



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



1150059321

IQ  
T/UNICAMP T739d

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**DETERMINAÇÃO DE Sb (V) EM MEDICAMENTOS**  
**ANTILEISHMANIÓTICOS POR EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO EM**  
**SISTEMA AUTOMATIZADO DE**  
**ANÁLISE EM FLUXO**

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

**Luciano Augusto Trivelin**

***Orientadora: Prof. Dra. Susanne Rath***

***Co-orientador: Prof. Dr. Jarbas José Rodrigues Rohwedder***

**CAMPINAS – SP**

**2003**

UNIDADE	IQ		
Nº CHAMADA	T739d		
V	EX		
TOMBO BC/	59321		
PROC.	16-117-04		
C	<input type="checkbox"/>	D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00		
DATA	22/10/04		
Nº CPD			

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA  
UNICAMP

CM00198530-0

BIBID 318503

T739d

Trivelin, Luciano Augusto.

Determinação de Sb (V) em medicamentos antileishmanióticos por extração líquido-líquido em sistema automatizado de análise em fluxo/ Luciano Augusto Trivelin. – Campinas, SP: [s.n], 2003.

Orientador: Susanne Rath.

Co-orientador: Jarbas José Rohwedder

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. \*Antimônio (V). 2. \*Rodamina B. 3. \*Par iônico.  
4. Leishmaniose. I. Rath, Susanne. 2. Rohwedder, Jarbas José. II. Universidade Estadual de Campinas.  
III. Título.

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho em especial á minha mãe que sempre acreditou e me deu todo apoio para alcançar os objetivos propostos e aos demais familiares de Campinas e Piracicaba.

Aos amigos de passagem e aos amigos que ficam para sempre em nossas vidas.

## AGRADECIMENTOS

- ❖ Em primeiro lugar a Deus, pela presença sempre constante nos finais de semanas passados na Unicamp trabalhando no desenvolvimento do projeto.
- ❖ A minha família que me apoiou de todas as maneiras e concepções em todas as etapas da minha vida à sua maneira.
- ❖ A Professora Dra. Susanne Rath pela oportunidade, apoio incondicional, confiança e paciência nas discussões e finalização do trabalho. Pela presença firme durante toda as etapas e mudanças do projeto, principalmente na escolha de deixar minha bolsa de mestrado da FAPESP e partir para o desafio do mercado industrial no meio do programa de Mestrado.
- ❖ Ao Professor Dr. Jarbas José Rodrigues Rohwedder pela co-orientação, oportunidade e confiança depositados no desenvolvimento da parte experimental e na utilização dos recursos do Grupo de Instrumentação e Automação (GIA – Unicamp), bem como todo o ensinamento proporcionado em uma área completamente nova.
- ❖ Aos Professor Drs. Orlando Fatibello e Célio Pasquini pelas valiosas sugestões e participação como membros da banca examinadora da defesa de Dissertação de Mestrado.
- ❖ Em especial ao Professor Aleixo (*in memoriam*) pelos agradáveis momentos de convivência e bate-papo e presença constante no laboratório.

- ❖ Aos amigos do laboratório Kleber, Regiane Gregório, Raquel, Marcelo, Guida, Maria do Socorro e Paula por terem mantido um ambiente agradável de trabalho e que apesar do pouco convívio, ajudaram no que foi necessário durante o desenvolvimento do trabalho e também todos os amigos que demonstraram apoio e confiança, obrigado.
  
- ❖ Ao pessoal do laboratório de Instrumentação e Automação principalmente Emerson Vidal e Maria Celeste pela ajuda e discussão no desenvolvimento da parte experimental do trabalho.
  
- ❖ Aos funcionários da Unicamp, Srs. Gentil e Ademir pela confecção das vidrarias, Sr. Marcos pela confecção das diversas peças requeridas para montagem do sistema de extração, funcionários da secretaria de Pós-graduação e professores.
  
- ❖ Ao jornalista e amigo Duílio Fabbri Júnior, pelo apoio, presença constante, conselhos nos momentos de dificuldade e desânimo e dicas de português; Márcia Egídio e todos aqueles que de forma direta ou indireta acreditaram e contribuíram e estiveram presentes durante toda essa fase.
  
- ❖ A FAPESP pelo auxílio concedido e pelo período de 1 ano de bolsa de Mestrado.
  
- ❖ À vida

**CURRICULUM VITAE**

Rua Sarapuí, 34 - Parque da Figueira I  
Campinas - São Paulo - CEP: 13040-280  
Fone Residencial: 19 3238-9195 / Celular: 19 91254261

Brasileiro  
Solteiro  
29 anos

**FORMAÇÃO ACADÊMICA****Mestrado em Química**

Área de Concentração: Química Analítica

Trabalho: ***“Determinação de Sb (V) em Medicamentos Antileishmanióticos por Extração Líquido-Líquido em Sistema Automatizado de Análise em Fluxo”***

Universidade de Campinas – Unicamp - Concluído em 2003

**Bacharelado em Química com Atribuições Tecnológicas e Licenciatura em Química** - Universidade Federal de São Carlos – UFSCar - Concluído em 1998

**Técnico em Bioquímica**

Escola Técnica Estadual - Conselheiro Antônio Prado – ETECAP  
Concluído em 1993

**EXPERIÊNCIA ACADÊMICA****Iniciação Científica**

Trabalho: ***“Obtenção de Polímeros Condutores com Massa Molar e Condutividade Controlada”*** - Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica - LIEC – UFSCar - Período: 02/96 à 02/98

**PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSO / ARTIGOS**

RATH, S., TRIVELIN, L. A., JESÚS, M. N., TOMAZELA, D., CALVO, P. M.,  
TEMPONE, A., ANDRADE JUNIOR, H. F.

***“Antimoniais empregados na medicina: estado da arte”.***

Química Nova, Volume 26, nº 4, p. 550 - 550, 2003.

KEPPLER, A. F., IMBRUNITO, T. R., TRIVELIN, L. A., JESÚS, M. N., BARONE, J. S., BUENO, M. I. M. S., TEMPONE, A., ANDRADE JUNIOR, H. F., RATH, S.  
***“Antileishmanial drugs: speciation of antimony and identification of toxic contaminants”***

Symposium on Medicinal Chemistry - Caxambu, 2001.

**IV CIC - UFSCar - Congresso de Iniciação Científica**

Universidade Federal de São Carlos, 07 à 09 de outubro de 1996

***“Síntese e caracterização de Polianilinas Obtidas a Diferentes Razões Molares monômero/oxidante”***

**EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL - INDÚSTRIA****Unilever Brasil Ltda****Função:** Coordenador de Desenvolvimento de Produto**Período:** outubro/01 à atual**Prodome Química e Farmacêutica****Função:** Analista Químico Júnior - Controle de Qualidade**Período:** janeiro/99 a setembro/00**Rhodia Brasil Ltda.****Função:** Estagiário no Departamento de Controle de Qualidade**Período:** janeiro/98 a outubro/98**Mogiana Alimentos S.A.****Função:** Estagiário em Análise Química – Controle de Qualidade**Período:** novembro/93 a março/94**EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL - ENSINO MÉDIO****Escolas Estaduais na cidade de Campinas**

- EEPSPG Prof. Milton de Tolosa no ano de 1999
- EEPSPG Deputado Jamil Gadia no ano de 2000
- EEPSPG Teresina da Fonseca Pares no ano de 2001

**Função:** Professor de Química no Ensino Médio**ATIVIDADES EXTRA-CURRICULARES****• I ESCOLA DE INVERNO EM FÍSICO-QUÍMICA E QUÍMICA ANALÍTICA****Curso:** Propriedades de Polímeros Condutores**Curso:** Tintas e Pinturas Anticorrosivas**Período:** 22/07 à 02/08/96 - (15 horas/aula cada curso)**• II ESCOLA DE INVERNO EM FÍSICO-QUÍMICA E QUÍMICA ANALÍTICA****Curso:** Galvanoplastia**Curso:** Instrumentação em Química Analítica**Período:** 25/07 à 03/08/97 - (15 horas/aula cada curso)**CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO**

Participação no curso de especialização: ***“Melhoria do ensino de 2º grau na área de Ciências: Comprometimento com o desafio da Educação. Um projeto para a Química”***, na Universidade Federal de São Carlos.

**1º módulo:** Período de 15 à 25/07/97 - Total de 80 horas**2º módulo:** Período de 01/08/97 à 15/12/97 - Total de 80 horas

**RESUMO: DETERMINAÇÃO DE Sb (V) EM MEDICAMENTOS  
ANTILEISHMANIÓTICOS POR EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO EM SISTEMA  
AUTOMATIZADO DE ANÁLISE EM FLUXO**

Neste trabalho é proposto um método para determinação seletiva de Sb (V) em amostras de medicamentos antileishmanióticos, baseado na extração de um par iônico formado entre o ânion hexacloroantimoniato e o cátion rodamina B em sistema automatizado de extração líquido-líquido por análise em fluxo (ELL-AF). A formação do par iônico foi conduzida em meio de ácido clorídrico e como solvente extrator foi empregado o tolueno. O processo de extração foi otimizado e os seguintes parâmetros experimentais foram estabelecidos: volume da câmara de extração de 5 mL, ácido clorídrico 6 mol L<sup>-1</sup>, volume da alça de amostragem do analito de 150 µL, volume da alça de amostragem da rodamina B de 900 µL, tempo de agitação de 100 s, tempo de separação de fases de 80 s e volume de solvente extrator de 1 mL.

Para a análise de amostras de N-antimoniato de meglumina, o emprego de energia ultra-som foi requerido para liberar o antimônio do complexo organo-estibiado para posterior formação do par iônico.

Os parâmetros avaliados e os resultados obtidos para a validação do método compreenderem: faixa linear (7,0x10<sup>-5</sup> a 7,2x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> Sb (V)), linearidade (0,9989), sensibilidade (1,61x10<sup>6</sup> ± 2 u.a. L mol<sup>-1</sup>, para P<0,05), repetibilidade (3,5 %, para uma concentração de Sb (V) de 4,1x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> (n= 5)), seletividade (interferente As (V)), limite de detecção (2,9x10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> de Sb (V)) e limite de determinação (9,6x10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> de Sb (V)). A exatidão do método foi avaliada mediante comparação de resultados obtidos na análise de medicamentos pelo método ELL-AF com os obtidos por Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES) e Polarografia de Pulso Diferencial para Sb total e Sb (III), respectivamente.

