAAS* (EUA).

As análises estatísticas foram feitas utilizando o *software* Graph Pad Software[®], Inc. (*Instat 2.1*).

4.4. AMOSTRA

O medicamento, antimoniato de meglumina, utilizado para o desenvolvimento do presente trabalho, é comercializado em ampolas de 5 mL com concentração declarada de 81000 mg L⁻¹ de antimônio pentavalente em solução aquosa. As amostras comerciais do medicamento serão denominadas neste trabalho de lotes “A” e “B”. As mesmas foram diluídas em água, sendo o fator de diluição de acordo com as características de cada técnica utilizada. Desta forma, as diluições foram de 50000x para FI-HG AAS, 100000x para FI-HG-ICP-MS, 200000x (coluna IonPac) e 400000x (coluna PRP-X100) para LC-ICP-MS, 10000x para LC-HG-ICP-MS, utilizando a coluna de troca aniônica IonPacAS14 e 4000x utilizando a coluna de troca aniônica PRP-X100. As diluições das amostras foram necessárias para minimizar os problemas de interferência da matriz, tendo em vista que o antimoniato de meglumina possui uma elevada concentração de Sb(V), bem como grande quantidade de matéria orgânica e a própria concentração do analito.

4.5. ESPECIAÇÃO DE Sb EMPREGANDO LC-ICP-MS

O sistema LC-ICP-MS empregado pode ser visualizado na Figura 7.

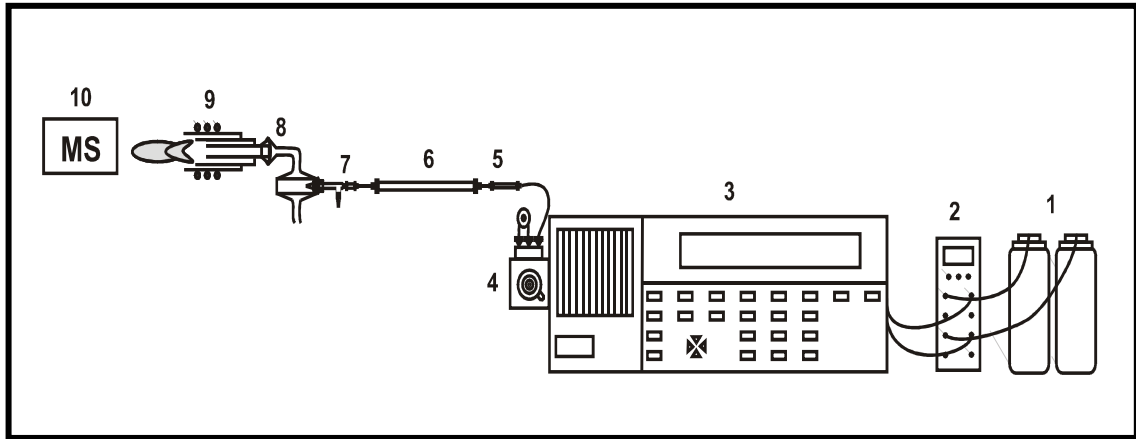


Figura 7. Sistema LC-ICP-MS. 1- fase móvel; 2- degaseificador a vácuo; 3- bomba de LC; 4- injetor e alça de amostragem; 5- coluna guarda (troca aniônica); 6- coluna de troca aniônica; 7- nebulizador; 8- câmara de nebulização; 9 e 10- ICP-MS.

4.5.1 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM NA SEPARAÇÃO DAS ESPÉCIES DE Sb

Para o ajuste dos principais parâmetros que influenciam na separação das espécies de Sb utilizando colunas de troca aniônica e para a obtenção do melhor desempenho do sistema LC-ICP-MS, foram utilizadas soluções de referência de Sb(III) e Sb(V) e soluções diluídas de antimoniato de meglumina.

Os estudos iniciais foram feitos com a coluna IonPac, sendo avaliados os seguintes parâmetros: tipo, concentração, pH, vazão e condição isocrática da eluição. Em função da separação das espécies de Sb e da elevada concentração de Sb(V) na amostra, foi feita uma avaliação da diluição adequada da amostra.

De acordo com dados da literatura,^{8,11,12,60,121,130} neste trabalho foram testados três tipos de fases móveis (EDTA, ftalato de potássio e a combinação de EDTA e ftalato de potássio) para avaliar a influência da interação da fase móvel com as espécies de Sb. Após a escolha da fase móvel, foi avaliada a influência da concentração entre 0,5 mmol L⁻¹ a 10 mmol L⁻¹. A vazão da fase móvel foi variada na faixa de 0,25 a 1,75 mL min⁻¹ com a finalidade de avaliar a influência na separação

das espécies de Sb. Para a separação das espécies de Sb, foi estudada a influência do pH na faixa de 3,5 a 7,0 sobre o tempo de retenção e ordem de eluição das espécies.

Com a finalidade de se obter melhor separação e tempo de eluição menor, a eluição foi avaliada no modo isocrático e gradiente.

4.6. DETERMINAÇÃO DE Sb EMPREGANDO FI-HG AAS

Para a determinação seletiva de Sb(III) foi desenvolvido um sistema de injeção em fluxo descrito no item 4.1.4 com geração de hidretos acoplada à espectrometria de absorção atômica descrito no item 4.1.3.2. O sistema FI-HG AAS proposto neste trabalho está representado na Figura 5.

4.6.1. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM NA DETERMINAÇÃO DE Sb(III) NO SISTEMA FI-HG AAS

Para o ajuste dos principais parâmetros que influenciam na determinação de Sb(III) e para a obtenção do melhor desempenho do sistema FI-HG AAS os seguintes parâmetros foram ajustados: concentração do redutor, concentração do ácido cítrico e tipo de carregador da amostra, assim como a vazão das soluções e do gás de arraste, o comprimento do percurso analítico e o volume de amostra injetada. Também, foi avaliada a influência da concentração do Sb(V) no sinal analítico para Sb(III), uma vez que na amostra há predominância do Sb(V). Para tanto, foram utilizadas, tanto soluções de referência de Sb(III) e Sb(V), quanto soluções diluídas de antimoniato de meglumina.

4.7. DETERMINAÇÃO DE Sb EMPREGANDO FI-HG-ICP-MS

Para a determinação de Sb foi utilizado o sistema desenvolvido e descrito no item 4.1.4. Foram, também, empregadas as mesmas condições do sistema FI-HG

AAS (item 4.6.1), exceto a vazão do gás de arraste (Ar). O sistema FI-HG-ICP-MS proposto neste trabalho está representado na Figura 6.

Os parâmetros operacionais do ICP-MS utilizados quando o sistema FI-HG foi acoplado ao ICP-MS são os mesmos descritos na Tabela 2, com exceção do número de leituras/replicata (700) e do *dwel time* (40 ms).

4.8. DETERMINAÇÃO DE Sb POR LC-HG-ICP-MS

Foram utilizadas as mesmas condições otimizadas do sistema FI-HG descrito no item 4.1.4 e LC-ICP-MS descrito no item 4.5, porém a geração de hidretos é feita de modo contínuo. O sistema LC-HG-ICP-MS proposto neste trabalho está representado na Figura 8.

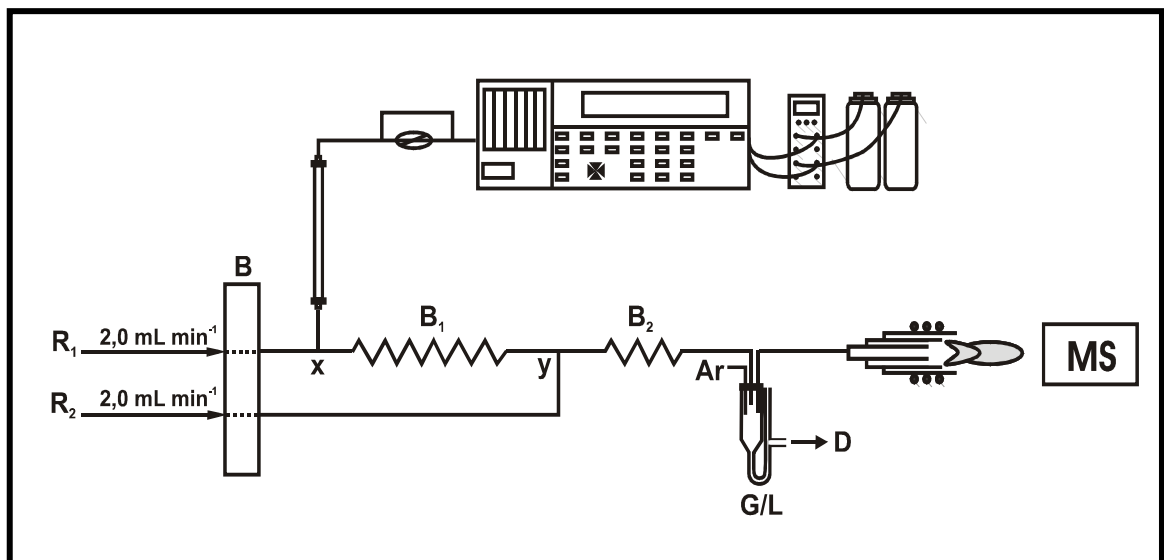


Figura 8. Sistema LC-HG-ICP-MS. Ver legendas das Figuras 5 e 7 para o significado das letras e números.

4.9. SEPARAÇÃO DAS ESPÉCIES DE Sb EMPREGANDO CPG-8HQ

Tendo-se em vista a complexação seletiva de Sb(III) com a 8HQ¹³⁵ foi feito um estudo para avaliar a possibilidade de reter seletivamente o Sb(III) em uma microcoluna com cerca de 10 mm de comprimento e com 3 mm de diâmetro interno. A coluna foi preenchida com 30 mg de CPG-8HQ. As variáveis que podem influenciar

no processo de retenção do Sb(III) na CPG-8HQ foram avaliados empregando soluções de referência de Sb e amostra adequadamente diluída. O eluato, bem como o resíduo obtido das soluções submetidas na coluna CPG-8HQ, após ajuste adequado do pH, foram injetados no cromatógrafo para avaliar a separação das espécies de Sb pela CPG-8HQ. Foram utilizadas duas colunas aniônicas, a PRP-X100 (LC-ICP-MS) e a IonPacAS14 (LC-HG-ICP-MS), sendo as condições cromatográficas empregadas descritas no item 5.1.3 e item 5.2, respectivamente.

4.10. MÉTODOS OFICIAIS DE DETERMINAÇÃO DE Sb(III), Sb(V) E Sb TOTAL EM ANTIMONIATO DE MEGLUMINA

4.10.1. Determinação da concentração de Sb total por F AAS

Segundo a Farmacopéia Brasileira,²⁸ a determinação de Sb total em antimoniato de meglumina é feita por F AAS conforme no item 4.1.3.1. A curva de calibração, na faixa de 10 a 40 mg L⁻¹ de Sb, foi feita a partir de solução estoque de Sb(III) a 1000 mg L⁻¹. A curva de calibração e as amostras (diluídas 2500x) foram preparadas em HCl 6,0 mol L⁻¹.

4.10.2. Determinação da concentração de Sb(III) por HG AAS

A determinação de Sb(III) no antimoniato de meglumina foi feita de acordo com a monografia da Farmacopéia Brasileira,²⁸ que recomenda o uso da HG AAS (descrito no item 4.1.3.2). Resumidamente, o método consiste da geração seletiva de Sb(III) na presença de Sb(V) pela complexação do Sb(V) com ácido cítrico. Ou seja, em determinadas condições, principalmente da concentração do redutor, do ácido cítrico e do tempo de reação de complexação, somente a estibina é gerada a partir de Sb(III).

A curva de calibração foi feita a partir da diluição adequada de uma solução estoque de Sb(III) a 1000 mg L⁻¹ em água. A solução de NaBH₄ a 1% (m/v) preparada e diluída com NaOH 0,1% (m/v) foi empregada para a geração de

hidretos. Para a geração de hidretos foram utilizados 10 mL de ácido cítrico a 4% (m/v), 500 µL da amostra diluída (50000x) ou soluções de referência de Sb. Após a adição da amostra no frasco de reação esperou-se exatamente 5s até adaptá-lo ao sistema HG. O sistema foi purgado com Ar durante 10s e então foi feita a medição do Sb(III).

4.10.3. Determinação da concentração de Sb(III) por método volumétrico e Sb(V) por método potenciométrico

Para a determinação de Sb(III) e Sb(V) no antimoniato meglumina injetável foi utilizado o procedimento descrito na Farmacopéia Britânica¹⁵³ para o fármaco estibogluconato de sódio, também utilizado no tratamento da leishmaniose. Para a determinação de Sb(III) foram utilizados 2 mL da amostra, adicionados de 30 mL de água e 15 mL de HCl concentrado. A titulação foi feita com bromato de potássio 0,0083 mol L⁻¹, utilizando alaranjado de metila como indicador.

Para a determinação de Sb(V) foram utilizados 0,5 mL da amostra, adicionados de 30 mL de HCl concentrado e 70 mL de ácido orto-fosfórico concentrado. A titulação foi feita com de sulfato de ferro(II) amoniacal 0,05 mol L⁻¹.

4.11. AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS MÉTODOS PROPOSTOS PARA A ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE Sb

Os métodos propostos foram avaliados através de teste de recuperação das espécies de Sb estudadas [Sb(III) e Sb(V)] no antimoniato de meglumina. Para a recuperação das espécies de Sb, foram adicionadas concentrações diferentes de cada espécie, dependendo da diluição empregada e da concentração de cada espécie de Sb previamente determinada.

4.12. RESUMO DOS MÉTODOS AVALIADOS PARA A DETERMINAÇÃO DE Sb(III) E Sb(V)

No fluxograma da Figura 9 estão mostradas, resumidamente, as principais etapas envolvidas na determinação de espécies de Sb no antimoniato de meglumina pelos diferentes métodos investigados.

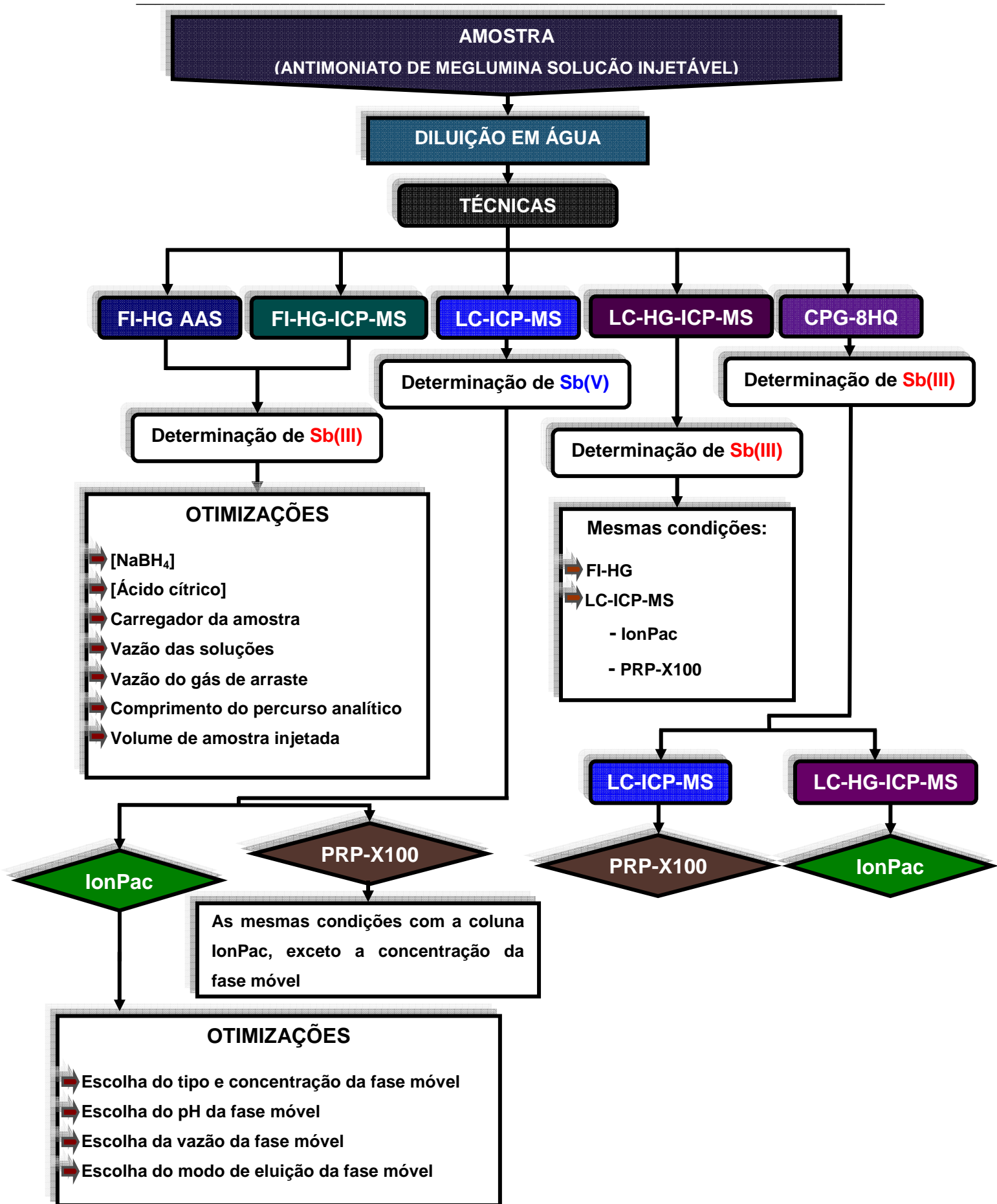


Figura 9. Métodos avaliados para a especiação de Sb em antimoniato de meglumine.

5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os tópicos relacionados aos ajustes das condições para o estudo de especiação de antimônio no antimoniato de meglumina. Será dada ênfase nas questões relacionadas aos procedimentos e técnicas empregados para separar e quantificar as espécies de Sb presentes na amostra. Com esta finalidade, foram utilizadas as técnicas de LC-ICP-MS, LC-HG-ICP-MS, FI-HG AAS e FI-HG-ICP-MS. Além disso, foi avaliada a separação do Sb(III) do Sb(V) empregando a CPG-8HQ.

Diversas técnicas foram avaliadas para a especificação de Sb em antimoniato de meglumina devido à dificuldade na determinação seletiva das espécies de Sb presentes na amostra, principalmente em decorrência da elevada concentração do Sb(V) em relação ao Sb(III), onde os sinais são parcialmente ou totalmente sobrepostos nas análises cromatográficas. Assim, foram feitas investigações sobre a separação das espécies de Sb empregando sistemas cromatográficos e não-cromatográficos. Em todos os casos, foram feitas avaliações detalhadas dos parâmetros que influenciam na separação das espécies de Sb. Resultados obtidos empregando métodos oficiais (determinação de Sb(III) por HG AAS e Sb total por F AAS segundo a Farmacopéia Brasileira²⁸ e determinação de Sb(III) por titulação volumétrica e Sb(V) por titulação potenciométrica segundo a Farmacopéia Britânica¹⁵³) foram empregados para comparar os resultados.

5.1. AJUSTE DO SISTEMA LC-ICP-MS

5.1.1. Ajuste do instrumento de ICP-MS

Todas as medições de Sb por ICP-MS foram feitas monitorando o ¹²¹Sb, isótopo mais abundante e com menor possibilidade de interferências espectral. O instrumento de ICP-MS foi inicialmente ajustado no modo convencional de introdução de soluções (nebulização pneumática), com a finalidade de obter máxima sensibilidade, conforme descrito no item 4.1.1. Quando o sistema de LC foi acoplado ao instrumento de ICP-MS, a otimização de cada parâmetro foi feita separadamente, onde a vazão da solução introduzida no nebulizador foi fixada em 1,50 mL min⁻¹ e a potência da radiofrequência em 1300 W. A vazão do gás de nebulização foi avaliada de 0,90 a 1,30 L min⁻¹ e fixada em 1,12 L min⁻¹, considerando a vazão onde se obteve a melhor razão sinal/ruído para o Sb.

5.1.2. Especificação de Sb empregando sistema LC-ICP-MS

Neste caso, o acoplamento LC-ICP-MS foi feito diretamente, ou seja, a saída da coluna de troca aniônica foi conectada ao nebulizador pneumático do instrumento. O tipo, concentração, pH, vazão e condição da eluição isocrática foram avaliados de forma a obter o melhor desempenho na separação e quantificação das espécies de Sb. O volume injetado de solução foi de 200 μ L para todos os testes realizados. Em função da separação das espécies de Sb e da elevada concentração de Sb(V) na amostra, foi feita uma avaliação em relação à diluição da amostra, após as otimizações feitas com soluções de referência de Sb. Os estudos iniciais foram feitos para amostra e soluções de referência diluídas na fase móvel (EDTA), tomando-se como base os parâmetros estabelecidos por Miekeley *et al.*⁶⁰ No entanto, amostra e soluções de referência foram diluídas em água, uma vez que não apresentou mudança no perfil do sinal cromatográfico, quando as mesmas foram diluídas em água, ao invés de EDTA.

5.1.2.1. Escolha da coluna de troca aniônica

Na cromatografia de íons, a separação é dependente da afinidade das espécies pela fase estacionária de acordo com as características da mesma, como a estrutura molecular, polaridade e carga, além das características do próprio analito. Em relação ao Sb, de acordo com dados da literatura^{8-10,12}, ainda há algumas características que não estão totalmente esclarecidas para as espécies inorgânicas de Sb presentes em soluções aquosas. O Sb(V) é facilmente solúvel em água, o qual está presente como hexaidróxido de antimônio ($[\text{Sb}(\text{OH})_6]^-$, pK_a 2,7). O Sb(III) apresenta um comportamento que indica a formação de um composto não dissociada, a qual está presente como triidróxido de antimônio $[\text{Sb}(\text{OH})_3]$. A forma Sb_2O_3 é solúvel somente na presença de certos ácidos orgânicos, como o ácido tartárico, onde forma o complexo $[\text{Sb}_2(\text{C}_4\text{O}_6\text{H}_2)_2]^{2-}$. Assim, em soluções aquosas de pH 2,7 a 10,4, o Sb(V) possui uma carga negativa e o Sb(III) é uma espécie neutra, a não ser quando este forma complexo com ácidos orgânicos. Assim, a separação de Sb(V) e Sb(III) pode ser facilmente realizada com coluna de troca aniônica.¹²¹

A partir de dados da literatura^{8,12,14,120,130} sobre a separação das espécies inorgânicas de Sb, optou-se por avaliar o desempenho da coluna de troca aniônica (IonPac) para a especiação de Sb, por permitir trabalhar em ampla faixa de pH (0 a 12), por resistir a pressões relativamente altas e baseado nas possíveis espécies de Sb presentes no antimoniato de meglumina.

5.1.2.2. Escolha do tipo e concentração da fase móvel

Primeiramente, foi avaliada a fase móvel, já que essa influencia na separação das espécies de Sb. Além disso, a fase móvel deve ser compatível com a técnica empregada (ICP-MS). Neste sentido, geralmente evita-se utilizar fases móveis com alto teor de sais (> 2% de sólidos totais dissolvidos), uma vez que pode ocasionar o entupimento do nebulizador e deposição de sais na interface, alterando a transmissão dos íons no decorrer da análise. Também, foi evitado o uso de solventes orgânicos como fase móvel, pois causam instabilidade no plasma, podendo extingui-lo, e deposição de carbono na interface.^{18,95,126,154} Assim, foram testadas soluções de EDTA, ftalato de potássio, EDTA + ftalato de potássio como fase móvel.^{11,12,27,60,121,130-132} Na Figura 10 são mostrados os cromatogramas obtidos a partir de soluções referência de Sb e da amostra, com as três fases móveis.

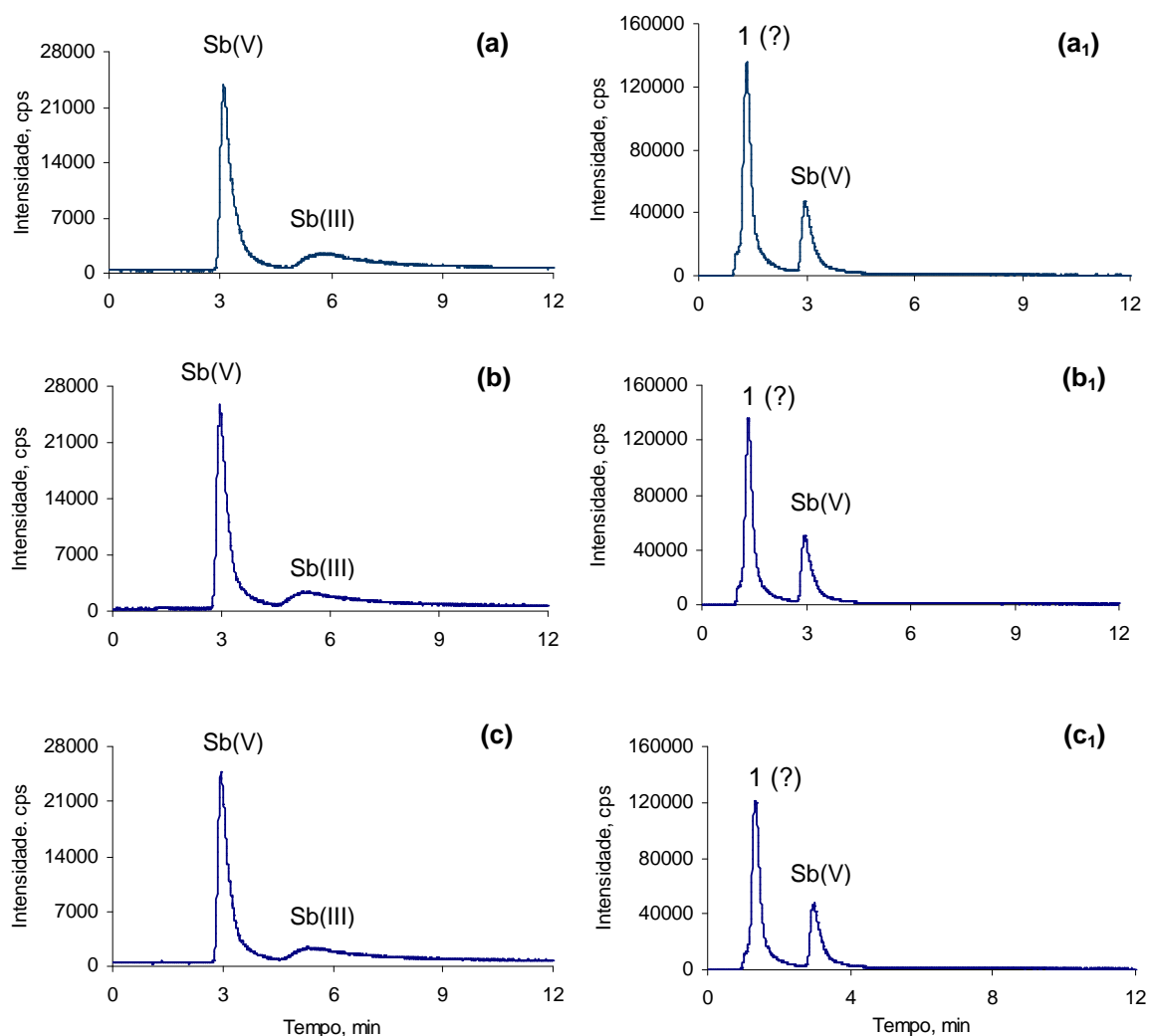


Figura 10. Influência da fase móvel na separação das espécies de Sb com coluna IonPac. Cromatogramas obtidos a partir de soluções contendo $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(V) + $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(III) e amostra diluída 2000000x; pH 4,5 da fase móvel. (a) e (a₁) EDTA $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$; (b) e (b₁) ftalato de potássio $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$; (c) e (c₁) EDTA $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ + ftalato de potássio $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$. (a), (b) e (c) soluções de referência e (a₁), (b₁) e (c₁) amostras.

