



**UFSM**

**Dissertação de Mestrado**

**ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE ANTIMÔNIO EM ANTIMONIATO DE  
MEGLUMINA**

---

**Franciéli Kaspary Schons**

**PPGQ**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2014**

# ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE ANTIMÔNIO EM ANTIMONIATO DE MEGLUMINA

---

por

**Francieli Kaspary Schons**

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

Santa Maria, RS, Brasil

2014

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

**ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE ANTIMÔNIO EM ANTIMONIATO DE  
MEGLUMINA**

Elaborada por

**Francieli Kaspary Schons**

Como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Mestre em Química**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

Prof. Dr. Valderi Luiz Dressler – Orientador (UFSM-RS)

---

Prof. Dr. Sergio Mortari (UNIFRA-RS)

---

Prof. Dr. Cezar Bizzi (UFSM-RS)

## AGRADECIMENTOS

---

Ao **Programa de Pós-Graduação em Química** da Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Valderi Luiz Dressler**, pela orientação neste trabalho e pelos inúmeros ensinamentos que contribuíram para minha formação profissional.

Aos professores **Dr. Cezar Bizzi** e **Dr. Sérgio Mortari** pela participação na banca examinadora, bem como pelas contribuições para o enriquecimento deste trabalho.

Aos demais professores do Laboratório de Análises Químicas, Industriais e Ambientais, **Dr. Érico Flores**, **Dra. Paola Mello**, **Dr. Edson Müller**, **Dr. Fábio Duarte**, **Dr. José Neri Paniz**, **Dr. Juliano Barin**, **Dra. Cláudia Barin**, pelas oportunidades de aprendizado durante o mestrado e convívio.

Aos colegas do LAQIA, pela colaboração na execução deste trabalho. Em especial a **Clarissa Marques Moreira**, **Suelem Kaczala**, **Cristiano Müller**, **Camila Knorr**, **Lucas Schmidt**, **Jucelino Marques Junior** e **Paula Balestrin**, pelo convívio, apoio, sugestões e contribuições para a realização deste trabalho.

Ao **Ademir** e **Valéria**, da secretaria do PPGQ, pela atenção e apoio dispensados.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** pela bolsa de estudo fornecida.

A minha família, em especial, minha mãe **Lisônia**, meu pai **Celso** e meus irmãos **Fábio** e **Fabíola**, pelo apoio incondicional, compreensão, companhia, bem como exemplo de honestidade e caráter.

**SUMÁRIO**

---

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....</b>	<b>xiii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xv</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xvi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. ANTIMÔNIO.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1.1. Efeito Toxicológico do Sb .....</b>	<b>4</b>
<b>2.2. LEISHMANIOSE .....</b>	<b>5</b>
<b>2.2.1. Tratamento.....</b>	<b>6</b>
<b>2.3. ANTIMONIATO DE MEGLUMINA .....</b>	<b>8</b>
<b>2.3.1. Mecanismo de Ação .....</b>	<b>9</b>
<b>2.4. ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO QUÍMICA.....</b>	<b>9</b>
<b>2.4.1. Técnicas utilizadas para a análise de especiação.....</b>	<b>11</b>
2.4.1.1. Geração de hidretos.....	12
2.4.1.2. Cromatografia a líquido.....	14
2.4.1.3. Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado.....	15
<b>2.5. ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE Sb .....</b>	<b>16</b>
<b>2.5.1. Análise de especiação de Sb em NMG .....</b>	<b>18</b>

<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
<b>4.1. INSTRUMENTAÇÃO .....</b>	<b>26</b>
4.1.1. Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado.....	26
4.1.2. Cromatografia a líquido .....	27
4.1.3. Injeção em fluxo com geração de hidretos .....	28
4.1.4. Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado.....	29
<b>4.2. REAGENTES.....</b>	<b>29</b>
<b>4.3. MATERIAIS DIVERSOS.....</b>	<b>30</b>
<b>4.4. AMOSTRAS E TRATAMENTO .....</b>	<b>30</b>
<b>4.5. SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA DAS ESPÉCIES .....</b>	<b>31</b>
<b>4.6. DETERMINAÇÃO DE Sb(III) POR LC-HG-ICP-MS .....</b>	<b>31</b>
<b>4.7. AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS MÉTODOS PROPOSTOS PARA     A ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO .....</b>	<b>32</b>
<b>5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS .....</b>	<b>34</b>
<b>5.1. OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA LC-ICP-MS.....</b>	<b>35</b>
5.1.1. Ajuste do instrumento de ICP-MS.....	35
5.1.2. Escolha das condições para a separação cromatográfica .....	35
5.1.2.1. Fase móvel EDTA .....	36
5.1.2.2. Fase móvel HNO <sub>3</sub> .....	45
<b>5.2. TRATAMENTO DAS AMOSTRAS EMPREGANDO O SISTEMA LC-ICP-     MS.....</b>	<b>49</b>

<b>5.3. RESULTADOS EMPREGANDO O SISTEMA LC-HG-ICP-MS.....</b>	<b>54</b>
<b>5.4. RESULTADOS UTILIZANDO O SISTEMA FI-HG-ICP-MS.....</b>	<b>56</b>
<b>5.5. ENSAIO DE RECUPERAÇÃO EMPREGANDO TRATAMENTO ÁCIDO NA AMOSTRA COM A TÉCNICA LC-ICP-MS .....</b>	<b>57</b>
<b>5.6. DETERMINAÇÃO DE Sb TOTAL EMPREGANDO A TÉCNICA DE ICP OES.....</b>	<b>57</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>59</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>61</b>

## LISTA DE FIGURAS

---

- Figura 1.** Duas estruturas propostas para o complexo meglumina:Sb(V).  
<sup>27</sup> ..... 9
- Figura 2.** Sistema LC-ICP-MS empregado. 1- Fases móveis; 2- Degaseificador à vácuo; 3- Bomba de LC; 4- Alça de amostragem e injetor; 5- Pré-coluna; 6- Coluna de troca aniônica; 7- Nebulizador; 8- Câmara de nebulização; 9 e 10- ICP-MS..... 28
- Figura 3.** Sistema LC-HG-ICP-MS. 1- Fases móveis; 2- Degaseificador à vácuo; 3- Bomba de LC; 4-Alça de amostragem e injetor; 5- Pré-coluna; 6- Coluna de troca aniônica; 7- Bomba peristáltica; 8- Entrada de ácido cítrico (2,0 mL min<sup>-1</sup>); 9- Entrada de NaBH<sub>4</sub> (2,0 mL min<sup>-1</sup>); 10- Caminho reacional (300 cm); 11- Entrada de argônio; 12- Separador gás-líquido; 13- Descarte; 14 e 15- ICP-MS. .... 32
- Figura 4.** Esquema das técnicas utilizadas no presente trabalho..... 33
- Figura 5.** (a) Cromatograma da separação de Sb(III) e Sb(V) em solução de referência empregando EDTA como fase móvel em pH 4,5, na vazão 1,0 mL min<sup>-1</sup>, utilizando o sistema LC-ICP-MS; (b) ampliação de 20 vezes do cromatograma (a)..... 37
- Figura 6.** Cromatograma obtido da separação das espécies de Sb presentes no medicamento e da solução de referência das espécies de Sb utilizando como fase móvel EDTA 20 mmol L<sup>-1</sup>, a 1,00 mL min<sup>-1</sup> no sistema LC-ICP-MS..... 38
- Figura 7.** (a) Cromatograma obtido na separação das espécies de Sb presentes no NMG utilizando EDTA 20 mmol L<sup>-1</sup> em pH 4,5 como fase móvel em diferentes vazões (A, B, C e D),



- descritas com mais detalhes na Tabela 4 e utilizando o sistema LC-ICP-MS; (b) ampliação de 5,5 vezes do cromatograma (a)..... 41
- Figura 8.** Cromatograma obtido a partir da solução de referência de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  de Sb(III) e  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  de Sb(V) utilizando EDTA  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  em pH 4,5 com LiCl  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  como fase móvel, vazão  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  e utilizando o sistema LC-ICP-MS..... 42
- Figura 9.** (a) Cromatograma obtido na separação das espécies de Sb(III) e Sb(V) na solução de referência utilizando EDTA  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  + metanol 0,5% (v/v) como fase móvel, vazão  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  utilizando o sistema LC-ICP-MS; (b) ampliação de 5 vezes do cromatograma (a)..... 44
- Figura 10.** Cromatograma obtido na separação das espécies de Sb(III) e Sb(V) da solução referência utilizando  $\text{HNO}_3$   $15 \text{ mmol L}^{-1}$  em pH 6,0 como fase móvel, vazão  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  e sistema de LC-ICP-MS..... 46
- Figura 11.** Cromatogramas obtidos na separação das espécies presentes no NMG diluída 400.000x em água utilizando a fase móvel de  $\text{HNO}_3$   $15 \text{ mmol L}^{-1}$  em pH 6,0 em diferentes vazões, no sistema de LC-ICP-MS, com os programas estudados descritos na Tabela 5. .... 47
- Figura 12.** Cromatograma obtido na separação das espécies presentes no medicamento utilizando 5 min de  $\text{HNO}_3$   $15 \text{ mmol L}^{-1}$  em pH 6,0 e após 10 min, EDTA  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  em pH 4,5, ambos na vazão de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  e sistema LC-ICP-MS..... 49
- Figura 13.** (a) Cromatograma obtido na separação das espécies de Sb presentes no NMG tratadas com diferentes concentrações

de HCl, utilizando como fase móvel o HNO<sub>3</sub> em pH 6,0 por 5 min mais 10 min com EDTA 20 mmol L<sup>-1</sup> em pH 4,5, ambos na vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e o sistema LC-ICP-MS e (b) ampliação de 35,7 vezes do cromatograma (a). ..... 50

**Figura 14.** Cromatograma obtido na separação da solução referência de Sb(III) tratada com HCl 5 mol L<sup>-1</sup>, utilizando como fase móvel HNO<sub>3</sub> em pH 6,0 por 5 min mais 10 min com EDTA 20 mmol L<sup>-1</sup> em pH 4,5, ambos na vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e o sistema LC-ICP-MS. .... 53

**Figura 15.** Cromatograma obtido na separação das espécies padrão de Sb(V) tratada com ácido, utilizando como fase móvel HNO<sub>3</sub>, pH 6,0 por 5 min mais 10 min com EDTA 20 mmol L<sup>-1</sup> em pH 4,5, ambos na vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e o sistema LC-ICP-MS. .... 53

**Figura 16.** Cromatograma obtido na separação das espécies presentes no NMG com e sem tratamento com HCl e solução referência de Sb(III), utilizando o sistema LC-HG-ICP-MS..... 55

**LISTA DE TABELAS**

---

<b>Tabela 1.</b> Resumo de trabalhos sobre a determinação das espécies de Sb em NMG.....	22
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros operacionais do instrumento de ICP-MS.....	26
<b>Tabela 3.</b> Parâmetros operacionais do instrumento de ICP OES.....	29
<b>Tabela 4.</b> Programas referentes à vazão da fase móvel utilizados na separação das espécies de Sb presentes no NMG.....	40
<b>Tabela 5.</b> Programas utilizados na separação das espécies presentes no medicamento.....	47
<b>Tabela 6.</b> Valores de resoluções obtidos nas otimizações utilizando o sistema LC-ICP-MS com diferentes proporções de EDTA, água e HNO <sub>3</sub> como fase móvel.....	48
<b>Tabela 7.</b> Resultados obtidos (média e desvio padrão, mg mL <sup>-1</sup> ; n=3) de espécies de Sb em NMG utilizando diferentes concentrações de HCl com o sistema LC-ICP-MS.....	51
<b>Tabela 8.</b> Resultados obtidos no NMG para Sb(III) utilizando o sistema LC-HG-ICP-MS (média e desvio padrão, mg mL <sup>-1</sup> ; n=3).....	56
<b>Tabela 9.</b> Resultados obtidos na determinação de Sb(III) no NMG utilizando o sistema FI-HG-ICP-MS (média e desvio padrão, mg mL <sup>-1</sup> ; n=3).....	56
<b>Tabela 10.</b> Resultados obtidos por LC-ICP-MS e ICP OES para Sb total na amostra com e sem tratamento com ácido HCl 5 mol L <sup>-1</sup> (média e desvio padrão, mg mL <sup>-1</sup> ; n=3).....	57

**Tabela 11.** Resultados obtidos para Sb(III) e Sb(V) utilizando os sistemas LC-HG-ICP-MS e LC-ICP-MS (média e desvio padrão, mg mL<sup>-1</sup>; n=3). .....58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

---

1. AFS, *atomic fluorescence spectrometry*, espectrometria de fluorescência atômica.
2. cps, *counts per second*, contagens por segundo.
3. DNA, *deoxyribonucleic acid*, ácido desoxirribonucléico.
4. DPP, *differential pulso polarography*, polarografia de pulso diferencial.
5. EDTA, ácido etilenodiaminotetracético.
6. EPA, *Environmental Protection Agency*, Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos.
7. ESI-MS, *electro spray ionization mass spectrometry*, espectrometria de massas com ionização por eletro spray.
8. F AAS, *flame atomic absorption spectrometry*, espectrometria de absorção atômica por chama.
9. FIA, *flow injection analysis*, análise por injeção em fluxo.
10. Fiocruz, Fundação Oswaldo Cruz.
11. GF AAS, *graphite furnace atomic absorption spectrometry*, espectrometria de absorção atômica por forno de grafite.
12. HG F AAS, *hydride generation with flame atomic absorption spectrometry*, espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos por chama.
13. ICP-MS, *inductively coupled plasma mass spectrometry*, espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado.
14. ICP OES, *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*, espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado.
15. IUPAC, *International Union of Pure and Applied Chemistry*, União Internacional de Química Pura e Aplicada.
16. LOD, *limit of detection*, limite de detecção.
17. LOQ, *limit of quantification*, limite de quantificação.
18. NMG, antimoniato de meglumina.
19. OMS, Organização Mundial de Saúde.
20. PEEK, poli(éter-éter-cetona).
21. PET, politereftalato de etileno.
22. PSA, *potentiometric stripping analysis*, análise potenciométrica de redissolução.

23. PSDVB, poliestireno divinil benzeno.
24. R, resolução.
25. RNA, *ribonucleic acid*, ácido ribonucleico.
26. SD, *standard deviation*, desvio padrão.
27. SEC, *size exclusion chromatography*, cromatografia de exclusão molecular.
28. SSG, *sodium stibogluconate*, estibogluconato de sódio.
29. W, Watts.

## RESUMO

---

Neste trabalho foram otimizadas as condições cromatográficas para a separação de espécies de antimônio no medicamento antimoniato de meglumina. Ademais, foi avaliado o efeito do tratamento da amostra com ácido clorídrico, a fim de converter as espécies Sb(III) e Sb(V), complexadas com a meglumina, em suas formas inorgânicas livres. A separação das espécies de Sb foi feita por cromatografia a líquido (LC) em uma coluna de troca aniônica (PRP-X100) e detecção por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). As concentrações de Sb obtidas por LC-ICP-MS foram comparadas às aquelas obtidas por LC-ICP-MS utilizando derivação pós-coluna por geração de hidretos (HG). Também foram comparados os resultados da concentração de Sb total, obtido pelo somatório das concentrações das espécies determinadas por LC-ICP-MS, com os resultados obtidos por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). Após as avaliações de diferentes fases móveis para a separação das espécies de Sb, as condições selecionadas foram: HNO<sub>3</sub> 15 mmol L<sup>-1</sup> em pH 6,0 por 5 min e EDTA 20 mmol L<sup>-1</sup> em pH 4,5 por 10 min, ambos com vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. Foi observada a presença de, no mínimo, quatro espécies de Sb, duas na forma inorgânica livre (Sb(III) e Sb(V)) e as outras complexadas com a meglumina. Os resultados obtidos para as espécies de Sb na amostra sem o tratamento ácido foram inferiores aos obtidos para as amostras com tratamento ácido. Isto provavelmente se deve ao fato de as espécies de Sb complexadas terem sido convertidas nas respectivas espécies de Sb inorgânicas livres. O resultado obtido por LC-HG-ICP-MS, após o tratamento da amostra, para a espécie Sb(III) não apresentou diferença estatística (test t, p > 0,05, intervalo de confiança de 95%), comparado ao resultado obtido por LC-ICP-MS. Da mesma forma, o resultado para Sb total, obtido por ICP OES, também não apresentou diferença estatística (test t, p > 0,05, intervalo de confiança de 95%) com o somatório das espécies de Sb obtido por LC-ICP-MS. Também foram feitos ensaios de recuperação sendo encontradas concordâncias superiores a 90% e 98% para Sb(V) e Sb(III), respectivamente.

## ABSTRACT

---

In this work the chromatographic conditions for the separation of species of antimony in the drug meglumine antimoniate were optimized. Furthermore, the effect of the treatment with hydrochloric acid in the sample was evaluated in order to convert Sb(III) species and Sb(V) complexed with meglumine in their free inorganic forms. The separation of Sb species was performed by liquid chromatography (LC) in an anion exchange column (PRP-X100) and detection by mass spectrometry with inductively coupled plasma (ICP-MS). The concentrations of Sb obtained by LC-ICP-MS were compared with those obtained by LC-ICP-MS using post-column derivatization by hydride generation (HG). The results of the total concentration of Sb were also evaluated, given by the sum of the concentrations of species determined by LC-ICP-MS, with the results obtained by spectrometry and inductively coupled plasma optical emission (ICP OES). After the evaluations of different mobile phases for separation of Sb species, the selected conditions were:  $\text{HNO}_3$  15 mmol  $\text{L}^{-1}$  at pH 6.0 for 5 min and 20 mmol  $\text{L}^{-1}$  EDTA at pH 4.5 for 10 min, both with a flow of 1.0 mL  $\text{min}^{-1}$ . The presence of at least four kinds of Sb, the two free inorganic (Sb(III) and Sb(V)) and other complexed with meglumine was observed. The results obtained for Sb species in the sample without acid treatment were lower than those obtained for samples with acid treatment. This is probably due to the fact that complexed Sb species have been converted into their free inorganic species of Sb. The result obtained by LC-HG-ICP-MS after sample treatment for Sb(III) species showed no statistical difference (t test,  $p > 0.05$ , confidence interval 95%), compared with the result obtained by LC-ICP-MS. Likewise, the result for the total Sb, obtained by ICP OES also no statistically significant difference (t test,  $p > 0.05$ , confidence interval 95%) with the addition of Sb species obtained by LC-ICP-MS. Recovery tests were also made, higher concordance found to be 90% and 98% for Sb(V) and Sb(III), respectively.



## 1. INTRODUÇÃO

---

Leishmaniose é uma doença conhecida desde o século XVI, com ocorrência predominante em regiões tropicais, dentre elas, o Brasil.<sup>1</sup> Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), anualmente, mais de 12 milhões de casos são registrados e cerca de 10 mil pessoas morrem.<sup>2</sup> A Leishmaniose é transmitida ao ser humano pelo mosquito do gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, contaminado com protozoários do gênero *Leishmania*.<sup>3</sup> Pode ocasionar, quando em sua forma mais branda, feridas nas mucosas e na pele e, na sua forma mais grave, pode levar até a morte. O tratamento da Leishmaniose é feito com antimoniais pentavalentes, dos quais se destacam o estibogluconato de sódio (SSG) e o antimoniato de meglumina (NMG). No Brasil, faz-se uso da aplicação de doses elevadas (10 a 20 mg/kg/dia) do NMG em pacientes com esta patologia, conforme preconizado pelo Ministério da Saúde. Essas doses elevadas acabam ocasionando efeitos colaterais bastante severos aos pacientes, como dores musculares, além de problemas hepáticos e cardíacos.<sup>3</sup>

O antimoniato de meglumina é composto majoritariamente por meglumina e antimônio (Sb). Porém, apesar do seu uso desde 1950 e de diversos estudos, as estruturas químicas presentes no medicamento ainda não foram totalmente elucidadas. Com isso, foi proposta uma mistura de complexos em diferentes proporções de meglumina:Sb, podendo estar no estado de oxidação (III) ou (V).<sup>1, 4, 5</sup> Além disso, segundo a Farmacopeia Brasileira, a concentração de Sb(III) não pode exceder 4,0 mg mL<sup>-1</sup>.<sup>6</sup>

O mecanismo de ação do medicamento ainda não foi totalmente elucidado, mas é postulado que o Sb(V) atua como uma pró-droga, sendo convertido à sua espécie mais tóxica, o Sb(III), que é capaz de inativar a célula do hospedeiro. Outra teoria é a de que o próprio Sb(V) seria capaz de alterar o processo de  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, levando à diminuição do nível de energia (adenosina trifosfato) da célula do hospedeiro.<sup>7</sup>

Os efeitos tóxicos ocasionados pelo Sb ainda são pouco conhecidos. Sabe-se que a espécie Sb(III) é cerca de dez vezes mais tóxica que a espécie Sb(V), e as espécies inorgânicas são, em geral, mais tóxicas que as orgânicas.<sup>8</sup> Nesse sentido, a determinação apenas da concentração de Sb total presente na amostra não é

---

suficiente. Além da diferença de toxicidade entre as espécies de Sb, existem estudos que correlacionam a concentração de Sb(III) com a resistência do hospedeiro ao tratamento da Leishmaniose utilizando NMG.<sup>5,6</sup>

Estudos para determinar a concentração das espécies Sb(III) e Sb(V) presentes no NMG têm sido realizados utilizando as mais variadas técnicas analíticas.<sup>9, 10</sup> Entretanto, nenhum destes estudos faz referência ao uso da HG acoplada a técnicas mais sensíveis e seletivas, como a cromatografia a líquido (LC) acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Além disso, poucos trabalhos utilizam o tratamento da amostra com ácido a fim de liberar o Sb da meglumina.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

*Esta seção encontra-se dividida em três partes. Na primeira delas será realizado um breve histórico sobre o uso do antimônio e algumas de suas propriedades, como a toxicidade. Na segunda parte será feita uma breve introdução sobre a Leishmaniose e seu tratamento. Por fim, na terceira parte, é dispendida uma abordagem sobre a análise de especiação química e a determinação do antimônio no antimoniato de meglumina, destacando-se alguns dos principais trabalhos publicados, bem como descrição das técnicas utilizadas no presente trabalho.*

## 2.1. ANTIMÔNIO

O antimônio (Sb) é um metalóide que ainda não possui atividade biológica conhecida.<sup>11</sup> Possui a configuração externa de orbital [Kr]  $s^2p^3$ . Devido a este fato, os estados de oxidação mais estáveis são +III e +V, podendo ocorrer, ainda, nos estados 0 e -III. Encontra-se no meio ambiente principalmente na forma de óxidos, hidróxidos, oxoânions e sulfetos.<sup>1,12</sup>

A estibinita ( $Sb_2S_3$ ) é o principal minério encontrado na natureza e possui grande aplicação na produção de materiais eletrofotográficos.<sup>13</sup> Este minério é produzido, principalmente, por 15 países, sendo que China, México, Bélgica e Bolívia correspondem a 87% de toda produção mundial. A maior parte da reserva mundial (estimada em 1,8 milhões de toneladas) está em território chinês (aproximadamente 53% da estibinita existente na crosta terrestre).<sup>12-14</sup>

O  $Sb_2O_3$  é amplamente empregado como retardante de chama (na presença de compostos halogenados),<sup>12,15</sup> em produtos como adesivos, plásticos, tintas e, também, como catalisador na produção de politereftalato de etileno (PET). Além disso, possui aplicação na produção de diodos devido a sua propriedade de aumentar a resistência mecânica dos materiais. Seu uso se estende na área medicinal desde o século XVI, por ser um potente emético, além do tratamento de doenças parasitárias como a Esquistossomíase e a Leishmaniose, na forma de tártaro emético e antimoniato de meglumina (NMG), respectivamente.<sup>1,13</sup>

### 2.1.1. Efeito Toxicológico do Sb

As informações sobre a toxicidade do Sb são limitadas, contudo sabe-se que o comportamento toxicológico e fisiológico do Sb no organismo depende do estado de oxidação, da presença de ligantes e da solubilidade dos compostos.<sup>16-18</sup> Além disso, é classificado como clastogênico (capaz de quebrar cromossomos) e possível agente carcinogênico. Alguns estudos comprovam sua possível carcinogenicidade, relatando casos de tumores no pulmão em ratos.<sup>17</sup>

As espécies orgânicas do Sb são menos tóxicas quando comparadas com as espécies inorgânicas do mesmo.<sup>19</sup> A espécie trivalente (Sb(III)) chega a ser dez vezes mais tóxica que a espécie pentavalente (Sb(V)). O Sb(III) em meio aquoso,

está sob a forma de  $[\text{Sb}(\text{OH})_3]^0$ , possuindo maior facilidade para passagem através de membranas celulares, quando comparado ao Sb(V) que, em meio aquoso, encontra-se sob a forma  $[\text{Sb}(\text{OH})_6]^{-1}$ .<sup>8</sup> Outra possível razão para a elevada diferença de toxicidade é devido ao fato de que o Sb(III) possui maior afinidade aos eritrócitos e a grupamentos sulfidríla (-SH), constituintes das células e presentes na maioria das proteínas, ficando, assim, mais facilmente retido nos tecidos e, conseqüentemente, bloqueando grupamentos de importância biológica. Já o Sb(V), por sua vez, é praticamente impermeável aos eritrócitos, sendo facilmente excretado.<sup>8, 16</sup>

Mortari *et al.*<sup>20</sup> realizaram um estudo em pacientes com Leishmaniose que foram tratados com NMG. Os autores verificaram que o modo de excreção do Sb ocorre principalmente pela urina e que, em sua maior parte, na espécie de Sb(V).