O método proposto apresentou uma frequência analítica de 8 determinações h<sup>-1</sup>, eficiência de extração de 50,5 % e baixo consumo de reagentes, podendo ser aplicado para a determinação de Sb (V) no Controle de Qualidade de medicamentos antileishmanióticos.



**ABSTRACT****LIQUID-LIQUID EXTRACTION FLOW ANALYSIS SPECTROFOTOMETRIC  
DETERMINATION OF ANTIMONY Sb (V) IN ANTILHEISHMANIOTIC DRUGS  
USING AUTOMATED SYSTEM**

In this work a selective method for the Sb (V) determination in antileishmaniotics drugs is proposed, based on the extraction of an ion pair formed between hexachloroantimoniate anion and the rhodamine B cation in an automated liquid-liquid extraction flow analysis system (LLE-FA). The ion-pair was formed in hydrochloride acid and as solvent toluene was employed. The extraction process was optimized and the following experimental parameters were established: volume of the extraction vessel 5 mL, 6 mol L<sup>-1</sup> hydrochloride acid, sample loop of 150 µL, 900 µL of rhodamine B, 100 s of stirring time, 80 s for the phase separation and 1 mL of toluene as extractor solvent.

For the analyses of Sb (V) in N-meglumine antimoniate, the ultra-sound energy was required to liberate the antimony from the organostibium complex for the further ion pair formation.

The evaluated parameters and results for the validation of the proposed method comprised: linear range (7.0x10<sup>-5</sup> a 7.2x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> Sb (V), linearity (0.9989), sensitivity (1.61x10<sup>6</sup> ± 2 u.a. L mol<sup>-1</sup>, P<0.05), repeatability (3.5 %, for 4.1x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> Sb (V) (n= 5)), selectivity (As (V) interferes), limit of detection (2.9x10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> of Sb (V)) and limit of determination (9,6x10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> de Sb (V)). The accuracy of the method was evaluated through comparison of results obtained by the analyses of drugs by the proposed LLE-FA method with those obtained by inductive coupled plasma optic emission spectrometry (ICP-OES) and differential pulse polarography for total antimony and Sb (III), respectively.

The proposed method presented an analytical frequency of 8-analysis h<sup>-1</sup>, an extraction efficiency of 50.5 % and low organic reagents consumption. The automated LLE-FA is suitable for the Sb (V) determination in the quality control of antileishmaniotics drugs.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
LISTADE SIGLAS, ABREVIATURAS OU SÍMBOLOS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
1 – INTRODUÇÃO.....	1
2 – OBJETIVOS.....	4
3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
3.1 – Leishmaniose.....	7
3.2 – Vetores.....	8
3.3 – Áreas endêmicas.....	9
3.4 – Diagnóstico da doença.....	11
3.5 –Fármacos empregados no tratamento da leishmaniose.....	11
3.6 – Antimoniato de N-metilglucamina.....	16
3.7 – Toxicologia do antimônio.....	18
3.8 – Métodos analíticos para determinação de antimônio.....	19
3.9 – Espectrofotometria.....	21

3.10 – Sistemas de extração líquido-líquido utilizando análise por injeção em fluxo.....	21
<b>4 – EXPERIMENTAL.....</b>	<b>25</b>
4.1 – Reagentes e soluções.....	26
4.1.1 – Solução de HCl 6 mol L <sup>-1</sup> .....	26
4.1.2 – Solução estoque de Sb (V) em HCl 6 mol L <sup>-1</sup> .....	26
4.1.3 – Solução estoque de Rodamina B em HCl 6 mol L <sup>-1</sup> .....	26
4.1.4 – Soluções padrões de Sb (III).....	27
4.1.5 – Soluções padrões de Pb (II).....	27
4.1.6 – Soluções padrões de As (III) e As (V).....	27
4.1.7 – Solução estoque de Sb (III).....	27
4.1.8 – Solução de lodo.....	28
4.2 – Equipamentos.....	28
4.3 – Materiais e métodos.....	29
4.3.1 – Sistema de extração líquido-líquido de análise em fluxo.....	29
4.3.2 – Determinação do teor de antimônio (V) no antimoniato de metilglucamina por ELL-AF.....	31
4.3.3 – Circuito eletrônico de controle.....	33
4.3.4 – Sistema de detecção espectrofotométrico e chave óptica.....	34
4.3.5 – Programa de controle.....	35

---

5.6.3 – Influência do tempo de agitação sobre a eficiência de extração.....	56
5.6.4 – Influência da razão de fases sobre a eficiência de extração.....	57
5.6.5 – Influência da concentração de rodamina B na formação do PI.....	59
5.7 – Estudo de interferentes.....	60
5.8 – Estudo do efeito de matriz.....	62
5.9 – Validadação do método.....	64
5.9.1 – Faixa linear.....	65
5.9.2 – Linearidade.....	67
5.9.3 – Sensibilidade.....	67
5.9.4 – Repetibilidade.....	67
5.9.5 – Seletividade.....	67
5.9.6 – Limite de detecção.....	68
5.9.7 – Limite de determinação.....	68
5.9.8 – Exatidão.....	69
5.10 – Eficiência de extração do procedimento em fluxo comparado com o procedimento em batelada na determinação de Sb (V).....	71
<b>6 – CONCLUSÕES.....</b>	<b>72</b>
<b>7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>75</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CVE	Centro de Vigilância Epidemiológica no Estado de São Paulo
ELL-AF	Extração Líquido-Líquido por Análise em Fluxo
FA	Flow Analysis
FIA	Flow Injection Analysis
FUNASA	Fundação Nacional da Saúde
ICH	International Conference of Harmonization
ICP-OES	Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry
LLE-FA	Liquid-Liquid Extraction Flow Analysis
PI	Par iônico
SE-FI	Solvent Extraction Flow Analysis
SUCEN	Superintendência de Controle de Endemias
WHO	World Health Organization

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Estrutura química de antimoniais trivalentes empregados na clínica médica com os respectivos nomes químicos e comerciais.....	13
Tabela 2 – Estrutura química de antimoniais pentavalentes empregados na clínica médica.....	14
Tabela 3 – Outras drogas empregadas na terapia da leishmaniose.....	15
Tabela 4 – Condições experimentais iniciais para determinação das variáveis no sistema de ELL-AF.....	53
Tabela 5 – Resultados da influência do interferente na determinação de Sb (V)..	61
Tabela 6 – Recuperação média de Sb (V) em amostras comerciais de antimoniato de metilglucamina por ELL-AF.....	63
Tabela 7 – Parâmetros utilizados na obtenção da curva analítica para o Sb (V)...	65
Tabela 8 – Resultados obtidos para os medicamentos anti-leishmanióticos comerciais pelo sistema de ELL-AF e ICP-OES (antimônio total) e polarografia de pulso diferencial [Sb (III)].....	70

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 – Flebotomíneo (*Lutzomyia*) se alimentando em um homem (WHO, 2002)..... 8

Figura 2 – a-) Países com índice elevado de leishmaniose como co-infecção em doentes portadores de HIV e b-) países com número elevado de casos de leishmaniose cutânea (WHO, 2002)..... 10

Figura 3 – Esquema do sistema de ELL-AF: a: microcomputador contendo a interface paralela; b: circuito eletrônico para o condicionamento dos sinais analógicos e digitais, c: agitador magnético; d: câmara de extração; e: injetor proporcional; f: bomba peristáltica; g: reservatório de fase orgânica, h: sistema de detecção composto por fotodiodo e LED verde (560 nm); V1, V2, V3 e V4: válvulas solenóide de três vias; SO1, SO2, SO3: sensores ópticos; L1 e L2: alças de amostragem contendo solução de rodamina B e solução de antimônio ambas em meio ácido respectivamente..... 30

Figura 4 – Desenho esquemático mostrando a câmara de agitação do sistema ELL-AF: detalhes dos tubos capilares, barra magnética, sistema de detecção e sensores ópticos..... 32

Figura 5 – a-) Circuito eletrônico dimensionado para o controle das 4 válvulas solenóides de três vias, 4 chaves ópticas, condicionamento do sinal do fotodiodo (amplificação e ajuste do off-set) e um relé de estado sólido para controle do agitador magnético..... 33

Figura 6 – Detalhe da cela de detecção utilizada no sistema de ELL-AF para leitura do sinal analítico; a: LED verde (560 nm); b: fotodiodo; c: fase orgânica; d: fase aquosa, e: ar e f: bloco de Teflon® grafitado..... 34

Figura 7 – Tela principal do programa para controle e aquisição de dados do sistema ELL-AF.....	36
Figura 8 – Fluxograma do programa de controle e aquisição de dados do sistema ELL-AF.....	37
Figura 9 – Sistema de injeção de solvente; a: água e b: tolueno.....	38
Figura 10 – Voltamograma característico. Eletrólito suporte: HCl 2 mol L <sup>-1</sup> , (1) amostra de Sb (III). Adição de padrão Sb (III): (2) 1,61x10 <sup>-5</sup> mol L <sup>-1</sup> , (3) 3,16 x10 <sup>-5</sup> mol L <sup>-1</sup> , (4) 4,65x10 <sup>-5</sup> mol L <sup>-1</sup> e (5) 6,08 x10 <sup>-5</sup> mol L <sup>-1</sup> .....	39
Figura 11 – Estrutura molecular da rodamina B.....	44
Figura 12 – Espectro na região do visível de uma solução aquosa de rodamina B de concentração 4,1x10 <sup>-4</sup> mol L <sup>-1</sup> .....	45
Figura 13 – Espectro na região do visível de uma solução aquosa de rodamina B de concentração 4,1x10 <sup>-4</sup> mol L <sup>-1</sup> em HCl 6 mol L <sup>-1</sup> .....	45
Figura 14 – Espectro na região do visível do par iônico em tolueno.....	46
Figura 15 – Espectros na região do visível em função do tempo para o PI (Sb (V) / rodamina B) em tolueno. Concentração de Sb (V): 2,5x10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> e rodamina B: 4,1x10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> .....	48
Figura 16 – Curva logarítmica de absorvância versus tempo para o PI em tolueno medida a 560 nm.....	49