Como pode ser observado na Figura 10, os cromatogramas são bastante semelhantes para as três fase móveis testadas, levando a uma boa separação, tanto da amostra com das soluções contendo Sb(III) e Sb(V). Entretanto, com o EDTA como fase móvel, a repetitividade (em relação ao tempo de retenção das espécies de Sb) é melhor. Comportamento semelhante também foi reportado em outros trabalhos.^{11,12,15,60,130}

Como mostrado na Figura 10(a), (b) e (c), a espécie com maior tempo de retenção é o Sb(III), apresentando picos menos simétricos, com cauda.

Possivelmente a interação do Sb(V) com a fase estacionária da coluna é mais fraca, conseqüentemente apresentando picos mais estreitos e menor tempo de retenção. Provavelmente estas características são decorrentes da formação de complexos entre as espécies inorgânicas de Sb com o EDTA, sendo que o complexo EDTA-Sb(III) possui maior densidade de carga (carga 2-), enquanto que o complexo EDTA-Sb(V) possui menor densidade (carga 1-).^{8-9,12} Além disso, o número de coordenação do Sb(V) é 6 e a geometria é octaédrica, o que pode levar a interações mais fracas com a resina, permitindo uma eluição mais fácil. Por outro lado, como o Sb(III) está complexado com o tartarato e possui número de coordenação 4, a interação com a resina é mais forte, aumentando o tempo de retenção e o pico é mais alargado. Também, deve-se salientar que o Sb(III) utilizado neste trabalho, mesmo estando complexado com tartarato de potássio, pode ser complexado pelo EDTA. É importante mencionar que as espécies de Sb podem ser interconvertidas, onde o Sb(III) é facilmente oxidado à Sb(V). Portanto, apesar da solução referência de Sb(III) estar na forma de tartarato, o EDTA pode complexá-lo e conseqüentemente auxiliar na preservação das espécies em solução.¹²¹ Entretanto, para as três fases móveis testadas pode-se observar que o tempo de retenção dos dois picos obtidos para a amostra é bem inferior ao tempo de retenção obtido para o Sb(III) e Sb(V) nas soluções de referência. Este comportamento pode ser ocasionado devido à forma com que as espécies estão presentes na amostra, possivelmente como complexos. Inclusive a interação do Sb relativo ao primeiro sinal deve ser muito fraca, pois é eluído logo após o volume morto da coluna. Também, em princípio, poder-se-ia inferir que o segundo pico da amostra corresponde ao Sb(V).

Como com o EDTA obtiveram-se melhores características de separação, optou-se por trabalhar com esta fase móvel. Assim, foi avaliada a influência da sua concentração na separação das espécies de Sb. Os resultados estão mostrados na Figura 11.

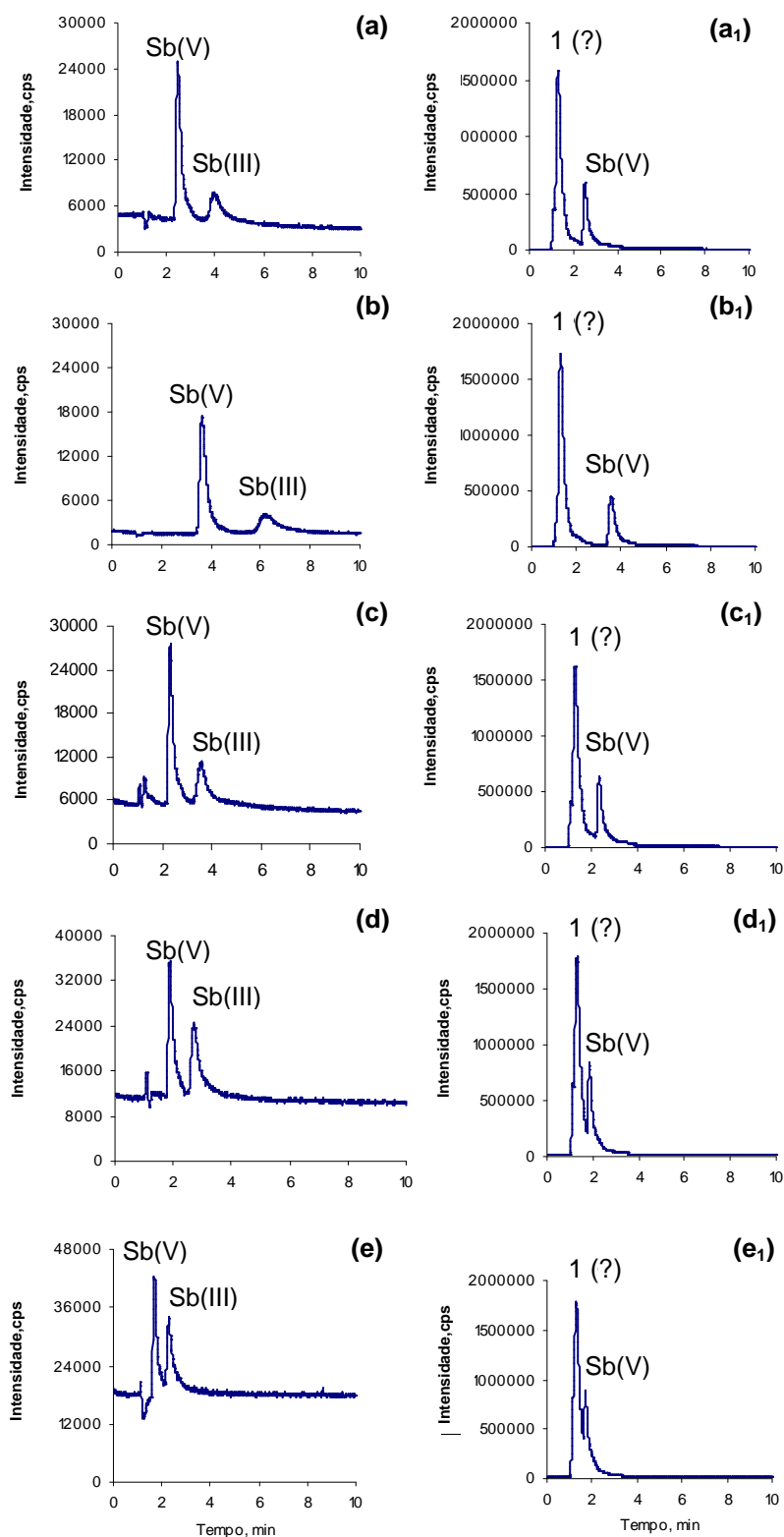


Figura 11. Influência da concentração do EDTA na fase móvel (pH 4,5) na separação das espécies de Sb com a coluna IonPac. Cromatogramas obtidos a partir de soluções contendo $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(V) + $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(III) e amostra diluída 2000000x. (a) e (a₁) EDTA 0,2 mmol L⁻¹; (b) e (b₁) EDTA 0,5 mmol L⁻¹; (c) e (c₁) EDTA 1,0 mmol L⁻¹; (d) e (d₁) EDTA 4,0 mmol

L^{-1} ; (e) e (e₁) EDTA 8,0 mmol L^{-1} . (a), (b), (c), (d) e (e) soluções de referência e (a₁), (b₁), (c₁), (d₁) e (e₁) amostras.

De acordo com a Figura 11, pode-se observar que a concentração de EDTA que leva a uma melhor separação e resolução dos picos, tanto para as soluções de referência de Sb, quanto para a amostra, foi de 0,5 mmol L^{-1} [Figura 11 (b) e (b₁)]. Dessa forma, optou-se por usar EDTA 0,5 mmol L^{-1} para os estudos subsequentes.

5.1.2.3. Escolha da vazão da fase móvel

A vazão da fase móvel pode influenciar na separação das espécies e, além disso, deve ser compatível com o sistema de introdução de amostra no plasma. Na Figura 12 são mostrados os cromatogramas obtidos para soluções de referência e amostra em diferentes vazões da fase móvel. Melhor separação das espécies de Sb foi observada com vazão de 1,5 mL min^{-1} . Além disso, com esta vazão, a resposta do instrumento não foi prejudicada. Vazões maiores de 1,75 mL min^{-1} , não foram testadas, pois a pressão do sistema aumenta muito (pressão da coluna superior a 2850 psi), o que pode danificar a coluna. Como pode ser observado na Figura 12, em vazões baixas há um aumento no tempo de retenção e na largura dos picos, não ocorrendo uma melhor separação entre as espécies.

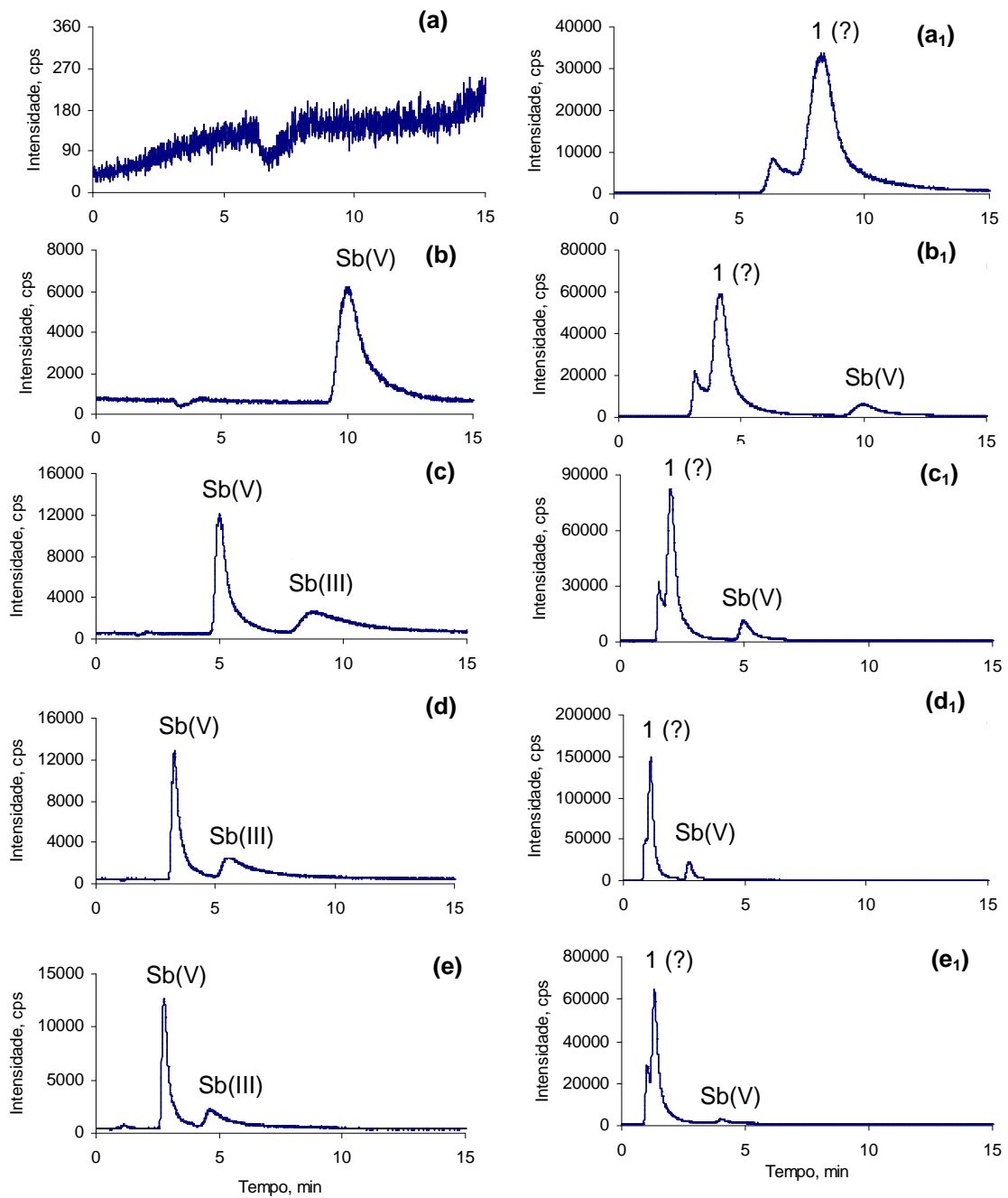


Figura 12. Influência da vazão da fase móvel (EDTA 0,5 mmol L⁻¹, pH 4,5) na separação das espécies de Sb com a coluna IonPac. Cromatogramas de solução referência de 5 µg L⁻¹ de Sb(V) + 5 µg L⁻¹ de Sb(III) e amostra diluída 2000000x, respectivamente, da fase móvel. (a) e (a₁) vazão da fase móvel de 0,25 mL min⁻¹; (b) e (b₁) 0,50 mL min⁻¹; (c) e (c₁) 1,0 mL min⁻¹; (d) e (d₁) 1,5 mL min⁻¹ e (e) e (e₁) 1,75 mL min⁻¹.

5.1.2.4. Escolha do pH da fase móvel

A retenção de espécies de Sb em coluna de troca iônica também é influenciada pelo pH. Isto é, o pH altera a força iônica da fase móvel, podendo modificar o processo de separação, bem como influencia a forma em que as espécies de Sb se encontram em solução. Ou seja, a distribuição das espécies inorgânicas de Sb depende do pH do meio.²⁷ Assim, a carga do complexo Sb(III)-tartarato, em $\text{pH} < 3$, permanece com uma carga negativa, não separando do Sb(V). Em pH entre 3 e 7, o Sb(III) forma um complexo com duas cargas negativas, possivelmente, na proporção de um átomo de Sb para duas moléculas de tartarato. Em $\text{pH} > 7$ forma moléculas carregadas e aglomeradas que são difíceis de serem eluídos da coluna.²⁷ Na Figura 13 são mostrados os cromatogramas obtidos para soluções de referência e amostra em diferentes pH da fase móvel.

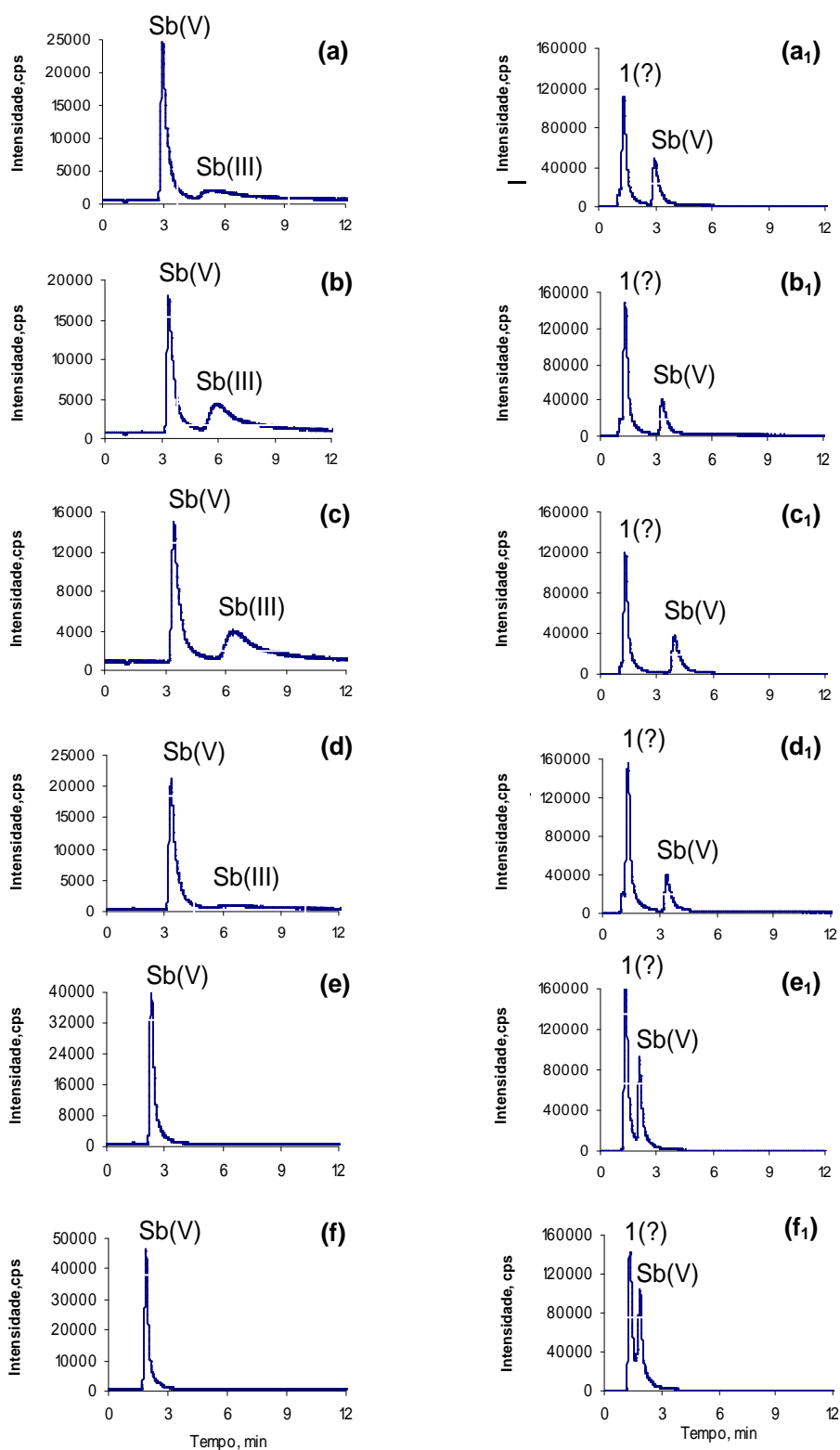


Figura 13. Influência do pH da fase móvel (EDTA 0,5 mmol L⁻¹) na separação das espécies de Sb com a coluna IonPac. Cromatogramas de solução referência de 5 µg L⁻¹ de Sb(V) + 5 µg L⁻¹ de Sb(III) e amostra diluída 2000000x, respectivamente. (a) e (a₁) pH da fase móvel de 3,5; (b) e (b₁) 4,0; (c) e (c₁) 4,5; (d) e (d₁) 5,0; (e) e (e₁) 6,0; (f) e (f₁) 7,0. (a), (b), (c), (d), (e) e (f) soluções de referência e (a₁), (b₁), (c₁), (d₁), (e₁) e (f₁) amostras.

De acordo com os resultados obtidos em relação ao pH da fase móvel, foi observado que a melhor faixa é entre 4,0 e 5,0, tanto para as soluções de referência como amostra. Para a amostra em $\text{pH} > 5,0$, a separação das espécies é prejudicada, e para as soluções de referência, os sinais estão praticamente sobrepostos. Acredita-se na possibilidade de oxidação do Sb(III) para Sb(V), já que o sinal para o Sb(III), diminuiu consideravelmente e aumentou para Sb(V). Comportamento semelhante foi observado por Morita *et al.*¹³³

Dessa forma, o pH escolhido foi 4,5, sendo este o mais adequado para separação de espécies de Sb, tanto para as soluções de referência, quanto para a amostra. Alguns autores^{8-10,12-13} recomendam a faixa de pH entre 3,0 e 7,0 como a mais apropriada para separar espécies de antimônio por cromatografia de íons. A mesma observação foi feita por Zheng *et al.*¹³² quando estudaram o efeito do pH na separação das espécies de antimônio. A espécie Sb(V) não apresentou mudanças no tempo de retenção e na área do pico nesta faixa de pH. Para a espécie Sb(III), o tempo de retenção permaneceu constante na faixa de pH entre 2,0 e 7,0 enquanto que, em pH 9,0, observaram uma mudança no tempo de retenção e diminuição da área do pico de 10%. Isto foi atribuído a uma possível oxidação do Sb(III) para Sb(V). No entanto, outros trabalhos foram feitos utilizando os mesmos valores de pH.^{27,121} Porém, segundo Lintschinger *et al.*¹²¹ a melhor faixa de pH para a separação de espécies de Sb, utilizando EDTA como fase móvel, é de 4,3 a 5,0. Isto é, a mesma conclusão que foi obtida no presente trabalho.

5.1.2.5. Escolha do modo de eluição da fase móvel

A eluição das espécies de Sb da coluna foi avaliada no modo isocrático e gradiente. No modo gradiente, a separação das espécies de Sb foi melhor, conforme pode ser observado na Figura 14. Porém, não foi possível a quantificação das espécies, pois a integração da área do pico é dificultada porque a linha base é bastante instável. Com eluição no modo isocrático, obteve-se boa separação das espécies e a linha base foi estável durante o tempo de eluição, favorecendo a integração da área do pico. Dessa forma, a eluição isocrática foi preferida à eluição gradiente.

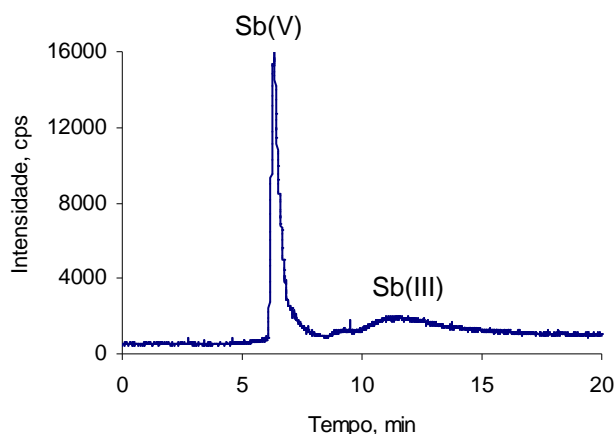


Figura 14. Influência do modo de eluição (gradiente) com a coluna IonPac. EDTA (pH 4,5), condição de eluição: 0,5 mmol L⁻¹/10 min; 10 mmol L⁻¹/10 min. Cromatograma de solução referência de Sb(V) 5 µg L⁻¹+ Sb(III) 5 µg L⁻¹.

5.1.2.6. Condicionamento da coluna cromatográfica

Para uma separação reprodutível das espécies de Sb foi necessária uma etapa de condicionamento da coluna cromatográfica, pois, ao contrário, foi observado que a linha base aumentava com o tempo. Isto ocorre, possivelmente, devido ao tempo insuficiente de eluição de constituintes da amostra provenientes da análise anterior. Tendo em vista este efeito, foi necessário condicionar a coluna por cerca de 5 min com a fase móvel.

Depois de feitos os ensaios descritos anteriormente e a escolha das condições experimentais mais adequadas para a separação das espécies de Sb, estas foram aplicadas para a quantificação das espécies de Sb na amostra. Na Tabela 3 estão relacionados os parâmetros e as condições utilizadas para especificação de Sb em antimoniato de meglumina por LC-ICP-MS. Na Figura 15 estão mostrados os cromatogramas obtidos nestas condições.

Tabela 3. Parâmetros operacionais para o instrumento de LC, empregando coluna de troca aniônica IonPac.

Parâmetros	Condições
Coluna	IonPacAS14, Dionex (250 x 4,0 mm d.i., 9 µm de diâmetro de partícula)
Fase Móvel	EDTA 0,5 mmol L ⁻¹ , pH 4,5, isocrática
Vazão da Fase Móvel	1,5 mL min ⁻¹
Volume de Amostra	200 µL
Pressão	2500 psi

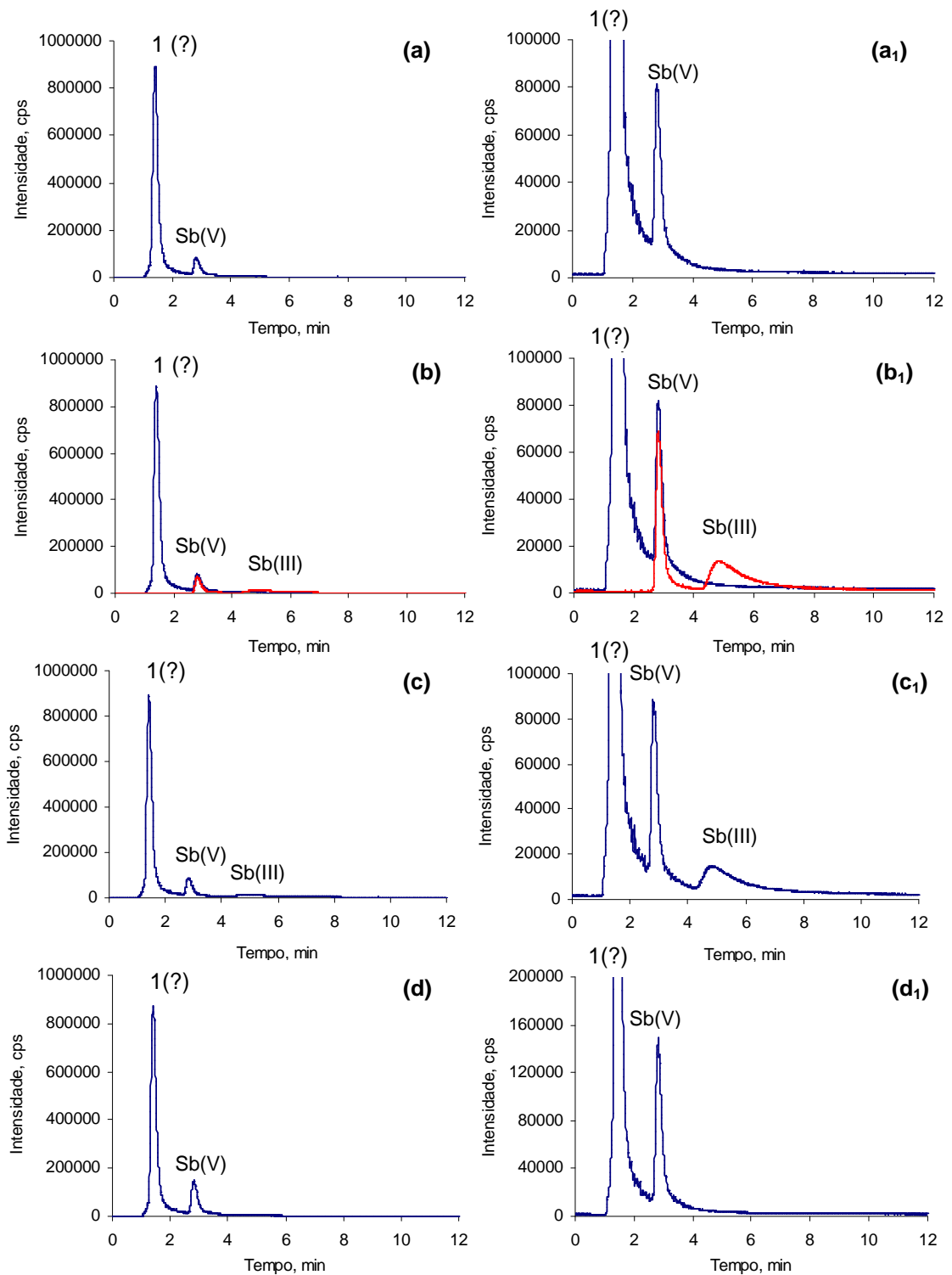


Figura 15. Cromatogramas obtidos após a otimização das condições para especiação de Sb em antimoniato de meglumina com a coluna IonPac. (a) amostra diluída 200000x; (a₁) idem (a) e ampliação de 10x; (b) sobreposição de amostra diluída 200000x (em azul) e solução referência de 30 µg L⁻¹ de Sb(V) + 30 µg L⁻¹ de Sb(III) (em vermelho); (b₁) idem (b) e ampliação de 10x; (c) amostra + 30 µg L⁻¹ de Sb(III); (c₁) idem (c) e ampliação de 10x; (d) amostra + 30 µg L⁻¹ de Sb(V); (d₁) idem (d) e ampliação de 5x.