## 2.2. LEISHMANIOSE

A Leishmaniose é uma doença infecciosa tropical, não contagiosa, considerada uma zoonose, sendo classificada como uma das doenças mundialmente negligenciadas.<sup>1, 21, 22</sup> É ocasionada por protozoários do gênero *Leishmania* que são transmitidos por insetos fêmea do gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, previamente infectadas. A manifestação clínica da doença, quando mais branda, ocasiona úlceras na pele, em lesões locais (cutânea), de forma difusa (cutânea difusa) ou, ainda, desfigurando a pele (mucocutânea). Já a manifestação clínica mais grave ataca as vísceras (chamada de Calazar), podendo levar inclusive à morte caso não tratada.<sup>1, 2</sup>

Encontra-se, também, nomeada como Leishmaniose Tegumentar Americana que é apenas um meio de abranger tanto a Leishmaniose cutânea como a mucocutânea.

Segundo a OMS, a maior incidência de casos na forma mucocutânea ocorre em países latinos Bolívia, Brasil e Peru. Cerca de 90% dos casos de Leishmaniose cutânea ocorrem no Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria. Na sua forma mais letal, a Leishmaniose visceral, ocorre principalmente em Bangladesh, Nepal, Sudão, norte da África, sul da Europa e na América Latina.<sup>2</sup> Adicionalmente, conforme a OMS, cerca de 2 milhões de novos casos são estimados todos os anos,

entretanto apenas 600 mil são oficialmente notificados. Isso ocorre, pois a Leishmaniose é uma doença que ocorre, principalmente, afetando pessoas de baixa renda, que possuem condições de habitação precárias e sistema imunológico débil.<sup>2, 23</sup>

No Brasil, a doença predomina nas regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste, estando distribuída em 17 estados. Entre 1985 e 2000 a doença afetou 422,5 mil pessoas e no período de 2000 a 2012 foram detectados aproximadamente 66,8 mil novos casos.<sup>2</sup> Além disso, verificou-se alteração no perfil das regiões endêmicas, antes concentradas em áreas rurais, agora, também, com registros em áreas urbanas. Essa expansão da doença pode ser atribuída a fatores ambientais tais como desmatamento, construção de represas, urbanização, migração de população não-imune para áreas endêmicas, dentre outros fatores.<sup>24</sup>

A descoberta da existência de agentes etiológicos ocorreu em 1885 na Índia, por Cunningham, que verificou formas amastigotas e, em 1898, Borovisky verificou ser um protozoário o seu causador. Leishman e Donovan, em 1903, estudaram o protozoário existente na Índia e realizaram as primeiras descrições do mesmo. Em homenagem aos descobridores, Ross denominou os protozoários como *Leishmania donovani*.<sup>1, 25</sup> Em 1909, Gaspar Vianna correlacionou algumas lesões ocasionadas por doenças com o protozoário do gênero *Leishmania*, nomeando-as como *Leishmania braziliensis*.<sup>1</sup>

A partir de 1903, diferentes relatos demonstram que a Leishmaniose Calazar não era uma doença exclusiva da Índia, tendo sido registrados casos na China e na Síria.<sup>25</sup>

### 2.2.1. Tratamento

Por muito tempo, os primeiros tratamentos da Leishmaniose mucocutânea, consistiam na aplicação de Sb(III) complexado com tartarato de potássio. Todavia, o Sb(III) apresentava efeitos adversos muito severos, sendo, então, interrompido a sua utilização em 1923.<sup>12</sup> Isto levou a descoberta da eficácia do tratamento utilizando os antimoniais pentavalentes, o que salvou milhões de pessoas, levando à indicação do prêmio Nobel em 1942 ao seu descobridor, Brahmachari.<sup>26</sup> Acredita-se que a descoberta da eficácia do Sb(V) complexado com meglumina tenha ocorrido na

França durante a Segunda Guerra Mundial, como um medicamento alternativo ao gluconato de antimônio (V) sódico.<sup>1</sup>

Após estudos melhor elaborados, o mais comum antimonial usado no Brasil, França e em países de colonização francesa é o Glucantime (antimoniato de N-metilglucamina). O antimoniato de N-metilglucamina, ou como também conhecido por NMG é constituído por um principio ativo à base de Sb(V), sem composição, nem mecanismo de ação totalmente elucidados.<sup>27</sup> Conforme recomendado pelo Ministério da Saúde, o tratamento da Leishmaniose utilizando NMG consiste na aplicação de altas doses (10 - 20 mg/kg/dia) de Sb(V) durante, pelo menos, 4 semanas.<sup>3</sup> Já nos países de colonização inglesa, o Pentostan (também conhecido como SSG) é o mais usado.<sup>7, 25</sup>

Diversos casos de resistência aos antimoniais pentavalentes têm sido relatados,<sup>5, 22</sup> principalmente, em pacientes com Leishmaniose visceral. Para isso, algumas drogas de segunda linha, que incluem a pentamidina e a anfotericina B, têm sido utilizadas. Entretanto, estas drogas possuem alto custo de produção e efeitos adversos muito severos, como náuseas, dores localizadas no corpo e até hiperglicemia.<sup>28</sup> Elas são indicadas para o tratamento de Leishmaniose em regiões onde os antimoniais não possuem mais efeito, como na Índia.

A comercialização do medicamento é realizada em ampolas de 5 mL, com aplicações injetáveis, aumentando assim sua distribuição pelos órgãos e tecidos. Experimentos com antimoniais encapsulados em lipossomos têm sido realizados para o tratamento de infecções por *Leishmania donovani* em ratos e humanos. A droga é seletivamente incorporada, através da endocitose, e alcança os fagolisossomos dos macrófagos, onde se encontram os parasitas. Desta forma, diminui a toxicidade do medicamento, já que o mesmo apenas é liberado no local onde deverá atuar.<sup>1, 21</sup>

Outro estudo para uso de novos medicamentos contra a Leishmaniose está sendo realizado pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).<sup>23</sup> Este estudo consiste no desenvolvimento de um medicamento à base de sulfato de paromomicina em gel a 10%, com principio ativo para a Leishmaniose cutânea. Ademais, têm sido investigado o uso de vacinas, no entanto ainda não foram obtidos resultados conclusivos em humanos.<sup>29</sup> Sendo assim, apesar de diversos estudos com o intuito de substituir o NMG, ainda se faz uso deste para o tratamento da Leishmaniose.

### 2.3. ANTIMONIATO DE MEGLUMINA

Com o objetivo de elucidar qual a fórmula estrutural do NMG, Roberts *et al.*<sup>30</sup> realizaram um estudo por medidas de osmolaridade, ressonância magnética nuclear de próton, bombardeamento atômico rápido acoplado à espectrometria de massa e ionização por eletro-spray acoplado à espectrometria de massa (ESI-MS). A partir dos resultados das análises os autores concluíram que o NMG consiste em uma série de oligômeros com mistura de complexos, possuindo fórmula geral (meglumina-Sb)<sub>n</sub>-meglumina e (meglumina-Sb)<sub>n</sub>, com *n* variando de 1 a 4. Com base nas medidas de osmolaridade os autores também verificaram a existência de complexos na proporção 1,43 átomos de Sb por molécula de meglumina.

Frézard *et al.*<sup>4</sup> realizaram estudos para identificar as estruturas químicas existentes no SSG e no NMG utilizando ESI-MS, tanto no modo positivo quanto no modo negativo de ionização, além de medidas de osmolaridade. No caso do NMG utilizando ESI-MS, foi proposta a existência de uma mistura 1:1, 1:2, 2:2 e 2:3 de Sb(V):meglumina e 1:1 de Sb(III):meglumina, ambas com importante papel farmacológico. Pelos experimentos de osmolaridade concluíram que as composições químicas do NMG e SSG são dependentes do tempo de fabricação e da concentração. Sendo assim, o NMG é formado por uma mistura de complexos em diferentes proporções de meglumina:Sb (2:2, 2:3, 1:1 e 2:1). Na Figura 1 estão mostradas duas estruturas existentes no NMG.<sup>27</sup>



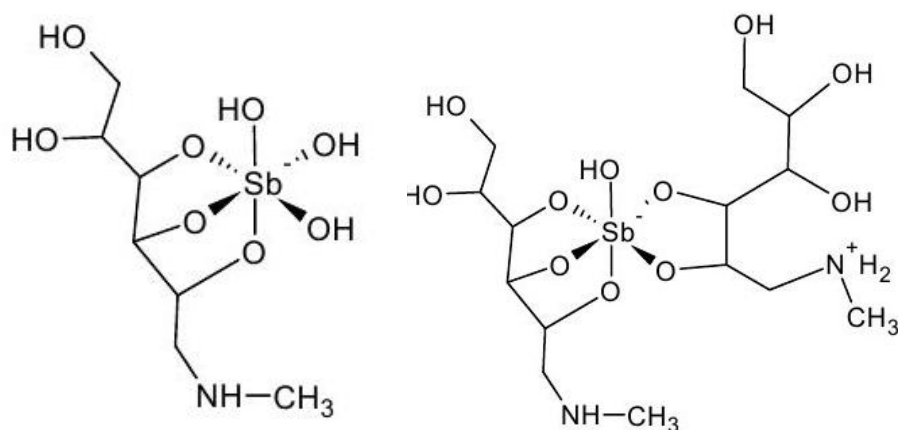


Figura 1. Duas estruturas propostas para o complexo meglumina:Sb(V).<sup>27</sup>

### 2.3.1. Mecanismo de Ação

O mecanismo de ação do NMG postulado é que o Sb(V) atua como uma pró-droga sendo convertido em Sb(III) no parasita ou no macrófago do hospedeiro. Desta forma, pode interferir no processo de  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos e glicólise do parasita, levando a uma depleção dos níveis de energia (adenosina trifosfato) intracelular.<sup>1</sup> Para que ocorra esta redução é necessário a participação de grupamentos tióis, como a glutatona e a cisteína.<sup>31</sup>

Outra hipótese existente é que o Sb(V) seja capaz de penetrar na célula do protozoário e complexar com certas biomoléculas como a adenosina, os ribonucleosídeos e a adenosina monofosfatada. Por conseguinte, acaba inibindo a produção do DNA.<sup>32</sup> Apesar de existirem diversos estudos com o objetivo de identificar o modo de ação do NMG, estes ainda têm se mostrado insuficientes para reavaliar a composição do medicamento e permitir, desse modo, uma melhor compreensão da ação farmacológica e toxicidade do NMG.

## 2.4. ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO QUÍMICA

A concentração total do analito em determinada amostra, em muitos casos, não é suficiente para esclarecer determinados parâmetros (como composição, estabilidade, ciclo biológico, transformações, entre outros). Nestes casos, faz-se necessário o estudo da análise de especiação.<sup>33</sup> Segundo a *International Union of*

*Pure and Applied Chemistry* (IUPAC)<sup>34</sup>, o termo *especiaçãoção* é caracterizado pela distribuição das diferentes espécies químicas de um elemento na amostra. O termo *análise de especiaçãoção* é o processo que conduz à identificação e quantificação das espécies de um determinado elemento presentes na amostra. *Espécie química* é o termo relacionado com a forma específica de um elemento, como o estado de oxidação e a estrutura. Quando ocorrem conversões de uma espécie química em outra, o termo utilizado é *transformação de espécies*. Ainda, de acordo com a IUPAC, outro termo utilizado é o *fracionamento* que é relacionado ao processo de classificação de um elemento ou um grupo de elementos em determinada amostra, de acordo com as propriedades físicas (tamanho, solubilidade) ou químicas (ligação, reatividade).<sup>35</sup>

O principal objetivo da análise de especiaçãoção é a obtenção de maior conhecimento sobre a composição, ciclo biológico, as transformações e possíveis interações das espécies de um determinado elemento em uma amostra.<sup>34-37</sup> A análise de especiaçãoção química pode estar relacionada ao elemento quando presente em diferentes estados de oxidação (como no caso do Cr(III) e Cr(VI)), ou a elementos que formam ligações com moléculas orgânicas (como a arsenobetaína e ácido monometil arsênio) ou ainda a diferentes isótopos do mesmo elemento (como por exemplo, o <sup>13</sup>C e o <sup>12</sup>C).<sup>14, 35, 36</sup> Um exemplo clássico da importância da análise de especiaçãoção é o caso do mercúrio (Hg), que quando presente em alimentos na espécie de metilmercúrio (CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup>) é capaz de ser absorvido pelo organismo até cem vezes mais do que o mercúrio inorgânico.<sup>19, 35, 36</sup>

Para realizar análise de especiaçãoção química, deve-se ter muito cuidado para que não ocorra transformação das espécies químicas.<sup>19, 37</sup> Outro importante cuidado que se deve ter é em relação à estabilidade das espécies que é dependente da matriz, radiação UV, temperatura, concentração de matéria orgânica, entre outros.<sup>14</sup> Estudos para verificar a estabilidade das espécies de Sb em diferentes amostras foram feitos. Lindeman *et al.*<sup>38</sup> fizeram um estudo para verificar a estabilidade de espécies de Sb e outros elementos, em água, urina, extratos de peixe e solo, utilizando cromatografia de troca aniônica acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (LC-ICP-MS). Após a avaliação de parâmetros como temperatura e incidência de claridade, os autores verificaram que a melhor condição de armazenagem da solução aquosa foi a 3 °C em ambiente sem iluminação, sendo assim, possível a preservação das espécies por 2 semanas. No extrato de solo

armazenado à 3 °C por 3 dias houve conversão de aproximadamente 15% de Sb(V) em uma espécie de Sb não identificada. Nas amostras de peixe, após extração com metanol e água, as espécies de Sb(V) e Sb(III) foram parcialmente convertidas para duas novas espécies de Sb não identificadas. Este estudo demonstra a necessidade de extremo cuidado no manuseio e armazenagem das amostras.

Na maioria das vezes, para realizar a análise de especiação, tem-se a necessidade de efetuar uma etapa para preparo da amostra. Este preparo deve ser sempre em condições menos agressivas, a fim de impedir a conversão das espécies presentes. O preparo varia de acordo com a matriz, além da espécie que se deseja determinar. Deve-se ter cautela ao realizar o tratamento das amostras, pois a medida que aumentam o número de etapas realizadas, aumentam as chances de ocorrer transformação das espécies ou contaminação provinda dos equipamentos ou de reagentes.<sup>36</sup>

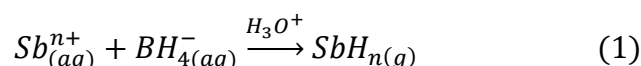
#### **2.4.1. Técnicas utilizadas para a análise de especiação**

Usualmente, para realizar a análise de especiação é empregado o acoplamento de equipamentos, onde as espécies são, primeiramente, separadas e na sequência detectadas com um detector sensível. Com o aumento da disponibilidade de equipamentos com maior sensibilidade, é possível quantificar as amostras com limites de detecção na faixa de  $\text{ng L}^{-1}$ .

As técnicas mais utilizadas para separação de espécies de Sb são a cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC)<sup>39</sup>, a cromatografia por exclusão de tamanho (SEC)<sup>20</sup> e a eletroforese capilar (CE)<sup>40</sup>. As técnicas de geração de hidretos (HG) e a espectrofotometria (UV-Vis), através do uso de reagentes como o borohidreto e complexantes seletivos, como o bromopirogalol, também são empregados para a análise de especiação de Sb.<sup>39, 41</sup> Dentre as técnicas de detecção pode-se destacar ICP-MS e ICP-OES, as quais serão descritas a seguir, juntamente com as técnicas de separação mais utilizadas para a análise de especiação de Sb, HG e LC.

### 2.4.1.1. Geração de hidretos

A geração de hidretos é uma técnica consolidada e com seletividade. Consiste em uma reação de derivatização das espécies do analito com um agente redutor em meio ácido, formando o hidreto volátil das espécies. Na equação 1 tem-se a reação geral da HG para Sb. O agente redutor mais utilizado é o borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ).



O mecanismo da HG permaneceu por muito tempo com conceitos divergentes. D'Ulivo *et al.*<sup>42-44</sup> realizaram diversos estudos a fim de sanar estas questões. Em um de seus estudos<sup>44</sup>, os autores verificaram que a teoria mais correta para o mecanismo é que a formação dos hidretos ocorre, na maioria dos casos, a partir de intermediários gerados por sucessivas reações dos reagentes, formando o hidreto volátil.

A temperatura ambiente, os hidretos encontram-se na forma gasosa, sendo então direcionados por um fluxo de gás até o atomizador, que pode este ser uma cela de quartzo aquecida. Decompondo-se os hidretos no atomizador, forma-se o vapor atômico e o sinal analítico é obtido. Os elementos que podem ser analisados nesta técnica são As, Bi, Cd, Hg, Pb, Ge, Se, Sn, Sb, e Te.<sup>45</sup>

O Sb ao entrar em contato com o  $\text{NaBH}_4$  em meio ácido é reduzido para estibina ( $\text{SbH}_3$ ), que é volátil a  $-17\text{ }^\circ\text{C}$ . O  $\text{SbH}_3$  quando gerado em pH de 2 a 14 provém somente do Sb(III) e, em  $\text{pH} \leq 1$ , provém do Sb(V). Sendo assim, com o controle do pH pode-se controlar a seletividade da reação.<sup>45, 46</sup>

As principais vantagens da HG são a separação do analito da matriz; seletividade na determinação nas situações em que se tem controle do pH; elevada eficiência na introdução da amostra ao detector (aproximadamente 100%), obtendo-se baixos limites de detecção (LOD) quando comparado às técnicas que utilizam nebulização pneumática.<sup>45, 47</sup>

A HG é uma técnica capaz apenas de separar o analito da matriz, sendo assim, necessário o acoplamento da mesma a um equipamento de detecção. A HG pode ser realizada no modo *on-line*, no qual é diretamente acoplado ao detector ou no

modo *off-line*, onde primeiro é gerado hidreto e, em seguida ocorre direcionamento ao detector.<sup>48,49</sup> Diferentes trabalhos podem ser encontrados na literatura utilizando os modos *on-line* e *off-line* para a análise de Sb em diferentes amostras.<sup>9,10, 39, 41, 50-53</sup>

Petit de Peña *et al.*<sup>50</sup> propuseram um sistema *on-line* automatizado para a extração e especiação de Sb por HG AAS em tecidos biológicos tratados com NMG. Para a extração das espécies de Sb(V) e Sb(III) os autores utilizaram ácido sulfúrico e ácido acético, respectivamente. A redução de Sb(V) para Sb(III) foi realizada com L-cisteína. O LOD obtido para Sb(III) foi  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  e para Sb(V), foi  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Figueiredo *et al.*<sup>49</sup> desenvolveram um método espectrofotométrico com injeção em fluxo para a determinação indireta de Sb total e Sb(III) em fármacos. A estibina gerada foi transportada ao detector com o auxílio de um fluxo de ar. Uma solução de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  foi adicionada ao sistema a fim de reduzir o Cr(VI) para Cr(III). A concentração de Cr(III) é monitorada em 610 nm, o qual foi proporcional à concentração de Sb(III). Diferentes lotes de NMG foram analisados e os resultados variaram para Sb(V) de 4,43 a 6,53  $\text{mg mL}^{-1}$  e para Sb(III) e de 98 a 121  $\text{mg mL}^{-1}$  para Sb total.

A seletividade da técnica na análise de especiação de Sb pode ser aumentada utilizando-se complexantes para a geração de hidretos. Flores *et al.*<sup>41</sup> realizaram um estudo de análise de especiação de Sb(III) e verificaram os fatores interferentes utilizando um sistema HG AAS. Dentre os parâmetros estudados, foi otimizado o ácido que complexaria com o Sb(V), a fim de suprimir totalmente o sinal referente a esta espécie. Foram estudados os ácidos acético, tartárico, cítrico, láctico e oxálico, todos na concentração 20% (m/v). Segundo os autores, os ácidos tartárico e acético não foram capazes de complexar o Sb(V) presente na amostra. Já os ácidos oxálico e láctico foram mais efetivos na supressão do Sb(V), porém ainda apresentavam pequena intensidade de sinal. Com o ácido oxálico foi verificado a presença de um precipitado, enquanto que o ácido cítrico foi o complexante que proporcionou os melhores resultados para a espécie Sb(III), sendo, portanto, escolhido. Outros autores<sup>54, 55</sup> também relatam que o ácido cítrico é o melhor complexante do Sb(V) na análise de especiação de Sb(III).