- Figura 17 – Curva do sinal analítico obtido em função de soluções de  $\text{KMnO}_4$  de concentrações na faixa de  $5 \times 10^{-5}$  a  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  ..... 50
- Figura 18 – Região linear do detector LED/Fotodiodo para soluções de  $\text{KMnO}_4$  na faixa de concentração de  $5 \times 10^{-5}$  a  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  ..... 50
- Figura 19 – Perfil característico obtido na determinação de Sb (V) no sistema de ELL-AF. Sinal I: a1: ar; b: branco (fase orgânica), a2: ar; c: fase aquosa. Sinal II: a: ar; d: PI na fase orgânica - Sb (V) a  $4,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; e: fase aquosa..... 51
- Figura 20 – Comportamento do sinal analítico em função da concentração de HCl. Concentração de Sb (V):  $2,05 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  em soluções de HCl 2, 4, 5, 6, 8 e  $10 \text{ mol L}^{-1}$ , concentração da rodamina B:  $4,1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  em HCl  $6 \text{ mol L}^{-1}$ , tempo de agitação na câmara: 60 s, razão de fases (aq/org): 0,5..... 54
- Figura 21 – Comportamento do sinal analítico em função do tempo de equilíbrio após extração do PI. Concentração de Sb (V):  $2,05 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  em solução de HCl  $6 \text{ mol L}^{-1}$ , concentração da rodamina B:  $4,1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  em HCl  $6 \text{ mol L}^{-1}$ , tempo de agitação: 60 s, razão de fases (aq/org): 0,5..... 55
- Figura 22 – Comportamento do sinal analítico em função do tempo de agitação na câmara de extração no sistema ELL-AF. Concentração de Sb (V):  $2,05 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  em solução de HCl  $6 \text{ mol L}^{-1}$ , concentração da rodamina B:  $4,1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  em HCl  $6 \text{ mol L}^{-1}$ , tempo de separação de fases: 80 s, razão de fases (aq/or): 0,5..... 56

- Figura 23 – Comportamento do sinal analítico em função do volume de solução extratora empregada no sistema de ELL-AF. Concentração de Sb (V):  $2,05 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> em solução de HCl 6 mol L<sup>-1</sup>, concentração da rodamina B:  $4,1 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> em HCl 6 mol L<sup>-1</sup>, tempo de extração sob agitação: 100 s, tempo de separação de fases: 80 s..... 58
- Figura 24 – Comportamento do sinal analítico referente ao estudo da concentração ótima de rodamina B para formação e extração do PI. Concentração de Sb (V):  $4,1 \times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> em solução de HCl 6 mol L<sup>-1</sup>, concentrações de rodamina B em solução de HCl 6 mol L<sup>-1</sup>:  $2,05 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>,  $4,1 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>,  $8,2 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>,  $1,65 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>,  $2,45 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, tempo de agitação na câmara: 100 s, volume de solvente: 1 mL; tempo de separação de fases: 80 s..... 59
- Figura 25 – Curva analítica obtida para Sb (V) no sistema de ELL-AF. As condições empregadas estão descritas na Tabela 5..... 66

# ***1. Introdução***

---

## 1 – INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença infecciosa que vem aumentando consideravelmente em todo mundo<sup>1</sup>. Nas últimas três décadas, houve um grande avanço no conhecimento da biologia celular e imunologia nestas infecções, mas a quimioterapia não foi aprimorada em igual amplitude. Preparações de antimônio são as drogas de escolha no tratamento das diversas formas de leishmaniose, nos últimos 90 anos. Sua introdução foi baseada em conceitos terapêuticos do século XIX, onde era significativa a participação terapêutica de sais de metais, como arsênio e outros<sup>17</sup>.

A indústria pouco tem contribuído no desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento da leishmaniose e, no Brasil; a droga de eleição continua sendo o antimoniato de N-metilglucamina<sup>19-21</sup>. A estrutura e composição desta droga ainda não foram totalmente esclarecidas, e o mecanismo de ação ainda é pouco conhecido. Existem fortes evidências que o antimônio pentavalente seja reduzido *in vivo* a sua forma trivalente, o que vem a explicar a toxicidade da droga, bem como seu efeito terapêutico<sup>29</sup>.

A especiação do estado de oxidação do antimônio é importante devido à elevada toxidez do estado trivalente e, principalmente, devido a constatação da mesma como contaminante nos medicamentos a base de Sb (V) empregados na terapia da leishmaniose. A toxicidade e o comportamento biológico dependem do estado de oxidação do elemento, sendo que o Sb (III) é dez vezes mais tóxico do que o antimônio pentavalente<sup>25,29</sup>.

Quanto às metodologias analíticas, ainda existe uma deficiência quanto à disponibilidade de métodos simples e de baixo custo que permitam a especiação de antimônio e que possam ser implantados em laboratórios de controle de qualidade de medicamentos, visando não somente a determinação do teor de Sb (V), mas também de possíveis contaminantes tóxicos.

A Farmacopéia Brasileira não apresenta monografia para o doseamento de Sb (V) no antimoniato de metilglucamina<sup>53</sup>. A dosagem de antimônio pentavalente no stibogluconato de sódio, segundo a monografia contida na Farmacopéia Britânica, é realizada mediante titulação potenciométrica do antimônio com sulfato ferroso amoniacal<sup>86</sup>. No entanto, essa

metodologia, além de ser lenta, carece de precisão e não permite a determinação seletiva de Sb (III) e Sb (V) em fármacos.

Os métodos empregados nas indústrias brasileiras para determinação de antimônio em medicamentos são baseados, principalmente, em métodos volumétricos ou potenciométricos<sup>42,60-69</sup>. Essas metodologias de modo geral não são adequadas, visto que permitem apenas a determinação de antimônio total.

Atualmente está em fase de implementação na Farmacopéia Brasileira um procedimento para determinação seletiva de Sb (III) em amostras de medicamentos a base de Sb (V) utilizando um sistema de injeção em fluxo acoplado a técnica de espectrofotometria de absorção atômica com geração de hidretos como método oficial<sup>87</sup>.

Pela necessidade de métodos simples, rápidos e de baixo custo, foi proposto um sistema automatizado de extração líquido-líquido em sistema de análise em fluxo para a determinação de Sb (V), baseado na extração do par iônico formado a partir do antimônio pentavalente e rodamina B.

O método de extração líquido-líquido com análise em fluxo (ELL-AF) proposto apresenta como objetivos melhorar itens relacionados à extração como: menor consumo de reagentes, menor contato do analista com o solvente, controle automático de todas as etapas de extração como: mistura efetiva entre as fases aquosa e orgânica, separação de fases, obtenção dos dados analíticos, boa frequência analítica e determinação seletiva de Sb (V).

## ***2. Objetivos***

---

## 2 - OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo geral o desenvolvimento de um método analítico para a determinação de antimônio pentavalente, visando aplicação no controle de qualidade de medicamentos antileishmanióticos a base de Sb (V).

Como objetivos específicos tem-se:

- Avaliação da reação de formação de par iônico entre o hexacloroantimoniato e rodamina B.
- Adaptação do sistema de extração líquido-líquido em batelada para o sistema de extração líquido-líquido em fluxo.
- Construção de um sistema automatizado para extração líquido-líquido em sistema de análise em fluxo, utilizando uma câmara de extração.
- Desenvolvimento e validação do método analítico para a determinação de Sb (V) baseado na formação do par iônico empregando o método de extração líquido-líquido em sistema automatizado de análise em fluxo.

### **3. Revisão Bibliográfica**

---

*A revisão bibliográfica apresentada neste capítulo está dividida em 10 partes: uma revisão sobre leishmaniose, uma breve descrição sobre os vetores de transmissão da doença e das áreas endêmicas, diagnóstico da doença, principais fármacos empregados no tratamento da leishmaniose, bem como propostas de estruturas para o antimoniato de metilglucamina, aspectos toxicológicos do antimônio, métodos analíticos para a determinação de antimônio, uma descrição dos métodos espectrofotométricos e alguns exemplos de extração líquido-líquido utilizando análise por injeção em fluxo.*



### 3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 – Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença infecciosa zoonótica, que afeta o homem e animais que está amplamente distribuída em todo mundo, ocorrendo na Ásia, Europa, África e Américas. Existem relatos sobre a doença, no Continente Americano, desde a época colonial. Em 1571 foi relatado que os povos situados nos vales quentes do Peru eram dizimados por uma doença que desfigurava o nariz, a qual, atualmente, é conhecida como leishmaniose<sup>1</sup>. A importância era tamanha, que chegou a impressionar artistas da época que registravam em peças de cerâmica as deformações provocadas pela doença<sup>2</sup>.

A descoberta dos agentes etiológicos das leishmanioses, entretanto, só ocorreu o final do século XIX, quando Cunningham<sup>2</sup> em 1885, na Índia, descreveu formas amastigotas (não flageladas) em casos de calazar. Em 1898, o pesquisador russo Borovisky<sup>2</sup> demonstrou ser um protozoário o agente etiológico do botão do oriente. Em 1903, Leishman e Donovan<sup>2</sup> realizaram as primeiras descrições do protozoário responsável pelo calazar indiano, denominado mais tarde de *Leishmania donovani*. Igualmente em 1903, Wright descreveu o parasita do Botão do Oriente, conhecido atualmente como *Leishmania tropica*<sup>3</sup>. A partir de 1904, diferentes relatos demonstram que o calazar não era exclusivamente da Índia, visto que casos também foram registrados na China.

Como o calazar na região do mediterrâneo atingia principalmente crianças, as evidências de diferenças entre o organismo causador do calazar de uma região para outra justificaram o estabelecimento de uma espécie *Leishmania infantum* por Nicole em 1908. Um organismo semelhante foi descrito por Wright em 1903 em uma criança com Botão do Oriente na Síria, sendo proposto o nome de *Helcosoma tropicum* para este parasita. Mais tarde ele foi colocado no gênero *Leishmania*: *Leishmania tropica*, Wright, 1903<sup>2-3</sup>.

No continente americano, várias doenças que criavam lesões, freqüentes em determinadas regiões, eram chamadas de úlcera de Bauru, ferida brava, uta, úlcera dechiclero. A correlação destas lesões com um protozoário do gênero *Leishmania* foi estabelecido por Gaspar Vianna, em 1909, no Instituto Oswaldo Cruz, recebendo o nome de *Leishmania braziliensis*.

Em 1993 a Organização Mundial da Saúde considerou a leishmaniose como a

segunda doença causada por protozoário de importância pública<sup>4</sup>.

### 3.2 – Vetores

Os vetores da leishmaniose são dípteros da família *Psychodida*, hematófagos pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo), com vasta distribuição nos climas quentes e temperados. Somente as fêmeas são hematófagas. Pertencem ao tipo dos dípteros de atividade crepuscular e pós-crepuscular, abrigando-se durante o dia em lugares úmidos, sombrios e bem protegidos dos ventos. São encontrados em tocas de animais silvestres, buracos existentes em madeiras e ocos de bambu<sup>5</sup>.