Após os ajustes dos parâmetros cromatográficos, o método foi aplicado para a análise do medicamento, onde se observou uma boa separação dos picos das espécies de Sb. Além disso, observou-se que o tempo de retenção do primeiro pico de Sb na amostra não corresponde a nenhuma das espécies usadas como referência [Sb(V) e Sb(III)]. Somente o segundo pico da amostra, conforme mostrado na Figura 15, tem o tempo de retenção semelhante com o Sb(V) da solução de referência e, aparentemente, não há sobreposição com outra espécie. Mesmo assim, não se tem certeza que realmente este sinal corresponde ao Sb(III).

Tendo em vista estas observações e limitações quanto à quantificação das espécies de Sb, foi testada a coluna de troca aniônica PRP-X100. Esta coluna, como foi mencionada anteriormente no item 4.1.2, apresenta maior força de troca aniônica do que a coluna IonPac. Com isto espera-se uma melhor separação das espécies de Sb.

5.1.3. Coluna de troca aniônica PRP-X100

Os testes iniciais com a coluna PRP-X100 foram feitos nas mesmas condições anteriores (Tabela 3), exceto a concentração da fase móvel que foi ajustada para tentar obter a melhor separação das espécies de Sb. A concentração da fase móvel escolhida foi de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de EDTA, porém foi necessário diluir a amostra 400000x para não exceder a capacidade de troca aniônica da coluna. Na Tabela 4 são mostradas as condições instrumentais utilizadas para a especiação de Sb no antimoniato de meglumina, empregando a coluna de troca aniônica PRP-X100.

Tabela 4. Parâmetros operacionais para o instrumento de LC, empregando coluna de troca aniônica PRP-X100.

Parâmetros	Condições
Coluna	PRP-X 100, Hamilton (250 x 4,1 mm d.i., 10 µm de diâmetro de partícula)
Fase Móvel	EDTA 1,0 mmol L ⁻¹ , pH 4,5, isocrática
Vazão da Fase Móvel	1,5 mL min ⁻¹
Volume de Amostra	200 µL
Pressão	1500 psi

Na Figura 16 são mostrados os cromatogramas obtidos empregando as condições descritas na Tabela 4.

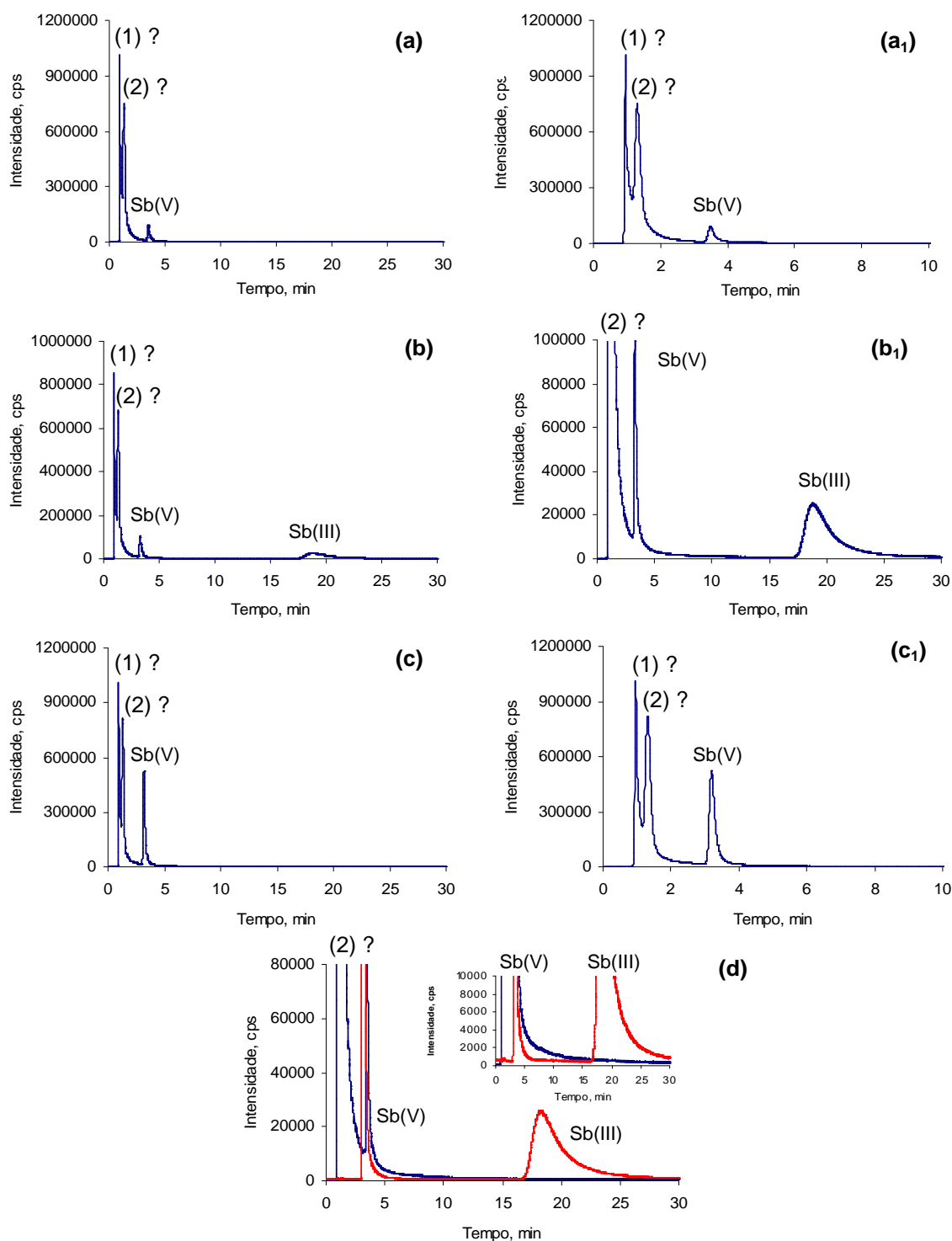


Figura 16. Cromatogramas obtidos empregando a coluna PRP-X100 para especificação de Sb em antimoniato de meglumina. (a) amostra diluída 400000x; (a₁) idem (a) e ampliação de 3x na escala de tempo; (b) amostra + 50 µg L⁻¹ de Sb(III); (b₁) idem(b) e ampliação de 10x; (c) amostra + 50 µg L⁻¹ de Sb(V); (c₁) idem (c) e ampliação de 10x; (d) sobreposição de amostra diluída 400000x (em azul)-ampliação de 15x e solução referência de 50 µg L⁻¹ de Sb(V) + 50 µg L⁻¹ de Sb(III) (em vermelho) e ampliação de 15x e o mesmo cromatograma com ampliação de 120x.

De acordo com os cromatogramas mostrados na Figura 16, pode-se observar que o perfil cromatográfico dos picos com coluna PRP-X100 é diferente àqueles obtidos com a coluna IonPac. Alterações nos tempos de retenção das espécies de Sb e separação parcial do primeiro pico em dois picos foram observadas. Possivelmente, esta separação é devida à presença de mais do que uma espécie de Sb. Este comportamento já tinha sido verificado em outros trabalhos e pode ser atribuído à presença de espécies de complexos de Sb.⁶⁰

Para tentar identificar as espécies de Sb na amostra, adicionou-se quantidades conhecidas de solução de referência de Sb(V) e Sb(III), separadamente. Os resultados estão mostrados nos cromatogramas da Figura 16 (b), (b₁), (c) e (c₁). Pode-se verificar que nenhuma das espécies presentes na amostra tem o mesmo tempo de retenção do Sb(III). Na Figura 16(c) e (c₁) está mostrado o cromatograma obtido após a adição de Sb(V). Como pode ser visto, há um aumento da altura do terceiro pico, devido à sobreposição com o pico do Sb(V) na Figura 16(d). Portanto, possivelmente este pico na amostra é devido à presença de Sb(V).

Tendo em vista, o pequeno tempo de retenção do primeiro pico, foi necessário verificar o tempo morto do sistema cromatográfico. Para tal, foi utilizado lítio (Li). O primeiro pico (t_R 0,96 min) e o segundo pico (t_R 1,3 min) foram eluídos muito próximo do tempo de retenção Li (t_R 1,04 min). Isto indica que na amostra, possivelmente, há presente uma mistura de espécies Sb de natureza catiônica ou neutra, com fraca interação com a coluna.

É importante salientar que pode haver interferência em espécies que saem no tempo morto, ou próximo deste, quando da presença de elementos como o sódio. Neste caso, geralmente, há a supressão do sinal. No caso da amostra estudada, apesar da presença de metabissulfito de sódio (utilizado na formulação do fármaco), a concentração é relativamente baixa para interferir. O próprio EDTA, usado como fase móvel, contém sódio. Foi observado que durante a eluição o plasma muda de cor, ficando amarelo claro. Entretanto, a concentração de sódio não foi suficiente para ocasionar uma alteração na sensibilidade do instrumento de ICP-MS, bem como afetar na separação das espécies de Sb. Krachler *et al.*¹² avaliaram a influência do Na no tempo de retenção das espécies de Sb, já que este está presente em concentrações relativamente elevadas na amostra estudada (urina). Foi observado que o Na, por ser um cátion, foi eluído da coluna de troca aniônica no

tempo morto. Também, como a concentração de Na é elevada na amostra, o plasma fica com coloração amarela quando esta chega no plasma.

Como mencionado anteriormente, a coluna PRP-X100 é uma resina de troca aniônica mais forte do que a IonPac. Possivelmente devido a estas características da coluna obteve-se uma melhor separação entre o segundo e o terceiro pico da amostra, o que também foi verificado por Krachler *et al.*¹². Porém, o primeiro pico não foi adequadamente separado em relação ao segundo pico.

Como foi constatado (a partir do tempo de retenção) há uma possível presença de diferentes espécies de Sb(V) na amostra. Desta forma, fez-se uma investigação no sentido de tentar identificar as espécies do primeiro e segundo picos, bem como do Sb(III). Para tal, partindo do princípio que a 8-hidroxiquinolina forma complexo somente com Sb(III),¹³⁵ esta foi usada com objetivo de separar esta espécie da amostra, antes da análise por cromatografia. Esta avaliação está descrita na seção 5.1.4.

5.1.4. Separação das espécies de Sb empregando CPG-8HQ

Uma vez que a 8-HQ forma complexo preferencialmente com Sb(III), foi avaliada a possibilidade de reter seletivamente esta espécie numa coluna contendo a CPG-8HQ. Para tanto, um determinado volume da solução de referência de Sb ou amostra diluída foram processadas na coluna. O resíduo e o eluato (eluição do Sb(III) feita com HCl 2 mol L⁻¹) foram analisados por cromatografia. Em princípio só o Sb(V) e suas espécies devem estar presentes no resíduo obtido após separação na coluna CPG-8HQ. Ao contrário, somente o Sb(III) ou suas espécies devem estar presentes no eluato da coluna CPG-8HQ.^{155,156} As condições empregadas para a separação das espécies de Sb com a CPG-8HQ estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5. Condições utilizadas para a separação de Sb(III) empregando a CPG-8HQ.

Parâmetros	Condições
Vazão da solução amostra	1,2 mL min ⁻¹
Tempo de condicionamento da coluna	3 min com água
Tempo de pré-concentração	5 min
Limpeza do sistema	1 min com água
Eluição do Sb(III)	HCl 2 mol L ⁻¹
pH da amostra	5,8

Na Figura 17 são mostrados os cromatogramas obtidos do eluato e do resíduo da coluna CPG-8HQ, após ajuste adequado do pH destas soluções.

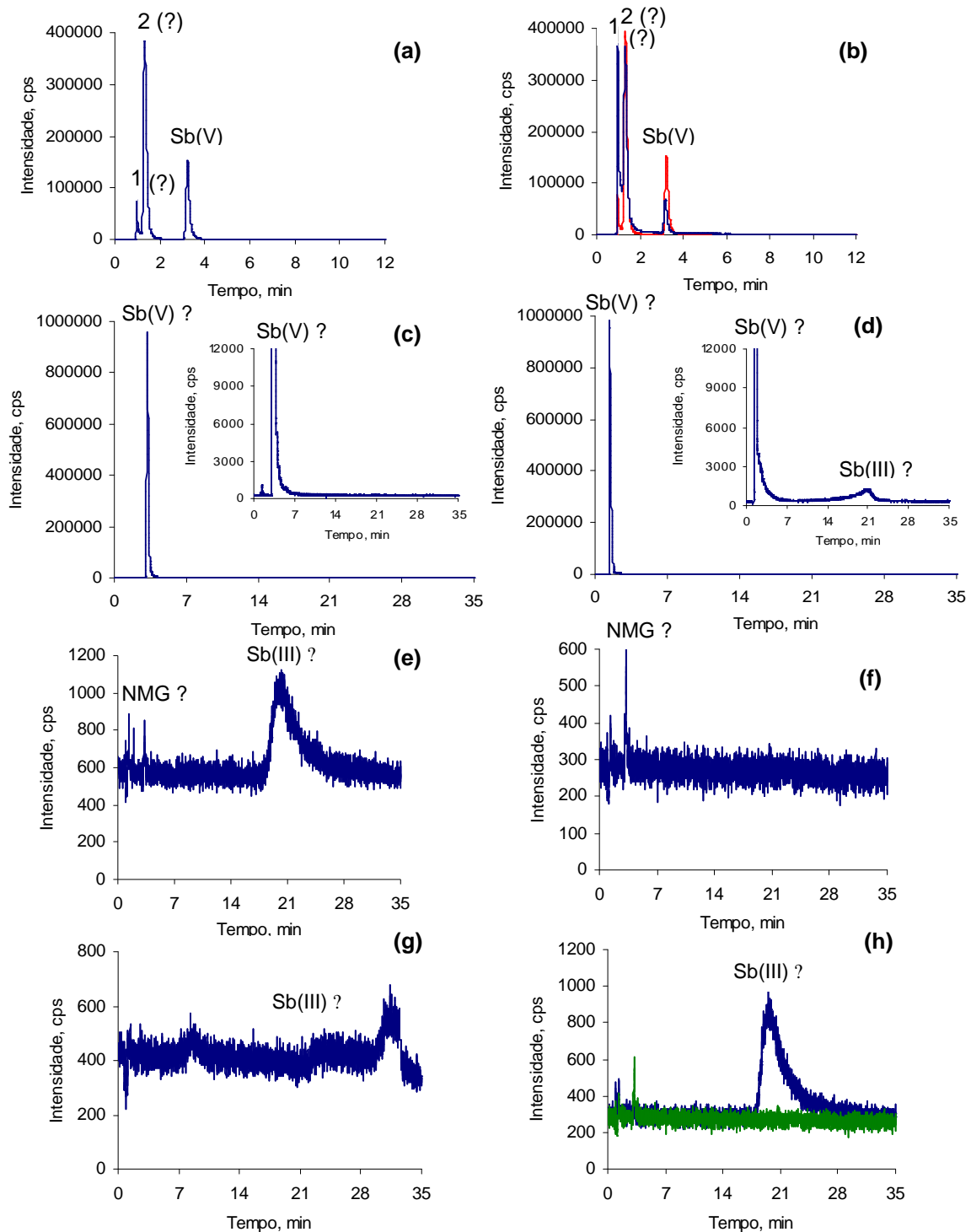


Figura 17. Cromatogramas obtidos com coluna PRP-X100 após tratamento das soluções de referência e amostra com a CPG-8HQ. (a) resíduo da coluna obtido da solução amostra diluída 400000x, após submetida na CPG-8HQ; (b) sobreposição da amostra (azul) + resíduo da coluna obtido da solução amostra submetida na CPG-8HQ (vermelho); (c) resíduo da coluna obtido da solução de referência de Sb(V) + Sb(III) submetida na CPG-8HQ e ampliação de 83x; (d) eluato (coluna CPG-8HQ) da solução referência de Sb(V) + Sb(III) e ampliação de 83x; (e) solução referência de Sb(III) + NMG diluída 200000x

injetada direto no cromatógrafo; (f) resíduo da coluna obtido da solução referência de Sb(III) + NMG diluída 200000x após submetida na CPG-8HQ; (g) eluato da coluna obtida da solução referência de Sb(III) + NMG diluída 200000x após submetida na CPG-8HQ; (h) sobreposição de solução referência de Sb(III) + NMG diluída 200000x (azul) com aquecimento e injetado direto no cromatógrafo e solução referência de Sb(III) + NMG diluída 200000x (verde) sem aquecimento e após submetida na CPG-8HQ e ampliação de 40x.

Conforme mostrado na Figura 17(a) pode-se concluir que houve uma redução significativa do pico duplo (pico 1). Entretanto, a outra parte deste pico duplo (pico 2) foi parcialmente reduzida, indicando que pode ser um complexo de Sb(III), o que possivelmente dificulta a complexação do Sb(III) pela 8-HQ e conseqüente retenção na CPG-8HQ. Dessa forma, podemos inferir que estes dois picos possivelmente são espécies de complexos de Sb(III) e Sb(V). No entanto, no cromatograma 17(b) pode-se observar que a sobreposição da amostra sem submeter à CPG-8HQ (azul) e o resíduo da coluna obtido da amostra submetida na coluna (vermelho) tem o mesmo perfil cromatográfico. O tempo de retenção também é praticamente o mesmo, confirmando o que foi observado no cromatograma da Figura 16, ou seja, a possível existência da espécie Sb(III) na forma de complexo. Também, no pico representado como sendo Sb(V), não houve modificações significativas após submeter à amostra na CPG-8HQ. No cromatograma 17(c), que representa a condição onde a solução de referência de Sb(V) + Sb(III) foi submetida na coluna de CPG-8HQ, pode-se observar que o Sb(III) ficou totalmente retido na coluna. No entanto, o Sb(V) não ficou retido na coluna CPG-8HQ, conforme pode ser observado pelo cromatograma. No cromatograma 17(d), correspondente ao eluato do material retido na coluna CPG-8HQ após processar a solução de referência de Sb(III) + Sb(V), pode-se observar um pico no mesmo tempo de retenção do Sb(V) e outro no do Sb(III). O sinal para o Sb(III) mostra que esta espécie foi retida na CPG-8HQ e o Sb(V) foi eluído provavelmente devido a efeito de memória.

Após estes resultados e para avaliar a possível influência da meglumina na retenção e separação das espécies de Sb, foi feita uma solução contendo Sb(III) + NMG (260 g L^{-1} , diluída 200000x, o que corresponde à composição da amostra de antimoniato de meglumina) e submetida à análise. No cromatograma 17(e) está mostrado o resultado obtido na análise direta da solução por LC-ICP-MS. O pico observado no cromatograma pode ser devido a uma espécie de Sb(III) ligado à

NMG, pois não corresponde ao tempo de retenção observado para o Sb(III). O tempo de retenção está mais próximo a um dos sinais observados para o fármaco. No cromatograma 17(f), correspondente ao resíduo obtido após submeter a solução Sb(III) + NMG na coluna CPG-8HQ, fica evidenciado que o sinal é devido ao Sb(III). No cromatograma 17(g), correspondente ao eluato da solução Sb(III) + NMG submetida na coluna CPG-8HQ, pode ser observado que o Sb(III) ficou retido na CPG-8HQ. No cromatograma 17(h) é mostrada a sobreposição da solução referência de Sb(III) + NMG diluída 200000x (azul) com aquecimento e injetado direto no cromatógrafo + solução referência de Sb(III) + NMG diluída 200000x (verde) sem aquecimento e após submetida na CPG-8HQ.

A partir destes testes, foi evidenciado que o Sb(III) é retido na CPG-8HQ, sendo, portanto, seletiva para esta espécie de Sb. No entanto, para amostra, conforme mostrado na Figura 17(a), houve uma diminuição da intensidade do primeiro pico, isto implica na possível existência de uma mistura de espécies na forma de complexo [por exemplo, Sb(V) + Sb(III) + NMG], com carga neutra ou catiônica.

Após esta etapa, avaliou-se o comportamento do Sb(V) + NMG frente a sua retenção na CPG-8HQ. Para isto, foi feita uma mistura de Sb(V) (80000 mg L^{-1}) + NMG (260 g L^{-1}), a qual foi diluída 200000x e injetada no cromatógrafo. Na Figura 18, estão mostrados os cromatogramas obtidos a partir desta mistura.

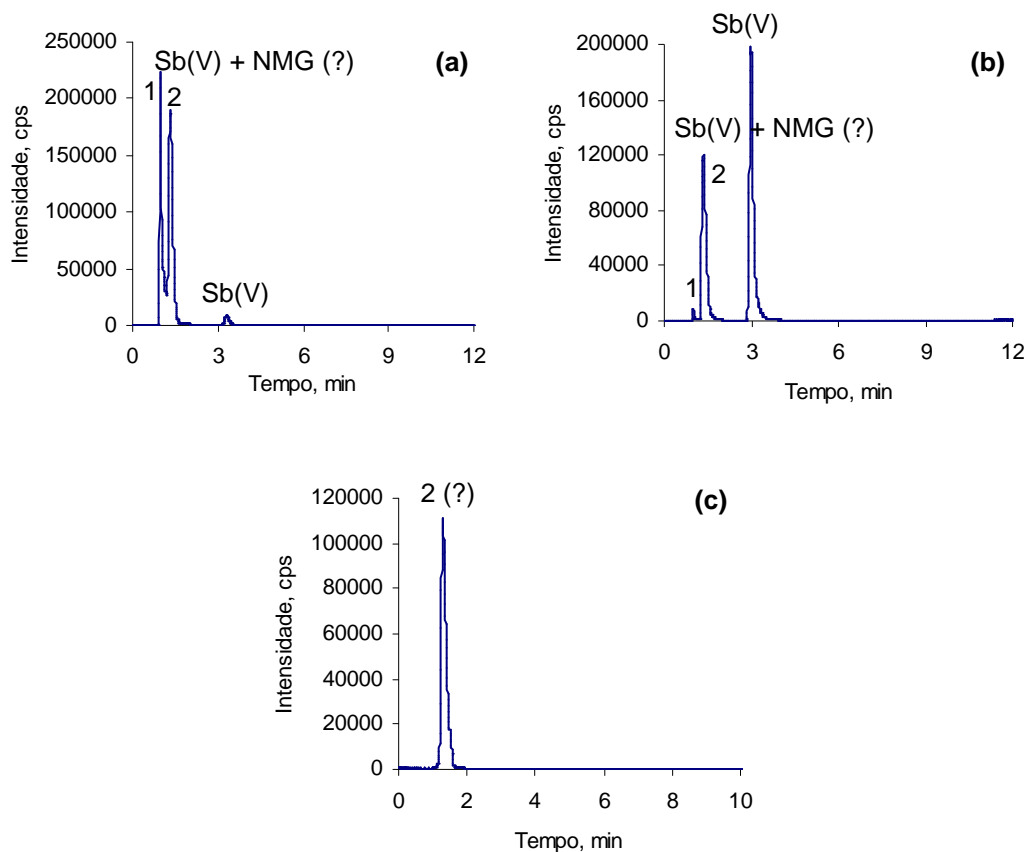


Figura 18. Cromatogramas obtidos com a coluna PRP-X100 e a CPG-8HQ. (a) Sb(V) + NMG; (b) resíduo da coluna obtida da solução Sb(V) + NMG submetida na CPG-8HQ; (c) eluato da mistura Sb(V) + NMG submetida na CPG-8HQ.

Pode-se observar que o cromatograma da Figura 18(a) é semelhante ao cromatograma da amostra mostrado na Figura 16(a). Como pode ser observado, o pico que desaparece após submeter a mistura na CPG-8HQ corresponde ao primeiro pico do cromatograma 18(b). Entretanto, como a CPG-8HQ é seletiva para o Sb(III), esta espécie pode ser Sb(III) ligado a NMG. O Sb(III) livre pode ser devido a uma contaminação do próprio Sb(V) ou Sb(III) que formado a partir do Sb(V) durante o manuseio das soluções. A partir do cromatograma 18(c), correspondente ao eluato do material retido do tratamento do Sb(V) + NMG na CPG-8HQ, pode-se verificar que o tempo de retenção é muito próximo do segundo pico [Sb(V) + NMG]. Sendo assim, pode-se concluir que esta espécie não foi eluída completamente ou não foi retida totalmente, principalmente pela CPG-8HQ ser seletiva ao Sb(III).

Com base nestes dados, foram feitos testes com uma mistura de Sb(V) (80000 mg L^{-1}) + Sb(III) (5000 mg L^{-1}) + NMG (260 g L^{-1} , diluída 200000x), com e

sem a solução a ser submetida na CPG-8HQ. Essa mistura sintética é semelhante à amostra. Na Figura 19 estão mostrados os cromatogramas obtidos a partir desta mistura sintética.

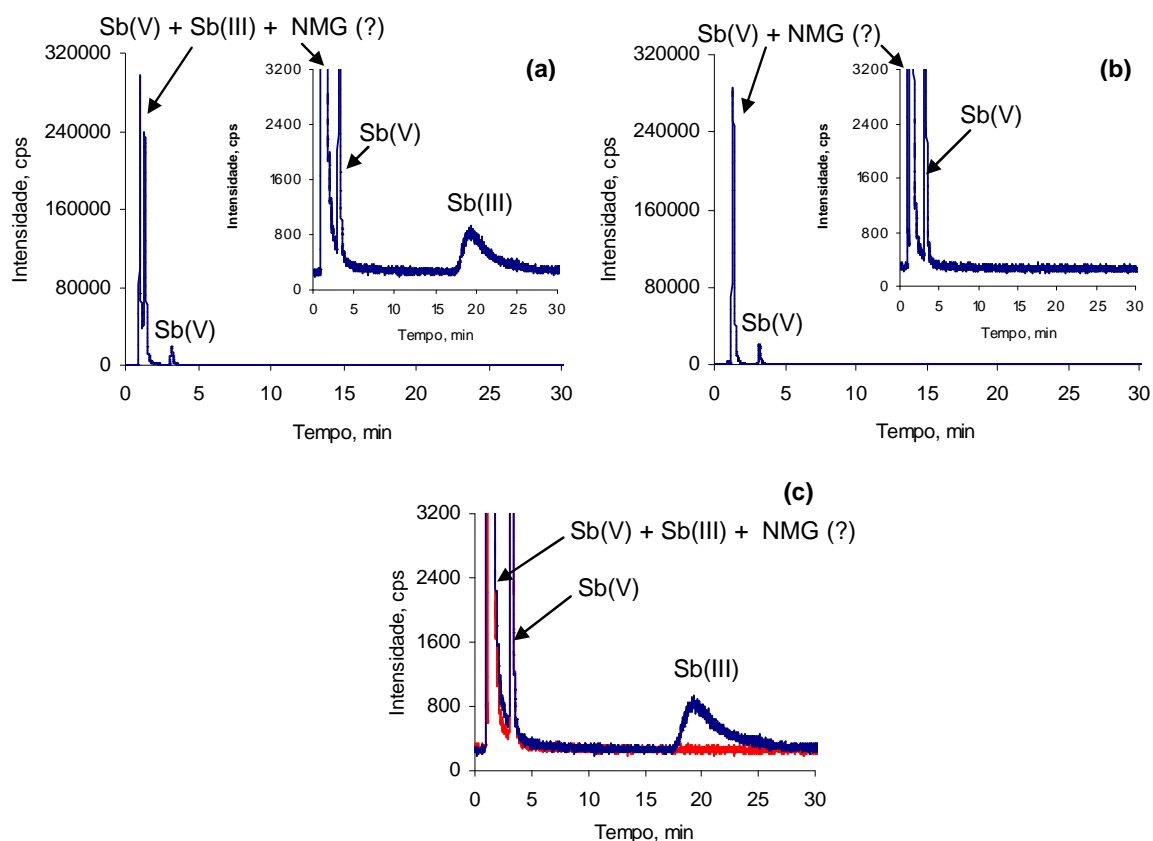


Figura 19. Cromatogramas obtidos com coluna PRP-X100 e a CPG-8HQ. (a) Sb(V) + Sb(III) + NMG, e ampliação de 10x; (b) resíduo da coluna obtida da solução Sb(V) + Sb(III) + NMG submetida na CPG-8HQ e ampliação de 10x; (c) sobreposição do (Sb(V) + Sb(III) + NMG, em azul) e (Sb(V) + Sb(III) + NMG, em vermelho) após submetida na CPG-8HQ e ampliação de 10x.