Outros parâmetros importantes na HG são volume de amostra, concentração de ácido e caminho reacional (tanto na geração do hidreto e na complexação de Sb(V), como na determinação seletiva de Sb(III)). Todos estes parâmetros devem

ser estudados quando um método de HG acoplado a qualquer técnica é desenvolvido. As principais técnicas utilizadas para a detecção acopladas à HG são UV-Vis<sup>49</sup>, AAS<sup>50</sup>, ICP-MS<sup>52, 54</sup> e AFS<sup>48, 56</sup>.

#### 2.4.1.2. Cromatografia a líquido

As técnicas de cromatografia baseiam-se nas diferentes propriedades das espécies químicas tais como carga, tamanho, afinidade e hidrofobicidade.<sup>35</sup> A LC, em particular, possui grande atratividade para a análise de especiação por possuir grande flexibilidade o que permite a separação simultânea de diferentes espécies, além de possibilitar a separação de complexos. Também, quando acoplada à técnicas de detecção, permite determinar tanto a concentração de uma espécie de um analito, como a concentração total do analito.<sup>33</sup>

A cromatografia a líquido é classificada em exclusão molecular, adsorção, distribuição, afinidade e troca iônica. Esta última é ainda subdividida em troca aniônica e troca catiônica.<sup>57</sup> As espécies de Sb, que são de maior interesse e que possuem solução de referência disponível (Sb(III), Sb(V) e trimetilSb(V)), encontram-se na forma iônica em solução aquosa.<sup>19</sup> Sendo assim, a cromatografia de íons é a que melhor se adapta para separar as espécies inorgânicas de Sb.<sup>46</sup>

O mecanismo de separação da cromatografia de íons é baseado na atração eletrostática entre os íons da solução e os grupos funcionais da resina da fase estacionária.<sup>57</sup> Desta forma, o tempo de retenção do analito é dependente da interação com a fase estacionária, enquanto que a separação depende do pH e da força iônica, da fase móvel e do trocador iônico.<sup>57</sup>

Para classificar uma separação cromatográfica, é comum conferir o valor da resolução (R) obtida na separação dos compostos. O valor de R considera o tempo de retenção e a largura do pico. Para informações qualitativas, um valor de R igual a 1 pode ser considerado.<sup>57</sup>

As fases estacionárias mais utilizadas na LC são resinas com grupamentos amônio. As colunas mais utilizadas na separação de espécies de Sb em diferentes amostras são PRP-X100<sup>58</sup>, Dionex IonPak<sup>53</sup>, ION-120<sup>53</sup>, Synchronpak<sup>59, 60</sup>, Phenomenex SAX-SB<sup>59</sup>, que são escolhidas de acordo com as espécies a serem determinadas, com a técnica de detecção e a faixa de pH utilizada.

Em geral, a eluição da espécie de Sb(V) pode ser realizada com diferentes fases móveis, enquanto que para a espécie Sb(III) é observado um pico alargado. Para tentar resolver este problema, faz-se uso de fases móveis complexantes como tampões tartarato de amônio, citrato de sódio, EDTA com ou sem ftalato de potássio.<sup>59</sup> Pode-se também, utilizar sais inorgânicos como fase móvel (NH<sub>4</sub>PO<sub>3</sub>).<sup>61</sup>

A LC, bem como a HG, é uma técnica de separação, sendo assim necessário o acoplamento desta com outras técnicas de detecção. Para a detecção, as técnicas mais utilizadas são: a espectrometria de fluorescência atômica (AFS)<sup>39</sup>, ICP-MS<sup>62</sup> e a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES)<sup>63</sup>.

Um grande número de publicações podem ser encontradas sobre a LC acoplada à técnica de ICP-MS e análise de especiação química. Isto se deve ao fato da LC ser capaz de proporcionar boa separação das espécies existentes, já que as mesmas interagem com intensidades diferentes entre a fase estacionária da coluna cromatográfica e a fase móvel. A LC-ICP-MS, por sua vez, proporciona grande seletividade e sensibilidade, permitindo a identificação e quantificação de algumas ou todas as espécies presentes nas amostras.<sup>64</sup>

#### **2.4.1.3. Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado**

A ICP-MS é uma técnica versátil para a análise em baixas concentrações (ng L<sup>-1</sup>), principalmente na análise de especiação, caracterizada por possuir baixos LOD e ampla faixa linear de trabalho. Apesar disso, a ICP-MS não pode ser utilizada sozinha para a análise de especiação, já que todas as espécies de um elemento introduzidas no equipamento são convertidas em íons, devido às altas temperaturas do plasma. Para tanto, usualmente é realizado o acoplamento de técnicas para a análise de especiação.<sup>61</sup>

Geralmente, a introdução da amostra ocorre na forma líquida, podendo inclusive ocorrer na forma gasosa. Quando na forma líquida, a mesma é transformada em aerossol com o auxílio de um nebulizador pneumático ou ultrassônico. No entanto, a introdução da amostra também pode ser na forma gasosa, sendo introduzida no equipamento por vaporização eletrotérmica, cromatografia gasosa, HG e ablação a laser.<sup>65, 84</sup>

A técnica de ICP-MS baseia-se no princípio da alta eficiência de ionização do plasma, gerando íons carregados positivamente, que, em seguida são direcionados e separados por um espectrômetro de massa. Os íons, depois de formados, são amostrados pelo cone de amostragem e *skimmer*. Os íons selecionados são direcionados ao espectrômetro de massa, com o auxílio da lente óptica iônica. No espectrômetro de massa os íons são separados de acordo, com a sua razão massa/carga ( $m/z$ ) e então, os íons são conduzidos ao detector.<sup>61</sup>

Como já fora comentado, para análise de especiação é comum acoplar o ICP-MS a outras técnicas como a LC e a HG. No caso da LC, para que seja feito o acoplamento, faz-se uso de uma linha de transferência que é conectada diretamente ao nebulizador do ICP-MS. O diâmetro e comprimento da linha de transferência devem ser tão pequenos quanto possíveis para evitar que o volume morto da interface provoque o alargamento do sinal.<sup>37, 61</sup>

A técnica de ICP-MS possui aplicação em análises de diferentes áreas, com grande aceitação na pesquisa farmacêutica. Entre as principais características da técnica, pode-se citar a melhor sensibilidade, a capacidade multielementar, os baixos limites de detecção e a boa precisão, quando comparada à métodos convencionais. Por este motivo, esta técnica tem sido indicada cada vez mais em monografias de análise no controle de qualidade de fármacos e matérias-primas em diferentes compêndios internacionais, como a Farmacopeia Americana e Europeia.<sup>66</sup>

## 2.5. ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE Sb

Como já comentado, diversas técnicas têm sido empregadas para a análise de especiação do Sb. Dentre elas, pode-se destacar HPLC-ICP-MS<sup>54</sup>, UV-Vis, espectrometria de absorção atômica em forno de grafite e geração de hidretos (HG GF AAS), CE-ICP-MS e HPLC-HG AFS. Além disso, métodos eletroquímicos também têm sido relatados para a análise de especiação de Sb, todavia, para a maioria dos eletrodos, apenas o Sb(III) é eletroativo, sendo a espécie Sb(V) determinada por diferença.<sup>67, 68</sup>

De um modo geral, os estudos de análise de especiação de Sb têm sido realizados em diferentes tipos de amostras, com o intuito de verificar a



biodisponibilidade e a toxicidade das espécies de Sb. Hansen *et al.*<sup>52</sup> verificaram em seus estudos a formação de complexos de Sb(V) em urina, iogurte e sucos que foram selecionadas de acordo com o teor de ácido cítrico e ácido láctico, utilizando a HPLC acoplado ao ESI-MS. Os autores concluíram que a complexação do Sb(V) é extremamente dependente da matriz existente, sendo, portanto, detectados complexos com citrato, lactose e adenosina com Sb(V).

Um outro estudo realizado por Ulrich *et al.*<sup>69</sup> objetivou separar e quantificar as espécies Sb(III) e Sb(V) utilizando cromatografia de troca aniônica e detecção por ICP-MS em extratos de célula de *Leishmania Donovanii* previamente incubadas com as espécies de Sb. A fase móvel utilizada foi ácido nítrico 15 mmol L<sup>-1</sup> em pH 6,0. Os autores verificaram que a fase móvel utilizada proporciona baixo sinal de ruído, melhorando o limite de detecção e quantificação. Observaram, também, a presença de duas espécies de Sb, além das espécies inorgânicas livres (Sb(III) e Sb(V)), que não puderam ser identificadas.

Gregori *et al.*<sup>56</sup> desenvolveram uma metodologia para a análise de especiação de Sb em algas e moluscos de origem marinha, coletados na costa chilena. Os autores avaliaram como soluções extratoras de Sb a água, o metanol e os ácidos cítrico e etilenodiaminotetracético (EDTA). A partir dos resultados obtidos concluíram que, baseando-se na eficiência de extração e estabilidade, o EDTA é a melhor solução extratora do Sb, por ser um bom agente complexante para a análise de especiação de Sb nestas matrizes. A análise de especiação foi realizada em uma coluna de troca aniônica e HG com detecção por AFS, sendo somente as espécies inorgânicas detectadas.

Um estudo foi realizado por Amereih *et al.*<sup>73</sup> para identificar espécies inorgânicas de Sb em amostras de solo utilizando diluição isotópica em HPLC-ICP-MS. Após as otimizações necessárias, a extração foi conduzida com a utilização de ácido cítrico 100 mmol L<sup>-1</sup> em pH 2,08, com radiação ultrassônica (banho de ultrassom) por 45 min à temperatura ambiente. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna de troca aniônica com fase móvel EDTA 10 mmol L<sup>-1</sup> e ácido ftálico 1 mmol L<sup>-1</sup>, ambos em pH 4,5. Dos resultados obtidos, a eficiência de extração foi de 42% e 6% para Sb(V) e Sb(III), respectivamente, que foram comparados com a concentração total de Sb em materiais de referência certificados (CRM).

Com o aumento expressivo do uso do Sb na produção de garrafas PET, diversos trabalhos podem ser encontrados na literatura relacionando a migração do Sb para o líquido do interior da garrafa. Sánchez-Martínez *et al.*<sup>74</sup> conduziram um estudo para identificar a quantidade de Sb capaz de migrar de embalagens PET para amostras de diferentes meios como água destilada, ácido acético, etanol, óleo vegetal e vinagre. Os autores utilizaram como técnica de detecção o ICP-MS e o HG AFS para determinação de Sb total, enquanto que a análise das espécies migratórias foi realizada por HPLC-ICP-MS. Conclusivamente, verificaram que a migração das espécies é dependente da temperatura, do re-uso da embalagem e do tempo de armazenamento. A espécie encontrada em maior concentração foi Sb(V). No vinagre e no suco de maçã a migração de Sb(V) foi superior que nas outras soluções. A solução contendo ácido acético foi a única que apresentou aumento da concentração de Sb devido ao re-uso da embalagem.

Em função dos trabalhos expostos, torna-se evidente que a concentração de Sb é importante em diferentes amostras, pois como já referido anteriormente, ainda não se conhece qual a atividade biológica do mesmo. Portanto, estudos com o intuito de determinar a concentração de Sb em diferentes amostras têm apresentado um aumento expressivo na literatura, principalmente em medicamentos, como o NMG.<sup>54, 55, 63, 67-69, 75-77, 80</sup>

### 2.5.1. Análise de especiação de Sb em NMG

O estado de oxidação dos elementos é de extrema importância nos medicamentos, visto que as espécies de um determinado elemento estão relacionadas ao efeito terapêutico deste. Além disso, dependendo do estado de oxidação, as espécies de um determinado elemento terão diferença na mobilidade e atuação no organismo.<sup>1, 29, 35</sup>

Desde 2002, a Farmacopeia Brasileira apresenta monografia, para o doseamento da espécie Sb(III) no NMG por HG AAS após diluição da amostra em água e complexação da espécie Sb(V) com ácido cítrico.<sup>6</sup> Moreira<sup>54</sup> determinou a espécie Sb(III) em NMG comparando os resultados com o método oficial da Farmacopeia Brasileira (HG AAS) com um método proposto utilizando HG-ICP-MS e o método oficial da Farmacopeia Britânica (método titulométrico).<sup>54</sup> Esta última

apenas determina a concentração de Sb(III) em SSG. No método proposto por Moreira<sup>54</sup> é utilizado o mesmo princípio adotado na Farmacopeia Brasileira. É realizada a complexação de Sb(V) com ácido cítrico e, em seguida, a geração da estibina (SbH<sub>3</sub>) proveniente apenas do Sb(III), e detecção por ICP-MS. A concentração de Sb(III) obtida utilizando o método da Farmacopeia Britânica foi 2,3 mg mL<sup>-1</sup>. Já para o método proposto e o método oficial da Farmacopeia Brasileira, não houve diferença significativa entre os resultados obtidos para o Sb(III), sendo 0,29 mg mL<sup>-1</sup> e 0,30 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

Outro método para a determinação das espécies Sb(III) e Sb(V) desenvolvido por Łukaszczyk *et al.*<sup>63</sup>, baseia-se na retenção de cloro complexos de Sb(III) em resina de troca aniônica, seguida da eluição com ácido clorídrico (HCl) e determinação por ICP OES. As amostras foram diluídas em HCl 1,5 mol L<sup>-1</sup> para quebrar os complexos existentes na amostra de NMG. Primeiramente, as amostras foram introduzidas em uma coluna de troca aniônica e na sequência foi passado HCl 1,5 mol L<sup>-1</sup> para liberar o Sb(V). Em seguida, os cloro complexos de Sb(III) foram eluídos com água deionizada. Os LODs obtidos para as espécies Sb(III) e Sb(V) foram, aproximadamente, 32 e 52 µg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Já as concentrações das espécies Sb(III) e Sb(V) determinadas na amostra foram 0,20 ± 0,01 e 80 ± 2,1 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

Flores *et al.*<sup>41</sup> em seu trabalho objetivaram a determinação seletiva de Sb(III) em medicamento utilizando a análise por injeção em fluxo para geração de hidretos (FIA-HG) e detecção por AAS. Para tanto, diferentes condições foram avaliadas, tais como as concentrações dos ácidos complexantes, a concentração do NaBH<sub>4</sub>, o volume injetado no sistema FIA, o comprimento do caminho de reação, a vazão do gás carreador e a influência de interferentes na amostra. A condição na qual o ácido suprimisse totalmente o sinal do Sb(V), sem alterar a intensidade do sinal do Sb(III) foi a escolhida. Esta condição foi com 20% (m/v) de ácido cítrico, 2,0% (m/v) de NaBH<sub>4</sub>, 125 µL de amostra e 180 cm de caminho reacional. As concentrações de Sb(III) em diferentes amostras variaram de 2,1 a 5,1 mg mL<sup>-1</sup> e, para Sb total, a concentração ficou na faixa de 102,9 a 83,5 mg mL<sup>-1</sup>.

Um método que utiliza voltametria adsortiva e complexação da espécie Sb(III) com bromopirogalol foi desenvolvido por González *et al.*<sup>67</sup> para determinar Sb(III), utilizando calibração multivariada, isto é, regressão dos mínimos quadrados parciais. A concentração da espécie Sb(V) foi obtida pela diferença entre Sb total e Sb(III).

Depois das otimizações necessárias, os LODs para as espécies Sb(III) e Sb(V) foram 0,013 e 1,15 ng L<sup>-1</sup>, nesta ordem. O método foi aplicado para amostra de NMG e as concentrações obtidas de Sb(III) e Sb(V) foram 7,82 mg mL<sup>-1</sup> e 78,78 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

Almeida *et al.*<sup>9</sup> desenvolveram um sistema FIA com detecção UV-Vis para a determinação de Sb(III) e Sb total no NMG. Com o intuito de melhorar a seletividade foi utilizado bromopirogalol, pois este complexa com Sb(III), em um meio de Triton X-100. O Sb total foi determinado após a redução do Sb(V) para Sb(III) com KI e ácido ascórbico. As amostras também foram submetidas à radiação ultrassônica (banho de ultrassom) durante 10 min para garantir que todo Sb complexado com meglumina fosse liberado, melhorando a exatidão do método (recuperação aumentou de 88,3% para 99,8%). Após as otimizações necessárias, o LOD foi de 29 ng mL<sup>-1</sup>. Ao todo, três amostras de NMG foram analisadas, de modo que, a concentração de Sb(III) ficou entre 2,23 e 3,01 mg mL<sup>-1</sup> e 75,20 a 84,00 mg mL<sup>-1</sup>, para Sb(V), sendo este último resultado obtido pela subtração entre Sb(III) e Sb total.

Santos<sup>75</sup> desenvolveu um método para a determinação das espécies Sb(III), Pb(II) em NMG utilizando um sistema de injeção em fluxo com extração em fase sólida (FI-SPE) e determinação por F AAS. Após as otimizações dos parâmetros, como vazão da amostra, vazão do eluente, tempo de pré-concentração e pH, foi verificado que a melhor condição para eluir o Sb(III) ocorre com HCl 2 mol L<sup>-1</sup> utilizando uma coluna contendo o complexante 8-hidroxiquinolina. A concentração de Sb(III) encontrada e o LOD obtido no NMG foram de 2,8 mg mL<sup>-1</sup> e 0,01 mg mL<sup>-1</sup>, na devida ordem.

Outro método foi desenvolvido por Flores *et al.*<sup>51</sup> para a especiação de Sb em NMG utilizando a técnica HG AAS. Este método se baseou na geração seletiva do hidreto de Sb(III) na presença de ácido cítrico, já que este último é capaz de complexar com a espécie Sb(V). Uma vez realizadas as devidas otimizações necessárias, as concentrações de Sb(III) em NMG foram de 1,6 a 3,1 mg mL<sup>-1</sup>.

Conforme mencionado anteriormente, o NMG é composto, além das espécies inorgânicas livres de Sb(III) e Sb(V), por espécies complexadas de Sb com meglumina. Poucos são os estudos<sup>76, 77</sup> que relatam a análise de especiação de Sb utilizando algum método de preparo para quebrar a ligação existente entre os complexos de meglumina:Sb, assegurando que não haja conversão das espécies presentes no medicamento. Nesse contexto, Séby *et al.*<sup>76</sup> desenvolveram dois

métodos para especiação de Sb em NMG. Um deles utiliza a cromatografia de troca aniônica (coluna PRP-X100) com detecção por ICP-MS, enquanto que o outro utiliza a polarografia de pulso diferencial (DPP). No primeiro método, as amostras de NMG foram sintetizadas e diluídas em HCl 5 mol L<sup>-1</sup> para que fossem quebrados os complexos existentes entre meglumina:Sb. Já no segundo método foi adicionado 20 mL de HCl 0,6 mol L<sup>-1</sup>, com a finalidade de solubilizar o pó e de minimizar possível redução da espécie Sb(V). A concentração obtida pelos dois métodos para as espécies Sb(III) e Sb(V) foram estatisticamente semelhantes, e ficaram no intervalo de 0,13 a 0,17 mg mL<sup>-1</sup> para a espécie Sb(III) e 75,4 a 84 mg mL<sup>-1</sup> para a espécie Sb(V).

Outro trabalho a utilizar um método eletroquímico foi elaborado por Santos *et al.*<sup>77</sup> no qual as amostras de NMG foram diluídas em HCl 0,5 mol L<sup>-1</sup> e por conseguinte analisadas por potenciometria de redissolução anódica (PSA) com eletrodo de pasta de nanotubo de carbono. Finalizadas as otimizações necessárias, a concentração de Sb(III) obtida no NMG foi de 0,24 a 0,28 mg mL<sup>-1</sup> e de 88,2 a 92,4 mg mL<sup>-1</sup> para o Sb(V) (determinado por diferença do Sb total e Sb(III)).

Na Tabela 1 estão resumidos os resultados obtidos para os trabalhos descritos anteriormente sobre a determinação de Sb em NMG.

**Tabela 1.** Resumo de trabalhos sobre a determinação das espécies de Sb em NMG.

<b>Técnica</b>	<b>Preparo da amostra</b>	<b>Sb(III) mg mL<sup>-1</sup></b>	<b>Sb(V) mg mL<sup>-1</sup></b>	<b>Sb total mg mL<sup>-1</sup></b>	<b>Referência</b>
FI-HG-UV-Vis	Diluição em água e tratamento com digestão MW	4,0 – 5,9	-	98 - 121	Figueiredo <i>et al.</i> <sup>49</sup>
ICP OES	Complexação e diluição em HCl 1,5 mol L <sup>-1</sup>	0,2	80,0	81,2 - 83	Łukaszczyk <i>et al.</i> <sup>63</sup>
Voltametria Adsorbtiva	Diluição em água	7,8	78,8	84	González <i>et al.</i> <sup>67</sup>
FI-UV-Vis	Complexação e sonicação	3,0	75,2	78,5 – 85,5	Almeida <i>et al.</i> <sup>9</sup>
HG ICP-MS	Diluição em água e complexação	0,3	-	73 - 79	Moreira <sup>54</sup>
FI - F AAS	SPE	2,8	-	-	Santos <sup>75</sup>
FI- HG AAS	Complexação e diluição	2,1 - 5,1	-	83 – 103	Flores <i>et al.</i> <sup>41</sup>
HG AAS	Complexação e diluição	1,6 - 3,1	-	84 – 110	Flores <i>et al.</i> <sup>51</sup>
DPP	HCl 0,6 mol L <sup>-1</sup>	0,16	-	-	Séby <i>et al.</i> <sup>76</sup>
HPLC-ICP-MS	Diluição e HCl 5 mol L <sup>-1</sup>	0,15	75 - 81	-	Séby <i>et al.</i> <sup>76</sup>
PSA	Diluição e HCl 0,5 mol L <sup>-1</sup>	0,24- 0,28	88,2 - 92,4	89 - 93	Santos <i>et al.</i> <sup>77</sup>

Como pode ser observado na Tabela 1, há uma discrepância entre os resultados obtidos para métodos oficiais e propostos nos diferentes trabalhos. Uma das causas para essa discrepância pode ser atribuída à forma com a qual o Sb(III) encontra-se na amostra. Em algumas delas, a espécie de Sb(III) se encontra na forma inorgânica livre, enquanto que em outras na forma complexada com meglumina. Provavelmente nem todos métodos são capazes de determinar ambas as espécies, o que pode levar a resultados diferentes. Adicionalmente, como a relação entre a concentração de Sb(V) e Sb(III) pode chegar a um fator de até cem vezes maior, o Sb(V) pode acabar se tornando um interferente no método utilizado, durante a determinação de Sb(III).