**Figura 1:** Flebotomíneo (*Lutzomyia*) se alimentando em um homem (WHO, 2002).

O flebótomo, dos gêneros *Lutzomyia* e *Psychopopygus*, se infectam ao picar o animal portador da doença, aspirando macrófagos parasitados ou amastigotas livres no sangue ou tecidos e podem assim transmitir a doença ao homem<sup>6</sup>. Os mamíferos portadores da leishmaniose são geralmente animais silvestres como a preguiça, o tamanduá, roedores, raposas e outros, sendo que grande parte das lesões nestes não é aparente. No Brasil, o mais importante reservatório animal é o cão e a raposa<sup>7</sup>. A partir de estudos patofisiológicos foi verificado que a *Leishmania* se desenvolve no tubo intestinal

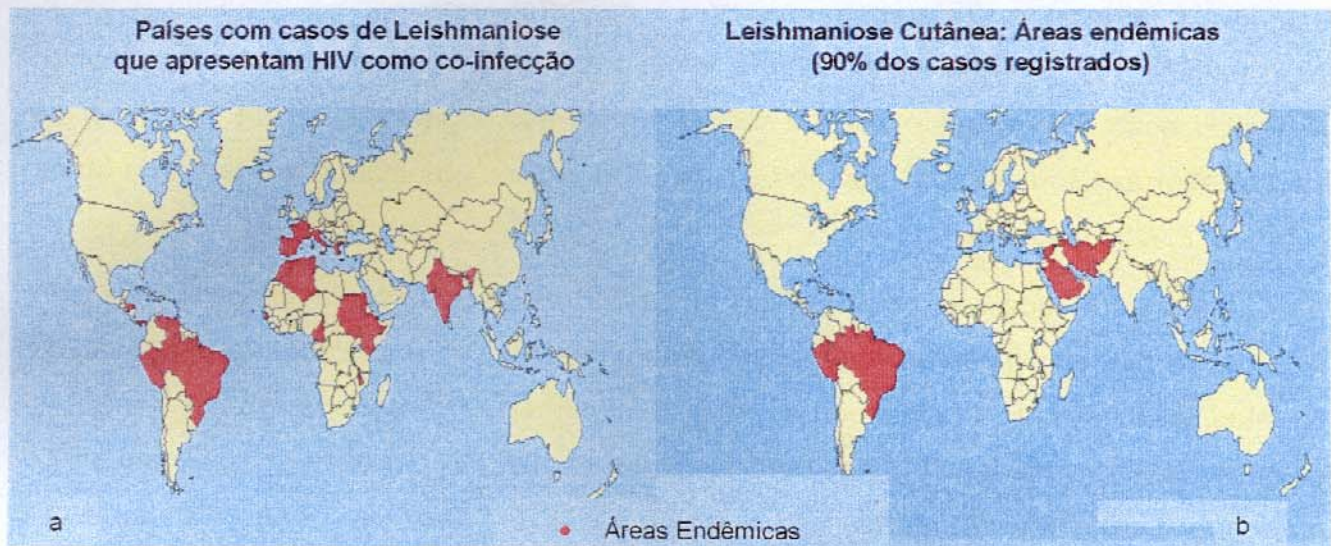
do hospedeiro invertebrado, na forma promastigota, e essa, uma vez introduzida nos mamíferos, através da picada, transforma-se na forma amastigota. Enquanto a forma promastigota é flagelada e extracelular, a forma amastigota é intracelular sem movimento. A multiplicação dos amastigotas, que são as formas não flageladas, ocorre no interior de vacúolos parasitóforos em macrófago de diferentes tecidos, originando a doença na forma cutânea, mucocutânea ou visceral<sup>7</sup>.

No Novo Mundo, são reconhecidas oito espécies de *Leishmanias* responsáveis pela doença no homem, pertencentes ao subgênero *Vianna* (*V*) e *Leishmania* (*L*), onde os agentes etiológicos correspondentes são: *Leishmania* (*V*) *braziliensis*, *Leishmania* (*V*) *guyanensis*, *Leishmania* (*V*) *panamensis*, *Leishmania* (*V*) *lainsoni*, *Leishmania* (*L*) *mexicana*, *Leishmania* (*L*) *amazonensis*, *Leishmania* (*L*) *venezuelensis* e *Leishmania* (*L*) *chagas*<sup>8</sup>. Basicamente, pode-se diferenciar duas formas de leishmaniose: a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e a Leishmaniose Visceral Americana (LVA)<sup>1-7</sup>.

No Estado de São Paulo, o agente etiológico responsável pela ocorrência da doença, principalmente da forma cutânea, é a *Leishmania* (*V*) *braziliensis*<sup>1-7</sup>.

### 3.3 - Áreas endêmicas

A leishmaniose é considerada endêmica em 88 países, dos quais 72 são países considerados em desenvolvimento. Segundo a Organização Mundial da Saúde, 90% dos casos de leishmaniose visceral são registrados em Bangladesh, Brasil, Nepal, Índia e Sudão; 90% dos casos da leishmaniose moncutânea ocorrem no Brasil, Bolívia e Peru e 90% dos casos da leishmaniose cutânea ocorrem no Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria<sup>4</sup>.



**Figura 2:** a-) Países com índice elevado de leishmaniose como co-infecção em doentes portadores de HIV e b-) países com número elevado de casos de leishmaniose cutânea<sup>4</sup>.

No Brasil, a leishmaniose visceral encontra-se disseminada em 17 estados das regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste. A ampliação da área de distribuição geográfica da AIDS e sua extensão para camadas mais pobres da população e, por outro lado, a crescente urbanização da leishmaniose visceral faz supor que a prevalência da co-infecção LVA / HIV venha a aumentar nos próximos anos.

Entre 1985 e 2000 a leishmaniose atingiu no Brasil 422,5 mil pessoas e nos últimos dois anos foram detectados 66,8 mil novos casos da doença, que permanece sem controle<sup>9</sup>. De 1999 a 2001, foram registrados no Estado de São Paulo, 87 casos de LVA, sendo que em sete casos a doença levou o paciente ao óbito<sup>10-11</sup>.

### 3.4 – Diagnóstico da doença

Depois de levantada a suspeita de leishmaniose através da avaliação clínica e epidemiológica, o paciente deve ser submetido a exames laboratoriais para que o diagnóstico seja confirmado<sup>12</sup>.

O diagnóstico ocorre com certeza quando os protozoários do gênero *Leishmania* são visualizados<sup>13</sup>. Isto pode ser feito através do exame direto de esfregaços corados. O material é geralmente obtido por biópsia ou curetagem dos bordos da lesão<sup>14</sup>; por isso, deve ser realizado antes do início do tratamento, uma vez que as amastigotas tornam-se raras nas lesões após a instituição terapêutica<sup>12</sup>. As lâminas devem ser analisadas por um microscopista experiente, o que aumenta a sensibilidade do teste<sup>14</sup>.

Um dos principais problemas quanto a esse diagnóstico inicial é a semelhança do quadro clínico da leishmaniose visceral com algumas doenças linfoproliferativas e com a esquistossomose mansônica associada à bacteriose septicêmica prolongada<sup>10-14</sup>.

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado por (i) ensaios sorológicos, entre os quais destacam-se o ensaio imunoadsorvente ligado a enzima (ELISA) e o de imunofluorescência indireta (IFI) e (ii) exame parasitológico, realizado no material colhido por punção na medula óssea, baço ou fígado, onde o material é examinado em lâminas coradas, inoculado em cultura ou em hamster ou cultivado em meios apropriados. Ainda, podem servir no diagnóstico da doença o hemograma e dosagem de proteínas. Dependendo da forma clínica, podem ocorrer uma diminuição do número total de hemáceas, leucopenia com linfocitose relativa e plaquetopenia, bem como inversão da relação albumina/globulina<sup>10-14</sup>.

### 3.5 – Fármacos empregados no tratamento da leishmaniose

Apesar do uso medicinal de compostos de antimônio já ser conhecido desde a Antiguidade (séculos antes da era cristã), para diversos fins terapêuticos, somente em 1912, Gaspar de Oliveira Vianna<sup>15</sup> observou que o tartarato de antimônio e potássio era eficaz na terapêutica da leishmaniose tegumentar americana. Três anos mais tarde, na

Itália, também foi comprovada a eficácia dessa droga no tratamento da leishmaniose calazar<sup>16</sup>.

Devido aos efeitos tóxicos e severos efeitos colaterais indesejáveis do tártaro emético, entre esses a intolerância gastrointestinal e efeitos cardiopéxicos, os antimoniais trivalentes foram sendo substituídos por compostos estibiados pentavalentes. Bramachari, em 1920, desenvolveu o primeiro composto a base de antimônio pentavalente, a uréia estibamina, que é um derivado uréico do ácido p-aminofenil estibínico. Em 1936, Schmidt introduziu na terapia médica o gluconato de Antimônio (V) sódico, conhecido comercialmente como Solustibosan® (Bayer) ou Pentostam® (Glaxo Wellcome, Londres, Inglaterra)<sup>5,17</sup>.

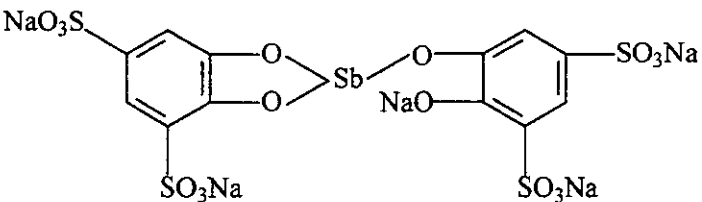
Durante a Segunda Guerra Mundial, surgiu na França, um medicamento alternativo ao até então gluconato de antimônio (V) sódico, o antimoniato de N-metil glucamina, comercializado como Glucantime® (Rhône-Poulenc-Rohrer, Paris, França). Enquanto o Pentostam® é distribuído, até hoje, nos países de língua inglesa, o Glucantime®, manufaturado é comercializado nos países de línguas francesa, espanhola e portuguesa<sup>17</sup>.

Um estudo comparativo com os medicamentos inovador e genérico do gluconato de sódio e antimônio, realizados no Quênia, revela a viabilidade de comercialização do medicamento a custos menores e, em consequência, a possibilidade do tratamento de maior número de pacientes infectados pela leishmaniose visceral na África<sup>18</sup>.