Conforme mostrado na Figura 19(a), o cromatograma obtido da mistura de Sb(V) + Sb(III) + NMG é semelhante ao da amostra. No cromatograma 19(b) é observado que o pico do Sb(III) desapareceu, significando que esta espécie ficou retida na CPG-8HQ, de acordo com o constado anteriormente. No cromatograma 19(c), correspondente a sobreposição dos cromatogramas obtidos a partir da mistura sintética não submetida na CPG-8HQ e da amostra sintética submetida na CPG-8HQ, pode-se confirmar a presença de Sb(III).

Na Figura 20, estão mostrados as sobreposições dos cromatogramas da mistura sintética não submetida e mistura sintética submetida na CPG-8HQ, e também, o cromatograma da amostra.

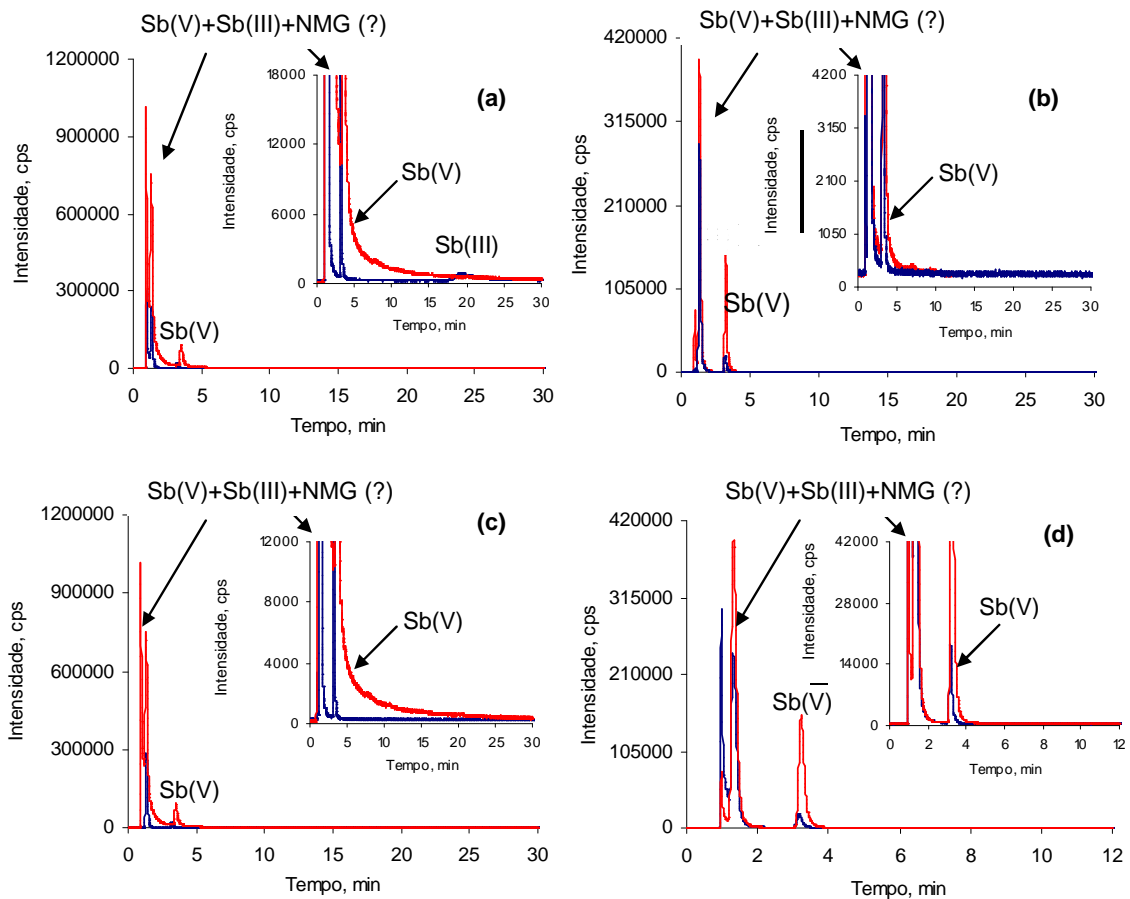


Figura 20. Cromatogramas obtidos com a coluna PRP-X100 e a CPG-8HQ. (a) sobreposição de Sb(V) + Sb(III) + NMG (azul) e amostra diluída 400000x (vermelho) e ampliação de 66x; (b) sobreposição do resíduo da coluna obtido da mistura Sb(V) + Sb(III) + NMG após submetida na CPG-8HQ (azul) e amostra diluída 400000x e ampliação de 100x; (c) sobreposição de resíduo da coluna obtido da mistura Sb(V) + Sb(III) + NMG (azul) após submetida na CPG-8HQ e amostra diluída 400000x e ampliação de 100x; (d) sobreposição do resíduo da coluna obtido da amostra + solução referência de Sb(V) + Sb(III) + NMG (azul) e resíduo da coluna obtido da amostra 400000x diluída, submetida na CPG-8HQ e ampliação de 100x.

De acordo com o cromatograma mostrado na Figura 20(a), pode ser observada a semelhança dos cromatogramas da amostra sintética com a amostra de antimoniato de meglumina. Pode ser observado, que o Sb(III) inorgânico não pôde ser identificado na amostra. Entretanto, os tempos de retenção dos sinais das espécies de Sb na amostra sintética foram muito semelhantes com àqueles das

espécies de Sb no antimoniato de meglumina. No cromatograma 20(b) pode ser verificado que os tempos de retenção entre os picos de Sb nas duas amostras também foram semelhantes, assim como o perfil dos picos. E, a partir do cromatograma 20(c), pode se concluir que não é possível a identificação de Sb(III) na amostra, já que o tempo de retenção deste não foi igual a nenhum outro pico. No cromatograma 20(d) pode-se verificar a semelhança entre os cromatogramas obtidos a partir do resíduo da coluna CPG-8HQ da solução de Sb(V) + Sb(III) + NMG e amostra submetida na CPG-8HQ com o cromatograma obtido a partir da solução de Sb(V) + Sb(III) + NMG submetida na CPG-8HQ com a amostra, [cromatograma 20(c)]. Isto significa que com estes testes pode ser identificada somente a presença de Sb(V).

A partir destes resultados, pode-se também considerar que há uma semelhança no perfil cromatográfico entre o antimoniato de meglumina e a amostra sintética. Entretanto, com estes testes foi possível identificar, por LC-ICP-MS e CPG-8HQ, somente a espécie de Sb(V). Também, com a utilização da coluna CPG-8HQ, pode-se observar que esta é seletiva somente para a espécie Sb(III), dificultando a elucidação da espécie de Sb(III) ligada à meglumina.

5.2. DETERMINAÇÃO DE Sb(III) EMPREGANDO SISTEMA LC-HG-ICP-MS

A geração seletiva de hidreto de antimônio é possível em determinadas condições de reação.^{78,80} Assim, pode-se gerar estibina somente a partir de Sb(III) na presença de ácido cítrico, conforme será mostrado posteriormente (item 5.4.1.1). Portanto, com o intuito de determinar seletivamente Sb(III) na amostra, foi desenvolvido um sistema para geração de hidretos a partir do eluato da coluna cromatográfica empregando as condições estabelecidas no item 5.4 (Tabela 6). Portanto, após a separação das espécies de Sb na coluna cromatográfica, somente será detectado o Sb(III) presente na amostra. Isto favoreceria a seletividade e melhoraria o limite de detecção. Na Figura 21 estão mostrados os cromatogramas obtidos a partir do Sb(III) e Sb(V) e da amostra, utilizando o sistema LC-HG-ICP-MS.

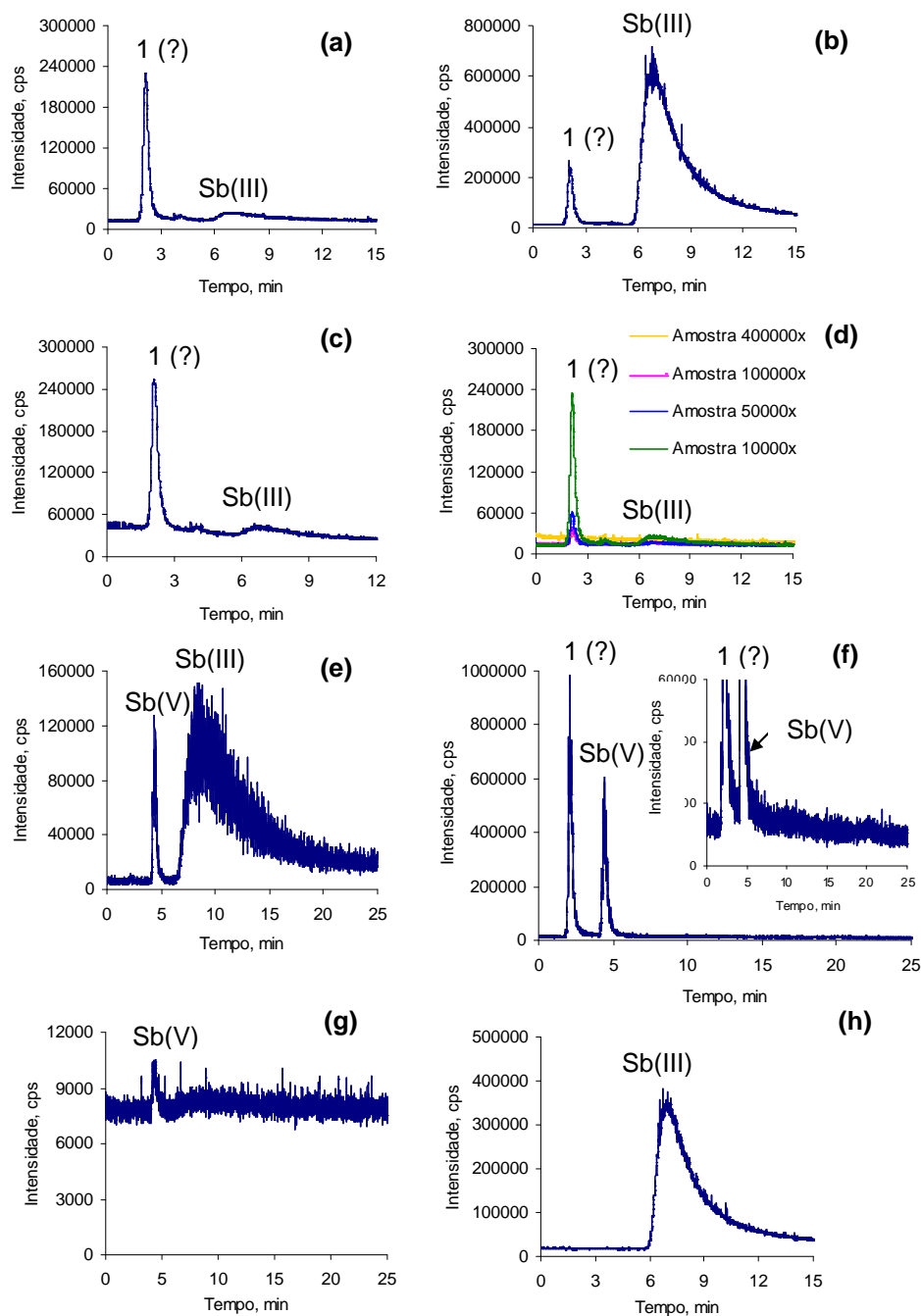


Figura 21. Cromatogramas obtidos por LC-HG-ICP-MS com a coluna IonPac. (a) amostra diluída 10000x; (b) amostra diluída 10000x + 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(III); (c) amostra diluída 10000x + 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(V); (d) amostra diluída; (e) Sb(V) 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ + Sb(III) 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, sem ácido cítrico; (f) amostra diluída 100000x, sem ácido cítrico e ampliação de 16x; (g) 800 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(V) com ácido cítrico 10% e (h) 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(III) com ácido cítrico 10%.

Tendo-se em vista que o Sb(V) ou suas espécies não geram hidretos na presença de ácido cítrico, esperava-se que um dos sinais do cromatograma obtido para a amostra deveria desaparecer. Entretanto, conforme pode ser observado na Figura 21(a) (amostra diluída 10000x), houve somente uma supressão da intensidade do primeiro pico. Possivelmente, isto significa que há uma mistura de espécies de Sb(V) e Sb(III) que tem praticamente o mesmo tempo de retenção.

No cromatograma 21(b), correspondente a adição de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(III) na amostra, o pico com tempo de retenção de aproximadamente 6,6 min é referente ao Sb(III). No entanto, não se pode afirmar que a eficiência da geração de hidreto da espécie de Sb correspondente ao primeiro pico (possivelmente um complexo de Sb(III) com a meglumina) é a mesma que a do terceiro pico [Sb(III) livre]. Também, com a finalidade de identificar o Sb(V), esta espécie foi adicionada à amostra na concentração de $800 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(V). O resultado está mostrado no cromatograma 21(c), onde pode ser verificado novamente que para o primeiro e o terceiro picos não houve mudança significativa na intensidade dos picos, da mesma forma para o segundo pico (tempo de retenção de aproximadamente 4,4 min), o qual pode ser considerado como um sinal devido ao Sb(V). Desta forma, verifica-se a eficiência do ácido cítrico (10%, m/v) na complexação seletiva com o Sb(V), suprimindo o sinal completamente, mesmo em concentrações relativamente elevadas.

Para certificar qual é o sinal correspondente ao Sb(V) na amostra foram feitos testes de geração de hidretos na presença e ausência de ácido cítrico. A partir da análise de uma solução mista de Sb(V) e Sb(III), observou-se (Figura 21) que o cromatograma 21(e), sem a presença de ácido cítrico, o tempo de retenção para Sb(V) é de aproximadamente 4,4 min, sendo muito semelhante com o tempo de retenção do segundo pico do cromatograma da amostra, mostrado no cromatograma 21(f). Também, o tempo de retenção do Sb(III), de aproximadamente 6,9 min, mostrado no cromatograma 21(e) é semelhante com o terceiro pico (tempo de retenção de aproximadamente 6,8 min) da amostra, mostrado no cromatograma 21(a).

No cromatograma 21(g) pode-se verificar que o sinal do Sb(V) foi totalmente suprimido quando da geração de hidretos na presença de ácido cítrico. No cromatograma 21(h) é mostrado o sinal do Sb(III) na solução referência, onde pode-se observar que não há interferência do Sb(V). O tempo de retenção (6,9 min) para

o Sb(III) na solução referência é próximo do tempo de retenção (6,6 min) do Sb(III) na amostra. Isto comprova a presença de Sb(III) na amostra.

Com o propósito de identificar a espécie de Sb(III) na amostra os cromatogramas obtidos com a coluna de troca aniônica IonPac pelo sistema LC-HG-ICP-MS estão mostrados na Figura 22.

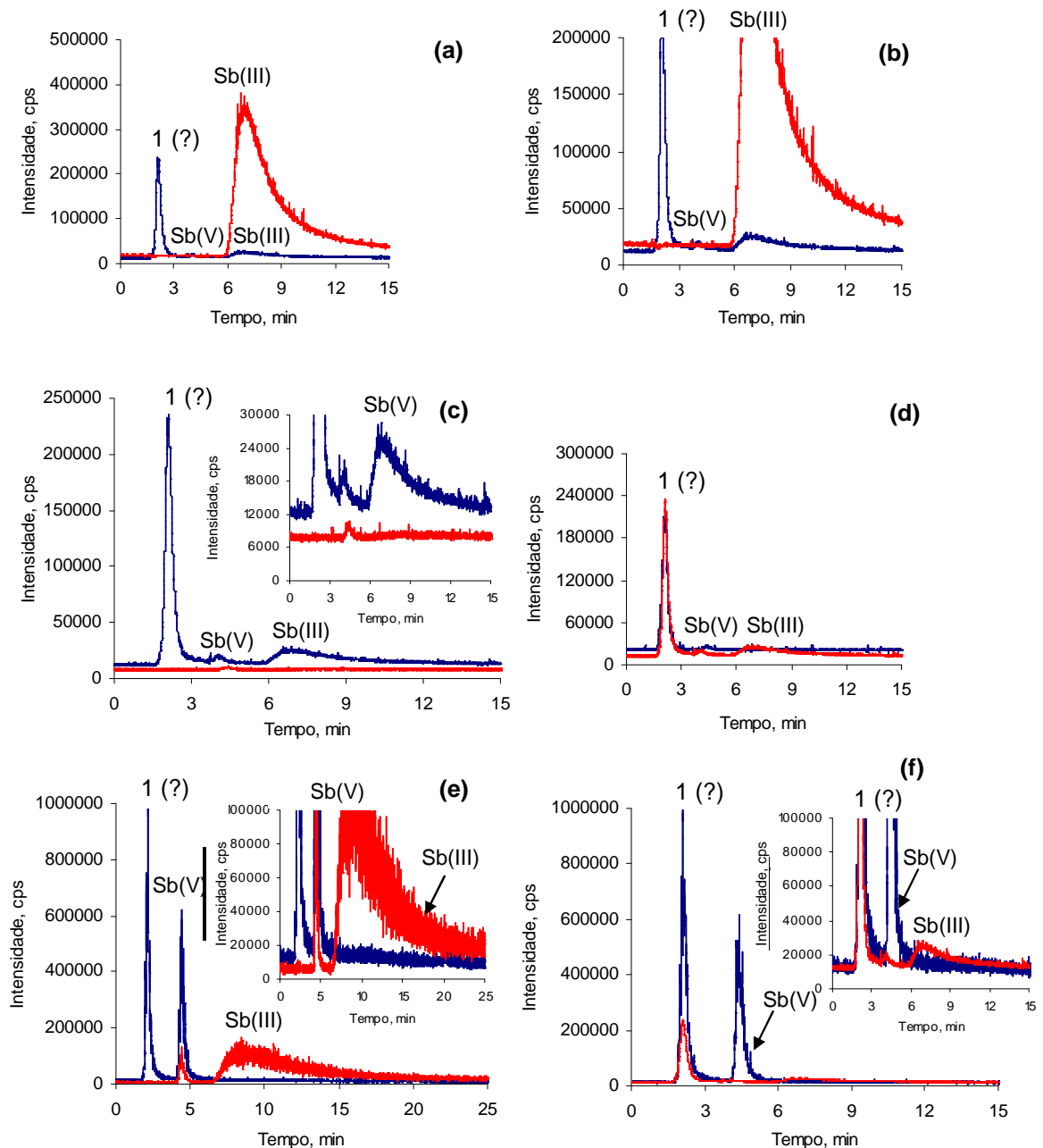


Figura 22. Cromatogramas obtidos por LC-HG-ICP-MS com coluna IonPac. (a) sobreposição da amostra diluída 10000x (azul) e $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(V) + $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(III) (vermelho); (b) idem (a) e ampliação de 2,5x; (c) sobreposição da amostra diluída 10000x (azul) e solução

referência de $800 \mu\text{g L}^{-1}$ Sb(V) (vermelho) e ampliação de 8x; (d) sobreposição de resíduo da coluna obtido da amostra diluída 10000x (azul) após submetida na CPG-8HQ e da amostra diluída 10000x (vermelho); (e) sobreposição da amostra diluída 100000x (azul) e $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(V) + $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(III) (vermelho) na ausência de ácido cítrico 10% na HG e ampliação de 10x; (f) sobreposição da amostra diluída 100000x (azul) na ausência de ácido cítrico na HG e amostra diluída 100000x (vermelho) na presença de ácido cítrico 10%.

Nos cromatogramas (a) e (b) da Figura 22, correspondente a amostra (azul) e referência de Sb(V) $50 \mu\text{g L}^{-1}$ + Sb(III) $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (vermelho), pode-se confirmar a presença de Sb(III) na amostra, através dos tempos de retenção. No cromatograma 22(c) pode-se verificar que o sinal do Sb(V) na solução referência (vermelho) é totalmente suprimido, enquanto um pequeno sinal residual aparece no cromatograma da amostra (azul). Portanto, pode-se concluir que o sinal que foi suprimido corresponde ao Sb(V) na amostra. No cromatograma 22(e) estão mostrados os cromatogramas da amostra (azul) e do Sb(V) + Sb(III) na solução referência (vermelho) com geração de hidretos na ausência de ácido cítrico. Pode-se verificar que a presença de Sb(III) na amostra não é evidenciada (em diluições maiores que 10000x), já que no tempo de retenção do Sb(III) da solução de referência não é observado nenhum pico na amostra. O tempo de retenção do Sb(V) para amostra e solução referência foram praticamente os mesmos. Isto confirma a presença de Sb(V) na amostra.

De qualquer modo, após este estudo, ainda permanece a incerteza quanto à espécie referente ao primeiro pico da amostra. Acredita-se que seja uma espécie de Sb(III), uma vez que foi gerado hidreto na presença de ácido cítrico. Entretanto, não se pode afirmar que a geração do hidreto a partir desta espécie é quantitativa, pois pode ser de uma espécie ligada à meglumina do fármaco. Por esta razão, testes foram feitos empregando a CPG-8HQ com a finalidade de verificar a retenção desta espécie. Desta forma poder-se-ia afirmar se é ou não Sb(III). Portanto, após processamento da amostra na CPG-8HQ a amostra foi submetida à análise no sistema LC-HG-ICP-MS.

Na Figura 23 estão mostrados os cromatogramas obtidos pelo sistema LC-HG-ICP-MS empregando a coluna IonPac após submeter a amostra na CPG-8HQ.

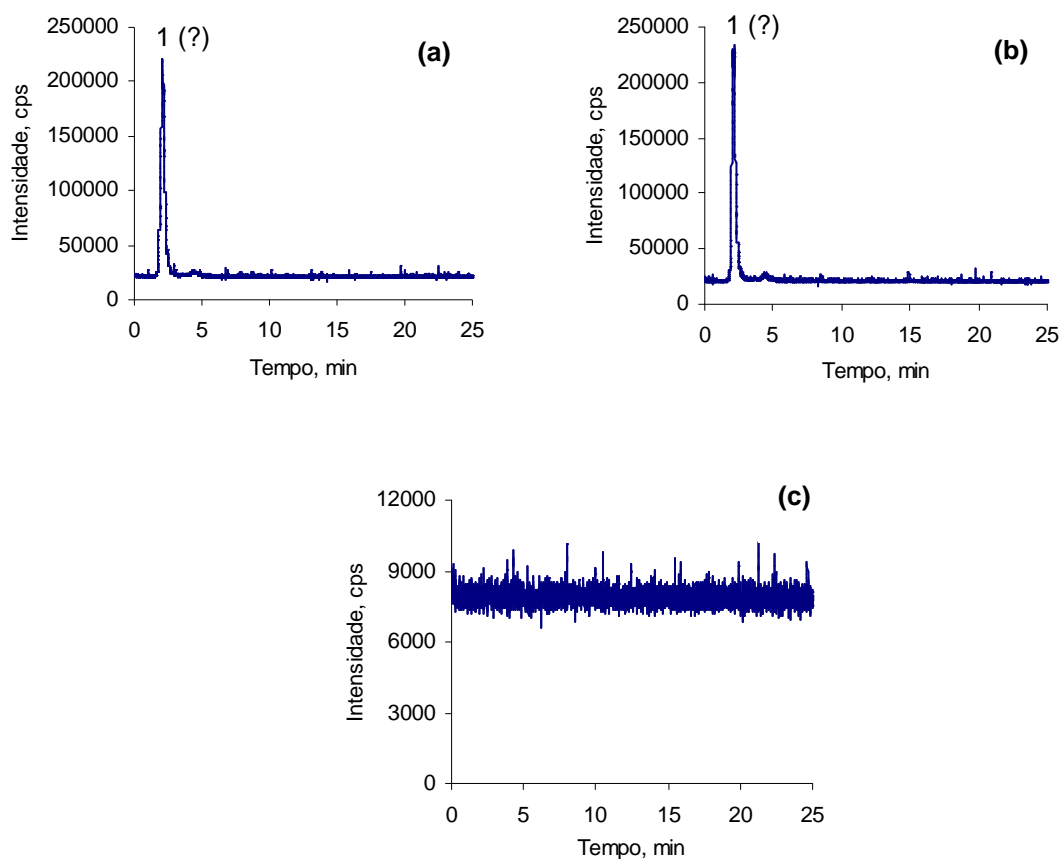


Figura 23. Cromatogramas obtidos por LC-HG-ICP-MS com coluna IonPac após submeter as soluções da amostra na CPG-8HQ. (a) resíduo da coluna obtido da amostra diluída 10000x submetida na CPG-8HQ; (b) eluato obtido da amostra diluída 10000x adicionada de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(III) submetida na CPG-8HQ; (c) solução referência de Sb(V) $50 \mu\text{g L}^{-1}$ + Sb(III) $50 \mu\text{g L}^{-1}$ submetida na CPG-8HQ.

De acordo com a Figura 23(a) pode-se verificar que somente o pico referente ao Sb(III) foi suprimido, ou seja, somente esta espécie ficou retida na CPG-8HQ. O primeiro pico não foi retido na CPG-8HQ, não se podendo obter uma conclusão definitiva, pois se esperava que a combinação da HG com ácido cítrico e o tratamento da solução com CPG-8HQ resultaria na supressão total do sinal. Possivelmente esta espécie de Sb pode ser um complexo de Sb(III) com a meglumina que não interage com a CPG-8HQ. No cromatograma 23(b), foi observado que tanto o terceiro pico, que seria o Sb(III) da amostra, quanto o pico do Sb(III) na solução referência, foram suprimidos quando a solução é submetida na CPG-8HQ. No cromatograma 23(c) foi suprimido o sinal para o Sb(V) e o Sb(III) na solução referência, mostrando a eficiência do sistema HG com ácido cítrico na supressão do Sb(V) e a CPG-8HQ na retenção do Sb(III).

Com base nestes ensaios não foi possível identificar o primeiro pico da amostra, já que a espécie de Sb não ficou retida na CPG-8HQ e nem a HG na presença de ácido cítrico suprimiu o sinal. Dessa forma, a única conclusão que pode ser feita é a de que a espécie referente ao primeiro pico seja uma espécie de Sb(III) ligada à NMG.