Apesar da quantidade de trabalhos descritos na literatura, poucos fazem referência a determinação seletiva de Sb(III) e Sb(V) no fármaco com tratamento ácido. Nesse sentido, é bastante comum realizar a determinação de uma das espécies e a outra calculada por diferença. Quando uma das espécies é determinada por diferença, a concentração da outra espécie é influenciada pelo desvio padrão da espécie quantificada, podendo ocasionar erros de exatidão e precisão.

### 3. OBJETIVOS

---

Ancorado no que fora exposto até então, pode-se verificar que há uma discrepância na concentração das espécies de Sb no NMG obtidos por diferentes autores. Nesse mesmo sentido, ressalta-se que poucos trabalhos fazem uso de técnicas seletivas, como a HG e a LC com tratamento das amostras de NMG. Desta forma, os objetivos deste trabalho são: otimizar a separação cromatográfica das espécies presentes no medicamento; desenvolver um método para a análise de especiação utilizando as técnicas LC-ICP-MS e LC-HG-ICP-MS e comparar os resultados obtidos; explorar o tratamento ácido da amostra, a fim de converter as espécies complexadas de meglumina:Sb, nas respectivas espécies inorgânicas livres (Sb(III) e Sb(V)).



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

---

*Neste capítulo são descritos os materiais, instrumentos e reagentes utilizados para a consecução dos objetivos supra-apresentados. Em virtude disso, nas seções que sucedem este capítulo são descritas as metodologias empregadas utilizando LC-ICP-MS, LC-HG-ICP-MS, ICP OES e a separação das espécies Sb(III) e Sb(V).*

## 4.1. INSTRUMENTAÇÃO

### 4.1.1. Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado

As determinações por ICP-MS foram realizadas empregando o seguinte equipamento: um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado PerkinElmer SCIEX (ELAN DRC II, <http://www.perkinelmer.com>, EUA); um nebulizador pneumático Meinhard (tipo A, <http://www.meinhard.com>, EUA); uma câmara de nebulização ciclônica (Glass Expansion, <http://www.geicp.com>, Austrália); uma tocha com tubo injetor de quartzo de 2 mm de diâmetro interno; e Argônio com 99,998% de pureza (White martins, <http://www.whitemartins.com.br>, Brasil) foi utilizado para gerar o plasma. Na Tabela 2 são mostrados os parâmetros operacionais utilizados.

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

Parâmetros	Condições
Potência RF, W	1300
Vazão de Ar L min <sup>-1</sup> Principal	12
Intermediário	1,2
Nebulizador	1,0
Cone de amostragem e “Skimmer”	Pt
Resolução, u	0,7
<i>m/z</i> monitorado	121
Varreduras/leituras, <i>Sweeps/reading</i>	1
Leituras/replicata	1
Replicatas	11650
“Dwell time”, ms	100
Lente iônica	<i>Auto lens: on</i>
Modo de medida	<i>Peak hopping</i>
Modo de operação do detector	<i>Dual</i>

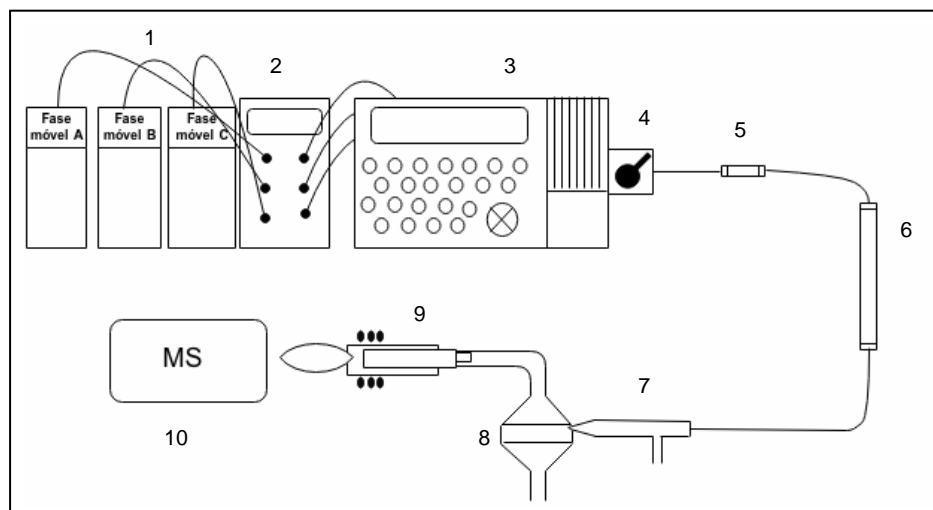
Diariamente foram avaliadas as principais condições de operação do equipamento de ICP-MS e, quando necessário, as mesmas foram ajustadas. Conforme recomendações do fabricante, foi monitorada a intensidade do sinal obtido para <sup>115</sup>In<sup>+</sup>, (indicado para ser superior a 30.000 contagens s<sup>-1</sup>, cps); a menor

formação de óxidos, avaliada pela razão das intensidades da espécie poliatômica  $^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}^+$  por  $^{140}\text{Ce}^+$  (indicado para ser inferior a 3% da intensidade obtida para o  $^{140}\text{Ce}^+$ ); e a menor intensidade para o íon  $^{136}\text{Ba}^{++}$  (indicado para inferior a 3% em relação ao  $^{136}\text{Ba}^+$ ). A avaliação foi realizada a partir de uma solução contendo  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  de In e Ce e  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de Ba. Também, é recomendado que o ruído do instrumento seja inferior a 2 cps na razão  $m/z$  8,5 e  $m/z$  220. Ajustes na calibração do detector e no quadrupolo (calibração de massa), por exemplo, foram realizados com menor frequência, apenas quando necessário, conforme indicações do fabricante.<sup>78</sup>

A determinação do Sb foi realizada pelo monitoramento do isótopo  $^{121}\text{Sb}$  (57%), por ser o mais abundante. O outro isótopo é o  $^{123}\text{Sb}$  com abundância de 43%. Ambos os isótopos possuem pouca interferência espectral (isobárica, poliatômica e óxidos).

#### 4.1.2. Cromatografia a líquido

A separação das espécies de antimônio foi realizada em um sistema cromatográfico composto por uma bomba quaternária (PerkinElmer, modelo Series 200 LC Pump), um degaseificador a vácuo (PerkinElmer, modelo Series 200 Vacuum Degasser), uma válvula injetora manual Rheodine com uma alça de amostragem de poli(éter-éter-cetona) (PEEK) de  $200 \mu\text{L}$  e uma coluna de troca aniônica (Hamilton, PRP-X100,  $250 \times 4,1 \text{ mm}$ , d.i.,  $10 \mu\text{m}$  de diâmetro de partícula - <http://www.hamiltoncompany.com>, EUA) preenchida com resina de poliestireno divinil benzeno (PSDVB) com grupos funcionais trimetilamônio. A pré-coluna utilizada é constituída do mesmo material da coluna. A saída da coluna cromatográfica foi acoplada diretamente ao nebulizador pneumático do instrumento de ICP-MS através de um capilar de PEEK (Upchurch Scientific, <http://www.upchurch.com>, EUA,  $0,007 \text{ mm}$  de d.i. e  $10 \text{ cm}$  de comprimento). A injeção das soluções na alça de amostragem do cromatógrafo foi executada manualmente através de uma seringa com capacidade para  $5 \text{ mL}$  (Henke-Sass Wolf GmbH, <http://www.henkesasswolf.de>, Alemanha). A vazão da fase móvel foi avaliada de  $0,25$  a  $1,75 \text{ mL min}^{-1}$ . Na Figura 2 está demonstrado o esquema do sistema utilizado para LC-ICP-MS.



**Figura 2.** Sistema LC-ICP-MS empregado. 1- Fases móveis; 2- Degaseificador à vácuo; 3- Bomba de LC; 4- Alça de amostragem e injetor; 5- Pré-coluna; 6- Coluna de troca aniônica; 7- Nebulizador; 8- Câmara de nebulização; 9 e 10- ICP-MS.

#### 4.1.3. Injeção em fluxo com geração de hidretos

O sistema para HG foi acoplado à saída da coluna cromatográfica para derivatização pós-coluna. O sistema foi projetado no próprio laboratório (Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais - UFSM) e é constituído por uma bomba peristáltica de oito canais (Gilson, MiniPlus 3, França) para a propulsão das soluções, tubos de Tygon de diferentes diâmetros internos e tubos de polietileno (d.i. 0,8 mm) para carrear as soluções, um separador gás/líquido do tipo em “U” (10 cm de comprimento e 1,5 cm d.i.) e um injetor-comutador em acrílico para injetar a amostra. Este sistema foi acoplado ao instrumento de ICP-MS para a determinação seletiva da espécie Sb(III), conforme descrito por Moreira.<sup>54</sup>

O ajuste necessário do sistema para se obter sinal com maior intensidade para Sb(III) já foi descrito na literatura<sup>54</sup> e, portanto, não foram otimizados neste trabalho. O sistema para HG possui três entradas: uma para a amostra, outra para o ácido cítrico e a terceira para o borohidreto de sódio. A quantificação das amostras foi realizada por integração da área obtida pelo sinal analítico.

#### 4.1.4. Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado

Para as determinações de Sb total foi utilizado um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (Perkin Elmer, modelo Optima DV 4300, EUA) com configuração de vista axial e radial, sendo utilizada apenas a vista axial. A introdução da amostra no equipamento foi conduzida utilizando um nebulizador pneumático do tipo Gemcone e tocha com tubo injetor de alumina de 2 mm de d. i.. O plasma foi gerado utilizando-se argônio conforme citado na Subseção 4.1.1. Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado. Na Tabela 3 estão descritos os parâmetros operacionais do instrumento de ICP OES.

**Tabela 3.** Parâmetros operacionais do instrumento de ICP OES.

Parâmetros	Condições
Potência RF, W	1400
Vazão de Ar, L min <sup>-1</sup> Principal	12
Intermediário	0,2
Nebulizador	0,7
Câmara de nebulização	Ciclônica
Visualização do plasma	Axial
Linhas de <i>emissão atômicas</i> monitoradas, nm	206,834; 217,582
Replicatas	3

#### 4.2. REAGENTES

Os reagentes utilizados foram de grau analítico. Todas as soluções foram preparadas com água previamente destilada e deionizada em uma coluna de troca iônica convencional e purificada em sistema Milli-Q (Millipore, EUA), obtendo resistividade igual a 18,2 MΩ cm.

As soluções de referência das espécies de Sb foram preparadas diariamente a partir de diluições de solução de tartarato de antimônio e potássio (1000 mg mL<sup>-1</sup>) para Sb(III) e hexahidróxido de antimônio e potássio (KSb(OH)<sub>6</sub>, 1000 mg mL<sup>-1</sup>) para Sb(V). A quantificação das espécies de Sb foi realizada com o auxílio do software WinFAAS (EUA) por intensidade de sinal integrado.

No tratamento da amostra foram utilizados HCl (36%, 1,18 kg L<sup>-1</sup>, Merck, Alemanha), e ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>, 65%, 1,4 kg L<sup>-1</sup>, Merck, Alemanha), utilizado como fase móvel e para ajuste do pH da mesma. Os ácidos foram purificados com o uso de um sistema *sub-boiling* da Milestone (modelo duoPUR 2.01E, Itália). A fase móvel de EDTA (Reagen, Brasil) foi preparada pela dissolução do sólido com hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>OH 30%, 0,88 kg L<sup>-1</sup>, Merck, Alemanha). Todas as soluções foram armazenadas em frascos de polietileno a 4 °C.

### 4.3. MATERIAIS DIVERSOS

Todas as pesagens foram realizadas em uma balança digital Shimadzu, com resolução de 0,0001 g e capacidade de 220 g (modelo AY 220, Japão).

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

O separador gás-líquido utilizado foi confeccionado no Laboratório de Hialotecnia do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria.

### 4.4. AMOSTRAS E TRATAMENTO

As amostras de NMG utilizadas estão na forma de ampolas de 5 mL com concentração declarada de 81000 mg L<sup>-1</sup> de antimônio total em solução aquosa (Sanofi Aventis, Brasil). Estas amostras foram diluídas 400.000 e 100.000 vezes para posterior análise por LC-ICP-MS e LC-HG-ICP-MS, respectivamente, com o intuito de minimizar os problemas de interferência de matriz, pois a concentração de Sb está na ordem de mg mL<sup>-1</sup>, como já mencionado em trabalhos anteriores.<sup>20, 54</sup>

As amostras foram diluídas 400.000 vezes em água e também em HCl 1, 2, 3, 4 e 5 mol L<sup>-1</sup>. Inicialmente, as amostras foram diluídas por um fator de 1.000 vezes em água ou no ácido, e, em seguida, mais 400 vezes em água. Na diluição em ácido, as amostras foram previamente desareadas com argônio, inserindo o tubo de polietileno em um dispositivo para saída de argônio na vazão 0,4 L min<sup>-1</sup> por 30 min,

como descrito por Séby *et al.*<sup>76</sup>. Posteriormente, foram analisadas no sistema LC-ICP-MS. Os ensaios de recuperação de Sb(III) e Sb(V) foram realizados para verificar possíveis interferências oriundas da amostra. As amostras também foram analisadas por LC-HG-ICP-MS com o intuito de confirmar os resultados obtidos para Sb(III) por LC-ICP-MS.

#### 4.5. SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA DAS ESPÉCIES

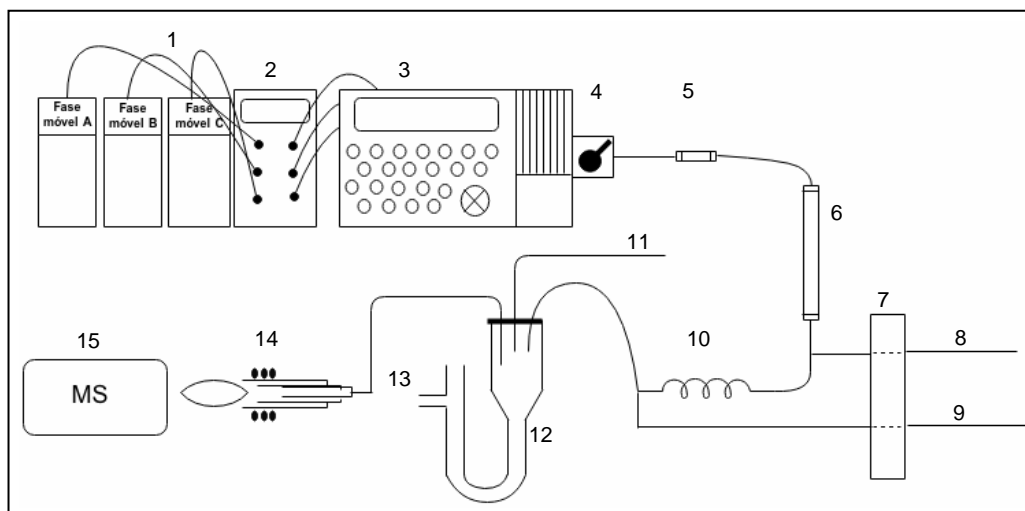
Para o estabelecimento dos principais parâmetros que influenciam na separação cromatográfica das espécies de Sb, utilizando coluna de troca aniônica, e para o ajuste do melhor desempenho do sistema LC-ICP-MS, foram utilizadas soluções de referência de Sb(III) e Sb(V) e soluções diluídas de NMG. Em um primeiro momento, foram avaliados os seguintes parâmetros da fase móvel: tipo, concentração, vazão e condição isocrática ou gradiente da eluição.

Para garantir uma boa reprodutibilidade na separação cromatográfica, as injeções das amostras e solução referência foram precedidas de etapas de condicionamento da coluna. Essa etapa foi realizada durante 5 min com as fases móveis utilizadas.

De acordo com a literatura,<sup>39, 54, 62, 69, 73</sup> as fases móveis avaliadas foram HNO<sub>3</sub> (15 mmol L<sup>-1</sup>, em pH 6,0)<sup>69</sup> e EDTA (em diferentes concentrações e em pH 4,5). Os parâmetros avaliados foram a vazão das fases móveis (na faixa de 0,25 a 1,75 mL min<sup>-1</sup>), o efeito do cloreto de lítio (LiCl, Merck, Alemanha) e do metanol (Carlo Erba, Itália) na fase móvel de EDTA.

#### 4.6. DETERMINAÇÃO DE Sb(III) POR LC-HG-ICP-MS

As condições do equipamento de ICP-MS foram as mesmas descritas na Tabela 3. Na Figura 3 tem-se um esquema do sistema LC-HG-ICP-MS utilizado no presente trabalho. O sistema LC-HG-ICP-MS é semelhante ao sistema LC-ICP-MS, porém agora possui a derivatização para formação do hidreto volátil na saída da coluna cromatográfica.



**Figura 3.** Sistema LC-HG-ICP-MS. 1- Fases móveis; 2- Degaseificador à vácuo; 3- Bomba de LC; 4- Alça de amostragem e injetor; 5- Pré-coluna; 6- Coluna de troca aniônica; 7- Bomba peristáltica; 8- Entrada de ácido cítrico ( $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ ); 9- Entrada de  $\text{NaBH}_4$  ( $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ ); 10- Caminho reacional (300 cm); 11- Entrada de argônio; 12- Separador gás-líquido; 13- Descarte; 14 e 15- ICP-MS.

#### 4.7. DETERMINAÇÃO DE Sb(III) POR FI-HG-ICP-MS

O sistema FI-HG-ICP-MS utilizado neste trabalho é semelhante ao descrito por Moreira <sup>54</sup>, com as condições do sistema de HG descritas na Subseção 4.1.3. (Injeção em fluxo com geração de hidretos). As condições do equipamento de ICP-MS são as mesmas descritas na Tabela 3, exceto o *Dwell time* (40 ms) e *Replicatas* (700).

#### 4.8. AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS MÉTODOS PROPOSTOS PARA A ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO

Como ainda não se dispõe de materiais certificados para avaliar a exatidão dos resultados, os métodos foram avaliados por testes de recuperação a partir das soluções referência de Sb(III) e Sb(V). Sendo assim, foram adicionadas, na amostra quantidades conhecidas das espécies de Sb, dependendo da diluição empregada e da concentração de cada espécie de Sb previamente quantificada.



Na Figura 4 está apresentado um esquema com as principais otimizações realizadas no presente trabalho, bem como as espécies possíveis de serem determinadas em cada técnica utilizada.

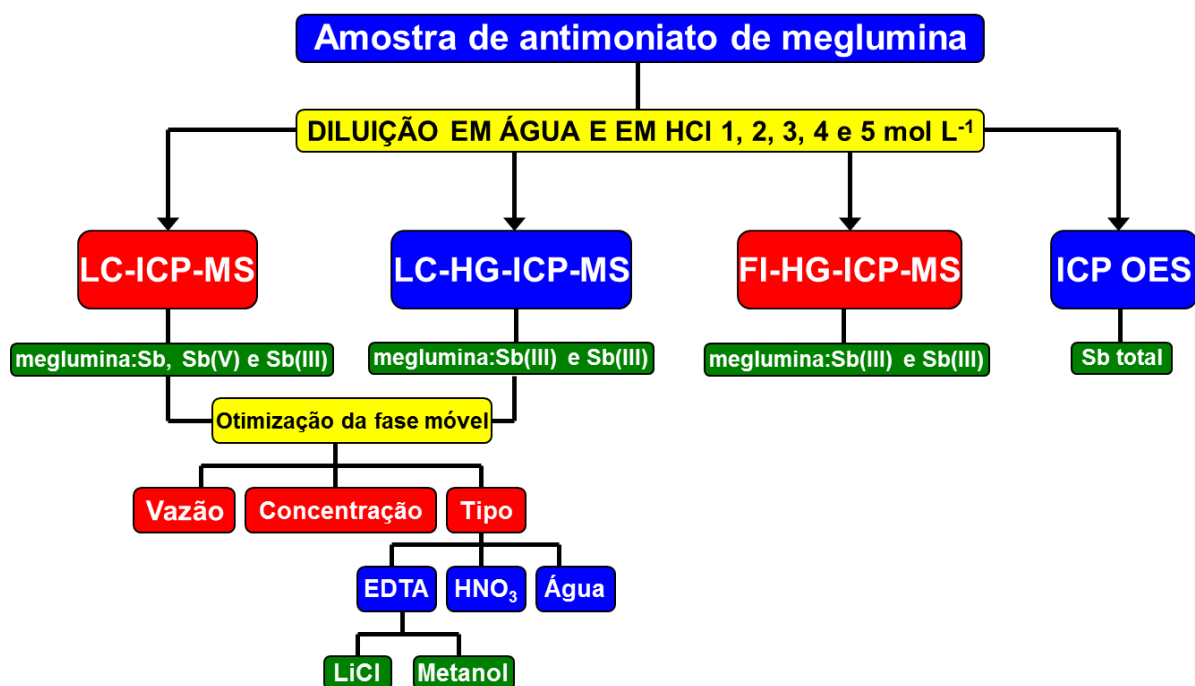


Figura 4. Esquema das técnicas utilizadas no presente trabalho.

## 5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

---

*Neste capítulo estão apresentados e discutidos os resultados obtidos para as espécies de Sb, utilizando as técnicas LC-ICP-MS e LC-HG-ICP-MS empregando ou não o tratamento ácido das amostras de NMG. Inicialmente são descritos e avaliados os resultados para as otimizações realizadas na separação cromatográfica das espécies presentes no medicamento. Por fim, são referendados os resultados obtidos na análise de especificação de Sb.*

## 5.1. OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA LC-ICP-MS

### 5.1.1. Ajuste do instrumento de ICP-MS

As condições do instrumento de ICP-MS foram diariamente avaliadas e otimizadas, atendendo ao disposto na Subseção 4.1.1 (Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado) e, mais especificamente na Tabela 2. Tanto nas determinações realizadas por LC-ICP-MS como por LC-HG-ICP-MS, o gás nebulizador foi avaliado de 0,90 e 1,30 L min<sup>-1</sup>, sendo fixada em 1,00 L min<sup>-1</sup>, pois esta foi a condição que proporcionou melhor razão sinal/ruído. As demais condições do instrumento de ICP-MS estão descritas na Tabela 2.

### 5.1.2. Escolha das condições para a separação cromatográfica

A separação cromatográfica é dependente da afinidade das espécies de interesse com a fase móvel e estacionária.<sup>19, 79</sup> Além disso, o pH exerce grande influência no estado de oxidação das espécies. Em solução aquosa, a espécie Sb(V) está na forma [Sb(OH)<sub>6</sub>]<sup>-</sup> em valores de pH de 2,7 a 10,4. Salienta-se contudo, que a solução de referência da espécie Sb(V) utilizada foi preparada a partir de KSb(OH)<sub>6</sub>, enquanto que o Sb(III), em meio aquoso, preparado em tartarato de potássio, o qual pode ser encontrado nas formas [Sb(OH)<sub>4</sub>]<sup>-</sup> ou [SbO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, em pH inferior a 3,0. Em pH entre 3,0 e 7,0, o Sb(III) forma complexos com carga 2-. Por exemplo, quando complexado com tartarato, o Sb(III) forma o complexo de fórmula estrutural [Sb<sub>2</sub>(C<sub>4</sub>O<sub>6</sub>H<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sup>2-</sup>.<sup>16, 19, 80, 81</sup> Como o pH do medicamento está entre 5,5 e 7,5, foi considerado que as espécies inorgânicas livres de Sb estarão na forma aniônica.