Além dos antimoniais, outras drogas atualmente têm sido empregadas no tratamento das diversas formas de leishmaniose, entre as quais se destacam a pentamidina, anfotericina B, paromomicina e miltefosine.

As estruturas moleculares e os nomes químicos e comerciais dos fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose estão apresentadas nas Tabelas 1, 2 e 3<sup>19</sup>.

**Tabela 1:** Estrutura química de antimoniais trivalentes empregados na clínica médica com os respectivos nomes químicos e comerciais.

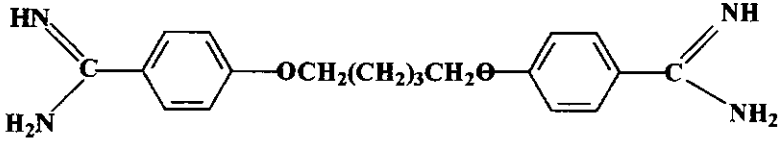
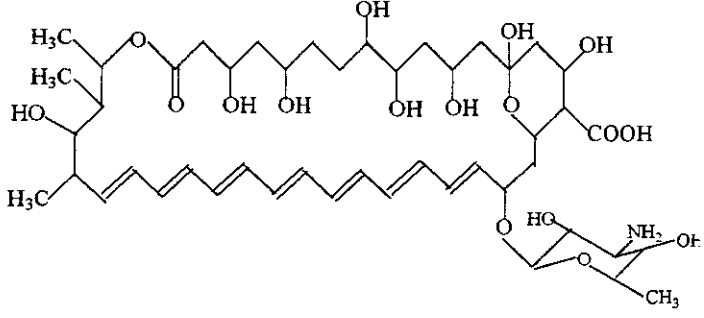
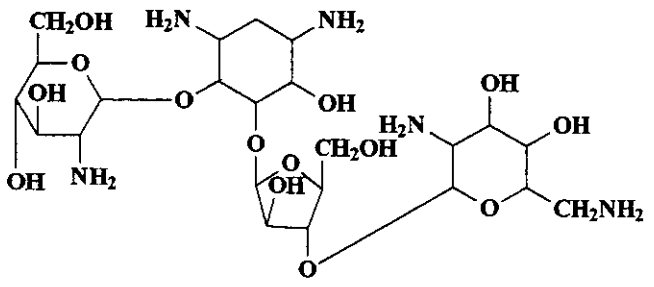
Nome Químico	Formula estrutural	Nome comercial
<b>Tartarato de antimônio e potássio</b>	$\left[ \begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{CO} - \\   \\ \text{HCO} - \text{Sb} - \text{OH} \\   \\ \text{HCO} / \\   \\ \text{COOH} \end{array} \right] \text{K}$	<b>Tártaro emético</b>
<b>Antimônioato de bis-catecol-3,5-dissulfonato sódico</b>		<b>Stibophen, Repodral, Fuadina</b>
<b>Tioglicolato de sódio e antimônio</b>	$\begin{array}{c} \text{CH}_2^- \text{S} \\   \\ \text{O}=\text{C} - \text{O} \end{array} \text{Sb} - \text{S} - \text{CH}_2\text{COONa}$	

**Tabela 2:** Estrutura química de antimoniais pentavalentes empregados na clínica médica.

Nome Químico	Formula estrutural proposta	Nome comercial
<p><b>Atimoniato de N-metil-glucamina</b></p>	$  \begin{array}{c}  \text{CH}_2\text{NHCH}_3^+ \\    \\  \text{HCOH} \\    \\  \text{HOCH} \\    \\  \text{HCOH} \\    \\  \text{HCOH} \\    \\  \text{CH}_2\text{OH}  \end{array}  \cdot (\text{OH})_2\text{Sb}_2\text{O}^-  $	<p><b>Glucantime® ; Antimoniato de meglumina</b></p>
<p><b>Gluconato de antimônio (V) sódico ou Estibogluconato de sódio</b></p>	$  \left\{ \begin{array}{c}  \text{CH}_2\text{OH} \\    \\  \text{CHOH} \\    \\  \text{HCO} \diagdown \quad \text{OH} \quad \text{O}^- \\    \quad \quad \quad   \\  \text{HCO} - \text{Sb} - \text{O} - \text{Sb} - \text{OCH} \\    \quad \quad \quad   \quad \quad \quad   \\  \text{HCO} \diagdown \quad \quad \quad \text{OCH} \\    \quad \quad \quad \quad \quad \quad   \\  \text{HCO} \quad \quad \quad \quad \quad \quad \text{OCH} \\    \quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad   \\  \text{COO}^- \quad \quad \quad \quad \quad \quad \text{COO}^-  \end{array} \right\} \text{Na}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}  $	<p><b>Pentostam® Solustibosan®</b></p>
<p><b>Uréia estibamina</b></p>	$  \begin{array}{c}  \text{OH} \\    \\  \text{O} = \text{Sb} - \text{CH}_3 \\    \\  \text{C}_6\text{H}_4 \\    \\  \text{NH} - \text{CO} - \text{NH}_2  \end{array}  $	<p><b>Estibamine®</b></p>



Tabela 3: Outras drogas empregadas na terapia da leishmaniose.

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

### 3.6 – Antimoniato de N-metilglucamina

No Brasil, o medicamento a base de antimônio, utilizado como primeira escolha na terapêutica da leishmaniose, é o antimoniato de metilglucamina. O composto é obtido sinteticamente a partir do ácido antimônico e da N-metil-glucamina, sendo a última obtida previamente a partir da aminaçãõ redutora da glicose em presença de metilamina. O composto, de fórmula estrutural não definida, é solúvel em água e pouco solúvel em solventes orgânicos<sup>19-21</sup>.

O antimoniato de N-metilglucamina é especialmente eficaz no tratamento das leishmanioses cutânea, mucocutânea e visceral. O medicamento provoca regressão rápida das manifestações clínicas e hematológicas da doença, bem como provoca a esterilização do parasita<sup>20-22</sup>.

Devido às baixas dosagens e tratamentos descontínuos, começaram a ocorrer falhas na terapia e conseqüente aumento das formas resistentes de parasitas. Conforme recomendação da Organização Mundial de Saúde, as doses de antimoniais não devem ultrapassar o limite recomendado de 20 mg kg<sup>-1</sup>, pois a alta toxicidade já é o fator limitante desse grupo de drogas. Mialgias, dores abdominais, alterações hepáticas e distúrbios cardiológicos são efeitos colaterais freqüentes associados ao uso destas drogas<sup>20</sup>.

Após administração intravenosa ou intramuscular, o antimoniato de N-metilglucamina é rapidamente absorvido e, praticamente, 90% do antimônio é excretado nas primeiras 48 horas pelos rins<sup>23</sup>. Em conseqüência, se faz necessário a administração de doses elevadas do fármaco, em regime contínuo, para garantir um elevado teor de antimônio nos tecidos e assim obter a eficácia do tratamento. A alta dosagem faz com que o antimônio possa ser detectado no cabelo do paciente tratado com antimoniais pentavalentes após um ano do término do tratamento<sup>24</sup>.

Efeitos colaterais como nefrites, distúrbios gastrintestinais, cardiovasculares e respiratórios tem sido observados. Antimoniais pentavalentes são geralmente 10 vezes menos tóxicos em células de mamíferos, quando comparados aos antimoniais trivalentes (tártaro emético), utilizados primeiramente por Gaspar Vianna em 1912<sup>15,25</sup>. Em determinados casos, além de destruir o parasita, o medicamento acaba por levar o paciente ao óbito<sup>26</sup>.

Apesar do emprego do antimoniato de metilglucamina no tratamento da leishmaniose já ocorrer por mais de 50 anos, a estrutura e a composição do composto, igualmente ao gluconato de antimônio (V) sódico, ainda permanecem indeterminadas.

Os dados mais recentes sobre a tentativa de caracterização do antimoniato de meglumina foram reportados por ROBERTS *et al.*, 1998<sup>25</sup>. Segundo os autores a razão molar antimônio: N-metil-D-glucamina é de 1:1,37 (m/m) e várias espécies complexas entre o antimônio e N-metil-D-glucamina coexistem em solução. Oligômeros foram observados, sendo a maior massa molar encontrada de 507 uma (unidade de massa atômica). DEMICHELI *et al.*, 1999<sup>27</sup>, sintetizaram o antimoniato de meglumina e sugerem que o antimônio se liga na metilglucamina através do oxigênio do carbono C3.

No entanto, a eficácia terapêutica destas formas poliméricas ou mesmo do antimônio pentavalente ainda não foram esclarecidas. Há indícios que o Sb (III) é substancialmente mais potente do que o Sb (V) contra as formas promastigotas e amastigotas de pelo menos três espécies de *Leishmania*. Esses resultados reforçam a hipótese de uma conversão metabólica intramacrofágica do Sb (V) em Sb (III), sendo neste caso o Sb (III) o elemento tóxico as leishmanias no estado intracelular<sup>20</sup>. O seu mecanismo de ação ainda é pouco compreendido e sugere-se que o antimônio pentavalente possa ser uma pró-droga, sendo convertido a antimônio trivalente após sua administração<sup>25</sup> e que assim, possam interferir no processo de  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos e glicólise do parasita, levando à uma depleção dos níveis de ATP intracelular<sup>20</sup>. Além disso, existe na forma amastigota uma metaloprotease zinco dependente, que poderia ser inativada se o antimônio substituísse o zinco nesta enzima, essencial para o desenvolvimento do parasita<sup>28</sup>. Recentemente, foi verificado que após administração intramuscular de antimoniato de N-metilglucamina em pacientes com leishmaniose, ocorre conversão *in vivo* do composto orgânico estibiado para as formas iônicas Sb (III) e Sb (V)<sup>29</sup>. Ainda, foi observado que ocorre a bio-redução do Sb (V) para a sua forma trivalente, corroborando com outros estudos que evidenciam que a formação *in vivo* do Sb (III) seja responsável pela toxicidade da droga e pela atividade terapêutica da mesma<sup>29</sup>.