No entanto, cabe destacar, a importância desta metodologia para identificar a espécie Sb(III) inorgânica presente na amostra, pois somente foi identificada utilizando o sistema LC-HG-ICP-MS combinada com o tratamento da amostra com CPG-8HQ.

A partir destas conclusões, optou-se por testar a coluna PRP-X100 para avaliar a separação das espécies de Sb e tentar identificar a espécie Sb(III) na amostra diante do sistema LC-HG-ICP-MS.

Na Figura 24 estão mostrados os cromatogramas obtidos com o sistema LC-HG-ICP-MS utilizando a coluna de troca aniônica PRP-X100.

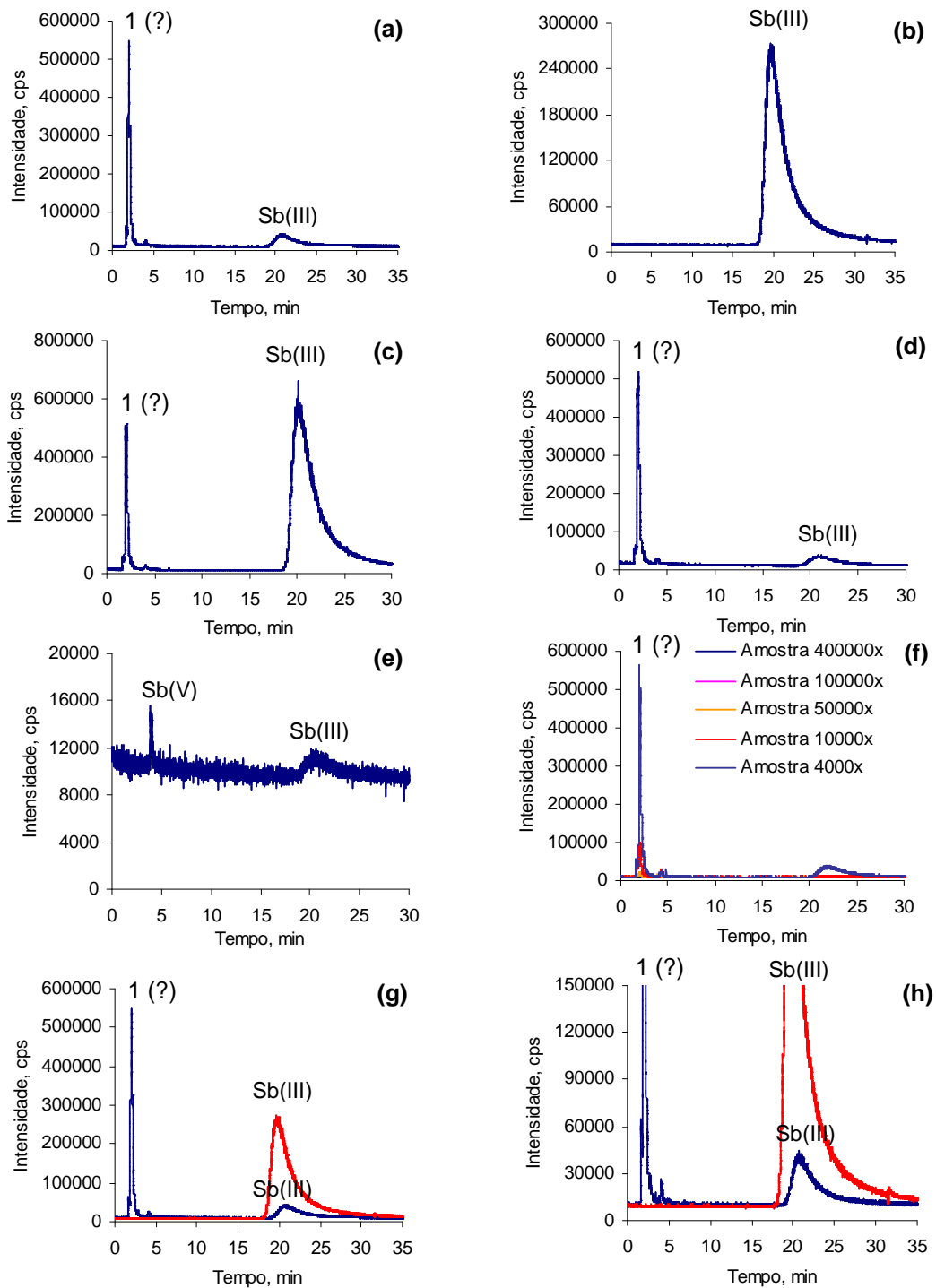


Figura 24. Cromatogramas obtidos por LC-HG-ICP-MS com a coluna PRP-X100. (a) amostra diluída 4000x; (b) 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(V) + 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(III); (c) amostra diluída 4000x + 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(III); (d) amostra diluída 4000x + 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(V); (e) 800 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(V); (f) amostra; (g) sobreposição da amostra diluída 4000x (azul) e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(V) + 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Sb(III) (vermelho); (h) cromatograma (g) e ampliação de 4x.

De acordo com a Figura 24, pode-se observar através dos cromatogramas (a), (b) e (c) a presença da espécie Sb(III) na amostra. A Figura 24(f), onde é mostrado o cromatograma da amostra em diferentes diluições, confirma a presença de Sb(III). Além disso, também foi observado outro pico em aproximadamente 3 min, o que corresponde a uma espécie de Sb(III), pois o Sb(V) é suprimido nas condições empregadas. Entretanto, possivelmente é uma espécie de Sb(III) ligada à NMG. No cromatograma 24(d), onde foi adicionado Sb(V) à amostra, é observado que o tempo de retenção e a intensidade do primeiro pico e terceiro pico não alteraram, ou seja, da mesma forma que anteriormente, o sinal para Sb(V) foi totalmente suprimido. No cromatograma 24(e) verifica-se que o sinal do Sb(V) ($800 \mu\text{g L}^{-1}$), cujo tempo de retenção de aproximadamente 4,5 min, foi totalmente suprimido, evidenciando a eficiência de complexação do Sb(V) pelo ácido cítrico. Além disso, deve-se salientar que apareceu um pico no tempo de retenção do Sb(III), o qual pode ser devido a presença de Sb(III) na solução referência de Sb(V). No cromatograma 24(g) pode-se verificar novamente a presença de Sb(III) na amostra, pois coincide com o tempo de retenção do Sb(III) da solução de referência. Porém, o primeiro pico não apresentou o mesmo tempo de retenção da solução referência de Sb(III), confirmando o que foi constatado anteriormente.

Portanto, a partir dos cromatogramas mostrados pode-se afirmar novamente que ainda é pouco conclusiva a identificação do primeiro pico da amostra, já que este não foi totalmente retido na CPG-8HQ e nem suprimido na HG com ácido cítrico. Porém, comparado com os dados das duas colunas utilizadas, pode-se afirmar que o primeiro pico pode ser de uma espécie de Sb(III) ligada à NMG, a qual não é complexada e retida na CPG-8HQ. Também, por este motivo, o tempo de retenção do primeiro pico é completamente diferente do Sb(III) presente na solução referência, bem como da espécie Sb(III) da amostra.

Assim, foram feitos outros estudos para verificar a possibilidade de identificar mais espécies de Sb presentes na amostra. A seguir serão descritos os testes feitos para avaliar mudanças no estado de oxidação das espécies de Sb mediante aquecimento de soluções de amostra.

5.3. EFEITO DO AQUECIMENTO DAS SOLUÇÕES SOBRE A ESTABILIDADE DAS ESPÉCIES DE Sb NO ANTIMONIATO DE MEGLUMINA

Para avaliar o efeito do aquecimento sobre a estabilidade do Sb as soluções foram analisadas por LC-ICP-MS com coluna de troca aniônica PRP-X100. Para o aquecimento das soluções foi utilizado um forno de microondas doméstico, onde as amostras foram aquecidas durante 50s, cuja temperatura alcançou cerca de 90 °C.

Na Figura 25 estão mostrados os cromatogramas obtidos da amostra com e sem aquecimento.

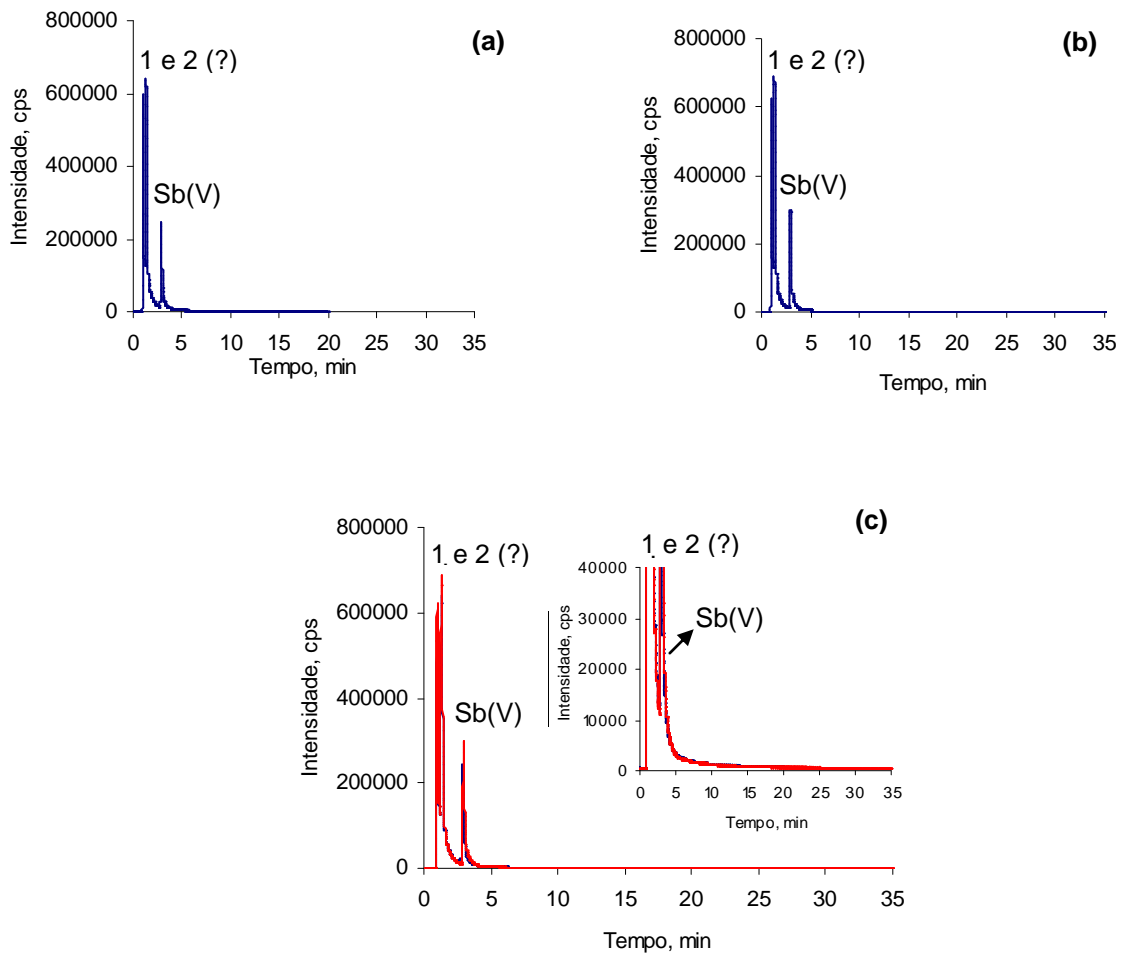


Figura 25. Cromatogramas obtidos por LC-ICP-MS com a coluna PRP-X100 nos testes de aquecimento da amostra. (a) amostra diluída 400000x (sem aquecimento); (b) idem (a), mas com aquecimento; (c) sobreposição da amostra (sem aquecimento) + amostra (com aquecimento).

Através da Figura 25 é observado que os picos no cromatograma (a), a amostra sem aquecimento, e no cromatograma (b), a amostra com aquecimento, possuem o mesmo perfil cromatográfico, assim como, praticamente o mesmo tempo de retenção. Além disso, não houve alteração significativa em relação à intensidade dos picos das espécies, o que poderia ser um indicativo da alteração das espécies de Sb presentes na amostra. Assim, testes foram feitos também na presença de Sb(III). Na Figura 26 estão mostrados os cromatogramas destes testes.

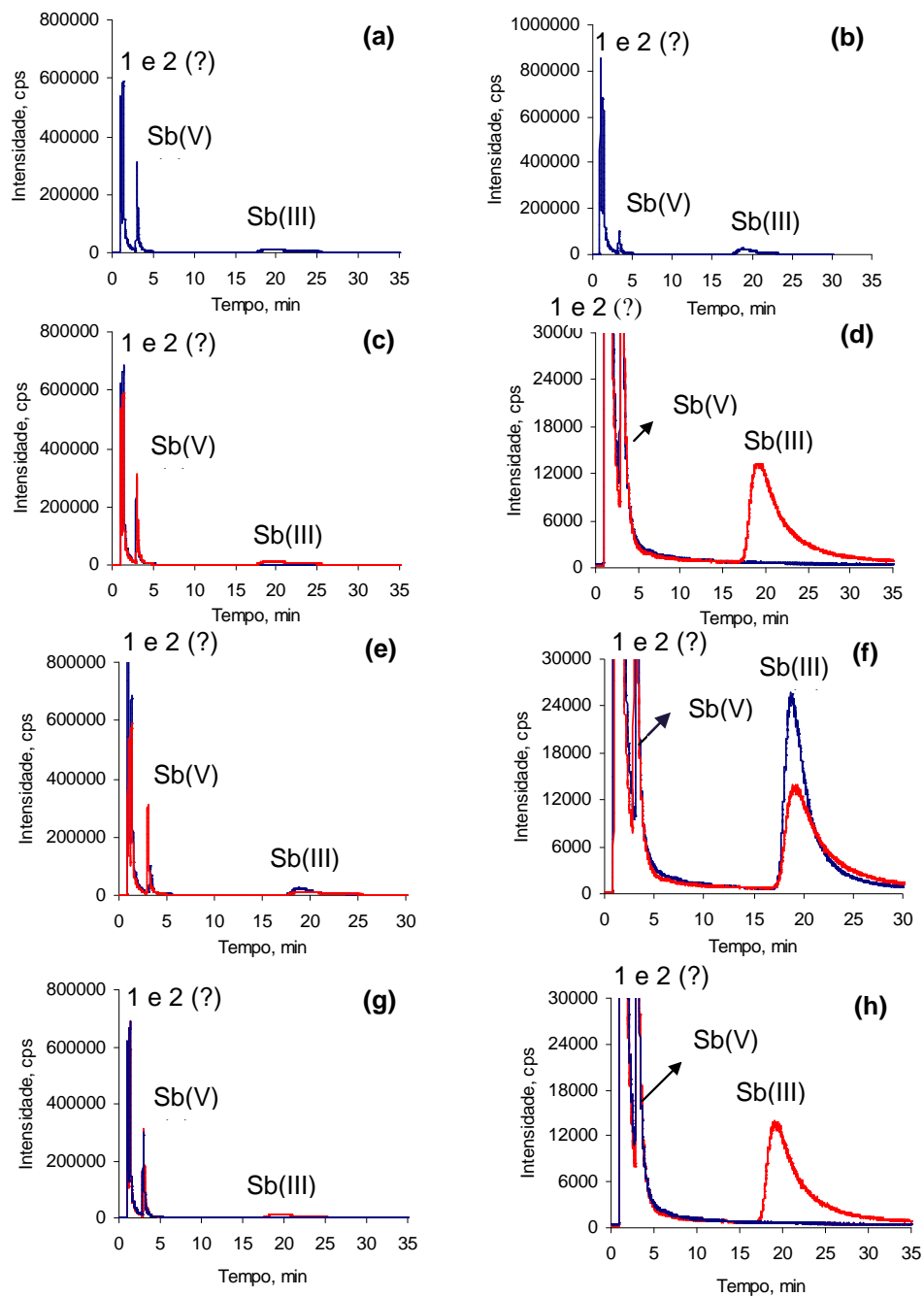


Figura 26. Cromatogramas obtidos por LC-ICP-MS com a coluna PRP-X100 nos testes de aquecimento das soluções. (a) amostra diluída 400000x + Sb(III) 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (com aquecimento); (b) idem (a), mas sem aquecimento; (c) sobreposição da amostra diluída 400000x + Sb(III) 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (com aquecimento) (vermelho) e amostra diluída 400000x (sem aquecimento) (azul); (d) cromatograma (c) e ampliação de 26x; (e) sobreposição da amostra diluída 400000x + Sb(III) 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (com aquecimento) (vermelho) e amostra diluída 400000x + Sb(III) 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (sem aquecimento) (azul); (f) cromatograma (e) e ampliação de 26x; (g) sobreposição da amostra diluída 400000x (com aquecimento) (azul) e amostra diluída 400000x + Sb(III) 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (com aquecimento) (vermelho); (h) cromatograma (g) e ampliação de 26x.

De acordo com os cromatogramas da Figura 26(a) e (b), onde é mostrado o resultado da amostra com a adição de Sb(III), com e sem aquecimento, respectivamente, pode-se observar um aumento na intensidade do sinal para o pico do Sb(V) quando a solução é aquecida. Isto mostra que uma das espécies de Sb(III) provavelmente é oxidada a Sb(V). Pode ser observado também que o primeiro pico, provavelmente de um complexo de Sb, bem como o pico do Sb(III) adicionado diminuíram de intensidade, enquanto o pico relativo ao Sb(V) (segundo pico) aumentou de intensidade. A partir da sobreposição dos cromatogramas 26[(e) e (f)] pode-se visualizar estes efeitos mais claramente, ou seja, possivelmente o Sb(V) pode ter aumentado em altura devido a oxidação de parte das espécies de Sb(III) e também pelo fato do primeiro pico ter diminuído em altura. Entretanto, também pode ser proposto que pode ter ocorrido a quebra de um possível complexo de Sb(V) com NMG, aumentando assim a intensidade do sinal do Sb(V).

No cromatograma 26(c) é mostrada a sobreposição dos sinais da amostra com aquecimento e com adição de Sb(III) (em vermelho) e a amostra sem aquecimento e sem adição de Sb(III) (em azul). Com base nestes cromatogramas percebe-se que a amostra submetida a aquecimento e com Sb(III) adicionado, a alteração é pouco significativa, pois no primeiro pico obteve-se somente um pequeno aumento na altura do pico. No cromatograma 26(d) pode ser verificado que não houve nenhum sinal para Sb(III), mesmo com aquecimento da solução amostra. No cromatograma 26(g) é mostrada a sobreposição da amostra submetida a aquecimento e adição de Sb(III) (vermelho) e a amostra submetida a aquecimento sem adição de Sb(III) (azul), onde novamente é confirmado o que foi destacado para o cromatograma 26(d), ou seja, não há alteração das espécies de Sb nas condições de aquecimento testadas.

Cabe destacar, novamente, que o Sb(III) na solução referência utilizada está na forma de complexo com tartarato de potássio, possivelmente prevenido a mudança do estado de oxidação desta espécie.¹¹

Na Figura 27, são mostrados os cromatogramas obtidos com aquecimento das soluções e utilizando o mesmo sistema LC-ICP-MS com a PRP-X100, destacando o perfil cromatográfico para a espécie Sb(V).

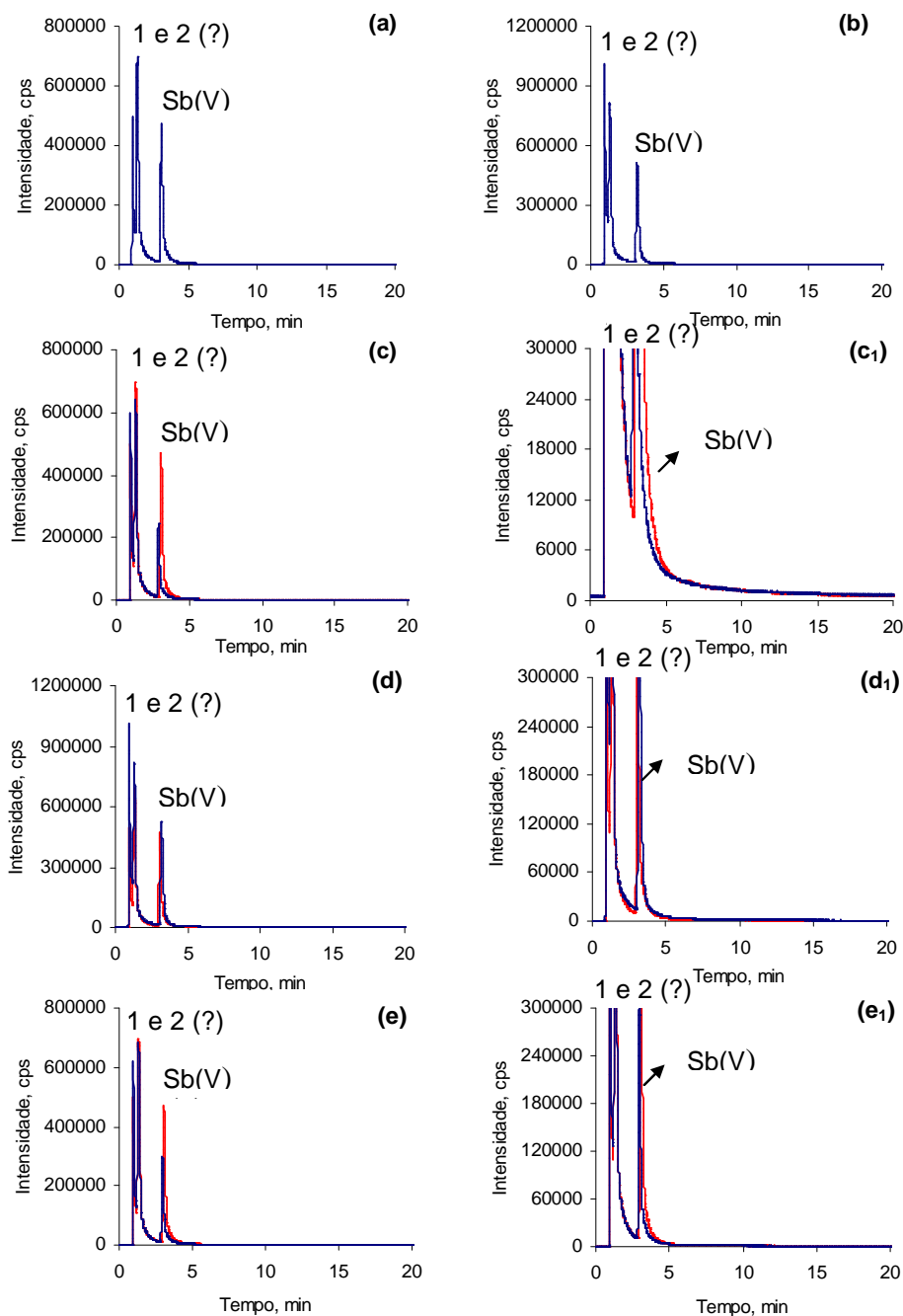


Figura 27. Cromatogramas obtidos por LC-ICP-MS com a coluna PRP-X100 nos testes de aquecimento das soluções. (a) amostra diluída $400000\times$ + Sb(V) $50\ \mu\text{g L}^{-1}$ (com aquecimento); (b) idem (a), mas sem aquecimento); (c) sobreposição da amostra diluída $400000\times$ + Sb(V) $50\ \mu\text{g L}^{-1}$ (com aquecimento) (vermelho) e amostra diluída $400000\times$ (sem aquecimento) (azul); (c₁) cromatograma (c) e ampliação de 26x; (d) sobreposição da amostra diluída $400000\times$ + Sb(V) $50\ \mu\text{g L}^{-1}$ (com aquecimento) (vermelho) e amostra diluída $400000\times$ + Sb(V) $50\ \mu\text{g L}^{-1}$ (sem aquecimento) (azul); (d₁) cromatograma (d) e ampliação de 4x; (e) sobreposição da amostra diluída $400000\times$ (com aquecimento) (azul) e amostra diluída $400000\times$ + Sb(V) $50\ \mu\text{g L}^{-1}$ (com aquecimento) (vermelho); (e₁) cromatograma (e) e ampliação de 2,6x.

Conforme mostrado nos cromatogramas da Figura 27(a) e (b), há uma diminuição na intensidade do primeiro pico, provavelmente referente a uma espécie orgânica de Sb e o aumento do sinal para o pico do Sb(V). Assim, pode-se propor que a espécie desconhecida possa ser o Sb(III) ligado à NMG e que após o aquecimento da solução tenha sido rompido o complexo do Sb com a NMG e este ser oxidado a Sb(V). No cromatograma 27(c) e (c₁) pode-se visualizar a sobreposição destes cromatogramas, observando as considerações já mencionadas.

No cromatograma 27(d) e (d₁) houve uma diferença pouco significativa, comparando o cromatograma da amostra adicionado de Sb(V) submetido a aquecimento (em vermelho) com o cromatograma da amostra sem ser aquecida (em azul). No segundo pico (desconhecido) houve um pequeno aumento na intensidade. Para o pico do Sb(V) não houve grande evidência de mudança de sinal. O aumento do sinal do Sb(V) deve-se ao Sb(V) adicionado à amostra.

No cromatograma 27(e) e (e₁) é mostrada a sobreposição dos sinais para a amostra com aquecimento e sem adição de Sb(V) (em azul) e a amostra com aquecimento e adição de Sb(V) (em vermelho). Nestes cromatogramas novamente pode ser concluído que não houve alteração nas espécies de Sb presentes na amostra. A mudança na altura do sinal para o Sb(V) é devida ao Sb(V) adicionado à amostra.

Sendo assim, pode-se afirmar que a espécie Sb(V) pode ser identificada com sistema LC-ICP-MS, enquanto a espécie Sb(III) pode ser identificada por LC-HG-ICP-MS. Entretanto, cabe destacar a dificuldade de identificar os outros sinais para o Sb, possivelmente complexos de antimônio, tais como, Sb(III) ligada à NMG ou Sb(V) ligada à NMG. Além disso, por não existirem materiais certificados para os complexos de Sb, devido à baixa estabilidade destes compostos no processo de síntese e durante a análise^{9,132} não é possível obter maiores informações a respeito da identificação e quantificação destes sinais para o Sb com os procedimentos investigados.

5.4. DETERMINAÇÃO DE Sb(III) EMPREGANDO SISTEMA FI-HG AAS

Para a determinação seletiva de Sb(III) foi utilizado um sistema de injeção em fluxo (descrito no item 4.1.4) com geração de hidretos acoplado ao espectrômetro de absorção atômica (descrito no item 4.1.3.2).

As variáveis físicas e químicas do sistema foram otimizadas. Para tal, foram estudados os seguintes parâmetros: concentração do redutor, concentração do ácido cítrico e tipo de carregador da amostra, assim como a vazão das soluções e do gás de arraste, o comprimento do percurso analítico e o volume de amostra injetada. Também, foi avaliada a influência da concentração do Sb(V) no sinal do Sb(III), uma vez que na amostra há predominância do Sb(V). Para tanto, foram utilizadas soluções de referência de Sb(III) e Sb(V) com concentração próxima do valor determinado no fármaco, obtido segundo o método oficial.²⁸

5.4.1. Estudo das variáveis químicas do sistema FI-HG AAS

5.4.1.1. Efeito da concentração de NaBH₄

A concentração de NaBH₄ é um dos parâmetros importantes, influenciando, principalmente, na cinética da reação de formação de hidretos. Além disso, como a geração de estibina depende do estado de oxidação de Sb e da forma como o mesmo está na solução (espécies inorgânicas ou complexos), a concentração do redutor poderá influenciar na formação da estibina. Para verificar a influência da concentração do NaBH₄ na geração de estibina a partir de soluções de referência de Sb(III) e Sb(V) pelo sistema FI-HG, foi feito um estudo com concentrações na faixa de 0,05 a 0,3% (m/v). Os resultados são mostrados na Figura 28.