Segundo a literatura,<sup>20, 56- 69</sup> a coluna PRP-X100 é a mais utilizada para realizar a separação das espécies de Sb. Neste trabalho, não foram realizados testes com outras colunas, pois a PRP-X100 é uma coluna trocadora de ânions e, como já mencionado, as espécies de Sb no pH do medicamento estarão preferencialmente na forma aniônica. Além disso, outros trabalhos<sup>16, 38, 54</sup>, depois de realizarem otimizações com diferentes colunas (IonPac,<sup>54</sup> Supelcosil<sup>16</sup> e Phenomenex<sup>82</sup>),

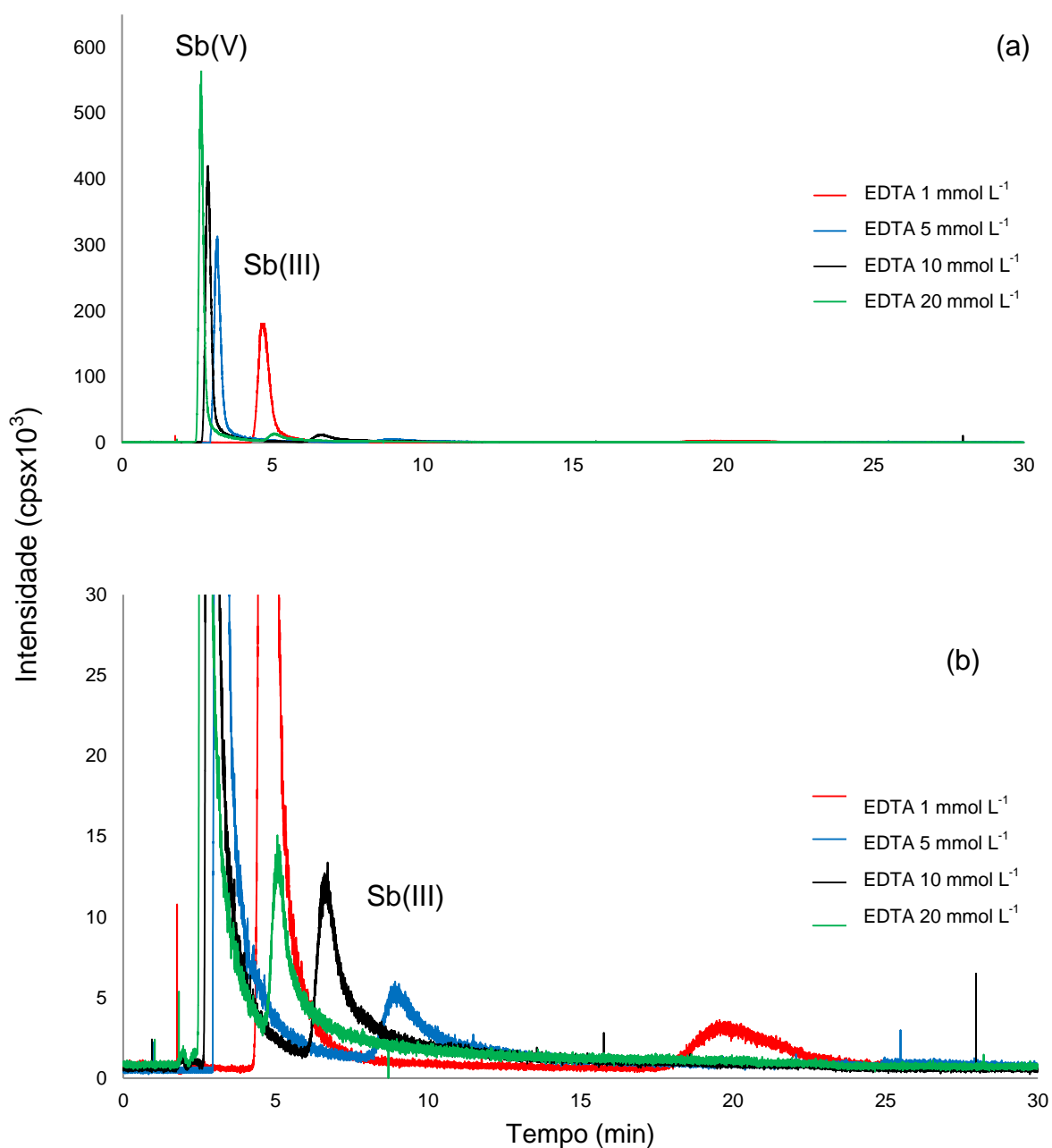
reportam que a PRP-X100 é a resina capaz de proporcionar melhor resolução na separação das espécies de Sb no NMG.

As condições otimizadas para a separação cromatográfica foram a composição da fase móvel, sua vazão e concentração, a fim de obter melhor resolução na separação e quantificação das espécies de Sb. Para isso, as fases móveis testadas foram HNO<sub>3</sub>, EDTA e água. Essas fases móveis foram adotadas, pois são as mais utilizadas para a separação cromatográfica das espécies de Sb, tanto no medicamento, como em outras matrizes.<sup>20, 54, 69</sup> Adicionalmente, foram testados o LiCl e o metanol como modificadores na fase móvel de EDTA, ambos descritos como melhoradores da resolução na separação cromatográfica.<sup>27, 81</sup>

#### 5.1.2.1. Fase móvel EDTA

Inicialmente a fase móvel testada foi o EDTA, no modo de eluição isocrático. A concentração de EDTA avaliada foi variada de 1 a 20 mmol L<sup>-1</sup>, já que é esta a faixa de concentração mais reportada na literatura.<sup>76,82, 83</sup> Não foram avaliadas concentrações maiores, para evitar a possível formação de resíduos sobre a interface do ICP-MS.<sup>46, 84</sup> O pH da fase móvel não foi otimizado, pois todos os trabalhos encontrados na literatura, concordam que a melhor separação obtida ocorre em pH 4,5.<sup>20, 54, 62, 64, 82</sup>

Na Figura 5 é ilustrado o cromatograma obtido na separação cromatográfica das soluções de referência das espécies Sb(III) e Sb(V) utilizando diferentes concentrações de EDTA como fase móvel. O programa utilizado para realizar a separação das espécies de Sb na solução de referência foi parametrizado com 100% de EDTA e vazão fixada em 1,0 mL min<sup>-1</sup> durante 30 min.



**Figura 5.** (a) Cromatograma da separação de Sb(III) e Sb(V) em solução de referência empregando EDTA como fase móvel em pH 4,5, na vazão 1,0 mL min<sup>-1</sup>, utilizando o sistema LC-ICP-MS; (b) ampliação de 20 vezes do cromatograma (a).

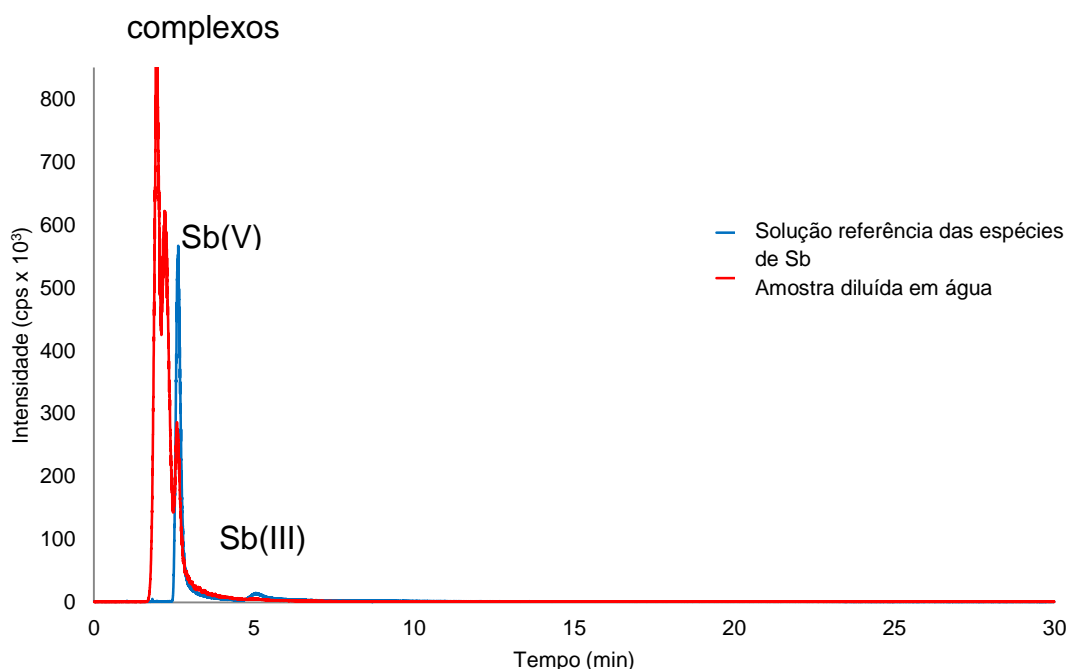
A partir dos cromatogramas apresentados na Figura 5, verifica-se que a medida que a concentração de EDTA aumenta, tanto o sinal do Sb(V) (sinais que aparecem em até 5 min) como o sinal do Sb(III), ficam mais estreitos e eluem em tempos menores, tornando-se menos assimétricos e alargados. A solução de EDTA a 20 mmol L<sup>-1</sup> proporcionou uma boa separação, com sinais simétricos para as duas espécies e eluição em 6 min. Nas demais concentrações (1, 5 e 10 mmol L<sup>-1</sup>) pode-

se verificar que o sinal de Sb(III) se tornou mais alargado. Por este motivo, a concentração de 20 mmol L<sup>-1</sup> de EDTA foi adotada para os testes subsequentes.

A retenção prolongada observada para a espécie Sb(III) já era esperada, pois diversos autores<sup>54, 55, 69, 73</sup> já haviam relatado este comportamento. Além do que já fora exposto, os complexos formados por Sb(III)-EDTA possuem carga 2- e, portanto maior afinidade pela resina da fase estacionária. Além disso, devido ao fato de estar ligado em 4 posições, com número de coordenação 4, a interação com a resina é mais forte.<sup>54, 82, 83</sup>

Por outro lado, o complexo Sb(V)-EDTA possui carga 1- e, por isso, menor afinidade pela resina da fase estacionária.<sup>16</sup> Ademais, o Sb(V) detém número de coordenação 6, com geometria octaédrica, ocasionando interações mais fracas com a resina da coluna e, conseqüentemente, eluindo em menos tempo. Isto resulta em um sinal mais estreito e simétrico.<sup>54, 82, 83</sup>

Desta forma, a fase móvel foi fixada em 20 mmol L<sup>-1</sup> de EDTA a 1,0 mL min<sup>-1</sup> para a análise da amostra de NMG. O cromatograma obtido a partir do NMG é mostrado na Figura 6.



**Figura 6.** Cromatograma obtido da separação das espécies de Sb presentes no medicamento e da solução de referência das espécies de Sb utilizando como fase móvel EDTA 20 mmol L<sup>-1</sup>, a 1,00 mL min<sup>-1</sup> no sistema LC-ICP-MS.

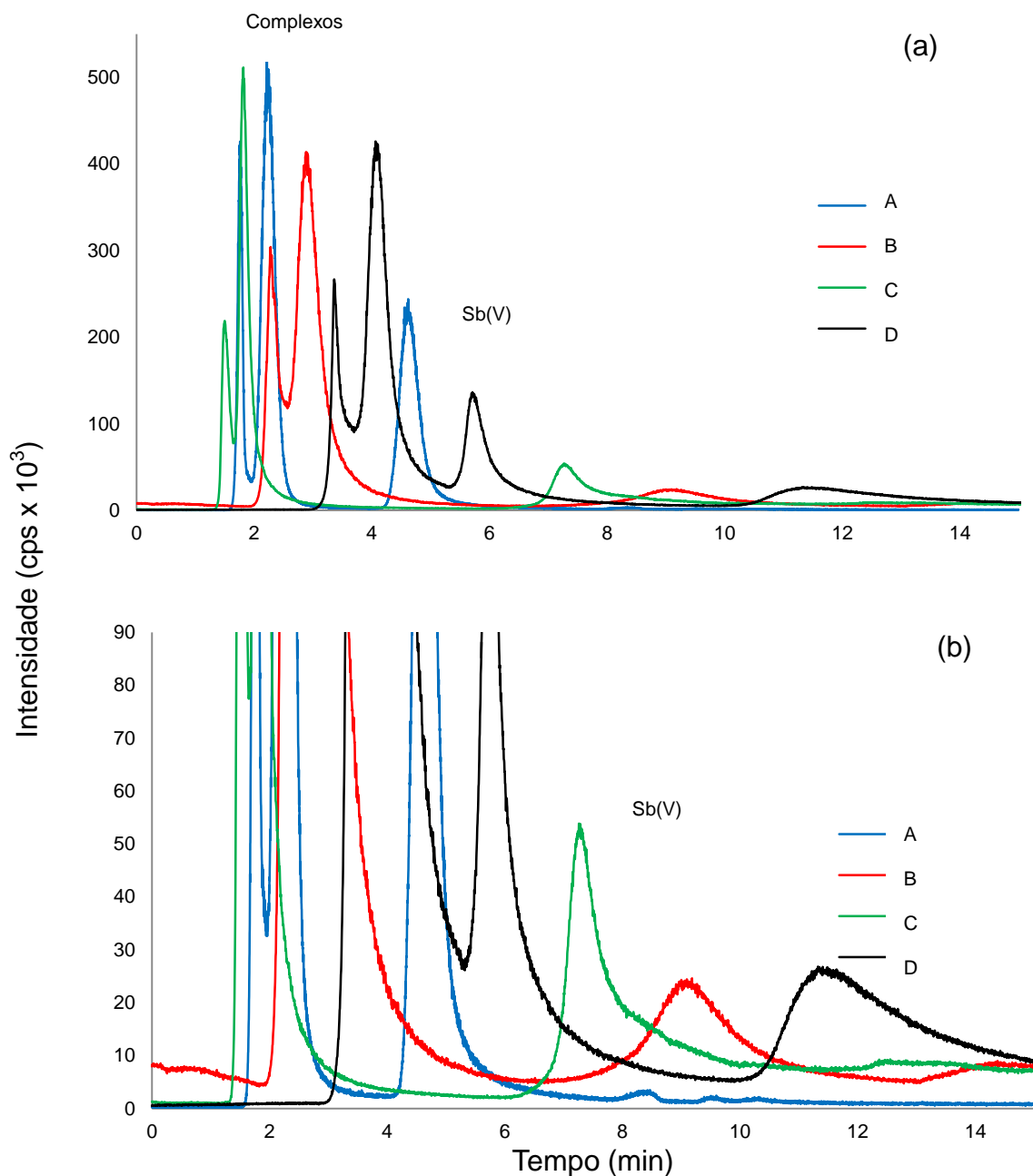
Conforme mostrado na Figura 6, pode-se verificar que as espécies inorgânicas livres presentes na amostra eluem no mesmo tempo de retenção das soluções de referência de Sb(III) e Sb(V). Também, pode-se perceber a existência de outros dois sinais que não correspondem ao tempo de retenção das soluções de referência disponíveis (Sb(III) e Sb(V)). Na literatura, cromatogramas semelhantes foram obtidos por Séby *et al.*<sup>76</sup> e por Moreira<sup>54</sup>, utilizando condições similares às apresentadas no presente trabalho. Nos experimentos de Moreira<sup>54</sup> os sinais em 1,7 e 2,2 min. foram atribuídos como sendo referentes aos complexos de Sb(III) e Sb(V), respectivamente. Entretanto, somente o Sb(III) e o Sb(V) (sinais em 4,4 min. e 6,9 min., respectivamente) foram quantificados, em função de não existirem compostos de Sb de referência iguais aos contidos na amostra (sinais relativos aos dois primeiros picos) e da sua incompleta separação. Os sinais em 1,7 e 2,2 min. foram atribuídos aos complexos Sb(III) e Sb(V) com a meglumina, respectivamente, após estudos empregando a geração de hidretos pós-coluna. Em determinadas condições de reação de geração de hidretos<sup>54</sup> somente o Sb(III) forma estibina (SbH<sub>3</sub>). Portanto, com geração de hidretos pós-coluna somente as espécies de Sb(III) são observadas no cromatograma. No trabalho de Séby *et al.*<sup>76</sup> foi verificado apenas a presença de um sinal em 1,07 min., além das espécies inorgânicas livres que, segundo os autores, é referente à espécie meglumina:Sb(V). As espécies de Sb(III) e Sb(V) total foram quantificadas após tratamento da amostra com HCl 5,0 mol L<sup>-1</sup>. Este tratamento promoveu a quebra dos complexos meglumina:Sb, convertendo-os nas espécies Sb(III) e Sb(V) inorgânicas livres.

As espécies complexadas não puderam ser totalmente separadas utilizando a fase móvel de EDTA nas concentrações 1, 5, 10 ou 20 mmol L<sup>-1</sup>, com vazão 1,0 mL min<sup>-1</sup>. Por isso, a separação foi otimizada em diferentes vazões (A, B, C e D), tanto no modo gradiente, como no modo isocrático, a fim de avaliar se a separação das espécies complexadas poderia ser obtida com melhor resolução. As condições avaliadas são descritas em maior detalhes na Tabela 4. Já os cromatogramas obtidos são demonstrados na Figura 7.

**Tabela 4.** Programas referentes à vazão da fase móvel utilizados na separação das espécies de Sb presentes no NMG.

Programa	Tempo (min)	Vazão (mL min <sup>-1</sup> )	EDTA 20 mmol L <sup>-1</sup> (%)	Água (%)
A	5	1,00	0	100
	10	1,50	100	0
B	5	0,75	0	100
	5	1,00	0	100
	20	1,50	100	0
C	5	2,00	0	100
	5	1,00	50	50
	20	1,50	100	0
D	10	0,25	50	50
	20	1,75	100	0



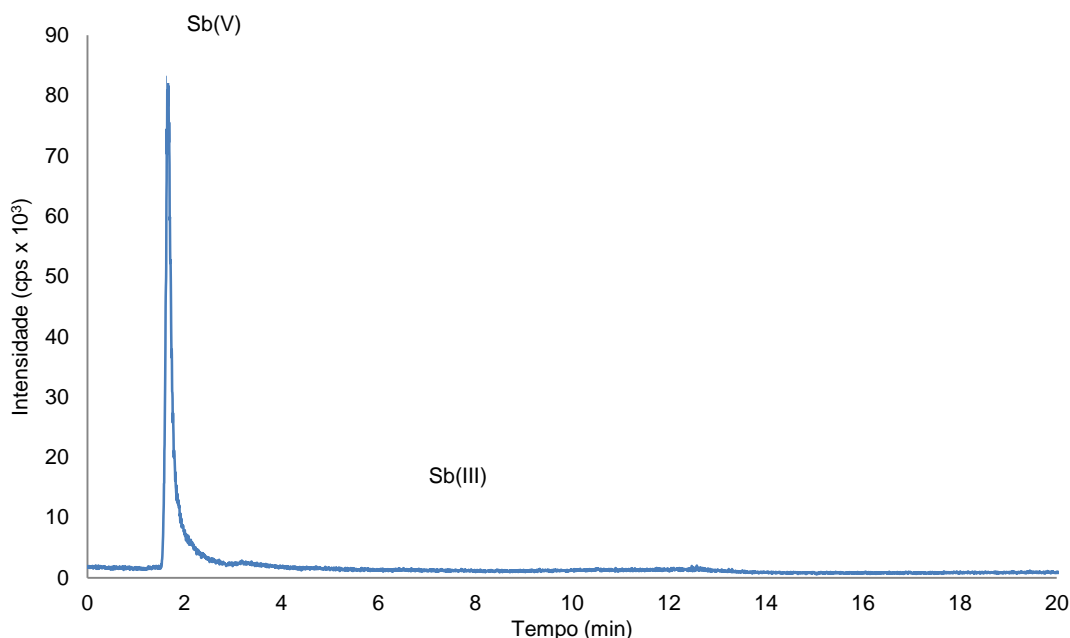


**Figura 7.** (a) Cromatograma obtido na separação das espécies de Sb presentes no NMG utilizando EDTA 20 mmol L<sup>-1</sup> em pH 4,5 como fase móvel em diferentes vazões (A, B, C e D), descritas com mais detalhes na Tabela 4 e utilizando o sistema LC-ICP-MS; (b) ampliação de 5,5 vezes do cromatograma (a).

Pela análise do cromatograma da Figura 7, pode-se concluir que o EDTA e a água não foram eficazes para separar as espécies de Sb complexadas presentes no NMG. O Sb complexado com a meglumina, provavelmente não possui nenhum sítio ativo capaz de complexar com o EDTA. Ainda pela análise dos cromatogramas da

Figura 7, pode-se verificar que o sinal do Sb(III) manteve-se assimétrico e um pouco “arrastado”, estando retido por uma forte interação com a fase estacionária. Para tentar contornar este problema foi testado o uso de LiCl. Cloretos e nitratos de metais alcalinos são capazes de diminuir a atração eletrostática de Sb com a resina, na cromatografia de quelação, já que, em solução aquosa, os mesmos estão totalmente dissociados.<sup>79</sup> Ulrich *et al.*<sup>81</sup>, adicionaram a solução de cloreto de potássio (KCl), ácido cítrico e ácido tartárico nas soluções de referência de Sb(III) e Sb(V). Eles verificaram que a adição de KCl alterou levemente a separação da espécie Sb(III), possivelmente devido a formação do complexo  $[SbCl_4]^-$  ocorrer apenas em altas concentração de cloreto. Apesar do mecanismo existente na separação das espécies de Sb ocorrer devido a atração eletrostática, este teste foi realizado com o objetivo de verificar se a atração existente entre o Sb(III) e a coluna poderia ser diminuída, para só então ser possível eluir o Sb(III) em um tempo menor.