### 3.7 – Toxicologia do antimônio

Antimônio é considerado um agente clastogênico, mas não mutagênico no seu estado trivalente, sendo que a espécie trivalente é responsável pela mediação dos efeitos toxicológicos. Ainda não foi comprovada a carcinogenicidade do antimônio em humanos, embora o  $Sb_2O_3$  seja classificado, pelo IARC, como possível carcinógeno humano. Estudos epidemiológicos ocupacionais não comprovam para humanos, a ocorrência de câncer de pulmão causada pelo antimônio em animais de experimentação, particularmente ratos<sup>30</sup>. As poucas informações existentes sobre os aspectos toxicológicos do antimônio são provenientes de estudos de compostos orgânicos a base de antimônio de uso farmacológico<sup>31</sup>.

O antimônio acumula-se em geral, em órgãos vascularizados e tecidos, principalmente rins e fígado, além de possuir grande afinidade pelo baço e pelo sangue. Uma quantidade expressiva de antimônio no sangue pode estar relacionada com a grande afinidade do Sb (III) pelos eritrócitos<sup>32</sup>.

O metabolismo do antimônio está relacionado com a mudança de valência que ocorre no organismo humano após incorporação. Aproximadamente de 5-10% do Sb (V) ingerido é reduzido para a forma trivalente. No homem, assim como em roedores, apenas uma pequena quantidade de Sb (V) é reduzida para a forma Sb (III). Entretanto, quantidades similares de Sb (III) são oxidadas para o estado pentavalente. A evidência de metilação de antimônio em mamíferos é baixa. Assim sendo, parece que o organismo não possui mecanismos eficientes de detoxificação do Sb (III)<sup>33</sup>.

A excreção de Sb (III) e Sb (V) em humanos é preferencialmente via renal. Mais que 80% do Sb (V) administrado intravenosamente como stibogluconato é excretado na urina após 6-8 horas<sup>34</sup>. A cinética de compostos de antimônio pentavalente (estibogluconato e antimonato de meglumina) após injeção intramuscular, pode ser descrito por um modelo de dois compartimentos e três termos farmacocinéticos, representando uma fase inicial de absorção com tempo de meia vida de 0,85 h, seguida de uma fase de eliminação rápida com um tempo de meia vida de 2,02 h e por último uma fase de eliminação com um tempo médio de meia vida de 76 h<sup>33-35</sup>.

### 3.8 – Métodos analíticos para a determinação de antimônio em diferentes matrizes

Diversos métodos analíticos têm sido desenvolvidos para a determinação de antimônio em matrizes como sedimento<sup>36</sup>, material biológico<sup>37-39</sup>, ligas metálicas<sup>40</sup>, medicamentos<sup>41-45</sup>, solos e plantas<sup>46-48</sup>, bebidas<sup>49</sup>, entre outros. No entanto, pelo fato do antimônio ser um elemento tóxico cumulativo e, ter sido detectado em águas naturais, a matriz água tem sido a mais estudada. A especiação do antimônio nas diferentes matrizes é fundamental, visto que a toxicidade e comportamento biológico serem dependentes do estado de oxidação.

Muitos métodos permitem apenas a determinação do elemento em um dos estados de oxidação, sendo o outro determinado indiretamente, por diferença entre o antimônio total e o previamente determinado. Neste sentido, as técnicas hífenadas são promissoras, visto que permitem simultaneamente separar e quantificar as espécies, Sb (III), Sb (V) e organoantimoniais, diminuindo assim a introdução de erros provenientes da determinação indireta. As técnicas hífenadas representam uma tendência atual no desenvolvimento de metodologias analíticas, entre as quais se destacam a eletroforese capilar com espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente (CE-ICP-MS), cromatografia líquida de alta eficiência com espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidretos (HPLC-HG-AFS) e a cromatografia líquida de alta eficiência com espectrometria de absorção atômica e geração de hidretos (HPLC-HG-AAS)<sup>46</sup>. Embora esses métodos sejam indubitavelmente promissores para a especiação de antimônio, ainda são pouco viáveis para serem empregados no controle e qualidade de medicamentos nas indústrias, onde se requer métodos simples, baratos e de elevada frequência analítica<sup>50-51</sup>.

Métodos analíticos reportados na literatura para a determinação de antimônio em fármacos recomendam, principalmente, métodos volumétricos e/ou potenciométricos<sup>52</sup>. Os métodos volumétricos são baseados na redução do Sb (V) para Sb (III) com um agente redutor, geralmente iodeto em meio ácido. O iodo formado no processo é evaporado e Sb (III) formado é determinado por iodometria. Essa metodologia não é adequada, visto que permite apenas a determinação de antimônio total. Ainda, está sujeita a erros decorrentes

de uma evaporação incompleta do iodo formado anteriormente a determinação do Sb (III) que pode interferir na titulação.

A Farmacopéia Brasileira<sup>53</sup> não apresenta monografia para o doseamento de antimônio no antimoniato de metilglucamina. A dosagem de antimônio pentavalente no stibogluconato de sódio, segundo a monografia contida na Farmacopéia Britânica (3ª edição)<sup>86</sup> é realizada mediante titulação potenciométrica do antimônio com sulfato ferroso amoniacal. No entanto, essa metodologia, além de ser lenta, carece de precisão.

BLOOMFIELD *et al.*, 1992<sup>54</sup> descreveram um método de análise por injeção em fluxo (FIA, do inglês flow injection analysis) para a determinação de antimônio pentavalente no Pentostam. No entanto, nenhum dos métodos acima citados faz referência a determinação seletiva de Sb (III) e Sb (V) nos fármacos estudados<sup>54</sup>. A determinação de Sb (V) por FIA no antimoniato de metilglucamina foi relatada por KEPPLER *et al.*, 2001<sup>55</sup>. Cabe destacar que a análise por FIA apresenta diversas vantagens frente a outros métodos analíticos, principalmente no que concerne a utilização de uma instrumentação simples, economia no consumo de reagentes e velocidade de processamento, sendo, portanto, especialmente atrativa para o controle de qualidade de medicamentos.

A importância da especificação do antimônio no fármaco é importante, visto que o efeito terapêutico versus toxicidade está intimamente relacionado com o estado de oxidação do elemento. Nesse sentido, é importante que as monografias apresentadas nas farmacopéias sejam revistas. A contaminação do antimoniato de metilglucamina por Sb (III) foi relatada por FRANCO *et al.*, 1995 e RATH *et al.*, 1997<sup>42,56</sup>; empregando diversos métodos como a polarografia de pulso diferencial, espectrometria de absorção atômica, espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado e a espectrofotometria<sup>42,56</sup>.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde colocou, recentemente, em estudo e consulta pública uma monografia para o antimoniato de N-metil-glucamina a ser introduzida no 4º Fascículo da Farmacopéia Brasileira. Nesta monografia, sugere-se o doseamento do antimônio trivalente e pentavalente por espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos em batelada, com atomização em cela de quartzo, sendo que o Sb (V) é previamente reduzido por uma solução redutora de tetraidoborato de sódio em meio alcalino<sup>57</sup>.

### 3.9 - Espectrofotometria

Na determinação de Sb (V) pelo método espectrofotométrico, reagentes cromogênicos como xantinas, no qual inclui-se a rodamina B<sup>60-64</sup> e trifenilmetanos como verde brilhante<sup>65</sup>, verde malaquita e cristal violeta<sup>58-59</sup> têm sido largamente empregados. Os métodos baseiam-se na formação de um par iônico entre o corante catiônico e o ânion hexacloroantimoniato ( $\text{SbCl}_6^-$ ), onde o par iônico formado é extraído para uma fase apolar como benzeno, tolueno, éter isopropílico; com posterior determinação do cromóforo por espectrofotometria na região do visível.

Para a determinação direta de Sb (III) em solução aquosa, reagentes específicos como iodeto<sup>66</sup>; molibdato<sup>67</sup>, vermelho de bromopirogalol<sup>68</sup> e verde de malaquita<sup>69</sup> têm sido empregados. O uso de iodeto, molibdato e vermelho de bromopirogalol na determinação de Sb (III) foi revisada por RATH *et al.*, 1997<sup>42</sup>. O procedimento que emprega o iodeto apresenta a desvantagem de determinar simultaneamente o Sb (V), visto que nas condições experimentais recomendadas o antimônio pentavalente é reduzido ao estado trivalente. Já o método que envolve o emprego de molibdato apresenta a desvantagem de formar um complexo heteropoliácido-Sb (III) instável em solução aquosa. O método que emprega o vermelho de bromopirogalol apresenta a vantagem de ser rápido e simples, com aplicação também à determinação, após redução prévia, de Sb (V). O método foi aplicado na determinação de Sb (III) e Sb (V) no antimoniato de N-metilglucamina<sup>42</sup>.

### 3.10 - Sistemas de extração líquido-líquido utilizando análise em fluxo

Os sistemas de análise em fluxo têm sido utilizados na substituição de processos manuais de separação, reduzindo custos, tempo de análise e manipulação de amostras, menor risco de contaminação e perdas, além do uso de menores quantidades de solventes orgânicos no laboratório, sendo este último de extrema importância devido à rigidez atual das leis de proteção ambiental<sup>70</sup>.

A tendência atual na Química Analítica envolve a utilização de sistemas mecanizados e/ou automatizados visando à melhoria da repetibilidade, confiabilidade,

minimização na geração de resíduos, da grande demanda nas determinações analíticas, bem como a utilização de métodos clássicos na elaboração de novos métodos de análise química. Dentro deste universo, a mecanização torna-se uma ferramenta indispensável através do uso de dispositivos mecânicos ou instrumentais, visando minimizar, refinar, estender ou suplementar a intervenção humana em um processo de análise química, para permitir uma garantia do resultado analítico. Já a automação consiste da mecanização do sistema adicionada de uma operação principal controlada sem a intervenção humana por um mecanismo de realimentação<sup>70</sup>.

Para o desenvolvimento de sistemas mecanizados ou mesmo automatizados, o conhecimento de áreas como a eletrônica digital, a mecânica de micro-estruturas, a programação de computadores, além do conhecimento analítico é extremamente importante. A característica multidisciplinar dos sistemas automatizados torna o trabalho do Químico Analítico um grande desafio, pois, desde a concepção da idéia até a elaboração do sistema, são necessários conhecimentos em áreas não tão triviais no dia a dia do químico.

A técnica de extração líquido-líquido é caracterizada pela partição da espécie de interesse entre dois solventes imiscíveis, em um sistema heterogêneo, através do contato intensivo entre estas duas fases e a formação de espécies neutras como, por exemplo, compostos de associação iônica. O objetivo é melhorar a seletividade de uma técnica de detecção separando o elemento de interesse dos constituintes majoritários, bem como aumentar a sensibilidade através das concentrações ou isolamento do analito em uma determinada fase. A extração pode ser feita em batelada (operação descontínua), numa operação contínua ou através de métodos automatizados<sup>70</sup>.