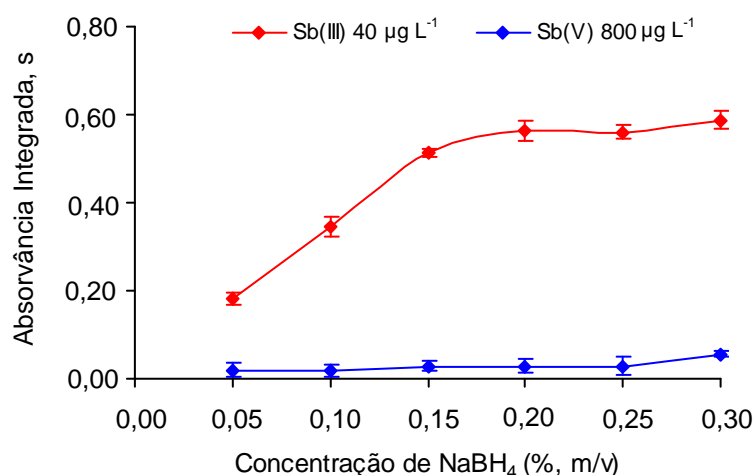


Figura 28. Influência da concentração de NaBH₄ na determinação do Sb(III) e Sb(V) por FI-HG AAS. Ácido cítrico: 20% (m/v); carregador da amostra: HCl 1,0 mol L⁻¹; vazões do ácido cítrico, amostra e NaBH₄: 2,0 mL min⁻¹; vazão do carregador da amostra: 4,5 mL min⁻¹; volume da amostra: 100 µL; percurso analítico 300 cm; vazão do gás de arraste: 0,4 L min⁻¹.

Como pode ser visto na Figura 28, a intensidade do sinal do Sb(V) aumentou somente a partir de 0,25% (m/v) de NaBH₄. Por outro lado, o sinal do Sb(III) alcança o máximo de intensidade a partir de 0,15% (m/v). Efeito semelhante também foi encontrado por Petit de Peña *et al.*⁷³ Assim, a concentração de NaBH₄ escolhida foi de 0,10% (m/v), pois nesta concentração, pode ser feita a determinação seletiva de Sb(III) na presença de até 800 µg L⁻¹ de Sb(V).

Deve-se destacar que este estudo foi feito com percurso analítico de 200 cm. O percurso analítico influencia na reação de geração de estibina e, principalmente, na reação de complexação do Sb(V) com o ácido cítrico. Ou seja, dependendo da cinética da reação de complexação, o aumento do percurso analítico pode influenciar na complexação e, conseqüentemente, na supressão da formação de estibina a partir de Sb(V).

5.4.1.2. Efeito da concentração do ácido cítrico

O ácido cítrico foi escolhido como reagente complexante em virtude de apresentar boa eficiência de complexação e, conseqüentemente, resultar na inibição da formação de estibina a partir do Sb(V). De acordo com Mohammad *et al.*¹⁵⁷ e Guy *et al.*¹⁵⁸ a concentração do ácido cítrico pode influenciar na formação de complexos

com espécies inorgânicas de Sb(V), o mesmo não ocorrendo com espécies inorgânicas de Sb(III). Entretanto, cabe ressaltar, que a interação do ácido cítrico com compostos de Sb, ainda não foi totalmente esclarecida.^{159,160}

Foi feito estudo para avaliar a concentração do ácido cítrico para suprimir o sinal do Sb(V), bem como propiciar um meio reacional ácido necessário para a reação de formação do hidreto a partir do Sb(III). A concentração do ácido cítrico foi avaliada no intervalo de 2 a 50% (m/v) com a finalidade de determinar a concentração mais adequada de complexação do Sb(V) sem interferir no sinal de Sb(III). Na Figura 29 está mostrado o sinal de Sb(III) e Sb(V) em diferentes concentrações de ácido cítrico.

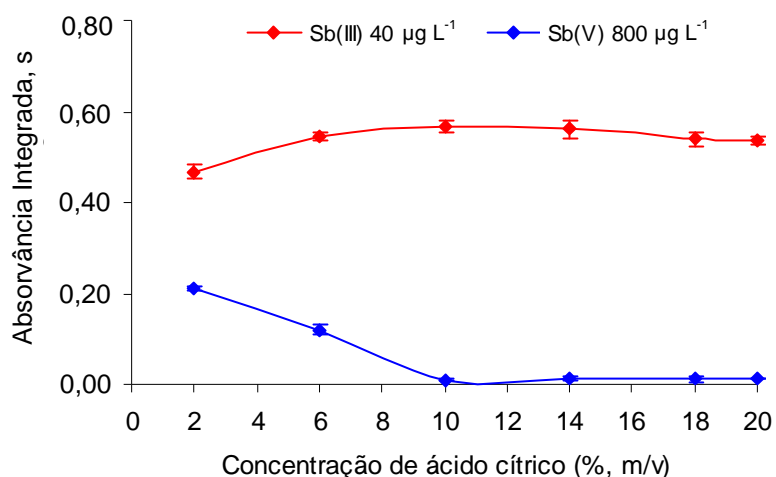


Figura 29. Influência da concentração de ácido cítrico na geração de hidretos de Sb(III) e Sb(V) por FI-HG AAS. NaBH₄: 0,1% (m/v); carregador da amostra: HCl 1 mol L⁻¹; vazões do ácido cítrico, amostra e NaBH₄: 2,0 mL min⁻¹; vazão do carregador da amostra: 4,5 mL min⁻¹; volume de amostra: 100 µL; percurso analítico: 300 cm; vazão do gás de arraste: 0,4 L min⁻¹.

De acordo com a Figura 29, pode-se observar que é necessária uma concentração de ácido cítrico de, no mínimo, 10% (m/v) para suprimir completamente o sinal do Sb(V), enquanto pouca influência é observada sobre a intensidade do sinal para Sb(III). Porém, uma vez que este complexante não é totalmente seletivo para o Sb(V), em concentrações elevadas pode ocasionar a diminuição da intensidade do sinal para o Sb(III).¹⁶⁰ Sendo assim, para determinar seletivamente o Sb(III) na presença de Sb(V) é necessário o uso, de no mínimo, soluções de ácido cítrico a 10% (m/v) e nas condições empregadas com sistema FI-HG AAS, pois a alteração

dos parâmetros utilizados, pode dificultar a complexação efetiva do Sb(V) pelo ácido cítrico.

Cabe destacar que o pH da solução é importante na geração de hidretos de Sb, pois em valores de pH baixos (p.ex., pH 5,0) é favorecida a redução do Sb(III) pelo NaBH_4 . Entretanto, esta condição reacional para o Sb(III) é relativamente ampla, ou seja, também há a formação de estibina a partir do Sb(III) em pH mais elevado. Porém, para o Sb(V), o pH deve ser menor [meio mais ácido do que para o Sb(III)], o que aumenta a eficiência de redução do Sb(V) à Sb(III) e formação o hidreto.^{77,85,157}

No caso do uso do ácido cítrico, foi observado que na concentração de 10% (m/v) o pH do meio reacional foi de aproximadamente 2,0, o que já favorece a geração rápida de estibina a partir de Sb(III), porém a geração de estibina a partir do Sb(V) nestas condições não é favorecida. Assim, para verificar o efeito da acidez do meio reacional, sem alterar a concentração do ácido cítrico, foi feita uma avaliação empregando ácido clorídrico.

5.4.1.3. Efeito da concentração do HCl como carregador da amostra

O HCl é o ácido mais indicado como meio reacional para a redução do Sb(III) com NaBH_4 , uma vez que para a formação do hidreto é necessário um meio reacional ácido e que preferencialmente este ácido tenha características redutoras. Também, considerando a especiação de Sb por HG, normalmente é determinado o Sb(III) e depois o Sb total, onde o Sb(V) é previamente reduzido a Sb(III). Por diferença é obtido o valor da concentração do Sb(V). Porém, são poucos os trabalhos que citam a utilização do ácido cítrico para complexação do Sb(V) para a determinação seletiva de Sb(III), como no presente trabalho. Quando o ácido cítrico é usado como complexante na HG, o meio reacional fica levemente ácido, sendo necessário avaliar a influência de condições mais drásticas de acidez através do uso de HCl. Neste trabalho este efeito foi avaliado usando HCl como carregador da amostra. Na Figura 30 pode ser observado influencia do HCl na geração dos hidretos a partir de Sb(III) e Sb(V).

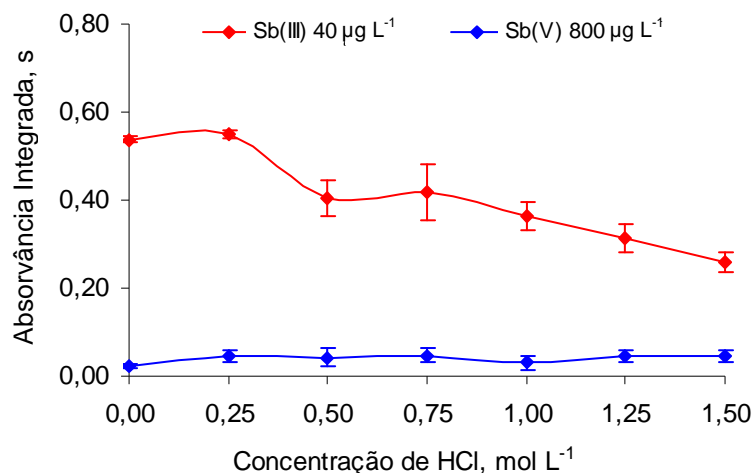


Figura 30. Influência da concentração do HCl como carregador da amostra na determinação do Sb(III) e Sb(V). Ácido cítrico: 10% (m/v); vazões do ácido cítrico, amostra e NaBH₄: 2,0 mL min⁻¹; vazão do carregador da amostra: 4,5 mL min⁻¹; volume de amostra: 100 µL; percurso analítico: 300 cm; vazão do gás de purga: 0,4 L min⁻¹.

Conforme pode ser visto na Figura 30, a presença de HCl na geração de estibina a partir do Sb(III) não foi favorecida. Possivelmente o meio reacional, com o ácido cítrico, já é ácido o suficiente para a reação ocorrer. Por outro lado, nenhum efeito foi observado para o Sb(V). Assim, escolheu-se água como carregador da amostra, a qual demonstrou ser a condição mais adequada, pois a intensidade do sinal para Sb(III) é maior e o sinal do Sb(V) é totalmente suprimido.

5.4.2. Variáveis físicas do sistema FI-HG AAS

5.4.2.1. Escolha do comprimento do percurso analítico

Para a seletividade do método em determinar Sb(III) sem interferência do Sb(V) é necessário que ocorra a formação do complexo Sb(V)-ácido cítrico. Uma das formas para favorecer a complexação é aumentar o tempo reacional, o qual pode ser alcançado a partir do aumento do percurso analítico do sistema FI (B₁ da Figura 5). Para tal, foram testados reatores de 100, 150, 200, 250 e 300 cm. Na Figura 31, está mostrado este efeito sobre a intensidade do sinal do Sb(V), bem como o tempo aproximado de reação em função do percurso analítico.

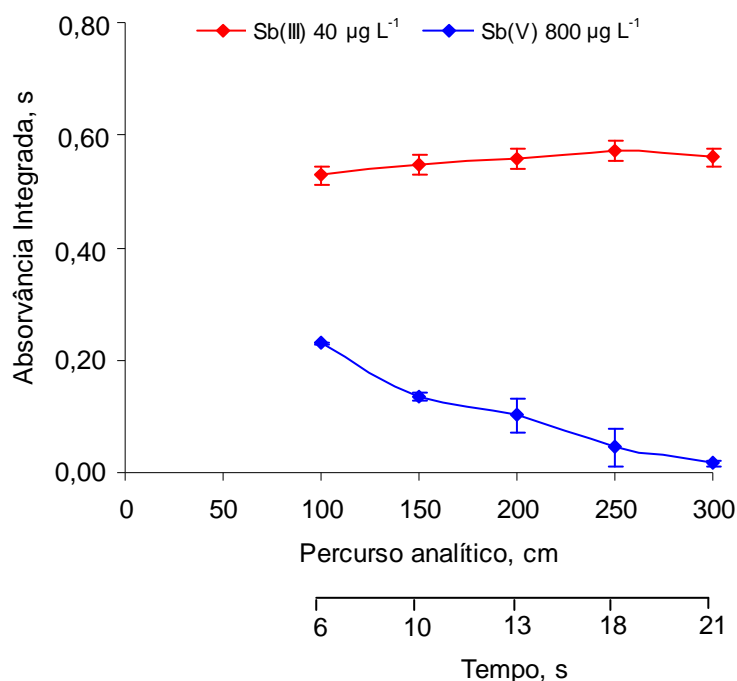


Figura 31. Influência do comprimento do percurso analítico sobre a intensidade do sinal do Sb(V). NaBH₄: 0,1% (m/v); ácido cítrico: 10% (m/v); carregador da amostra: água (4,5 mL min⁻¹); vazões do ácido cítrico, amostra e NaBH₄: 2,0 mL min⁻¹; volume de amostra: 100 µL; vazão do gás de purga: 0,4 L min⁻¹.

De acordo com a Figura 31, é observado um decréscimo gradual da intensidade do sinal aumentando o percurso analítico de 100 até 300 cm, obtendo-se a supressão total da intensidade do sinal para Sb(V). Isto significa que deve haver um tempo suficiente para ocorrer a complexação efetiva entre o Sb(V) e o ácido cítrico. Dessa forma, cabe destacar a importância do comprimento do reator, da concentração do ácido cítrico e das vazões das soluções na supressão do sinal de Sb(V). Logo, como condição de compromisso entre a supressão do sinal do Sb(V), obtenção de intensidade máxima para o Sb(III) e tempo de análise, o comprimento do percurso escolhido foi de 300 cm.

5.4.2.2. Escolha do volume da amostra

A escolha de volume adequado de solução amostra em sistemas FI resulta na obtenção de sinais com diferentes intensidades, influenciando na sensibilidade e limite de detecção e, dependendo do caso, na seletividade do método. De maneira geral, em sistemas FI a tendência é optar pelo uso de volumes menores, visando

uma economia de amostra e maior rapidez de análise. Para tal estudo, o comportamento da resposta do sistema FI foi avaliado para volumes entre 25 a 250 μL . Na Figura 32 são apresentados os resultados obtidos para o estudo do volume de amostra na determinação seletiva de Sb(III).

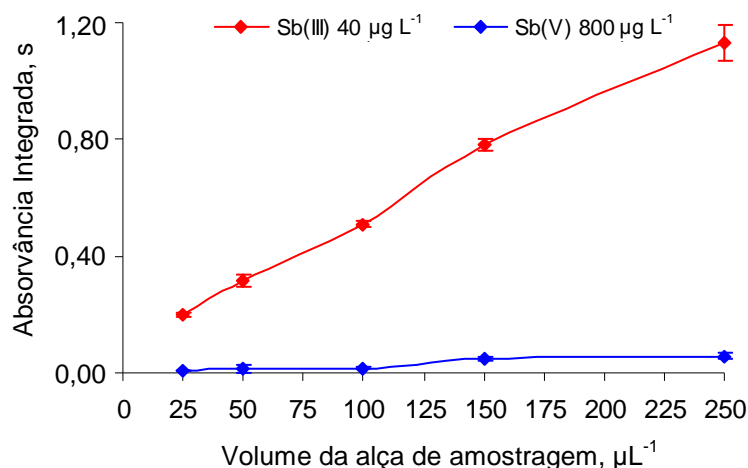


Figura 32. Influência do volume de amostra sobre a intensidade do sinal do Sb(V) e Sb(III). NaBH_4 : 0,1% (m/v); ácido cítrico: 10% (m/v); vazões do ácido cítrico, amostra e NaBH_4 : 2,0 mL min^{-1} ; vazão do carregador da amostra: 4,5 mL min^{-1} ; percurso analítico: 300 cm; vazão do gás de purga: 0,4 L min^{-1} .

Como era esperado (Figura 32), a intensidade do sinal em área de pico aumentou proporcionalmente com o aumento do volume de amostra injetado para o Sb(III). No entanto, a intensidade do sinal do Sb(V) também aumentou a partir de 100 μL de amostra injetados, sendo, portanto desfavorável para o objetivo do método proposto. Tendo em vista estas considerações, isso demonstra que o volume injetado pode ser variado, dependendo da sensibilidade necessária, porém é limitado pela seletividade, a cada determinação. Sendo assim, visando um sistema com boa sensibilidade, menor gasto de amostra e, principalmente, seletividade, o volume de amostra escolhido foi de 100 μL .

5.4.2.3. Escolha da vazão das soluções

Para avaliar a vazão das soluções foram fixados os diâmetros dos capilares da bomba peristáltica. Assim, foi usado capilar com d.i. 0,45 mm (vermelho/vermelho) para solução redutora, ácido cítrico e amostra e capilar com d.i. 0,69 mm (azul/verde) para o carregador da amostra e variada a rotação da bomba

peristáltica. Na Figura 33 está mostrado o efeito da vazão total do sistema sobre a intensidade do sinal do Sb(III) e Sb(V).

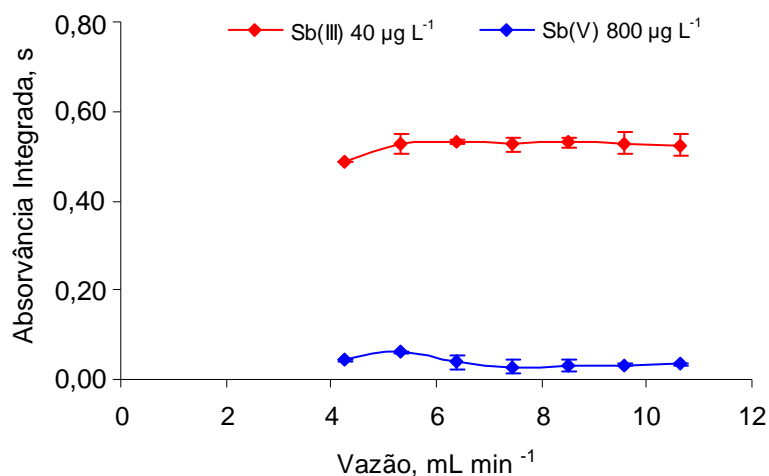


Figura 33. Influência da vazão total do sistema sobre a intensidade do sinal do Sb(V) e Sb(III). NaBH₄: 0,1% (m/v); ácido cítrico: 10% (m/v); volume de amostra: 100 µL; percurso analítico: 300 cm; vazão do gás de purga: 0,4 L min⁻¹.

Como pode ser visto na Figura 33, não foram observadas variações significativas na intensidade do sinal do Sb(III). No entanto, para o Sb(V) pode ser verificada uma pequena variação em função da vazão das soluções. Era de se esperar que houvesse um aumento da intensidade do sinal do Sb(V) em função do aumento da vazão, pois a complexação pode ser prejudicada (diminui o tempo de reação de complexação). Além disso, foi observado que vazões menores do que 7,4 mL min⁻¹ levaram a um alargamento do pico.

Dessa forma, o perfil dos picos, o tempo de retorno do sinal à linha base e a menor intensidade para o sinal do Sb(V) foram utilizados como critério de escolha da vazão das soluções. Assim, a vazão escolhida foi 8,5 mL min⁻¹, correspondendo a 2,0 mL min⁻¹ para as soluções do redutor e ácido cítrico e 4,5 mL min⁻¹ para o carregador da amostra.

5.4.2.4. Escolha da vazão do gás de arraste

Como na geração de hidretos, a fração gasosa é separada da parte líquida com auxílio de um gás de arraste no separador G/L, este deve ser avaliado uma vez que influencia no carregamento do hidreto até o detector, bem como na diluição do

hidreto formado. O gás utilizado para esta finalidade foi o argônio. Para o estudo da vazão do gás de arraste, as vazões foram variadas num intervalo de 0,4 a 2,0 L min⁻¹. Na Figura 34 está mostrada a influência da vazão do gás de arraste na resposta para o Sb(III).

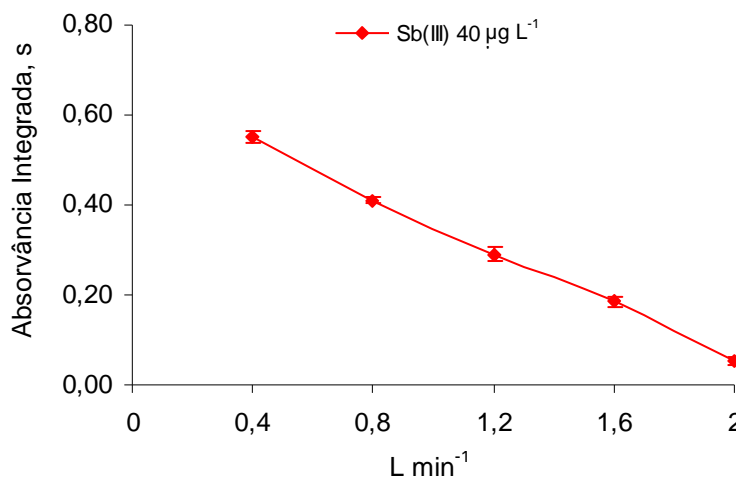


Figura 34. Influência da vazão do gás de arraste sobre a intensidade do sinal do Sb(III). NaBH₄: 0,1%(m/v); ácido cítrico: 10% (m/v); vazões do ácido cítrico, amostra e NaBH₄: 2,5 mL min⁻¹; vazão do carregador da amostra: 4,5 mL min⁻¹; volume de amostra: 100 µL; percurso analítico: 300 cm.

Como pode ser visto na Figura 34, a intensidade do sinal de Sb(III) apresentou uma tendência inversamente proporcional entre a vazão e a absorvância integrada. Isto pode ter sido acarretado devido à diluição do hidreto com o argônio. Sendo assim, a vazão de 0,4 L min⁻¹ foi selecionada como condição de trabalho, pois levou a maior intensidade de sinal para o Sb(III) e melhor perfil do sinal.

Cabe ressaltar que não foram testadas vazões menores do que 0,4 L min⁻¹, devido ao sinal analítico ser menos reprodutível e pelo perfil do sinal obtido, sendo muito alargado.

5.4.2.5. Interferência da concentração do Sb(V) na amostra sobre o Sb(III)

Para o estudo da influência da concentração de Sb(V), predominante na amostra, na determinação seletiva de Sb(III) foram avaliadas concentrações de 800 a 5000 µg L⁻¹ de Sb(V) na presença de 40 µg L⁻¹ de Sb(III). Na Figura 35, está mostrado o efeito da concentração de Sb(V) sobre a intensidade do sinal do Sb.

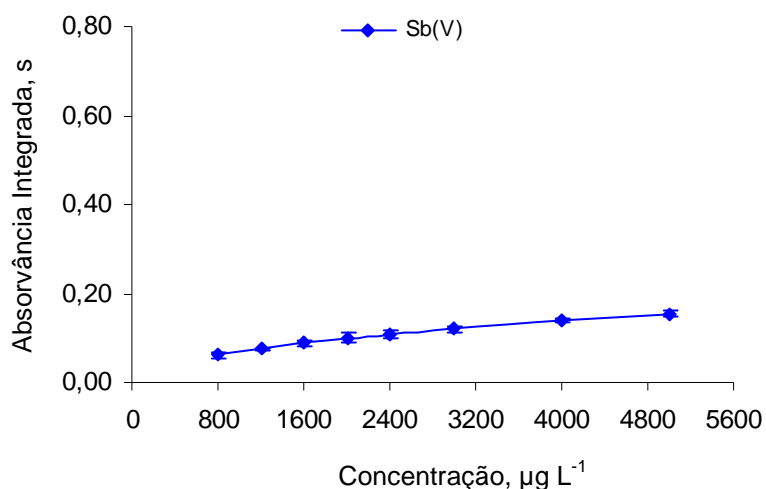


Figura 35. Efeito da concentração de Sb(V) sobre a intensidade do sinal do Sb. NaBH₄: 0,1%(m/v); ácido cítrico: 10% (m/v); vazões do ácido cítrico, amostra e NaBH₄: 2,5 mL min⁻¹; vazão do carregador da amostra: 4,5 mL min⁻¹; volume de amostra: 100 µL; percurso analítico: 300 cm; vazão do gás de arraste: 0,4 L min⁻¹.

De acordo com a Figura 35, é observado que a intensidade do sinal do Sb aumenta gradativamente para concentrações acima de 800 µg L⁻¹ de Sb(V), o qual pode ser gerado a partir do próprio Sb(V) ou de uma possível contaminação da solução com Sb(III). A partir destes dados pode-se concluir que é possível determinar seletivamente Sb(III) na presença de até 800 µg L⁻¹ de Sb(V).

As condições mais adequadas de trabalho para a determinação de Sb(III) em antimoniato de meglumina com o sistema FI-HG AAS estão mostradas na Tabela 6.

Tabela 6. Parâmetros operacionais utilizados para o sistema FI-HG AAS para a determinação seletiva de Sb(III) na presença de Sb(V).

Parâmetros	Condições
Concentração do ácido cítrico (% m/v)	10
Concentração de NaBH ₄ (% m/v)	0,1
Concentração de NaOH (% m/v) no NaBH ₄	0,05
Vazão do carregador da amostra (mL min ⁻¹)	4,5
Vazão da amostra e reagentes (mL min ⁻¹)	2,0
Volume de amostra (µL)	100
Vazão do gás de arraste (L min ⁻¹)	0,4
Comprimento do percurso analítico (cm)	300
Frequência de determinação/h ⁻¹	85

Uma vez definidas as condições experimentais para a determinação de Sb(III) (Tabela 6), o método foi aplicado para a determinação desta espécie em antimoniato de meglumina. Os resultados estão relacionados na Tabela 9.

Na Figura 36 pode ser verificado o perfil dos sinais obtidos a partir do Sb(III) de soluções de referência de Sb e amostra empregando o sistema FI-HG AAS proposto.

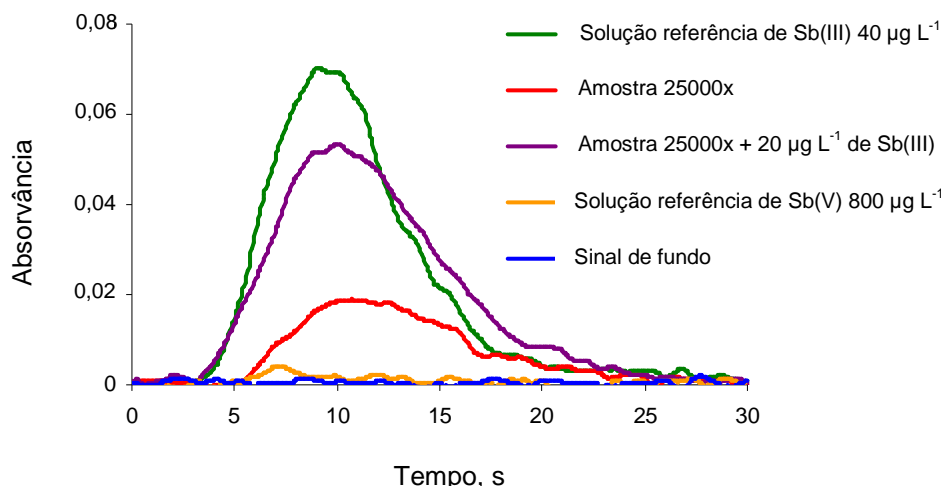


Figura 36. Perfil dos sinais para Sb obtidos pelo sistema FI-HG AAS proposto. NaBH₄: 0,1% (m/v); ácido cítrico: 10% (m/v); vazões do ácido cítrico, amostra e NaBH₄: 2,0 mL min⁻¹; vazão do carregador da amostra: 4,5 mL min⁻¹; volume de amostra: 100 µL; percurso analítico: 300 cm; vazão do gás de arraste: 0,4 L min⁻¹.