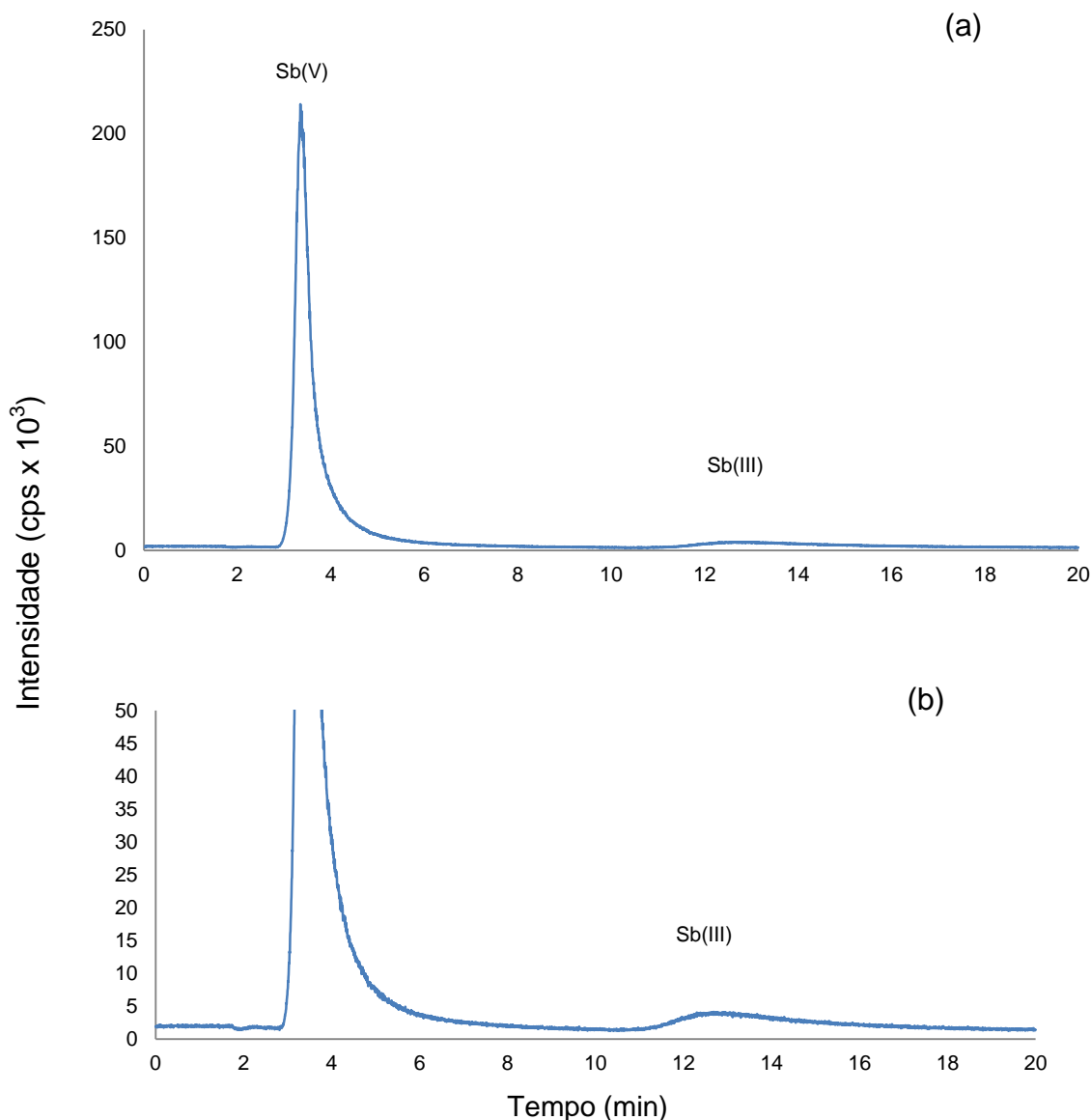
Na Figura 8 tem-se o cromatograma obtido para a separação das espécies de Sb utilizando fase móvel EDTA com adição de LiCl, na concentração de  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , com vazão de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  durante 20 min.



**Figura 8.** Cromatograma obtido a partir da solução de referência de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  de Sb(III) e  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  de Sb(V) utilizando EDTA  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  em pH 4,5 com LiCl  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  como fase móvel, vazão  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  e utilizando o sistema LC-ICP-MS.

A partir do cromatograma da Figura 8 é possível verificar que a adição do LiCl não diminui a retenção da espécie Sb(III). Além disso, não foi capaz de eluir a espécie Sb(III), sendo, portanto, desconsiderado o uso de LiCl como aditivo. Um resultado diferente foi obtido por Ulrich *et al.*<sup>81</sup> que ao adicionar KCl na solução de referência de Sb(III) houve uma leve melhora na separação cromatográfica das espécies de Sb, diminuindo o tempo de corrida cromatográfica.

Como já fora mencionado anteriormente, ao utilizar a fase móvel EDTA 20 mmol L<sup>-1</sup> em pH 4,5 para a separação cromatográfica das espécies de Sb na amostra de NMG (cromatograma da Figura 7), pode-se verificar que não houve separação dos compostos complexados presentes na amostra. Desta maneira, com o objetivo de tentar separar os compostos complexados da amostra, o metanol (na concentração 0,5% (v/v)) foi testado como aditivo na fase móvel de EDTA, pois como relatado em outros trabalhos,<sup>79, 85, 86</sup> o metanol é capaz de melhorar a separação de compostos com grupamentos orgânicos. Esse efeito ocorre, pois solventes orgânicos são capazes de aumentar a solubilidade de espécies com grupamentos orgânicos, diminuindo as interações entre o Sb e a resina da fase estacionária, além de alterar a polaridade da fase móvel.<sup>85</sup> Na Figura 9 pode-se observar o cromatograma obtido utilizando esta condição para separação das espécies de Sb(III) (5 µg L<sup>-1</sup>) e Sb(V) (50 µg L<sup>-1</sup>). A concentração das soluções de referência foram as anteriormente descritas, pois, com a diluição da amostra por um fator de 400.000 vezes, a concentração das espécies estará nesta ordem de grandeza.<sup>54</sup> A separação cromatográfica foi conduzida na vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> por 20 min.



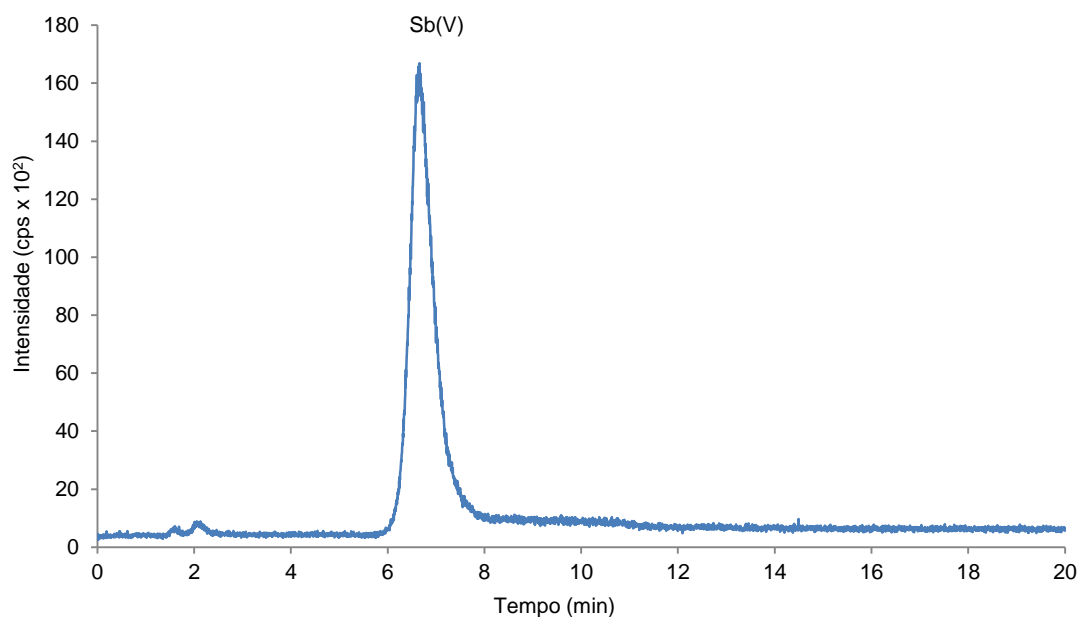
**Figura 9.** (a) Cromatograma obtido na separação das espécies de Sb(III) e Sb(V) na solução de referência utilizando EDTA 20 mmol L<sup>-1</sup> + metanol 0,5% (v/v) como fase móvel, vazão 1,0 mL min<sup>-1</sup> utilizando o sistema LC-ICP-MS; (b) ampliação de 5 vezes do cromatograma (a).

De acordo com a Figura 9, pode-se observar que não houve melhora significativa por ocasião da utilização do metanol como aditivo, quando comparado ao cromatograma com apenas EDTA como fase móvel. Esta condição foi, pois, desconsiderada. Ge *et al.*<sup>87</sup> otimizaram a separação das espécies de Sb em amostras de solo e verificaram que o metanol é capaz de melhorar a separação, apenas em concentrações acima de 2%. Porém, esta quantidade de metanol foi desconsiderada a fim de evitar ao máximo possíveis alterações no plasma do equipamento de ICP-MS.<sup>88-90</sup> Isso ocorre, pois solventes orgânicos, em

concentrações mais elevadas, podem acumular carbono na interface do equipamento de ICP-MS, decretando um eventual entupimento do cone de amostragem e *skimmer*.<sup>84</sup> Nesse sentido, a fase móvel contendo EDTA selecionada foi de 20 mmol L<sup>-1</sup>, sem a adição de modificador, utilizando o modo de eluição isocrático e em pH 4,5.<sup>20, 54</sup>

#### 5.1.2.2. Fase móvel HNO<sub>3</sub>

Os testes utilizando o HNO<sub>3</sub> como fase móvel foram realizados com o objetivo de melhorar a separação entre os complexos de meglumina:Sb e de diminuir o tempo de retenção da espécie Sb(III). O uso desta fase móvel na separação de espécies de Sb já foi relatado por Ulrich *et al.*<sup>69</sup>, no qual os tempos de retenção para as espécies inorgânicas Sb(V) e Sb(III) foram de 1,4 e 5 min., respectivamente. A coluna, concentração e o pH utilizados neste teste, são os mesmos adotados no trabalho de Ulrich *et al.*<sup>69</sup> (PRP-X100, 15 mmol L<sup>-1</sup> e 6,0, respectivamente). A Figura 10 ilustra o cromatograma obtido na separação da solução referência das espécies de Sb(III) e Sb(V). O modo de eluição utilizado foi o isocrático, por 20 min e vazão 1,0 mL min<sup>-1</sup>.

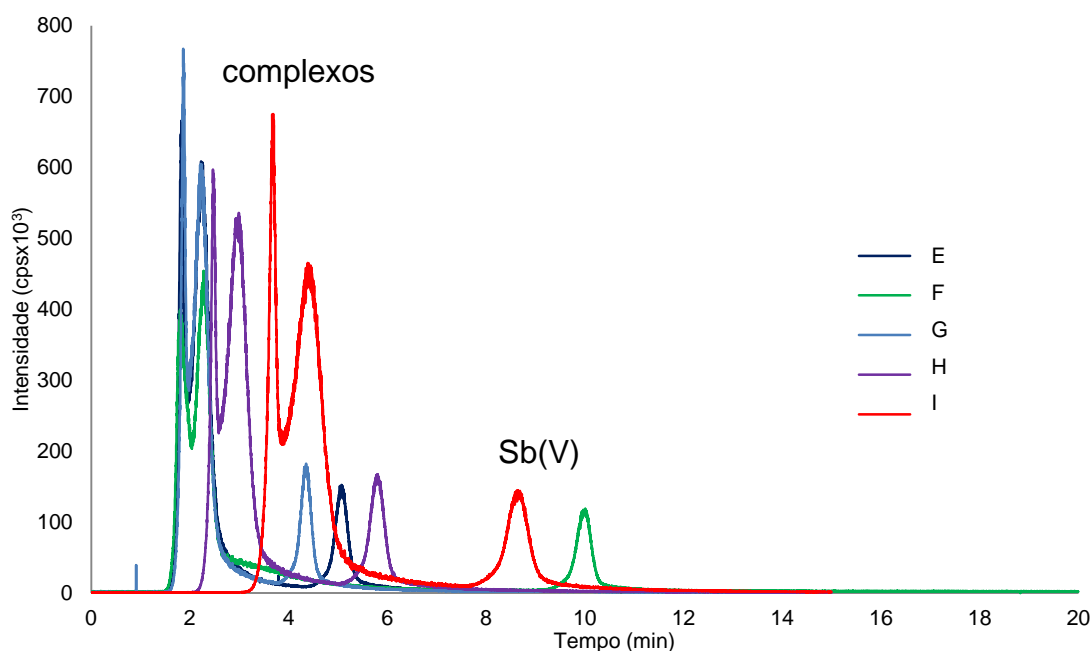


**Figura 10.** Cromatograma obtido na separação das espécies de Sb(III) e Sb(V) da solução referência utilizando  $\text{HNO}_3$   $15 \text{ mmol L}^{-1}$  em pH 6,0 como fase móvel, vazão  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  e sistema de LC-ICP-MS.

Como pode ser observado pelo cromatograma da Figura 10, a fase móvel com  $\text{HNO}_3$  não foi capaz de eluir o Sb(III), ao contrário dos resultados obtidos por Ulrich *et al.*<sup>69</sup>. Por outro lado, está de acordo com o resultado obtido por Mortari *et al.*<sup>55</sup>, que ao usar a fase móvel  $\text{HNO}_3$  nas mesmas condições de Ulrich *et al.*<sup>69</sup>, também observaram a não eluição da espécie Sb(III). Todavia, ao realizar a injeção de uma amostra utilizando a fase móvel  $\text{HNO}_3$  ( $15 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 6,0), verificou-se uma pequena melhora na separação das espécies complexadas, quando comparado com a separação das espécies da amostra de NMG utilizando a fase móvel EDTA ( $20 \text{ mmol L}^{-1}$  em pH 4,5) na Figura 7. Para tanto, foram avaliadas as vazões de 0,5, 0,75 e  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  e também a proporção de  $\text{HNO}_3$  ( $15 \text{ mmol L}^{-1}$  em pH 6,0) e de água (75:25, 25:75 e 100:0%), a fim de verificar a possibilidade de melhora na resolução da separação entre os complexos meglumina:Sb. Os cromatogramas obtidos podem ser visualizados na Figura 11 e na Tabela 5 estão detalhados os programas avaliados que foram nomeados E, F, G, H, e I.

**Tabela 5.** Programas utilizados na separação das espécies presentes no medicamento.

Tipo	Vazão (mL min <sup>-1</sup> )	Tempo (min)	HNO <sub>3</sub> 15 mmol L <sup>-1</sup> (%)	Água (%)
E	1,00	15	75	25
F	1,00	15	25	75
G	1,00	15	100	0
H	0,75	15	100	0
I	0,50	15	100	0

**Figura 11.** Cromatogramas obtidos na separação das espécies presentes no NMG diluída 400.000x em água utilizando a fase móvel de HNO<sub>3</sub> 15 mmol L<sup>-1</sup> em pH 6,0 em diferentes vazões, no sistema de LC-ICP-MS, com os programas estudados descritos na Tabela 5.

Ao examinar os cromatogramas da Figura 11, pode-se concluir que as alterações da vazão e da concentração de HNO<sub>3</sub> não foram capazes de melhorar a separação, não havendo, portanto, separação completa das espécies complexadas. Houve, apenas, alteração nos tempos de retenção das espécies de Sb. A condição que proporcionou uma pequena melhora na separação das espécies complexadas foi na vazão 1,0 mL min<sup>-1</sup> e HNO<sub>3</sub> 15 mmol L<sup>-1</sup> quando comparada com os demais programas avaliados.

A separação completa das espécies complexadas não pôde ser observada pois, muito provavelmente, os complexos não possuem diferença na densidade de carga ou, ainda, por serem uma mistura de complexos com diferentes proporções de

meglumina:Sb. Também, é possível supor que os complexos possuem carga total positiva ou neutra, impossibilitando a retenção nas condições utilizadas. Mesmo assim, o uso da fase móvel contendo  $\text{HNO}_3$  foi mais eficaz na separação das espécies complexadas quando comparado com a fase móvel contendo EDTA. Isso foi comprovado pelo cálculo das resoluções, descritas na Tabela 6.

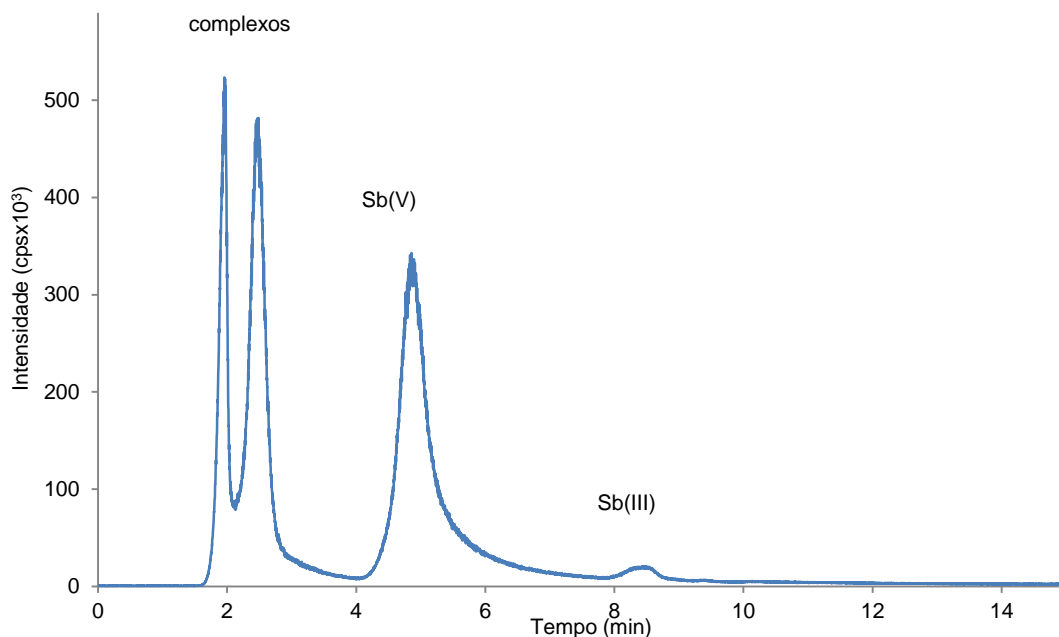
**Tabela 6.** Valores de resoluções obtidos nas otimizações utilizando o sistema LC-ICP-MS com diferentes proporções de EDTA, água e  $\text{HNO}_3$  como fase móvel.

Programa	Resolução		
	Meglumina:Sb(III)	Meglumina:Sb(V)	Sb(V)
A	0,32	0,60	1,58
B	0,26	0,79	1,50
C	0,45	0,30	1,30
D	0,45	0,80	1,60
E	0,50	0,75	1,40
F	0,40	1,83	1,92
G	0,70	1,50	1,51
H	0,56	1,93	2,29
I	0,34	2,60	2,40

Como já comentado, para realizar a quantificação de espécies na separação cromatográfica, é necessário ter-se um valor de  $R > 2,0$ .<sup>57</sup> De acordo com os resultados descritos na Tabela 6, pode-se verificar que nenhum programa estudado foi eficiente para realizar a quantificação das espécies complexadas.. Por outro lado, o programa que proporcionou a melhor separação, com resolução maior, foi utilizando a fase móvel de  $\text{HNO}_3$  (100%) na vazão  $1,00 \text{ mL min}^{-1}$ .

Portanto, o  $\text{HNO}_3$  ( $15 \text{ mmol L}^{-1}$ ) foi utilizado para separar as espécies complexadas na vazão de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  e o EDTA para separação das espécies inorgânicas livres. O programa utilizado nas separações cromatográficas subsequentes foi de 5 min com  $\text{HNO}_3$   $15 \text{ mmol L}^{-1}$  em pH 6,0 e após 10 min com EDTA  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  em pH 4,5, ambos na vazão de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ . O cromatograma obtido para a separação das espécies de Sb no medicamento é elucidado na Figura 12.





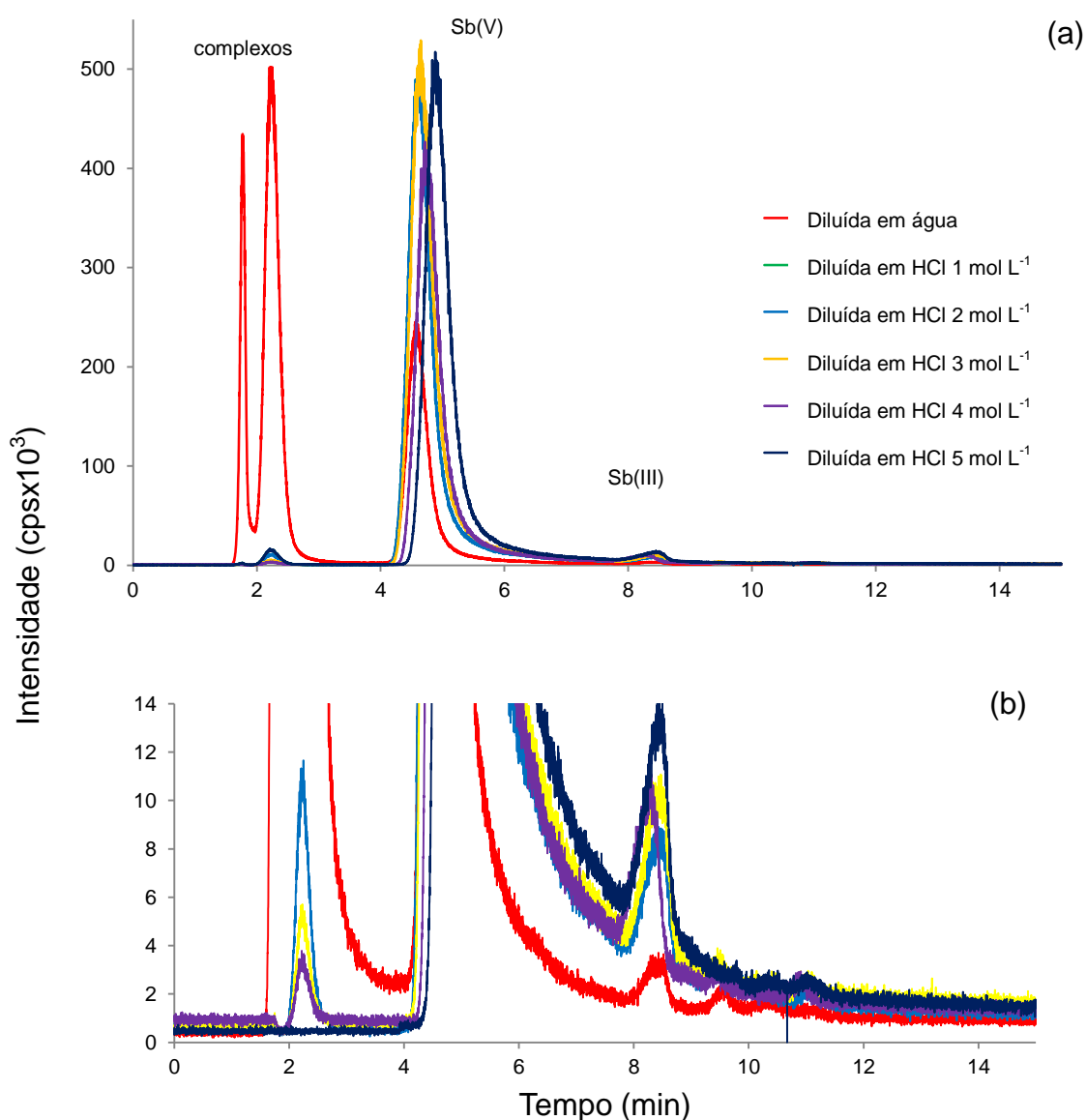
**Figura 12.** Cromatograma obtido na separação das espécies presentes no medicamento utilizando 5 min de  $\text{HNO}_3$  15  $\text{mmol L}^{-1}$  em pH 6,0 e após 10 min, EDTA 20  $\text{mmol L}^{-1}$  em pH 4,5, ambos na vazão de 1,0  $\text{mL min}^{-1}$  e sistema LC-ICP-MS.