A extração em batelada é empregada quando se pode alcançar com grande facilidade uma grande razão de distribuição, para a separação desejada. Um pequeno número de extrações remove fácil e completamente o componente desejado e podem ser feitas num simples funil de separação. Quando a razão de distribuição for baixa, usa-se o método de extração contínua em batelada. Este procedimento emprega uma corrente contínua de solvente imiscível, que flui através da solução; se o solvente for volátil pode-se recuperá-lo por destilação e condensação<sup>71</sup>.

Diante de tantas possibilidades, a extração líquido-líquido em fluxo monossegmentado, utilizando um sistema mecanizado aparece como uma alternativa aos



métodos clássicos em batelada, nos quais o uso de grande quantidade de reagentes, longos tempos de análise, agitação física do sistema pelo analista, a separação e equilíbrio de fases, a aquisição do sinal analítico, torna o trabalho dispendioso, cansativo, e muitas vezes não reprodutível devido a grande quantidade de operações unitárias necessárias as quais podem levar a erros analíticos no resultado final.

Os sistemas automatizados de extração por análise em fluxo envolvem três etapas: a) segmentação de uma amostra aquosa com um solvente orgânico imiscível em um segmentador de fase, com o objetivo de gerar segmentos alternados e regulares imiscíveis, b) transporte das espécies de analito insolúveis em água para a fase orgânica em uma bobina de extração e c) separação da fase orgânica da fase aquosa em um separador de fases, localizado após a bobina de extração que re-agrupa os segmentos de cada fase para posterior detecção. Dentro destas três etapas, a primeira (segmentação) e a última fase (separação) são críticas e podem apresentar problemas como reprodutibilidade, sensibilidade e confiabilidade. Vários segmentadores e separadores de fase têm sido desenvolvidos para melhorar a eficiência analítica dos métodos de FI-SE propostos (KUBAN; 1991)<sup>72</sup>.

O primeiro sistema de análise em fluxo foi introduzido por Skegg's em 1957 denominado "Análise em Fluxo Contínuo" (CFA)<sup>73</sup>. No sistema proposto a amostra era aspirada continuamente com segmentação por ar. A permanência da amostra no sistema ocorria até que o equilíbrio fosse atingido. Este sistema impedia a dispersão da amostra e a intercontaminação quase não ocorre. Este sistema foi utilizado nos "Auto Analysers" da Technicon<sup>74</sup>.

Ruzicka e Hansen, 1975<sup>75</sup>; introduziram um novo conceito de análise em fluxo denominado "Análise por Injeção em Fluxo" (FIA)<sup>75</sup>. A principal característica deste método é a injeção da amostra em um líquido carregador sem segmentação. Foi comprovado que a segmentação não é o fator necessário para impedir a intercontaminação das amostras.

KALBERG *et al.*, 1978<sup>76</sup> e, independentemente BERGAMIN *et al.*, 1978<sup>77</sup>; desenvolveram um sistema de Extração Líquido-Líquido em Fluxo (ELL-AF) no qual a amostra é inserida em um líquido carregador juntamente com os reagentes necessários e, em seguida, a amostra e a fase orgânica confluem de maneira a se obter segmentos alternados. A amostra segmentada passa por uma bobina de extração, onde o analito é extraído para a fase desejada. Antes do detector, ocorre a separação das fases através de

um sistema adequado a essa finalidade, como por exemplo, os que se utilizam a gravidade aproveitando a diferença de densidade entre as fases imiscíveis<sup>76-77</sup>.

FACCHIN *et al.*, 1994<sup>78-79</sup> desenvolveram um sistema de extração em fase única monossegmentado. No sistema proposto, uma fase única é obtida pela confluência de metil isobutil cetona com ácido tenoil tetracético (ligante extrator), álcool e a amostra aquosa para extração de íons metálicos. O sistema de fase única é desfeito através de uma solução salina de  $\text{NaNO}_3$  antes da detecção, formado duas fases imiscíveis sendo que o analito permanece na fase orgânica e é detectado em um espectrofotômetro.

ALONSO *et al.*, 2001<sup>80</sup> avaliaram três diferentes formas de SE-FI na determinação de alumínio em água: um primeiro modelo utilizando um sistema convencional de separação e segmentação de fases, um segundo modelo incluindo um segmentador sem um separador de fases e finalmente um terceiro modelo utilizando um segmento simples de solvente orgânico obtido pela injeção deste para um fluxo aquoso sem separação de fases. Comparando-se os três modelos, o segundo apresentou maior sensibilidade que o primeiro, devido à ausência do separador de fases onde ocorre uma dispersão adicional do analito. O terceiro modelo é muito mais sensível que os demais, devido a elevada taxa de pré-concentração alcançada quando o alumínio é extraído para um único e pequeno segmento orgânico.

Outras linhas de trabalho têm sido realizadas utilizando a propriedade de formação de um filme orgânico característico em superfícies de tubos de PTFE nas técnicas de SE-FIA. O mecanismo consiste na formação de um filme estacionário sobre PTFE na qual o analito pode ser extraído e re-extraído utilizando diferentes velocidades de fluxo de segmentos aquosos e orgânicos sem a utilização de separadores de fase e com um fator de pré-concentração de até 50 vezes<sup>81-82</sup>.

DINIZ *et al.*, 2002<sup>83</sup>, determinaram fosfato utilizando a reação de formação de complexação de cobre com PAN(1-(2-piridilazo)-naftol) e posterior extração do complexo formado com verde de malaquita para a fase orgânica usando metil isobutil cetona (MIC) como solvente e extrações múltiplas.

## **4. Experimental**

---

*Neste capítulo será feita uma descrição dos reagentes, procedimentos de preparação de soluções reagentes e de referência, preparo das amostras de antimoniato de metilglucamina, equipamentos, descrição do método de extração líquido-líquido de análise em fluxo, características do circuito eletrônico de controle, descrição do programa de controle e aquisição de dados e, finalmente, uma breve descrição da validação do método de extração líquido-líquido por análise em fluxo proposto, avaliação do efeito matriz e eficiência de extração do procedimento em fluxo comparado com o procedimento em batelada.*

## **4 - Experimental**

### **4.1 – Reagentes e soluções**

Todos os reagentes utilizados foram de grau P.A. A água utilizada no preparo das soluções foi obtida a partir de água deionizada e purificada em um sistema Milli-Q, Millipore, Brasil.

#### **4.1.1 - Solução de HCl 6 mol L<sup>-1</sup>**

Solução de HCl 6 mol L<sup>-1</sup> preparada a partir da diluição apropriada de ácido concentrado em água deionizada.

#### **4.1.2 - Solução estoque de Sb (V) em água**

Solução estoque de Sb (V) de concentração  $1,0 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> preparada pela dissolução de 0,6275 g de K<sub>2</sub>Sb(OH)<sub>6</sub> (Sigma) em 125 mL de água quente e sob agitação magnética até completa dissolução. Após resfriamento da solução, o volume foi levado para 250 mL com água deionizada.

#### **4.1.3 - Solução estoque de Rodamina B em HCl 6 mol L<sup>-1</sup>**

Solução de rodamina B (J.T.Baker) de concentração  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> preparada pela dissolução de 0,1197 g do cloreto de rodamina B em 250 mL de solução de ácido clorídrico 6 mol L<sup>-1</sup>.

#### 4.1.4 - Soluções padrões de Sb (III)

Soluções padrões de Sb (III) foram preparadas a partir de diluições com água de uma solução certificada de  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Aldrich), para obtenção de soluções padrões de Sb (V) de concentração  $2,73 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  contendo 1 e 10% (n/n) de antimônio (III), equivalentes às concentrações de  $2,73 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  e  $2,73 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  respectivamente.

#### 4.1.5 - Soluções padrões de Pb (II)

Soluções padrões de Pb (II) foram preparadas a partir de diluições apropriadas de uma solução certificada de  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Aldrich), para obtenção de soluções padrões de Sb (V) de concentração  $2,73 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  contendo 1 e 10% (n/n) de chumbo (II), equivalentes às concentrações de  $2,73 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  e  $2,73 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  respectivamente.

#### 4.1.6 - Soluções padrões de As (III) e As (V)

Soluções padrões de As (III) e As (V) foram preparadas a partir de diluições apropriadas de uma solução certificada de  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Aldrich), para obtenção de soluções padrões de Sb (V) de concentração  $2,73 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  contendo 1 e 10% (n/n) de arsênio (III) e arsênio (V), equivalentes às concentrações de  $2,73 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  e  $2,73 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  respectivamente.

#### 4.1.7 - Solução estoque de Sb (III)

A solução estoque de Sb (III)  $2,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada pela dissolução de 3,644 g de  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  (99%) em  $\text{HCl}$   $6 \text{ mol L}^{-1}$  em um balão volumétrico de 100 mL.

A solução foi padronizada com solução de iodo tomando-se uma alíquota de 10,0 mL desta solução e transferido-a para um erlenmeyer. Esta solução foi neutralizada com solução de  $\text{NaOH}$   $6 \text{ mol L}^{-1}$ , adicionado 1 mL de  $\text{HCl}$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , e neutralizada novamente com bicarbonato de sódio até cessar o desprendimento de  $\text{CO}_2$ . Adicionaram-se, então, 3 mL solução de amido 1% (m/v) e a solução foi titulada com a solução de iodo previamente padronizada.

### 4.1.8 - Solução de Iodo

Uma solução de iodo de concentração  $5,0 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> foi preparada a partir da dissolução de 36 g de iodeto de potássio (Merck) em aproximadamente 100 mL de água destilada. A esta solução foram adicionados 12,69 g de I<sub>2</sub>, o volume foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água.

A solução foi padronizada através da titulação com As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Aldrich). Para tanto, foi pesado 0,10 g de As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> previamente seco em estufa a 110 °C por 2 horas. A massa foi transferida para um erlenmeyer, dissolvida em 10 mL de NaOH 1 mol L<sup>-1</sup> e levemente acidificada, com HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Em seguida foi adicionada a solução, NaHCO<sub>3</sub> até cessar o desprendimento de CO<sub>2</sub> e o aparecimento de uma cor castanho claro. Neste ponto, foram adicionados 3 mL de uma solução de amido 1% (m/v) e a mesma foi titulada com iodo até ficar incolor e sua concentração real determinada.