Como pode ser visto na Figura 36, o perfil dos sinais é praticamente o mesmo para o Sb(III) nas soluções de referência e amostra. No entanto, para a amostra (em vermelho) é observada uma pequena diferença no tempo de aparecimento do sinal (aproximadamente 2s) em relação a solução de referência de Sb(III). Outro ponto importante verificado é a supressão do sinal do Sb(V), desprezível em relação aos sinais de Sb(III). A partir destes dados pode-se concluir que é viável a determinação de Sb(III) na presença de Sb(V). Além disso, pode-se verificar que o comportamento do perfil do sinal do Sb na amostra com adição de Sb(III) é semelhante com o da solução referência de Sb(III). Portanto, pode-se concluir que possivelmente não há interferência do Sb(V) sobre a determinação de Sb(III), nas condições empregadas.

Uma vez definidas as condições experimentais do sistema FI-HG AAS (Tabela 6), o método foi aplicado para a determinação da espécie Sb(III) em antimoniato de meglumina. Os resultados estão relacionados na Tabela 9.

Foram feitos testes de recuperação para Sb(III), sendo obtido recuperação da ordem de 104%.

5.5. DETERMINAÇÃO DE Sb(III) EMPREGANDO SISTEMA FI-HG-ICP-MS

Tendo-se em vista os ajustes dos parâmetros químicos e físicos do sistema FI-HG AAS onde foi possível determinar Sb(III) na presença de Sb(V), o mesmo sistema foi acoplado ao espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado. As mesmas condições foram empregadas, exceto a vazão do gás de arraste, o qual foi ajustado para $1,10 \text{ L min}^{-1}$, condição que leva a melhor sensibilidade. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 9. Como pode ser verificado, os resultados são da mesma ordem de grandeza àqueles obtidos por FI-HG AAS. Também foi feito teste de recuperação para Sb(III), sendo obtido recuperação da ordem de 91%.

5.6. MÉTODOS OFICIAIS DE DETERMINAÇÃO DE Sb(III), Sb(V) E Sb TOTAL EM ANTIMONIATO DE MEGLUMINA

Adicionalmente e para comparação de resultados, foram utilizadas metodologias recomendadas pelos compêndios oficiais, tais como, Farmacopéia Brasileira²⁸ e Farmacopéia Britânica¹⁵³, para a determinação de Sb total, Sb(V) e Sb(III).

5.6.1. Determinação da concentração do Sb total por F AAS

De acordo com o procedimento já descrito no item 4.10.1, a Farmacopéia Brasileira²⁸ preconiza a determinação de Sb total em antimoniato de meglumina por F AAS, conforme descrito no item 4.1.3.1. Para tal, foi feita uma curva de calibração na faixa de $10 \text{ a } 40 \text{ mg L}^{-1}$ de Sb, a partir de solução estoque de Sb(III) a 1000 mg L^{-1} . A curva de calibração e as amostras (diluídas 2500x) foram preparadas em HCl $6,0 \text{ mol L}^{-1}$. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 7.

5.6.2. Determinação da concentração de Sb(III) por HG AAS

De acordo com a monografia da Farmacopéia Brasileira²⁸, a determinação do Sb(III) em amostra de antimoniato de meglumina é feita utilizando HG AAS, conforme descrito no item 4.10.2. Conforme a metodologia preconiza, foi feita uma curva de calibração a partir da diluição adequada de uma solução estoque de Sb(III) a 1000 mg L^{-1} em água. A solução de NaBH_4 a 1% (m/v) foi preparada e diluída com NaOH 0,1% (m/v). Para a geração de hidretos foram utilizados 10 mL de ácido cítrico a 4% (m/v) como meio reacional, 500 μL da amostra diluída (50000x) ou alíquotas de 100 μL de soluções de referência de Sb. Após a adição da solução contendo Sb (referência ou amostra) no frasco de reação, esperou-se exatamente 5s até adaptá-lo ao sistema para geração de hidretos. O sistema foi purgado com argônio durante 10s e, então foi feita a medição do Sb(III). Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 9.

5.6.3. Determinação da concentração de Sb(III) por método volumétrico e Sb(V) por método potenciométrico

O procedimento utilizado para a determinação de Sb(III) e Sb(V) por volumetria e potenciometria, respectivamente, está descrito no item 4.10.3. Este método foi desenvolvido para o fármaco estibogluconato de sódio, o qual também é utilizado no tratamento da leishmaniose e avaliado neste trabalho para o antimoniato de meglumina injetável. Para a determinação de Sb(III) foram utilizados 2 mL da amostra, adicionados de 30 mL da água e 15 mL de HCl concentrado. A titulação foi feita com bromato de potássio $0,0083 \text{ mol L}^{-1}$, utilizado alaranjado de metila como indicador. Na Figura 37 pode-se visualizar a amostra com os reagentes antes (a) e após (b) a titulação.

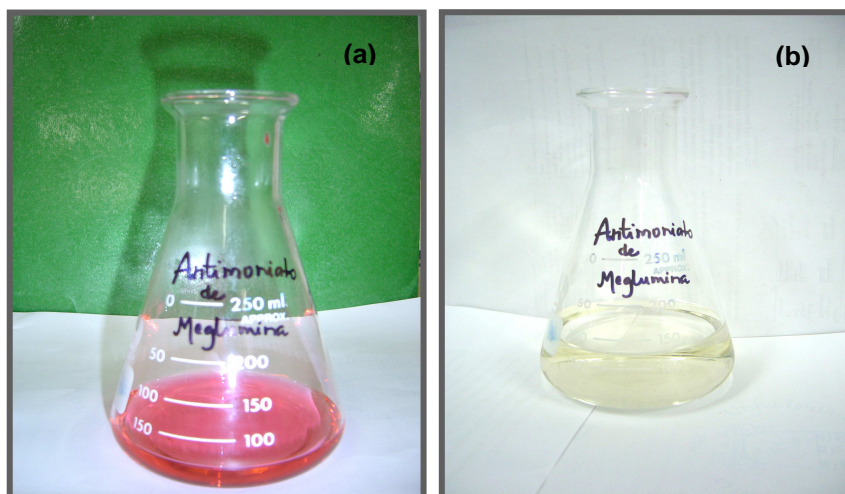


Figura 37. Fotos da solução de antimoníato de meglumina para determinação de Sb(III) pelo método oficial da Farmacopéia Britânica. (a) 2 mL da amostra + 15 mL de HCl + 30 mL de água + indicador alaranjado de metila, antes da titulação; (b) 2 mL da amostra + 15 mL de HCl + 30 mL de água + indicador alaranjado de metila, após a titulação.

De acordo com a Figura 37, pode-se verificar visualmente que o método proposto pela Farmacopéia Britânica¹⁵³ para a determinação de Sb(III) no estibogluconato de sódio é adaptável para o antimoníato de meglumina. As determinações foram feitas em triplicata e o resultado obtido para o Sb(III) foi de $2,3 \pm 0,04 \text{ mg mL}^{-1}$ no antimoníato de meglumina. A mesma metodologia foi utilizada para a determinação de Sb(V). Para tal, foram utilizados 0,5 mL da amostra, adicionados de 30 mL de HCl concentrado e 70 mL de ácido orto-fosfórico concentrado. A titulação foi feita com solução $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de sulfato de ferro(II) amoniacal. Na Figura 38 está mostrado a curva de titulação potenciométrica obtida.

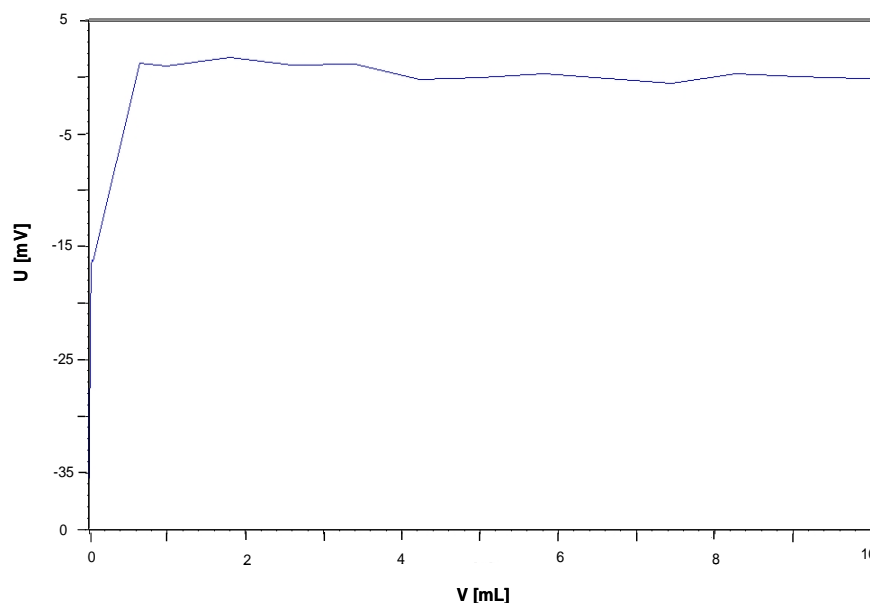


Figura 38. Curva de titulação potenciométrica obtida na determinação de Sb(V) em antimoniato de meglumina.

De acordo com a Figura 38, pode ser verificado através do perfil da curva de titulação obtido do Sb(V) na amostra que não há nenhum ponto de inflexão, ou seja, não é possível determinar o ponto de equivalência da titulação potenciométrica. Assim, pode-se concluir que a monografia do estibogluconato de sódio não pode ser usada para a determinação de Sb(V) no antimoniato de meglumina, provavelmente, devido a diferença da força de interação entre o Sb e o estibogluconato de sódio em relação ao antimoniato de meglumina.

5.7. AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS MÉTODOS PROPOSTOS PARA A ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE Sb

Os métodos propostos neste trabalho foram avaliados através de teste de recuperação das espécies de Sb estudadas [Sb(III) e Sb(V)] no antimoniato de meglumina. Para avaliar a recuperação das espécies de Sb, foram adicionadas concentrações conhecidas de soluções de Sb(V) e Sb(III) preparadas em água a partir de $C_4H_4KO_7Sb.0,5H_2O$ e $K[Sb(OH)_6]$, respectivamente. Para tal foram

utilizadas duas amostras (“A” e “B”) e diluídas com água de acordo com a concentração de cada espécie de Sb previamente determinada.

Nas Tabelas 7, 8 e 9 são apresentados os resultados obtidos das concentrações de Sb total, Sb(V) e Sb(III) em amostras comerciais de acordo com os métodos propostos e oficiais. Deve-se levar em conta que o valor teórico (descrito na bula do antimoniato de meglumina) para o Sb total é de 81 mg mL^{-1} e não há referência na descrição da amostra comercial em relação a presença de Sb(III).

Tabela 7. Concentrações de Sb total (mg mL^{-1}) obtidos por F AAS e LC-ICP-MS (coluna IonPac e PRP-X100) em antimoniato de meglumina. Os resultados correspondem a média e desvio padrão de 5 replicatas.

Lote	F AAS	LC-ICP-MS	
		(Coluna Dionex IonPac)	(Coluna PRP-X100)
A	$77,9 \pm 3,2$	$76,5 \pm 2,6$	$72,7 \pm 4,3$
B	$79,3 \pm 4,7$	$76,4 \pm 5,2$	$74,5 \pm 1,9$

Como pode ser observado na Tabela 7, os valores médios obtidos por LC-ICP-MS são um pouco inferiores do que os obtidos por F AAS. Esta diferença pode ser devido ao fato do Sb(III) não ter sido considerado na quantificação por LC-ICP-MS.

Tabela 8. Concentrações de Sb(V) (mg mL^{-1}) obtidas por LC-ICP-MS (coluna IonPac e PRP-X100) em antimoniato de meglumina. Os resultados correspondem a média e desvio padrão de 5 replicatas.

Lote	Sb(V)*	LC-ICP-MS	
		(Coluna Dionex IonPac)	(Coluna PRP-X100)
A	$76,9 \pm 2,7$	$7,5 \pm 0,12$	$8,4 \pm 0,14$
B	$78,3 \pm 4,3$	$7,4 \pm 0,20$	$8,1 \pm 0,19$
Recuperação (%)	- - -	96	101

*A concentração de Sb(V) foi obtida pela diferença entre os resultados do Sb total e Sb(III).

Tabela 9. Concentrações de Sb(III) inorgânico (mg mL^{-1}) obtidas por HG AAS, FI-HG AAS, FI-HG-ICP-MS e LC-HG-ICP-MS (coluna PRP-X100 e IonPac) em antimoniato de meglumina. Os resultados correspondem a média e desvio padrão de 5 replicatas.

Lote	HG AAS	FI-HG AAS	FI-HG-ICP-MS	LC-HG-ICP-MS (Coluna PRP- X100)	LC-HG-ICP-MS (Coluna IonPac)
A	$1,03 \pm 0,05$	$0,30 \pm 0,03$	$0,29 \pm 0,02$	$0,090 \pm 0,001$	$0,22 \pm 0,02$
B	$1,01 \pm 0,04$	$0,30 \pm 0,01$	$0,29 \pm 0,01$	$0,083 \pm 0,002$	$0,20 \pm 0,01$
Recuperação (%)	84	104	91	89	85
LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	---	1,1	0,05	2,7	---

De acordo com os resultados obtidos (Tabelas 7, 8 e 9), pode-se verificar através de teste estatístico (teste t, nível de confiança de 95%) que não houve diferença significativa nos resultados para Sb total para os dois lotes usados, bem como não houve diferença significativa entre os resultados obtidos pelos métodos propostos e o oficial.

Para os resultados de determinação de Sb(V), utilizando o mesmo teste estatístico, foi observada diferença entre os valores obtidos por LC-ICP-MS e pelo método oficial. No entanto, os ensaios de recuperação para determinação de Sb(V) foram de 96 a 101% para ambos os lotes.

Os resultados obtidos de Sb(III) nas amostras, também foram avaliados pelo mesmo teste estatístico e observou-se que entre os sistemas propostos (FI-HG AAS e FI-HG-ICP-MS) não houveram diferenças significativas. No entanto, comparando com o método oficial, os valores foram diferentes.

O sistema LC-HG-ICP-MS tem seletividade maior em comparação com os sistemas FI-HG AAS e FI-HG-ICP-MS, principalmente devido à melhor separação cromatográfica das espécies de Sb. É importante salientar, que a diferença entre os resultados obtidos com o sistema FI-HG AAS e a HG AAS pode ser devido a diferenças na cinética de reação de redução ou de complexação do ácido cítrico com o Sb(V). De maneira geral, os valores obtidos com a técnica HG AAS são maiores do que com a FI-HG AAS. Também, pode-se concluir que a metodologia proposta por LC-HG-ICP-MS permite melhor sensibilidade, principalmente devido às características da técnica de ICP-MS. No entanto, os resultados são estatisticamente diferentes dos outros métodos empregados, mas os ensaios de

recuperação do analito nos sistemas propostos para determinação de Sb(III) foram de 91 a 104% (FI-HG AAS e FI-HG-ICP-MS) e de 85 a 89% (LC-HG-ICP-MS), sendo portanto considerados satisfatórios.

Conforme exposto, percebe-se que ainda existe uma grande dificuldade para a identificação e quantificação de espécies de Sb no antimoniato de meglumina, principalmente por não existir material de referência certificado para este tipo de matriz. Além disso, ainda há a dificuldade de se obter soluções de compostos orgânicos de Sb. Existe somente um composto organometálico de Sb (o trimetilantimônio), sendo que outros compostos não são produzidos, devido a pouca estabilidade. Estes fatores dificultam a elucidação dos compostos de Sb presentes no fármaco, assim como a determinação das espécies inorgânicas e orgânicas de Sb. Desta forma, seria necessário avaliar as outras técnicas para elucidar os diferentes compostos de Sb presentes na amostra.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os objetivos propostos neste trabalho, foram avaliadas técnicas para a especiação de antimônio em antimoniato de meglumina. De maneira geral, foi possível concluir que há, no mínimo, quatro espécies de antimônio presentes neste fármaco. Entretanto, somente foi possível identificar e quantificar as espécies Sb(III) e Sb(V). As outras espécies não puderam ser identificadas e nem quantificadas, mas possivelmente, são espécies formadas entre Sb(III) e Sb(V) e a meglumina.

As técnicas empregadas para chegar nestes resultados foram a LC-ICP-MS, LC-HG-ICP-MS, FI-HG AAS e FI-HG-ICP-MS, bem como separações das espécies de Sb com CPG-8HQ. A seguir serão descritos, de modo detalhado, as observações tiradas de cada procedimento empregado.

Com o sistema LC-ICP-MS foram avaliados dois tipos de coluna de troca iônica [trocadora de ânions fraca (IonPac) e forte (PRP-X100)] para a separação e quantificação das espécies de Sb.

Com a coluna IonPac, foi possível separar duas espécies de Sb, porém apenas uma espécie inorgânica [Sb(V)] pode ser identificada por apresentar o mesmo tempo de retenção do Sb(V) usado como referência. O tempo de retenção do outro sinal obtido na separação cromatográfica não corresponde aos tempos de retenção do Sb(III) e Sb(V) usados como referência. Possivelmente, este sinal é devido a uma ou mais espécies de Sb ligada à NMG.

A separação dos picos foi relativamente boa, mas não adequada para a quantificação da espécie Sb(V). Entretanto, foi feito teste de recuperação para o Sb(V), obtendo-se uma recuperação satisfatória (da ordem de 96%).

Com a coluna PRP-X100, os picos cromatográficos obtidos, possuem melhor resolução. Entretanto, da mesma forma do que com a coluna IonPac, somente foi possível identificar e quantificar a espécie Sb(V), por apresentar o mesmo tempo de

retenção do Sb(V) usado como referência. Outros sinais, parcialmente sobrepostos, foram visualizados no cromatograma, mas não possuem tempos de retenção semelhantes a nenhuma das espécies inorgânicas de Sb usadas como referência. Estas espécies, provavelmente, são espécies de Sb ligada à NMG.

Porém, com o sistema LC-HG-ICP-MS sob determinadas condições reacionais de geração de hidretos é possível gerar somente estibina a partir de Sb(III) e suprimir os sinais referentes as espécies de Sb(V) e, identificar e/ou quantificar as espécies de Sb(III). Assim, empregando a coluna IonPac, conclui-se que o segundo pico eluído possui praticamente o mesmo tempo de retenção da solução referência de Sb(III), possibilitando afirmar que esta espécie na amostra pode ser o Sb(III) inorgânico. Também, foi satisfatório o resultado do teste de recuperação para o Sb(III) inorgânico.

Um outro pico cromatográfico observado pode ser uma espécie de Sb(III) ligada à NMG, cuja interação com a coluna é menor e, portanto, o tempo de retenção é menor do que o Sb(III) usado como referência.

Com a coluna PRP-X100, empregando LC-HG-ICP-MS, foram observados os mesmos aspectos relacionados com a coluna IonPac. Ou seja, foram observados dois picos cromatográficos, porém foi identificada somente a espécie Sb(III). Também, foi satisfatório o resultado do teste de recuperação para o Sb(III). O outro pico cromatográfico, não identificado, pode ser uma espécie Sb(III) ligada à NMG. Entretanto, a concentração determinada de Sb(III) na amostra foram inferiores aos obtidos com a coluna IonPac.

Portanto, com a técnica LC-HG-ICP-MS foi possível a separação e identificação da espécie inorgânica de Sb(III) presente na amostra.

Com os resultados obtidos com a utilização da CPG-8HQ associado com LC-ICP-MS foi possível identificar o Sb(III). O Sb(III) ficou totalmente retido na CPG-8HQ, sendo suprimido o sinal quando a solução residual [obtida a partir de solução contendo Sb(III) e Sb(V)] foi analisada por LC-ICP-MS. Além disso, foi observado que o primeiro pico também foi parcialmente suprimido nos testes empregando CPG-8HQ combinado com LC-ICP-MS. A partir destes testes pode-se concluir que há pelo menos duas espécies de Sb(III) presentes no antimoniato de meglumina, uma espécie de Sb(III) inorgânica e outra de Sb(III) ligada à NMG. Entretanto, com os testes feitos com a CPG-8HQ não foi possível obter maiores conclusões em relação às espécies de Sb presentes na amostra.

Em resumo, pode-se concluir que com o uso dos sistemas LC-ICP-MS e LC-HG-ICP-MS, as espécies inorgânicas de Sb(V) e Sb(III) podem ser identificadas e quantificadas, respectivamente. Entretanto, cabe destacar a dificuldade de identificar as outras espécies de antimônio presentes na amostra, possivelmente, Sb(III) e Sb(V) ligadas à NMG. Porém, a identificação e quantificação não foram possíveis por não existirem compostos de Sb ligada à NMG para serem usados como referência.

Os sistemas FI-HG AAS e FI-HG-ICP-MS foram utilizados para a determinação seletiva de Sb(III), através da complexação seletiva do Sb(V) com o ácido cítrico. Os resultados obtidos de Sb(III) total pelas duas técnicas foram da mesma ordem de grandeza. No entanto, os resultados de Sb(III) obtidos por estas técnicas foram inferiores aos resultados obtidos pelo método oficial descrito na Farmacopéia Brasileira, possivelmente devido a diferença de cinética de reação de geração de hidretos nos sistemas em fluxo e batelada.

Também, a partir dos resultados obtidos pode-se concluir que ainda existe uma grande dificuldade para a identificação e quantificação de todas as espécies de Sb no antimoniato de meglumina e que possivelmente alguns resultados reportados não representam a real concentração de todas as espécies de Sb presentes neste fármaco. Portanto, são necessárias mais investigações sobre este assunto. Possivelmente, será necessário o uso de outras técnicas complementares, tais como ESI-MS, para a identificação e quantificação das espécies não identificadas neste trabalho.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Berman, J. D., Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy and future strategies, *Rev. Infect. Dis.* 10 (1988) 560-586.
2. Guerin, P. J., Olliaro, P., Sundar, S., Boelaert, M., Croft S. L., Desjeux, P., Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis and treatment and a proposed research and development agenda, *Lancet. Infect. Dis.* 2 (2002) 494-501.
3. World Health Organization, WHO/TDR Tropical Disease Research-Leishmaniasis, <http://www.who.int>, acessado em 24/01/08.
4. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica- 2 ed., Ministério da Saúde, Brasília, 2007, 181 p.
5. Rath, S., Trivelin, L. A., Imbrunito, T. R., Tomazela, D. M., Jesús, M. N., Marzal, P. C., Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte, *Quím. Nova* 26 (2003) 550-555.
6. Dzamitika, S. A., Falcão, A. B. C., de Oliveira, F. B., Marbeuf, C., Garnier-Suillerot, A., Demicheli, C., Rossi-Bergmann, B., Frézard, F., Role of residual Sb(III) in meglumine antimoniate cytotoxicity and MRP1-mediated resistance, *Chem-Biol. Interact.* 160 (2006) 217-224.
7. Schubach, A. O., Marzochi, K. B. F., Moreira, J. S., Schubach, T. M. P., Araújo, M. L., Vale, A. C. F., Passos, S. R. L., Marzochi, M. C. A., *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38 (2005) 213-217.
8. Zheng, J., Ohata, M., Furuta, N., Antimony speciation in environmental samples by using high-performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Sci.* 16 (2000) 75-80.

9. Krachler, M., Emons, H., Zheng, J., Speciation of antimony for the 21st century: promises and pitfalls, *Trends Anal. Chem.* 20 (2001) 79-90.
10. Smichowski, P., Madrid, Y., Cámara, C., Analytical methods for antimony speciation in waters at trace and ultratrace levels - a review, *Fresenius J. Anal. Chem.* 360 (1998) 623-629.
11. Potin-Gautier, M., Pannier, F., Quiroz, N., Pinochet, H., Gregori, I., Antimony speciation analysis in sediment reference materials using high-performance liquid chromatography coupled to hydride generation atomic fluorescence spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 553 (2005) 214-222.
12. Krachler, M., Emons, H., Urinary antimony speciation by HPLC-ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 16 (2001) 20-25.
13. Lindemann, T., Prange, A., Dannecker, E., Neidhart, B., Simultaneous determination of arsenic, selenium and antimony species using HPLC/ICP-MS, *Fresenius J. Anal. Chem.* 364 (1999) 462-466.
14. Krachler, M., Emons, H., Potential of high performance liquid chromatography coupled to flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry for the speciation of inorganic and organic antimony compounds, *J. Anal. At. Spectrom.* 15 (2000) 281-285.
15. Krachler, M., Emons, H., Speciation analysis of antimony by high-performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry using ultrasonic nebulization, *Anal. Chim. Acta* 429 (2001) 125-133.
16. Smichowski, P., Antimony in the environment as a global pollutant: a review on analytical methodologies for its determination in atmospheric aerosols, *Talanta* 75 (2008) 2-14.
17. Campos, R. C., Gonçalves, R. A., Tonietto, G. B., Godoy, J. M., Brandão, G. P., High performance liquid chromatography hydride generation in situ trapping graphite furnace atomic absorption: A new way of performing speciation analysis spectrometry using GF AAS as detector, *Microchem. J.* 84 (2006) 26-30.
18. Wang, T., Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (LC-ICP-MS), *J. Liquid Chromatogr. & Rel Technol* 30 (2007) 807-831.

19. Montes-Bayón, M., DeNicola, K., Caruso, J. A., Liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 457-476.
20. Andrewes, P., Cullen, W., Organoantimony compounds in the environment in: Cornelis, J., *Organometallic Compounds in the Environment*, John Wiley & Sons Ltd., 2nd ed., Chichester, England, 2003, p. 277-303.
21. Feldmann, J., What can the different current detection methods offer for element speciation?, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 228-242.
22. Broekaert, J. A. C., Analytical Atomic Spectrometry with Flames and Plasmas. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA, Weinheim, Germany, 2002, 432 p.
23. Michalke, B., The coupling of LC to ICP-MS in element speciation: I. General aspects, *Trends Anal. Chem.* 21 (2002)142-153.
24. Michalke, B., Element speciation definitions, analytical methodology and some examples, *Ecotox. Environ. Safe.* 56 (2003) 122-139.
25. Szpunar, J., Lobinski, R., Species-selective analysis for metal biomacromolecular complexes using hyphenated techniques, *Pure Appl. Chem.* 71 (1999) 899-918.
26. Seubert, A., On-line coupling of ion chromatography with ICP-AES and ICP-MS, *Trends Anal. Chem.* 20 (2001) 274-287.
27. Ulrich, N., Shaked, P., Zilberstein, D., Speciation of antimony(III) and antimony(V) in cell extracts by anion chromatography/inductively coupled plasma mass spectrometry, *Fresenius J. Anal. Chem.* 368 (2000) 62-66.
28. Farmacopéia Brasileira, 4^a ed., Parte II, Fascículo 4, Atheneu Ltda, São Paulo, Brasil, 2002.
29. Filella, M., May, P. M., Computer simulation of the low-molecular-weight inorganic species distribution of antimony(III) and antimony(V) in natural waters, *Geochim. Cosmochim. Acta* 67 (2003) 4013-4031.
30. Filella, M., Belzile, N., Lett, M.-C., Antimony in the environment: a review focused on natural waters II., Relevant solution chemistry, *Earth-Sci. Rev.* 59 (2002) 265-285.
31. Lee, J. D., Química inorgânica não tão concisa, 6^a ed., Edgard Blücher Ltda. São Paulo, Brasil, 2006, p. 202-231.