## 5.2. TRATAMENTO DAS AMOSTRAS EMPREGANDO O SISTEMA LC-ICP-MS

Conforme já mencionado na Seção 4.4 Amostras e Tratamento, as amostras foram diluídas em água e também em meio ácido para verificar a possibilidade de quebrar a interação existente entre as espécies de meglumina:Sb. Neste contexto, as amostras foram diluídas em água (com e sem ácido), primeiramente por um fator de 1.000 vezes e, em seguida por mais um fator de 400 vezes. Esses valores de diluição adotados são elevados, pois a concentração de Sb e meglumina na ampola é bastante alta (na ordem de  $80000 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Evita-se, com isso, a saturação dos sítios da fase estacionária da coluna, além de minimizar possíveis interferentes da matriz, como oportunamente reportado por Moreira<sup>54</sup>.

Para realizar o tratamento, em um primeiro momento, o HCl foi preparado em diferentes concentrações, em tubos de polipropileno que foram desaerados por 30 min com argônio, a fim de evitar a conversão da espécie Sb(III) para Sb(V) devido a presença de  $\text{O}_2$  na solução. Esse tratamento já havia sido descrito por Séby *et al.*<sup>76</sup> que verificaram a conversão de 90% do Sb(III) para Sb(V) quando as soluções de referência não eram desaeradas. Em seguida, foram conduzidas sequencialmente,

as diluições de 1.000 vezes e de 400 vezes. Esse tratamento foi realizado para as amostras diluídas 1000 vezes com HCl na concentração de 1 a 5 mol L<sup>-1</sup>. A exemplo deste trabalho, Séby *et al.*<sup>76</sup> também verificaram que os complexos de Sb eram convertidos nas respectivas espécies Sb(III) e Sb(V) inorgânicas livres quando a amostra era submetida a tratamento ácido. Desta maneira, avaliou-se o efeito do tratamento da amostra com HCl entre 1 e 5 mol L<sup>-1</sup>. O cromatograma obtido pode ser visualizado na Figura 13.



**Figura 13.** (a) Cromatograma obtido na separação das espécies de Sb presentes no NMG tratadas com diferentes concentrações de HCl, utilizando como fase móvel o HNO<sub>3</sub> em pH 6,0 por 5 min mais 10 min com EDTA 20 mmol L<sup>-1</sup> em pH 4,5, ambos na vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e o sistema LC-ICP-MS e (b) ampliação de 35,7 vezes do cromatograma (a).

Ao analisar o cromatograma da Figura 13 pode-se concluir que a concentração de ácido foi capaz de desfazer a ligação existente entre as espécies de Sb que com meglumina. A partir deste fato, infere-se que o ácido é capaz de diminuir a estabilidade da ligação existente no complexo meglumina:Sb, formando assim, um complexo mais estável com Sb(III), o  $[\text{SbCl}_4]^-$ . Já no caso do complexo de meglumina:Sb(V), o Sb(V) é, possivelmente, convertido para o complexo  $[\text{Sb}(\text{OH})_6]^-$ .<sup>4, 54</sup>

Na Tabela 7 são apresentadas as concentrações das espécies com e sem adição do ácido e que foram determinadas por quantificação por integração da área. Os complexos de meglumina:Sb foram nomeados para complexo 1 para Sb(III) e complexo 2 para Sb(V).

**Tabela 7.** Resultados obtidos (média e desvio padrão, mg mL<sup>-1</sup>; n = 3) de espécies de Sb em NMG utilizando diferentes concentrações de HCl com o sistema LC-ICP-MS.

Diluição	Complexo 1	Complexo 2	Sb(V)	Sb(III)	Sb total <sup>b</sup>
Água	5,75 ± 0,28 <sup>a</sup>	29,18 ± 1,50 <sup>a</sup>	29,76 ± 1,37	2,59 ± 0,50	67,28 ± 1,88
HCl 1 mol L <sup>-1</sup>	-	0,38 ± 0,01 <sup>a</sup>	65,80 ± 0,26	4,38 ± 0,13	70,56 ± 0,08
HCl 2 mol L <sup>-1</sup>	-	0,13 ± 0,01 <sup>a</sup>	73,47 ± 0,84	5,92 ± 0,49	79,52 ± 0,95
HCl 3 mol L <sup>-1</sup>	-	-	74,49 ± 1,89	5,77 ± 0,29	80,26 ± 3,66
HCl 4 mol L <sup>-1</sup>	-	-	65,55 ± 1,59	6,26 ± 0,15	71,81 ± 2,55
HCl 5 mol L <sup>-1</sup>	-	-	71,43 ± 1,40	7,47 ± 0,65	78,90 ± 2,38

<sup>a</sup> Valor aproximado (ver texto).

<sup>b</sup> Somatório das concentrações de todas as espécies.

Salienta-se que os resultados apresentados (valores “a” na Tabela 7) das espécies meglumina:Sb (Complexo 1 e Complexo 2) para a amostra diluída em água são apenas valores aproximados, em virtude da incompleta separação das mesmas, não sendo possível fazer o correto tratamento de cada sinal individualizado. Nas amostras que foram tratadas com ácido, os sinais, provavelmente relativos às espécies meglumina:Sb(III) (Complexo 1) e meglumina:Sb(V) (Complexo 2) desapareceram, sendo que o aumento da intensidade dos sinais das espécies de Sb inorgânico livre é, aproximadamente, proporcional às intensidades dos sinais das espécies complexadas.

A concentração de Sb(III) foi com valor máximo (7,47 ± 0,65 mg mL<sup>-1</sup>) utilizando HCl 5 mol L<sup>-1</sup>. Todos os resultados obtidos com o tratamento ácido estão acima do permitido para Sb(III) segundo a Farmacopeia Brasileira<sup>6</sup> que estabelece o

valor de  $4,0 \text{ mg mL}^{-1}$ . Provavelmente, isto é decorrência da utilização de apenas uma amostra para o tratamento ácido, a mesma estar fora do prazo de validade, ter sido armazenada à temperatura ambiente e/ou exposta à luz.

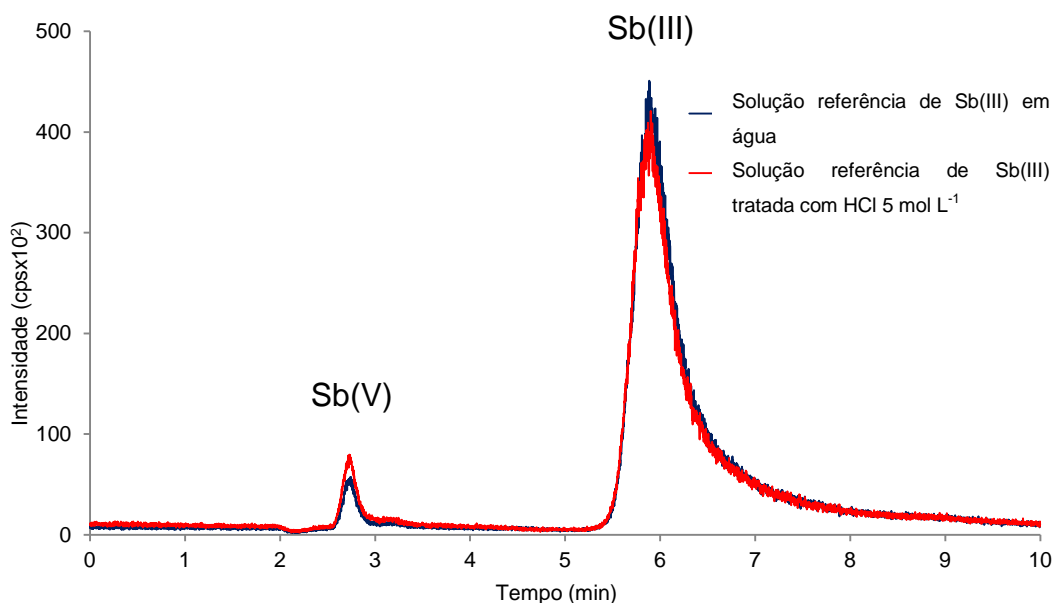
Por assim dizer, é necessário assegurar se a espécie meglumina:Sb(III) é capaz de interagir com as células do organismo da mesma forma que a espécie Sb(III), ocasionando os mesmos efeitos tóxicos no organismo.

Para a espécie Sb(V) a concentração resultou em valor máximo de  $74,49 \pm 1,89 \text{ mg mL}^{-1}$  quando da utilização do HCl  $3 \text{ mol L}^{-1}$  e quando os ácidos utilizados foram nas concentrações de 4 e  $5 \text{ mol L}^{-1}$ , houve um pequeno decréscimo.

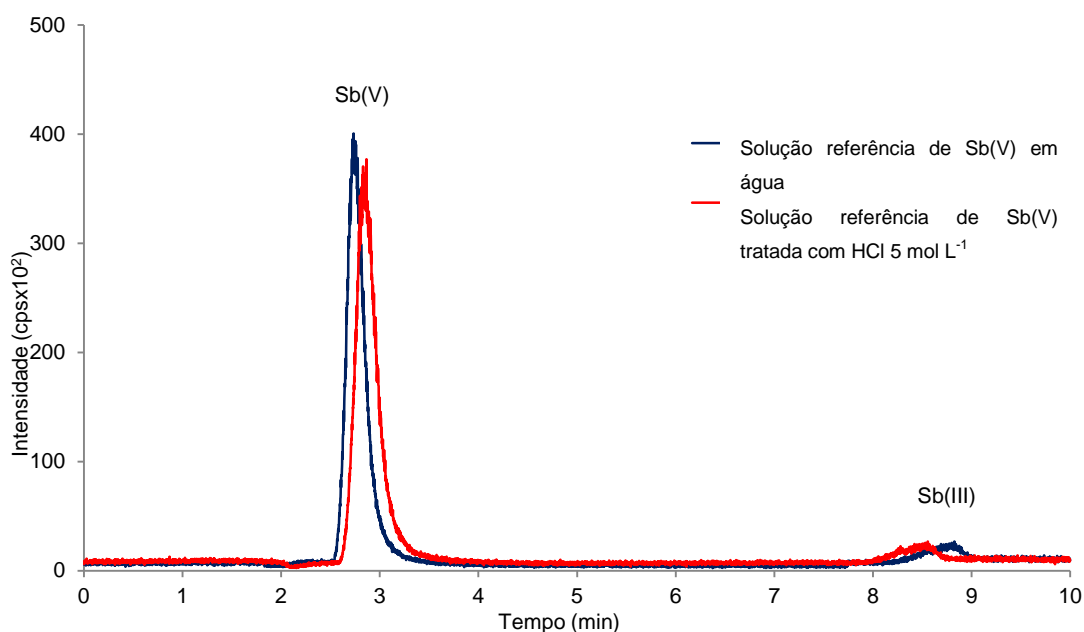
O LOD e o LOQ estimados pela curva de calibração para o sistema LC-ICP-MS foram de  $0,58 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  e  $1,93 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , para o Sb(III), nesta ordem, ao passo que para a espécie Sb(V) os valores de LOD e LOQ foram  $2,67 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  e  $8,88 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente.

Em virtude da ocorrência de quebra dos complexos, foram realizados testes para avaliar a possibilidade de acontecer a interconversão entre as espécies Sb(III) e Sb(V). Sendo assim, foram preparadas soluções de referência das espécies Sb(III) e Sb(V) em meio ácido, na concentração  $5 \text{ mol L}^{-1}$ . Oportunamente, cabe destacar que um pequeno sinal é observado para soluções de referência de Sb(III), o qual é devido à presença da espécie Sb(V) na solução de Sb(III).

Os cromatogramas obtidos podem ser visualizados nas Figuras 14 e 15.



**Figura 14.** Cromatograma obtido na separação da solução referência de Sb(III) tratada com HCl 5 mol L<sup>-1</sup>, utilizando como fase móvel HNO<sub>3</sub> em pH 6,0 por 5 min mais 10 min com EDTA 20 mmol L<sup>-1</sup> em pH 4,5, ambos na vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e o sistema LC-ICP-MS.



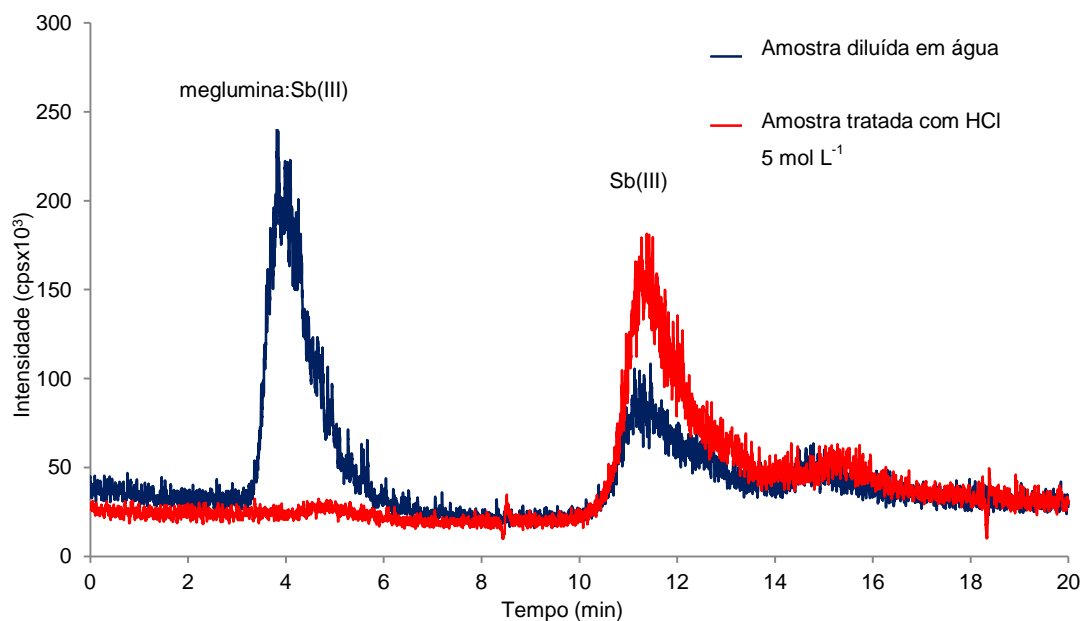
**Figura 15.** Cromatograma obtido na separação das espécies padrão de Sb(V) tratada com ácido, utilizando como fase móvel HNO<sub>3</sub>, pH 6,0 por 5 min mais 10 min com EDTA 20 mmol L<sup>-1</sup> em pH 4,5, ambos na vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e o sistema LC-ICP-MS.

Como pode ser constatado a partir dos cromatogramas das Figuras 15 e 16, não houve conversão das espécies inorgânicas Sb(III) e Sb(V) tratada com HCl. Sendo o HCl um ácido com características redutoras, seria esperado que ocorresse a

conversão da espécie Sb(V) para Sb(III), o que não se verificou. Este fato fora observado por Séby *et al.*<sup>76</sup> e Trivelin *et al.*<sup>91</sup> que fizeram uso do HCl 5 e 6 mol L<sup>-1</sup>, para tratamento de amostras de NMG e posterior determinação das espécies de Sb. Ademais, também não foi observado oxidação da espécie Sb(III), uma vez que as amostras haviam sido previamente desaeradas, o O<sub>2</sub> já havia sido removido.

### 5.3. RESULTADOS EMPREGANDO O SISTEMA LC-HG-ICP-MS

De acordo com os trabalhos encontrados na literatura,<sup>39, 41, 48, 51-54</sup> o Sb(V) não gera estibina na presença de ácido cítrico sob condições controladas de reação, como pH, concentração do redutor e tempo de reação. Sendo assim, a amostra foi analisada empregando um sistema LC-HG-ICP-MS, com e sem tratamento ácido (HCl 5 mol L<sup>-1</sup>). As condições para a geração de hidretos foram àquelas definidas por Moreira<sup>54</sup>. Resumidamente, o sistema consiste da derivatização (geração de hidretos) das espécies de Sb após a separação cromatográfica, sendo o efluente da coluna misturado inicialmente com uma solução de ácido cítrico a 20% (m/v) e posteriormente, com uma solução de NaBH<sub>4</sub> a 0,2% (m/v). Para isto, a vazão da fase móvel foi 1,0 mL min<sup>-1</sup> e as vazões do ácido cítrico e do NaBH<sub>4</sub> de 2,0 mL min<sup>-1</sup>. O comprimento do percurso reacional (entre a mistura do ácido cítrico com o efluente da coluna e entrada do NaBH<sub>4</sub>) distou 300 cm e o comprimento e o percurso da geração de hidreto foi de 50 cm. Nestas condições é observado que somente o Sb(III) gera estibina (reação apresentada na equação 1 – 2.4.1.1 Geração de Hidretos). A amostra foi analisada empregando o sistema LC-HG-ICP-MS com e sem tratamento utilizando o HCl. O cromatograma resultante pode ser visto na Figura 16.



**Figura 16.** Cromatograma obtido na separação das espécies presentes no NMG com e sem tratamento com HCl e solução referência de Sb(III), utilizando o sistema LC-HG-ICP-MS.

No cromatograma da Figura 16 pode-se observar um sinal em 4,0 min e outro em 11,3 min quando a amostra não é tratada com HCl, presente somente quando a amostra é diluída em água. Estes sinais correspondem às espécies de Sb(III) complexada e inorgânica livre, respectivamente. Salienta-se, contudo, que os sinais que foram completamente suprimidos correspondem as espécies de Sb(V). Por outro lado, quando a amostra foi tratada com HCl 5 mol L<sup>-1</sup>, somente um sinal é observado no cromatograma, ou seja, a espécie meglumina:Sb(III) foi completamente convertida para a espécie Sb(III) inorgânica livre. Estes resultados confirmam os resultados obtidos por LC-ICP-MS, bem como o postulado no trabalho de Moreira <sup>54</sup>, que observou os dois sinais referentes a Sb(III), mas quantificou somente a espécie Sb(III) inorgânica livre.

Na Tabela 8 são apresentados os resultados obtidos utilizando a técnica de LC-HG-ICP-MS com tratamento ácido (HCl 5 mol L<sup>-1</sup>).

**Tabela 8.** Resultados obtidos no NMG para Sb(III) utilizando o sistema LC-HG-ICP-MS (média e desvio padrão, mg mL<sup>-1</sup>; n=3).

Amostra	Sb(III), mg mL <sup>-1</sup>
Diluída em água	2,70 ± 0,10
Diluída em HCl 5 mol L <sup>-1</sup>	6,70 ± 0,30

Como pode ser observado, houve um aumento de aproximadamente 160% da concentração de Sb(III) após tratamento da amostra com HCl. Esse aumento é resultado da conversão do complexo meglumina:Sb(III) para o Sb(III) inorgânico livre, já que o ácido é capaz de quebrar a ligação existente entre o complexo e o Sb.

#### 5.4. RESULTADOS UTILIZANDO O SISTEMA FI-HG-ICP-MS

A técnica HG foi utilizada nas mesmas condições já descritas: solução de ácido cítrico a 20% (m/v), solução de NaBH<sub>4</sub> 0,2% (m/v), ambas com vazão de 2,0 mL min<sup>-1</sup>, comprimento do percurso reacional (entre a mistura do ácido cítrico com a amostra até a entrada do NaBH<sub>4</sub>) de 300 cm e comprimento do percurso da geração de hidreto de 50 cm. Porém, no sistema HG a amostra não passa pelo sistema cromatográfico, sendo injetada com o auxílio de um injetor manual com alça de amostragem de 50 µL e direcionada ao equipamento de ICP-MS. Este sistema foi utilizado para confirmar os resultados obtidos pelos métodos LC-ICP-MS e LC-HG-ICP-MS, que estão apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9.** Resultados obtidos na determinação de Sb(III) no NMG utilizando o sistema FI-HG-ICP-MS (média e desvio padrão, mg mL<sup>-1</sup>; n=3).

Amostra	Sb(III), mg mL <sup>-1</sup>
Diluída em água	0,27 ± 0,01
Diluída em HCl 5 mol L <sup>-1</sup>	0,12 ± 0,01
5 µg L <sup>-1</sup> Sb(III) em HCl 5 mol L <sup>-1</sup> (µg L <sup>-1</sup> )	4,88 ± 0,08

De acordo com os resultados expostos na Tabela 9, pode-se verificar que a adição de HCl ao invés de aumentar a concentração de Sb(III), diminui para a metade do valor obtido sem adição de ácido. A geração de hidreto de Sb(III) não possui interferência do HCl, nem mesmo quando o mesmo se encontra em elevadas concentrações.<sup>45</sup>



### 5.5. ENSAIO DE RECUPERAÇÃO EMPREGANDO TRATAMENTO ÁCIDO NA AMOSTRA COM A TÉCNICA LC-ICP-MS

Dada a indisponibilidade de material certificado do medicamento NMG ou ainda, material certificado com matriz semelhante ao medicamento, foram realizados testes de recuperação para verificar a ocorrência de interferência da matriz na separação cromatográfica. Para tanto, quantidades conhecidas das espécies ( $5 \mu\text{g L}^{-1}$  de Sb(III) e  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  Sb(V)) foram adicionados, a partir da solução referência das espécies nas amostras que haviam sido tratadas com HCl  $5 \text{ mol L}^{-1}$ . A diluição empregada para este ensaio foi de 4.000x vezes. Verificou-se que os valores para as recuperações de Sb(III) foram superiores a 98%, utilizando os métodos LC-ICP-MS e LC-HG-ICP-MS. Já para a espécie Sb(V) a recuperação obtida foi superior a 89% utilizando o método proposto por LC-ICP-MS. Estes fatos mostram a ausência de interferências nos métodos propostos.

### 5.6. DETERMINAÇÃO DE Sb TOTAL EMPREGANDO A TÉCNICA DE ICP OES

Os resultados obtidos de Sb total por ICP OES foram comparados com o somatório das concentrações das espécies obtidas por LC-ICP-MS, a fim de verificar sua concordância. Os resultados estão descritos na Tabela 9.

**Tabela 10.** Resultados obtidos por LC-ICP-MS e ICP OES para Sb total na amostra com e sem tratamento com ácido HCl  $5 \text{ mol L}^{-1}$  (média e desvio padrão,  $\text{mg mL}^{-1}$ ;  $n=3$ ).

Amostra	Sb total ( $\text{mg mL}^{-1}$ )	
	LC-ICP-MS	ICP OES
Diluída em água	$67,28 \pm 1,88$	$81,88 \pm 1,02$
Tratamento com HCl $5 \text{ mol L}^{-1}$	$78,90 \pm 2,38$	$81,11 \pm 1,00$

Pelos resultados apresentados na Tabela 10 é possível verificar que a concentração obtida para Sb total utilizando LC-ICP-MS em meio ácido, e Sb total por ICP OES não difere estatisticamente (teste t, nível de confiança 95%). No entanto, o resultado obtido para Sb total pela soma das espécies determinadas por LC-ICP-MS difere das demais. Isto ocorre, pois esta concentração foi obtida pelo

somatório das espécies de Sb, é provável que este erro esteja na aproximação das concentrações das espécies meglumina:Sb.

Os resultados obtidos no presente trabalho estão demonstrados na Tabela 11.

**Tabela 11.** Resultados obtidos para Sb(III) e Sb(V) utilizando os sistemas LC-HG-ICP-MS e LC-ICP-MS (média e desvio padrão, mg mL<sup>-1</sup>; n=3).

Amostra	LC-ICP-MS (mg mL <sup>-1</sup> )		LC-HG-ICP-MS (mg mL <sup>-1</sup> )
	Sb(III)	Sb(V)	Sb(III)
Diluída em água	2,59 ± 0,50	29,76 ± 1,37	2,70 ± 0,10
Diluída em HCl 5 mol L <sup>-1</sup>	7,47 ± 0,65	71,43 ± 1,40	6,70 ± 0,30

Tomando-se os resultados apontados na Tabela 11, pode-se concluir, após análise de teste estatístico (teste t, nível de confiança 95%), que os valores das concentrações não possuem diferença significativa. Os métodos LC-ICP-MS e LC-HG-ICP-MS foram seletivos e sensíveis para realizar a análise de especiação de Sb(III) e Sb(V) no NMG com tratamento ácido na amostra, obtendo-se recuperação na faixa de 89 a 112% para as espécies inorgânicas livres. Ambos os métodos, utilizando tratamento ácido (HCl 5 mol L<sup>-1</sup>), podem ser utilizados para realizar análise de especiação de Sb inorgânico.

Os resultados obtidos para Sb(III) após o tratamento ácido foram superiores ao limite máximo de 4,0 mg mL<sup>-1</sup> permitido pela Farmacopeia Brasileira.<sup>6</sup> Cabe salientar que é importante verificar a equivalência da toxicidade das espécies, Sb(III) e Sb(III):meglumina com ensaios de biodisponibilidade. Nesse sentido, é necessário assegurar que a espécie Sb(III):meglumina seja capaz de interagir com as células do organismo da mesma forma que a espécie Sb(III), ocasionando, assim, efeitos tóxicos no organismo. Ainda, são necessários estudos para avaliar se o efeito terapêutico do medicamento é causado pela espécie Sb(III) ou pelo complexo Sb(III):meglumina ou pelas espécies de Sb(V).

## CONCLUSÕES

---

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho e, de acordo com os objetivos propostos, pode-se concluir que o NMG é composto de espécies inorgânicas livres de Sb e de espécies complexadas de meglumina:Sb. As espécies complexadas não foram separadas completamente com as condições cromatográficas analisadas, provavelmente pelo fato de serem neutras ou com carga catiônica.

A condição que proporcionou a melhor separação cromatográfica das espécies presentes no medicamento foi com fase móvel  $\text{HNO}_3$  15  $\text{mmol L}^{-1}$  em pH 6,0 por 5 min, seguido de EDTA 20  $\text{mmol L}^{-1}$  em pH 4,5 por 10 min, ambos na vazão 1,0  $\text{mL min}^{-1}$ . Esta foi a condição que proporcionou a melhor separação entre os complexos e as espécies inorgânicas livres de Sb.

Utilizando o tratamento da amostra com diferentes concentrações de HCl foi possível converter as espécies complexadas em espécies inorgânicas livres. A concentração de Sb(III) alcançou valor máximo de  $7,47 \pm 0,65 \text{ mg mL}^{-1}$ , quando a amostra foi tratada com HCl 5  $\text{mol L}^{-1}$ , sendo que a concentração máxima para a espécie Sb(V) foi com valor de  $74,49 \pm 1,89 \text{ mg mL}^{-1}$ , em uso de HCl 3  $\text{mol L}^{-1}$ . No tratamento com HCl 5  $\text{mol L}^{-1}$ , a concentração para as espécies Sb(V) e Sb(III) foram  $71,43 \pm 1,40 \text{ mg mL}^{-1}$  e  $7,47 \pm 0,65 \text{ mg mL}^{-1}$ , respectivamente. No sistema LC-ICP-MS o LOD e o LOQ estimados pela curva de calibração para Sb(III) foram de  $0,58 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  e  $1,93 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente, enquanto que para a espécie Sb(V) o LOD e o LOQ resultaram  $2,67 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  e  $8,88 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ .

O resultado obtido para Sb(III) com o método LC-ICP-MS foi concordante (teste t, nível de confiança 95%) ao resultado obtido para Sb(III), utilizando o método LC-HG-ICP-MS ( $6,70 \pm 0,30 \text{ mg mL}^{-1}$ ), também, após tratamento da amostra com ácido. A soma das espécies, determinada pelo método proposto ( $78,90 \pm 2,38 \text{ mg mL}^{-1}$ ), também foi concordante (teste t, nível de confiança 95%) com o resultado obtido para Sb total, utilizando a técnica de ICP OES ( $81,11 \pm 1,00 \text{ mg mL}^{-1}$ ).

Utilizando-se o sistema FI-HG-ICP-MS com tratamento ácido, os resultados obtidos para a espécie Sb(III) foram diferentes dos resultados obtidos pelos outros

métodos. Isto provavelmente por existirem outros fatores determinantes na geração de hidretos e que não foram estudados no presente trabalho.

Em suma, a partir dos resultados aqui expostos, pode-se concluir que ainda são necessários estudos que permitam elucidar a estrutura presente no NMG, principalmente, utilizando técnicas mais sensíveis e seletivas como a ESI-MS.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. Rath, S., Trivelin, A., Imbrunito, T. R., Tomazela, D. M., Jesús, M. N., Marzal, P. C., Junior, H. F. A., Tempone, A. G., Antimoniais empregados no tratamento da Leishmaniose: estado da arte, *Quím. Nova*, 26, 2003, 550-555.
2. World Health Organization, disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>, acessado em 25 de agosto de 2013.
3. Ministério da Saúde, *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*, 2ª ed.; Brasília, 2007; pp. 181.
4. Frézard, F., Martins, P. S., Barbosa, M. C. M., Pimenta, A. M. C., Ferreira, W. A., Melo, J. E., Mangrum, J. B., Demicheli, C., New insights into the chemical structure and composition of the pentavalent antimonial drugs, meglumine antimonite and sodium stibogluconate, *J. Inorg. Biochem.*, 102, 2008, 656-665.
5. Dzamitika, S. A., Falcão C. A. B., 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.
6. *Farmacopeia Brasileira*, volume 2- Monografias, 5ª ed.; Fiocruz: Brasília, Brasil, 2010.
7. Singh, S., Sivakumar, R., Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis, *J. Infect. Chemother.*, 10, 2004, 307-315.
8. Gebel, T., Arsenic and antimony: comparative approach on mechanistic toxicology, *Chem. Biol. Interact.*, 107, 1997, 131-144.
9. Almeida, V. G. K., Lima, M. F., Cassela, 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.
10. 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.
11. Nordberg, G. F., Fowler, B. A., Nordberg, M., Fridberg, L., *Handbook on the*

- Toxicological of Metals*; Elsevier: Copenhagen, 2007; Vol. 2, pp 353-367.
12. Filella, M., Belzile, N., Chen, Y.-W., Antimony in the environment: a review focused on natural waters I. Occurrence, *Earth Sci.*, 57, 2002, 125-176.
  13. Anderson, C. G., The metallurgy of antimony, *Chem. Erde-Geochem.*, 72, 2012, 3-8.
  14. Gwaltney-Brant, S., Heavy Metals. In *Handbook of Toxicological Pathology*; Academic Press: Illinois, 2001; Vol. 1, pp 701-739.
  15. Housecroft, C. E., Sharpe, A. G., *Inorganic Chemistry*, 2<sup>nd</sup> ed.; Pearson Education Limited: England, 2005; pp 393-400.
  16. Krachler, M., Emons, H., Zheng, J., Speciation of antimony for the 21<sup>st</sup> century: promises and pitfalls, *TRAC-Trend. Anal. Chem.*, 20, 2001, 79-90.
  17. Léonard, A., Gerber, G. B., Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of antimony compounds, *Mutat. Res.*, 366, 1996, 1-8.
  18. Hansen, H. R., Pergantis, S. A., Mass spectrometric identification and characterization of antimony complexes with ribose-containing biomolecules and an RNA oligomer, *Anal. Bioanal. Chem.*, 385, 2006, 821-833.
  19. Cornelis, R., Caruso, J. A., Crews, H., Ackley, K. L., Heunemann, K., *Handbook of Elemental Speciation II- Species in the Environment, Food, Medicine and Occupational Health*; John Wiley & Sons Ltd.: England, 2003; Vol. II, 768 p..
  20. Miekeley, N., Mortari, S. R., Schubach, A. O., Monitoring of total antimony and its species by ICP-MS and on-line ion chromatography in biological samples from patients treated for leishmaniasis, *Anal. Bioanal. Chem.*, 372, 2002, 495-502.
  21. Freitas-Junior, L. H., Chartelain, E., Kim, H. A., Siqueira-Neto, J. L., Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it?, *Int. J. Parasitol.*, 2, 2012, 11-19.
  22. Lima, E. B., Porto, C., Motta, J. O. C., Sampaio, R. N. R., Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana, *An. Bras. Dermatol.*, 82, 2007, 111-124.
  23. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Inovação de Pesquisa em Doenças Negligenciadas, disponível em: <http://www.cdts.fiocruz.br/inct-idn/>, acessado em 30 de agosto de 2013.
  24. Desjeux, P., Piot, B., O'Neil, K., Meert, J. P., Co-infections of leishmania/HIV in

- south Europe, *Med. Trop.*, 61, 2001, 187-193.
25. Fundação Oswaldo Cruz, As leishmanioses, disponível em: <http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/>, acessado em 30 de agosto de 2013.
26. The Official Site of the Nobel Prize, disponível em: <http://www.nobelprize.org/nomination/medicine/nomination.php?action=show&showid=218>, acessado em 30 de agosto de 2013.
27. Frézar, D., Demicheli, C., Ribeiro, R. R., Pentavalent Antimonials: New perspective for old drugs, *Molecules*, 14, 2009, 2317-2336.
28. Jha, S. N., Singh, N. K., Jha, T. K., Changing response to diamine compounds in cases of kala-azar unresponsive to antimonial, *J. Assoc. Physicians India*, 39, 1991, 314-316.
29. Alvar, J. C. S. L., Kaye, P., Khameipour, A., Sundar, S., Reed, S. G., Case study for a vaccine against leishmaniasis, *Vaccine*, 315, 2013, B244-B249.
30. Roberts, W. L., McMurray, W. J., Rainey, P. M., Characterization of the Antimonial Antileishmanial Agent Meglumine Antimonate (Glucantime), *Antimicrob. Agents Ch.*, 42, 1998, 1076-1082.
31. Haldar, A. K., Sen, P., Roy, S., Use of antimony in the treatment of Leishmaniasis: Current status and future directions, *Mol. Biol. Int.*, 42, 2011, 1-23.
32. Demicheli, C., Frézar, F., Lecouvey, M., Garnier-Suillerot, A., Antimony(V) complex formation with adenine nucleosides in aqueous solution, *Biochim. Biophys. Acta*, 1570, 2002, 192-198.
33. 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.
34. International Union of Pure and Applied Chemistry - IUPAC, disponível em: <http://www.iupac.org/>, acessado em 12 de janeiro de 2014.
35. Templeton, D. M., Ariese, F., Cornelis, R., Danielsson, L., Muntau, H., Van Leeuwen, H. P., Łobinski, R., Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements definitions, structural aspects and methodical approaches, *Pure Appl. Chem.*, 72, 2000, 1453-1470.

36. Cornelis, R., Kimpe, J., Zheng, X., Trace elements in clinical samples revisited speciation is knocking the door. Sample preparation, separation of the species and measurements methods, *Spectrochim. Acta B*, 53, 1998, 187-196.
37. Caruso, J. A., Montes-Bayon, M., Elemental speciation studies- new directions for trace metal analysis. *Ecotox. Environ. Safe.*, 56, 2003, 148-163.
38. Lindemann, T., Prange, A., Dannecker, W., Neidhart, B., Stability studies of arsenic, selenium, antimony and tellurium species in water, urine, fish and soil extracts using HPLC/ICP-MS. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 368, 2000, 214-220.
39. Chen, Y.-W., Belzile N., HPLC-AFS for the speciation of the hydride and chemical vapour-forming elements As, Se, Sb and Hg: A critical review, *Anal. Chim. Acta*, 671, 2010, 9–26.
40. Michalke, B., Schrame, P., Antimony speciation in environmental samples by interfacing capillary electrophoresis on-line to an inductively coupled plasma mass spectrometer, *J. Chromatogr. A*, 834, 1999, 341–348.
41. Flores, E. M., Paula, F. R., Silva, F. E. B., Moraes, D. P., Paniz, J. N. G., Santos, E. P., Dressler, V. L., Bittencourt, C. F., Selective determination of Sb(III) in drugs by flow injection hydride generation AAS, *Atom. Spectrosc*, 24, 2003, 15-21.
42. D'Ulivo, A., Mester, Z. Meija, J., Sturgeon, R. E., Mechanism of generation of volatile hydrides of trace elements by aqueous tetrahydroborate(III). Mass spectrometric studies on reaction products and intermediates, *Anal. Chem.*, 79, 2007, 3008-3015.
43. D'Ulivo, A., Mester, Z., Sturgeon, R. E., The mechanism of formation of volatile hydrides by tetrahydroborate(III) derivatization: A mass spectrometric study performed with deuterium labeled reagents., *Spectrochim. Acta B*, 60, 2005, 423-438.
44. D'Ulivo, A., Dědina, J., Mester, Z., Sturgeon, R., Wang, Q., Welz, B., Mechanisms of chemical generation of volatile hydrides for trace element determination., *Pure Appl. Chem.*, 83, 2011, 1283-1340.
45. Dědina, J., Tsalev, D., *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England, 1995, 526 p..
46. Dressler, V. L., Antes, F. G., Moreira, C. M., Pozebon, D., Duarte, F. A., As, Hg,



- I, Sb, Se and Sn speciation in body fluids and biological tissues using hyphenated-ICP-MS techniques: A review., *Int. J. Mass Spectrom.*, 307, 2011, 149-162.
47. Smichovski, 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.
48. Potin-Gautier, M., Pannier, F., Quiroz, W., 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.
49. 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.
50. Petit de Peña, Y., Vielma, O., Burguera, J. L., 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 in samples of injectable drugs used for leishmaniasis treatment., *Talanta*, 55, 2001, 743-754.
51. Flores, E. 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.
52. Hansen, H. R., Pergantis, S. A., Identification of Sb(V) complexes in biological and food matrixes and their stibine formation efficiency during hydride generation with ICPMS detection, *Anal. Chem.*, 79, 2007, 5304-5311.
53. 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.
54. Moreira, C. M., Determinação de espécies de antimônio em antimoniato de meglumina, *Dissertação de mestrado - Universidade Federal de Santa Maria*, 2008, 160 p..

55. Mortari, S. R. . Determinação da concentração total de Sb e de suas espécies químicas em amostras clínicas de pacientes com Leishmanioses, *Tese de Doutorado, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro*, 2001, 143p..
56. Gregori, I., Quiroz, W., Pinochet, H., Pannier, F., Potin-Gautier, M., Speciation analysis of antimony in marine biota by HPLC-(UV)-HG-AFS: Extraction procedures and stability of antimony species, *Talanta*, 73, 2007, 458– 465.
57. Eith, C., Kolb, M., Rumi, A., Seubert, A., *Práticas em Cromatografia de íons*, 2ª edição, Metrohm: Herisau, Suíça, 2006, 144 p..
58. Ulrich, N., Speciation of antimony(III), antimony(V) and trimethylstiboxide by ion chromatography with inductively coupled plasma atomic emission spectrometry and mass spectrometry detection., *Anal. Chim. Acta*, 359, 1998, 245-253.
59. Miravet, R., Hernández-Nataren, E., Sahuquillo, A., Rubio, R. L.-S. J., Speciation of antimony in environmental matrices by coupled techniques. *TRAC-Trend. Anal. Chem.*, 29, 2010, 28-39.
60. 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.
61. Cornelis, R., Caruso, J., Crews, H., Heumann, K., *Handbook of Elemental Speciation I- Techniques and Methodology*, John Wiley & Sons Ltd: England, 2003, Vol. I., 666 p..
62. Krachler, M., Emons, H., Urinary antimony speciation by HPLC-ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.*, 16, 2001, 20-25.
63. Łukaszczyk, L., Zyrnicki, W., Speciation analysis of Sb(III) and Sb(V) in antileishmaniotic drug using Dowex 1×4 resin from hydrochloric acid solution, *J. Pharmaceut. Biomed.*, 52, 2010, 747–751.
64. Zheng, J., Ijima, 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.
65. Meyers, R. A., *Encyclopedia of Analytical Chemistry*; John Wiley & Sons: United States of America, 2000, Vol. 15, 14344 p..
66. 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. Pharmaceut. Biomed.*, 40, 2006, 227-234.
67. González, M. J. G., Renedo, O. D., Martínez, M. J. A., Speciation of antimony by adsorptive stripping voltametry using pyrogallol, *Talanta*, 71, 2007, 691-698.
68. Doretto, K. M., Síntese e Caracterização do antimoniato de meglumina usado no tratamento de Leishmaniose e desenvolvimento de métodos para especificação de antimônio., *Dissertação de Mestrado*, 2008, 145p..
69. 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.
70. Nash, M. J., Maskall, J. E., Hil, S. J., Methodologies for determination of antimony in terrestrial environmental samples, *J. Environ. Monit.*, 2, 2000, 97-109.
71. Loska, K., Wiechula, D., Korus, I., Antimony Concentration in Farming Soil of Southern Poland, *Environ. Contam. Toxicol.*, 72, 2004, 858-865.
72. Wilson, S. C., Lockwood, P. V., Ashley, P. M., Tighe, M., The chemistry and behaviour of antimony in the soil environment with comparisons to arsenic: A critical review, *Environ. Pollut.*, 158, 2010, 119-1181.
73. Amereih, S., Meisel, T., Kahr, E., Wegscheider, W., Speciation analysis of inorganic antimony in soil using HPLC-ID-ICP-MS, *Anal. Bioanal. Chem.*, 383, 2005, 1052-1059.
74. Sánchez-Martínez, M., Pérez-Corona, T., Cámara, C., Madrid, Y., Migration of antimony from PET containers into regulated EU food simulants, *Food Chem.*, 141, 2013, 816-822.
75. 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, 110p..
76. Séby, F., Gleyzes, C., Plau, B., Donard, O. F. X., Speciation of antimony in injectable drugs used for leishmaniasis treatment (Glucantime<sup>®</sup>) by HPLC-ICP-MS and DPP, *Anal. Bioanal. Chem.*, 404, 2012, 2939-2948.
77. Santos, V. S., Santos, W. J. R., Kubota, L. T., Tarley, C. R. T., Speciation of Sb(III) and Sb(V) in meglumine antimoniate pharmaceutical formulations by PSA

- using carbon nanotube electrode, *J. Pharmaceut. Biomed.*, 50, 2009, 151-157.
78. *ELAN Version 3.0, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer – Software Guide*, PerkinElmer SCIEX: Thornhill, Canada, 2003.
79. Nesterenko, P. N., Jones, P., Paull, B., *High Performance Chelation Ion*; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2011, 317p..
80. Friederich, K., Vieira, F. A., Porozzi, R., Marchevsky, R., Miekeley, R., Grinaldi, G., Paumgasrten, F. J. R., Disposition of antimony in rhesus monkeys infected with *Leishmania braziliensis* and treated with meglumine antimoniate, *J. Toxicol. Env. Heal. A.*, 63, 2012, 63-75.
81. Ulrich, N., Study of ion chromatographic behavior of inorganic and organic antimony species by using inductively coupled plasma mass spectrometric (ICP-MS) detection, *Fresen. J. Anal. Chem.*, 360, 1998, 797-800.
82. Lintschinger, J., Koch, I., Feldmann, J., Cullen, W. R., Determination of antimony species with high-performance liquid chromatography using element specific detection, *Fresen. J. Anal. Chem.*, 359, 1997, 484-491.
83. 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.
84. Jarvis, K. E., Gray, A. L., Houk, R. S., *Handbook of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*; Blackie: New York, USA, 1992, 380 p..
85. Vieira, F. A., Estudos sobre o comportamento do antimoniato de meglumina no corpo humano e em macacos Rhesus., *Tese de doutorado, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro*, 2008, 193p..
86. Rabin, S., Stillian, J., Practical aspects on the use of organic solvents in ion chromatography, *J. Chromatogr. A*, 671, 1994, 63-71.
87. Ge, Z., Wei, C., Simultaneous Analysis of Sb(III), Sb(V) and TMSb by High Performance Liquid Chromatography- Inductively Coupled Plasma- Mass Spectrometry Detection: Application to Antimony Speciation in Soil Samples, *J. Chromatogr. A*, 51, 2013, 391-399.
88. Zoorob, G. K., McKiernan, J. W., Caruso, J. A., ICP-MS for Elemental Speciation Studies, *Mikrochim. Acta*, 128, 1998, 145-168.

- 
89. Meermann, . S. M., Hyphenated techniques as tools for speciation analysis of metal-based pharmaceuticals: developments and applications, *Anal. Bioanal. Chem.*, 403, 2012, 1501-1522.
- 90 Grindlay, G., Mora, J., Loos-Vollebregt, Vanhaecke, F., A systematic study on the influence of carbon on the behavior of hard-to-ionize elements in inductively coupled plasma – mass spectrometry, *Spectrochim. Acta B*, 86, 2013, 42-49.
91. Trivelin, L. A., Rohwedder, J. J. R., Rath, S., Determination of pentavalent antimony in antileishmaniotic drugs using an automated system for liquid-liquid extraction with on-line detection, *Talanta*, 68, 2006, 1536-1543.