32. Filella, M., Belzile, N., Lett, M.-C., Antimony in the environment: a review focused on natural waters. III. Microbiota relevant interactions, *Earth-Sci. Rev.* 80 (2007) 195-217.
33. Gebel, T., Claussen, K., Dunkelberg, H., Human biomonitoring of antimony, *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 71 (1998) 221-224.
34. International Agency for Research on Cancer, <http://www.iarc.fr>, acessada em 13/02/08.
35. U.S. Environmental Protection Agency, Integrated Risk Information System (IRIS) on Antimony, Brief Toxicological Summary for Antimony trioxide Integrated Laboratory Systems, INC, Research Triangle Park, North Carolina, USA, 2005, 16 p.
36. Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) Analysis of hazardous substances in biological materials, VCH, Weinheim, Germany, 1994, 51 p.
37. Leonard, A., Gerber, G. B., Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of antimony compounds, *Mutat. Res.: Rev. Genetic. Toxicol.* 366 (1996)1-8.
38. Gilman, G. A., *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*, 9ª ed. Mc Graw Hill, Rio de Janeiro, Brasil, 1996, 735 p.
39. Croft, S. L., Sundar, S., Fairlamb, A. H., Drug resistance in leishmaniasis, *Clin. Microbiol. Rev.* 19 (2006) 111-126.
40. Biblioteca virtual em saúde, Ministério da Saúde, <http://bvsmms.saude.gov.br>, acessado em 18/05/2008.
41. Bennett, G., *Tratado de Medicina Interna*, vol. 1, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, 2001, 2184 p.
42. Tiekink, E. R. T., Antimony and bismuth compounds in oncology, *Crit. Rev. Oncol. Hemat.* 42 (2002) 217-224.
43. Frézard, F., Schettini, D. A., Rocha, O. G. F., Demicheli, C., Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio, *Quím. Nova* 3 (2005) 511-518.
44. Coutinho-Azereido, R. B. G., Mendonça, S. C. F., Callahan, H., Portal, A. C. Grögl, M., Sensitivity of *Leishmania braziliensis* promastigotes to meglumine antimoniate (glucantime) is higher than that of other *Leishmania* species and correlates with response to therapy in american tegumentary leishmaniasis, *J. Parasitol.* 93 (2007) 688-693.

45. Demicheli, C., Figueiredo, T. L., Carvalho, S., Sinesterra, R. D., Lopes, J. C. D., Frézard, F., Physico-chemical characterization of meglumine antimoniate, *Biometals* 12 (1998) 63-66.
46. Ouellette, M., Drummelsmith, J., Papadopoulou, B., Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments, *Drug Resist. Update* 7 (2004) 257-266.
47. GLUCANTIME: solução injetável. Suzano-SP, Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda, 2007. Bula de medicamento.
48. Roberts, W. L., McMurray, W. J., Rainey, P. M., Characterization of the Antileishmanial Agent Meglumine Antimonate (Glucantime), *Antimicrob. Agents Chemother.* 42 (1998) 1076-1082.
49. Roberts, W. L., Berman, J. D., Rainey, P. M., In vitro antileishmanial, *antimicrob. Agents Chemother.* 39 (1995) 1234-1239.
50. Oliveira, F. B., Schettini, D. A., Ferreira C. S., Rates, B., Rocha, O. G. F., Frézard, F., Demicheli, C., Kinetics of antimony(V) reduction by L-cysteine. pharmacological implications and application to the determination of antimony in pentavalent antimonial drugs, *J. Braz. Chem. Soc.* 8 (2006) 1642.
51. Shaked-Mishan, P., Ulrich, N., Ephros, M., Zilberstein, D., Novel intracellular Sb^V reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 3971-3976.
52. Frézard, F., Demicheli, C., Ferreira, C. S., Costa, M. A. P., Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate, *Antimicrob. Agents Ch.* 45 (2001) 913-916.
53. Moura, F. J. D., Leal, P. P., Furtado R. S., Muniz-Junqueira, M. I., Veiga, J. P. R., Pentoxifylline prevents the meglumine antimonate-induced renal toxicity in rats, but not that induced by the inorganic antimony pentachloride, *Toxicology* 243 (2008) 66-74.
54. Amato, V. S., Tuon, F. F., Bacha, H. A., Neto, V. A., Nicodemo, A. C., Mucosal leishmaniasis - Current scenario and prospects for treatment, *Acta Trop.* 105 (2008) 1-9.
55. Yan, S., Li, F., Ding, K., Sun, H., Reduction of pentavalent antimony by trypanothione and formation of a binary e ternary complex of antimony(III) by trypanothione, *J. Biol. Inorg. Chem.* 8 (2003) 689-697.

56. Ferreira, C. S., Martins, P. S., Demicheli, C., Brochu, C., Ouellette, M., Frézard, F., Thiol-induced reduction of antimony(V) into antimony(III): A comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione, *Biometals* 16 (2003) 441-446.
57. Dopp, E., Hartmann, L. M., Florea, A.-M., Rettenmeier, A. W., Environmental distribution, analysis and toxicity of organometal(oid) compounds, *Crit. Rev. Toxicol.* 34 (2004) 301-333.
58. Demicheli, C., Frézard, F., Antimônio no tratamento de zoonoses, *Química Nova na Escola* 6 (2005) 24-30.
59. Franco, M. A., Barbosa, A. C., Rath, S., Dorea, J. G., Antimony oxidation states in antileishmanial drugs, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 52 (1995) 435-437.
60. Miekeley, N., Mortari, S. R., Schubach, A. O., Monitoring of total antimony and its species by ICP-MS and on-line in chromatography in biological samples from treated for leishmaniasis, *Anal. Bioanal. Chem.* 372 (2002) 495-502.
61. Bienert, G. P., Schüssler, M. D., Jahn, T. P., Metalloids: essential, beneficial or toxic? Major intrinsic proteins sort it out, *Trends Biochem. Sci.* 33 (2007) 20-26.
62. Frézard, F., Martins, P. S., Barbosa, M. C. M., Pimenta, A. M. C., Ferreira, W. A., Melo, J. E., Mangrum, J. B., New insights into the chemical structure and composition of the pentavalent antimonial drugs, meglumine antimonate and sodium stibogluconate, *J. Inorg. Biochem.* 102 (2008) 656-665.
63. Demicheli, C., Ochoa, R., Lula, I. S., Gozzo, F. C., Eberli, M., Frézard, F., Pentavalent organoantimonial derivatives: two simple and efficient synthetic methods for meglumine, *Appl. Organomet. Chem.* 17 (2003) 226-231.
64. Cornelis, R., De Kimpe, J., Zhang, X., Trace elements in clinical samples revisited-speciation is knocking at the door. Sample preparation, separation of the species and measurements methods, *Spectrochim. Acta B* 53 (1998) 187-196.
65. Nakahara, T., Applications of hydride generation techniques in atomic-absorption, atomic fluorescence and plasma atomic emission-spectroscopy, *Prog. Anal. Atom. Spectrosc.* 6 (1983) 163-223.

66. Brown, G. E. Jr., Foster, A. L., Ostergren, E., Mineral surfaces and bioavailability of heavy metals: A molecular-scale perspective, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (1999) 3388-3395.
67. Templeton, D. M., Biomedical aspects of trace element speciation, *Fresenius J. Anal. Chem.* 363 (1999) 505-511.
68. *International Union for Pure and Applied Chemistry*, <http://www.iupac.org>, acessado em 20/03/2008.
69. Templeton, D. M., Ariese, F., Cornelis, R., Danielsson, L., Muntau, H., Van Leeuwen, H. P., Lóbinski, R., Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects and methodological approaches, *Pure Appl. Chem.* 72 (2000) 1453-1470.
70. Ebdon, L., Hill, S. J., Rivas, C., Organotin compounds in solid waste: a review of their properties and determination using high-performance liquid chromatography, *Trends Anal. Chem.* 17 (1998) 277-288.
71. Caruso, J. A., Montes-Bayon, M., Elemental speciation studies - new directions for trace metal analysis, *Ecotox. Environ. Safe* 56 (2003) 148-163.
72. Rondón, C., Burguera, J. L., Burguera, M., Brunetto, M. R., Galignani, M., Petit de Peña, Y., Selective determination of antimony(III) and antimony(V) in liver-tissue by microwave-assisted mineralization and hydride generation atomic-absorption spectrometry, *Fresenius J. Anal. Chem.* 353 (1995) 133-136.
73. Petit de Peña, Y., Vielma, O., Burguera, J. L., Burguera, M., Rondón, C., Carrero, P., On-line determination of antimony(III) and antimony(V) in liver tissue and whole blood by flow injection-hydride generation-atomic absorption spectrometry, *Talanta* 55 (2001) 743-754.
74. Flores, E. M. M., Santos, E. P., Barin, J. S., Zanella, R., Dressler, V. L., Bittencourt, C. F., Determination of antimony(III) and total antimony by hydride generation atomic absorption spectrometry in samples of injectable drugs used for leishmaniasis treatment, *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 819-823.
75. Apte, S. C., Howard, A. G., Determination of dissolved inorganic antimony(V) and antimony(III) species in natural-waters by hydride

- generation atomic-absorption spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 1 (1986) 221-225.
76. Kumar, A. R., Riyazuddin, P., Mechanism of volatile hydride formation and their atomization in hydride generation atomic absorption spectrometry, *Anal. Sci.* 21 (2005) 1401-1410.
77. Kumar, A. R., Riyazuddin, P., Non-chromatographic hydride generation atomic spectrometric techniques for the speciation analysis of arsenic, antimony, selenium and tellurium in water samples - a review, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 87 (2007) 469-450.
78. Matusiewicz, H., Krawczyk, M., Determination of total antimony and inorganic antimony species by hydride generation in situ trapping flame atomic absorption spectrometry: a new way to (ultra) trace speciation analysis, *J. Anal. At. Spectrom.* 23 (2008) 43-53.
79. Hansen, H. R., Pergantis, S. A., Analytical techniques and methods used for antimony speciation analysis in biological matrices, *J. Anal. At. Spectrom.* 23 (2008) 1328-1340.
80. Dedina, J., Tsalev, D. L., Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry, 1st ed., John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England, 1995, 526 p.
81. Cai, Y., Speciation and analysis of mercury, arsenic, and selenium by atomic fluorescence spectrometry, *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 62-66.
82. Akter, K. F., Chen, Z., Smith, L., Davey, D., Naidu, R., Speciation of arsenic in ground water samples: A comparative study of CE-UV HG-AAS and LC-ICP-MS, *Talanta* 68 (2005) 406-415.
83. Butler, O. T., Cook, J. M., Harrington, C. F., Hill, S. J., Rieuwerts, J., Miles, D. L., Atomic spectrometry update. Environmental analysis, *J. Anal. At. Spectrom.* 23 (2008) 249-286.
84. Zhang, L. S., Combs, S. M., Using the installed spray chamber as a gas-liquid separator for the determination of germanium, arsenic, selenium, tin, antimony, tellurium and bismuth by hydride generation inductively coupled plasma mass-spectrometry, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 11 (1996) 1043-1048.
85. Andreae, M., Asmodé, J. F., Foster, P., Van't dack, L., Determination of antimony(III), antimony(V) and methylantimony in natural waters by atomic

- absorption spectrometry with hydride generation, *Anal. Chem.* 53 (1981) 1766-1771.
86. Yamamoto, M., Urata, K., Murashige, K., Yamamoto, Y., Differential determination of arsenic(III) and arsenic(V), and antimony(III) and antimony(V) by hydride generation-atomic absorption spectrophotometry and its application to the determination of these species in sea water, *Spectrochim. Acta Part B* 36 (1981) 671-677.
87. Nakahara, T., Kikui, N., Determination of trace concentrations of antimony by the introduction of stibine into an inductively-coupled plasma for atomic emission spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 172 (1985) 127-138.
88. Calle-Gutiñas, M. B., Madrid, Y., Cámara, C., Speciation of Sb(III) and Sb(V) by pH-control using three inorganic acid (HCl, phosphoric and sulfuric), *Fresenius J. Anal. Chem.* 343 (1992) 597-599.
89. Calle-Gutiñas, M. B., Madrid, Y., Cámara, C., Speciation of Sb by AAS-applicability to selective determination of Sb(III) and Sb(V) in liquid samples and bioavailable Sb in sediments and soils samples, *Mikrochim. Acta* 109 (1992) 149-155.
90. Nash, M. J., Maskall, J. E., Hill, S. J. J., Methodologies for determination of antimony in terrestrial environmental samples, *J. Environ. Monit.* 2 (2000) 97-109.
91. Calle-Gutiñas, M. B., Torralha, R., Madrid, Y., Palacios, M. A., Bonilla, M., Cámara, C., A study of hydride forming elements in the determination of As by hydride generation atomic absorption spectrometry and minimization of Sb and Se interference by α -hidroxyacids and KI, *Spectrochim. Acta Part B* 47 (1992) 1165-1172.
92. Takase, I., Pereira, B. H., Luna, A. S., Grinberg, P., Campos, R. C., A Geração química de vapor em espectrometria atômica, *Quím. Nova* 25 (2002) 1132-1144.
93. Feldmann, J., Koch, I., Cullen, W., Complementary use of capillary gas chromatography mass spectrometry (ion trap) and gas chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry for the speciation of volatile antimony, tin and bismuth compounds in landfill and fermentation gases, *Analyst* 123 (1998) 815-820.

94. Smichowski, P., Madrid, Y., Calle-Guntiñas, M. B., Cámara, C., Separation and determination of antimony(III) and antimony(V) species by high-performance liquid chromatography hydride generation atomic absorption spectrometric and inductively coupled mass spectrometric detection, *J. Anal. At. Spectrom.* 10 (1995) 815-821.
95. Jarvis, K. E., Gray, A. L., Houk, R. S., *Handbook of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, Blackie, New York, USA, 1992, 380 p.
96. Karlberg, B., Pacey, G. E., *Flow Injection Analysis, A Practical Guide, Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, v.10, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 1989, p. 13-17.
97. Brindle, I. D., Alarabi, H., Karshman, S., Le, X., Zheng, S., Combined generator/separator for continuous hydride generation: application to on-line pre-reduction of arsenic(V) and determination of arsenic in water by atomic emission spectrometry, *Analyst* 117 (1992) 407-411.
98. Marshall, G. D., Vanstaden, J. F., Use of flow-injection for in-line elimination of interferences in hydride generation atomic-absorption spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 5 (1990) 681-686.
99. Fang, Z. L., Trends of flow injection sample pre-treatment approaching the new millennium, *Anal. Chim. Acta* 400 (1999) 233-247.
100. Nielsen, S., Hansen, E. H., Determination of As(III) and As(V) by flow injection-hydride generation-atomic absorption spectrometry via on-line reduction of As(V) by KI, *Anal. Chim. Acta* 343 (1997) 5-17.
101. Rojas, F. S., Ojeda, C. B., Pavón, J. M. C., An ion-exchange method for speciation of antimony by flow injection electrothermal atomic absorption spectrometry, *Talanta* 71 (2007) 918-922.
102. Flores, E. M. M., Paula, F. R., da Silva, F. E. B., de Moraes, D. P., Paniz, J. N. G., dos Santos, E. P., Dressler, V. L., Bittencourt, C. F., Selective determination of Sb(III) in drugs by flow injection hydride generation AAS, *At. Spectrosc.* 24 (2003) 15-21.
103. Galignani, M., Ayala, C., Brunetto, M. R., Burguesa, M., Burguesa, J. L., Flow analysis- hydride generation-Fourier transform infrared spectrometric determination of antimony in pharmaceuticals, *Talanta* 59 (2003) 923-934.
104. Figueiredo, E. C., Luccas, P. O., Arruda, M. A. Z., Off-line speciation of Sb(III) and total Sb in pharmaceuticals by spectrophotometric flow-injection

- hydride generation using the potassium dichromate reaction, *J. Flow Injection Anal.* 22 (2005) 134-137.
105. Lima, M. F., Almeida, V. G. K., Cassella, R. J., Merging zones FIA system for the spectrophotometric determination of Sb(III) and total Sb in drugs used in the treatment of leishmaniasis, *Spectrosc. Lett.* 39 (2006) 769-784.
 106. Almeida, G. K., Lima, M. F., Casella, R. J., Development of a reversed FIA system for the spectrophotometric determination of Sb(III) and total Sb in antileishmanial drugs, *Talanta* 71 (2007) 1047-1053.
 107. Suzuki, K. T., Direct connection of high-speed liquid chromatograph (equipped with gel permeation column) to atomic absorption spectrophotometer for metalloprotein analysis: metallothionein. *Anal. Biochem.* 102 (1980) 31-34.
 108. Van Loon, J. C., Metal speciation by chromatography/atomic spectrometry, *Anal. Chem.* 51 (1979) 1139A-1150A.
 109. Ebdon, L., Alonso, J. I. G., Hill, S., Hopkins, A., Versatile computer-controlled interface system for directly coupled high-performance liquid chromatography-flame atomic-absorption spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 3 (1998) 395-399.
 110. Ebdon, L., Hill, S. J., Jones, P., Speciation of tin in natural-waters using coupled high-performance liquid chromatography flame atomic-absorption spectrometry, *Analyst* 110 (1985) 515-517.
 111. Tsalev, D., Hyphenated vapour generation atomic absorption spectrometric techniques. Invited lecture, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 14 (1999) 147-162.
 112. Hill, S. J., Bloxham, M. J., Worsfold, P. J., Chromatography coupled with inductively coupled plasma atomic emission spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 8 (1993) 499-515.
 113. Sanz-Medel, A., Aizpun, B., Marchante, J. M., Segovia, E., Fernandez, M. L., Blanco, E., Vesicle-mediated high-performance liquid chromatography coupled to atomic detection for speciation of toxic elements. *J. Chromatogr. A* 683 (1994) 233-243.
 114. Lobinski, R., Schaumlöffel, D., Szpunar, J., Mass spectrometry in bioinorganic analytical chemistry, *Mass Spectrom. Rev.* 25 (2006) 255-289.

115. LaCourse, W. R., Column liquid chromatography: equipment and instrumentation, *Anal. Chem.* 74 (2002) 2813-2831.
116. Sutton, K. L., Caruso, J. A., Liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 856 (1999) 243-258.
117. Wang, L., May, S. W., Broner R. F., Pollock, S. H., Low-flow interface for liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry speciation using oscillating capillary nebulizer, *J. Anal. At. Spectrom.* 11 (1996) 1137-1146.
118. B`Hymer, C., Caruso, J. A., Arsenic and its speciation analysis using high-performance liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1045 (2004) 1-13.
119. Gong, Z., Lu, X., Ma, M., Watt, C., Le, X. C., Arsenic speciation analysis, *Talanta* 58 (2002) 77-96.
120. Nash, M. J., Maskall, J. E., Hill, S. J., Developments with anion exchange stationary phases for HPLC-ICP-MS analysis of antimony species, *Analyst* 131 (2006) 724-730.
121. Lintschinger, J. L., Koch, I., Serves, S., Feldmann, J., Cullen, W. R., Determination of antimony species with high-performance liquid chromatography using element specific detection, *Fresenius J. Anal. Chem.* 359 (1997) 484-491.
122. Dunemann, L., Coupling techniques in speciation analysis, *Fresenius J. Anal. Chem.* 342 (1992) 802-804.
123. Szpunar, J., Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques, *Analyst* 125 (2000) 963-988.
124. Statler, J., *Ion Chromatography in: Settle, F. A., Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*, Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, USA, 1997, p.199-217.
125. Sarzanini, C., Recent developments in ion chromatography, *J. Chromatogr. A* 956 (2002) 3-13.
126. Sarzanini, C., Liquid chromatography: a tool for the analysis of metal species, *J. Chromatogr. A* 850 (1999) 213-228.
127. Ackley, K. L., Caruso, J. A., *Separation techniques liquid chromatography*, in: Cornelis, R., Crews, H., Caruso, J. A., Heumann, K., *Handbook of*

- elemental speciation: Techniques and Methodology*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England, 2003, 147-162.
128. Ulrich, N., Speciation of antimony(III), antimony(V) and trimethylstiboxide by ion chromatography with inductively coupled plasma mass atomic emission spectrometric and mass spectrometric detection, *Anal. Chim. Acta* 359 (1998) 245-253.
 129. Miravet, R., López-Sánchez, J. F., Rubio, R., New considerations about the separation and quantification of antimony species by ion chromatography-hydride generation atomic fluorescence spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1052 (2004) 121-129.
 130. Lintschinger, J., Schramel, O., Kettrup, A., The analysis of antimony species by using ESI-MS and HPLC-ICP-MS, *Fresenius J. Anal. Chem.* 361 (1998) 96-102.
 131. Ulrich, N., Study of ion chromatographic behavior of inorganic and organic antimony species by using inductively coupled plasma mass spectrometric (ICP-MS) detection, *Fresenius J. Anal. Chem.* 360 (1998) 797-800.
 132. Zheng, J., Ohata, M., Furuta, N., Studies on the speciation of inorganic and organic antimony compounds in airborne particulate matter by HPLC-ICP-MS, *Analyst* 125 (2000) 1025-1028.
 133. Morita, Y., Kobayashi, T., Kuroiwa, T., Narukawa, T., Study on simultaneous speciation of arsenic and antimony by HPLC-ICP-MS, *Talanta* 73 (2007) 81-86.
 134. Lobinski, R., Speciation-targets, analytical solutions and markets, *Spectrochim. Acta Part B* 53 (1998) 177-185.
 135. Sandell, E. B., Onishi, H., *Photometric Determination of Traces of Metals General Aspects*, John Wiley & Sons Ltd., 4th, vol. 3, Parte I, New York, USA, 1978, 415-448.
 136. Katz, S. D., Salem, H., The toxicology of chromium with respect to its chemical speciation: a review, *J. Appl. Toxicol.* 13 (1993) 217-224.
 137. Lauding, M. W., Haraldson, C., Paxéux, N., Vinil polymer agglomerate based transition metal cation-chelating ion-exchange resin containing the 8-hydroxyquinoline functional group, *Anal. Chem.* 58 (1986) 3031-3035.

138. Sturgeon, R. E., Berman, S. S., Willie, S. N., Desaulniers, J. A. H., Preconcentration of trace elements from seawater with silica-immobilized 8-hydroxyquinoline, *Anal. Chem.* 53 (1981) 2337-2340.
139. Santos, E. P., Determinação de espécies de arsênio, antimônio e chumbo em antimoniato de meglumina por espectrometria de absorção atômica após extração em fase sólida, Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Maria, 2006, 94 p.
140. Petit de Peña, Y., Galignani, M., Burguera, M., Burguera, J. L., Añez, N., Lugo, A. Y., Selective determination of antimony(III) and antimony(V) in blood serum and urine by hydride generation and atomic absorption spectrometry, *J. Braz. Chem. Soc.* 1 (1990) 72-75.
141. Rath, S., Jardim, W. F., Dórea, J. G., A simple spectrophotometric procedure for the determination of antimony(III) and (V) in antileishmanial drugs, *Fresenius J. Anal. Chem.* 358 (1997) 548-550.
142. Figueiredo, E. C., Dedina, J., Arruda, M. A. Z., Metal furnace heated by flame as a hydride atomizer for atomic absorption spectrometry: Sb determination in environmental and pharmaceutical samples, *Talanta* 73 (2007) 621-628.
143. Cabral, L. M., Juliano, V. N. M., Dias, L. R. S., Dornelas, C. B., Rodrigues, C. R., Villardi, M., Castro, C. H., Santos, T. C., Speciation of antimony(III) and antimony(V) using hydride generation for meglumine antimoniate pharmaceutical formulations quality control, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 103 (2008) 130-137.
144. Trivelin, L. A., Rohwedder, J. J., Rath, S., Determination of pentavalent antimony in antileishmaniotic drugs using an automated system for liquid-liquid extraction with on-line detection, *Talanta* 68 (2006) 1536-1543.
145. Welz, B., Sperling, M.; *Atomic Absorption Spectrometry*, vol. 1, VHC, 3rd ed., Weinheim, Germany, 1999, 475 p.
146. Matusiewicz, H., Atom trapping and in situ preconcentration techniques for flame atomic absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta B* 52 (1997) 1711-1736.
147. Ammann, A. A., Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS): a versatile tool, *J. Mass Spectrom.* 42 (2007) 419-427.

148. Becker, J., S., *Inorganic Mass Spectrometry-Principles and Applications*. John Wiley & Sons, Ltd, Jülich, Germany, 2007, 30 p.
149. Huang, J., Hu, X., Zhang, J., Li., K., Yan, Y., Xu, X., The application of inductively coupled plasma mass spectrometry in pharmaceutical and biomedical analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40 (2006) 227-234.
150. Wang, T., Wu, J., Hartman, R., Jia, X., Egan, R. S., A multi-element ICP-MS survey method as an alternative to the heavy metals limit test for pharmaceutical materials, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23 (2000) 867-890.
151. Lewen, N., Mathew, S., Schenkenberger, M., Raglione, T., A rapid ICP-MS screen for heavy metals in pharmaceutical compounds, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35 (2004) 739-752.
152. ELAN Version 3.0 “*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer – Software Guide*”, PerkinElmer SCIEX, Thornhill, Canada, 2003.
153. British Pharmacopoeia. 4th ed. London, Her Majesty's Stationery Office, 2007, CD-ROM.
154. Zoorob, G. K., McKiernan, J. W., Caruso, J. A., ICP-MS for elemental speciation studies, *Mikrochim. Acta* 128 (1998) 145-168.
155. Beauchemin, D., Berman, S. S., Determination of trace metals in reference water standards by inductively coupled plasma mass spectrometry with on-line preconcentration, *Anal. Chem.* 61 (1989) 1851-1857.
156. Nelms, S. M., Greenway, G. M., Hutton, R. C., Application of multi-element time-resolved analysis to a rapid on-line matrix separation system for inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 10 (1995) 929-933.
157. Mohammad, B., Ure, A. M., Reglinski, J., Littlejohn, D., Speciation of antimony in natural waters: the determination of Sb(III) and Sb(V) by continuous flow hydride generation-atomic absorption spectrometry, *Chem. Spec. Bioavailab.* 3 (1990) 117-122.
158. Guy, A., Jones, P., Hill, S., J., Identification and chromatographic separation of antimony species with α -hydroxy acids, *Analyst* 123 (1998) 1513-1518.
159. Zheng, J., Lijima, A., Furuta, N., Complexation effect of antimony compounds with citric acid and its application to the speciation of antimony(III) and antimony(V) using HPLC-ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 16 (2001) 812-818.

-
160. Hansen, H. R., Pergantis, S. A., Investigating the formation of an Sb(V)-citrate complex by HPLC-ICP-MS and HPLC-ES-MS(/MS), *J. Anal. At. Spectrom.* 21 (2006) 1240-1248.