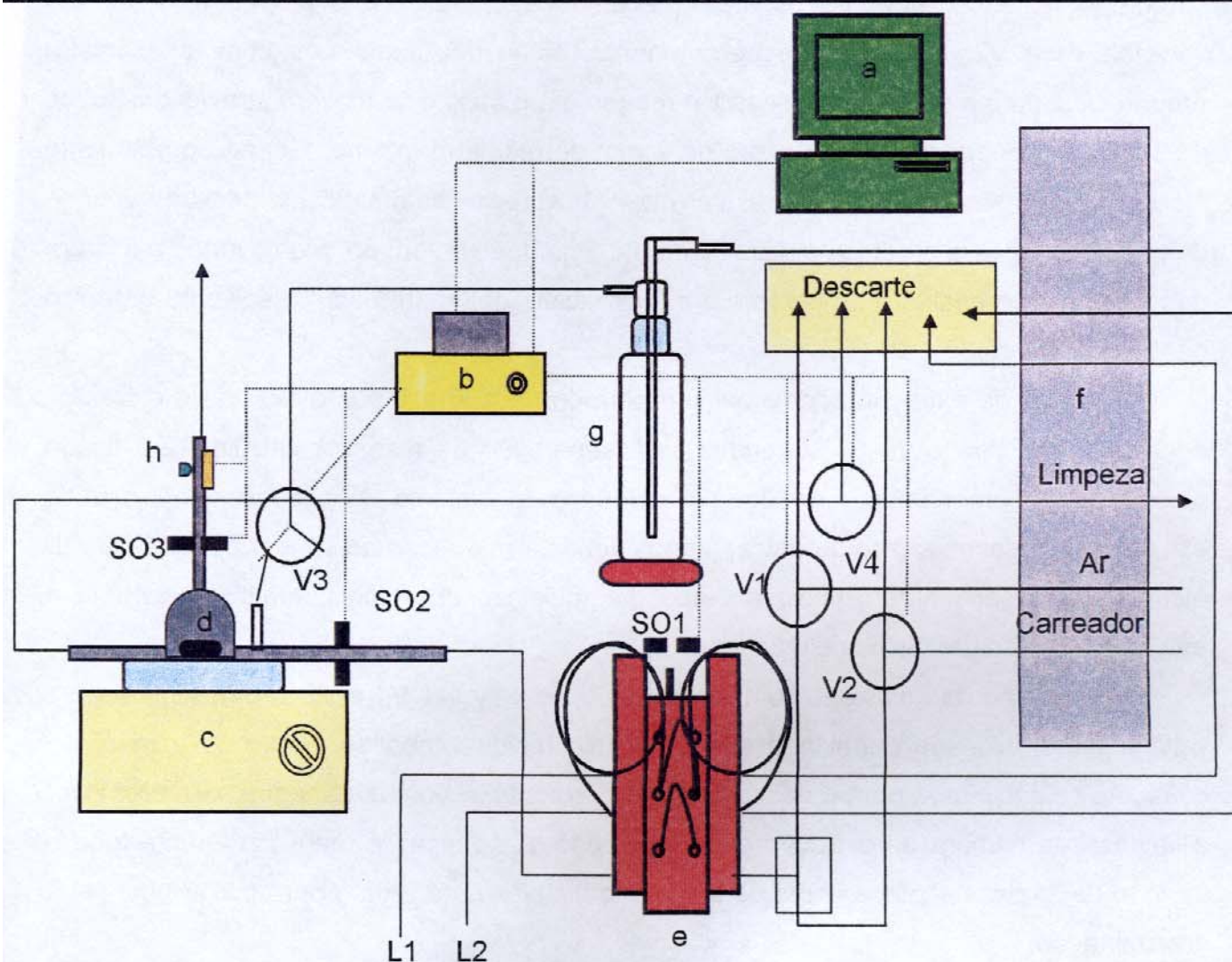
## 4.2 - Equipamentos

- Sistema de Extração Líquido-Líquido em Análise em Fluxo ELL-AF (Fig. 3, pág. 30).
- Microcomputador Pentium com programa escrito em linguagem Visual Basic 3.0.
- Balança Analítica Micronal, Brasil.
- pH-metro Radelkis pH/Ion Analyzer OP-271, Hungria.
- Bomba Peristáltica Ismatec IPC - High Precision Multichannel Dispenser.
- Agitador Magnético Fisatom, Brasil.
- Sistema de Água Milli-Q Academic, Millipore, Brasil.
- Banho de ultra-som, USC 700, Unique, Brasil.
- Espectrofotômetro UV-Vís 1601 PC Shimadzu, Japão.
- Potenciostato-galvanostato AUTOLAB® PGSTAT 30 (ECO CHEMIE – Holanda) com Stand para eletrodos 663 VA Metrohm, Suíça.
- Espectrômetro de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado, Optima 3000 DV, Perkin Elmer

## **4.3 – Materiais e Métodos**

### **4.3.1 Sistema de extração líquido-líquido de análise em fluxo**

A instrumentação empregada e o sistema desenvolvido para o método de ELL-AF podem ser observados na Figura 3. O arranjo consiste basicamente de um microcomputador que controla todo o sistema através de uma interface comercial paralela 711 S (ADVANTECH). Um circuito eletrônico montado no próprio laboratório permite o controle das válvulas e chaves ópticas. O sistema também é constituído por um injetor proporcional, uma bomba peristáltica, uma unidade de detecção fotométrica constituída por um fotodiodo e um diodo emissor de luz verde (LED) em comprimento de onda de 560 nm, um agitador magnético, uma câmara de mistura e um reservatório de solvente orgânico. A câmara foi confeccionada em vidro com capacidade para 5 mL, acoplada a um tubo de vidro de 4 mm de diâmetro externo e 2 mm de diâmetro interno. A entrada e saída lateral da câmara consistem de tubos capilares com 0,8 mm de diâmetro interno. Na saída superior da câmara, após o sensor óptico está localizado o sistema de detecção constituído por um LED e um fotodiodo. O tubo possui 2 mm de diâmetro interno, o qual define o caminho óptico.



**Figura 3:** Esquema do sistema de ELL-AF: a: microcomputador contendo a interface paralela; b: circuito eletrônico para o condicionamento dos sinais analógicos e digitais, c: agitador magnético; d: câmara de extração; e: injetor proporcional; f: bomba peristáltica; g: reservatório de fase orgânica, h: sistema de detecção composto por fotodiodo e LED verde (560 nm); V1, V2, V3 e V4: válvulas solenóide de três vias; SO1, SO2, SO3: sensores ópticos; L1 e L2: alças de amostragem contendo solução de rodamina B e solução de antimônio ambas em HCl 6 mol L<sup>-1</sup>, respectivamente.



Inicialmente a bomba peristáltica aspira as soluções ácidas contendo o analito e o corante em meio ácido para as alças de amostragem L1 e L2, respectivamente. As válvulas V1 e V2, ar e água respectivamente, estão desligadas. Ao comutar o injetor proporcional para a posição de injeção, o reagente e o analito se movem através dos tubos de Teflon até entrar no tubo de vidro de 2 mm de diâmetro interno. Quando o segmento alcança o sensor óptico SO2, a válvula V3 abre e automaticamente, um volume determinado da fase orgânica é adicionado e o agitador é acionado, promovendo a mistura das soluções do analito e do corante em meio ácido juntamente com o solvente orgânico dentro da câmara de extração.

A etapa de extração ocorre por um período de 100 s. Após o tempo de extração, decorre-se um tempo de 80 segundos para separação de fases. A válvula V2 é ligada permitindo o bombeamento de água destilada pelo sistema até atingir a câmara de extração deslocando a fase orgânica, menos densa, em direção ao sensor óptico SO3. Ao alcançar este sensor, tem início a etapa de aquisição dos sinais analíticos durante a passagem da fase orgânica pelo detector.

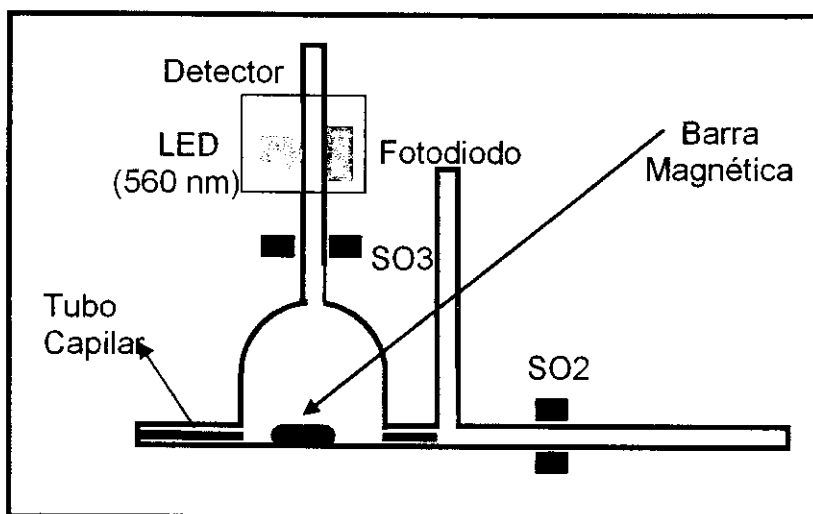
Ao término da aquisição do sinal analítico, as válvulas V1 e V2 são desligadas e a válvula V4 é acionada permitindo que a solução residual, contida dentro da câmara de agitação, seja aspirada para o descarte. Posteriormente, é bombeado água para promover a limpeza da câmara de extração e da tubulação. A agitação é mantida durante todo o período de limpeza. Após a etapa de limpeza o sistema está pronto para iniciar uma nova determinação.

#### **4.3.2- Determinação do teor de antimônio (V) no antimoniato de metilglucamina por ELL-AF**

As amostras de antimoniato de metilglucamina foram previamente diluídas 1:100 (v/v) em HCl 6 mol L<sup>-1</sup> e deixadas em banho de ultra-som (55 kHz) por 15 minutos. Antes de iniciar a análise, essa solução foi novamente diluída na proporção de 6:100 (v/v) com HCl 6 mol L<sup>-1</sup>. Essa solução é introduzida no sistema ELL-AF (Figura 3) pela alça de amostragem L2. A rodamina B em meio ácido é introduzida pela alça de amostragem L1 e os respectivos volumes contidos nas alças L1 e L2, são simultaneamente injetados no sistema ELL-AF empregando ar como carreador.

O solvente orgânico (tolueno) é introduzido no sistema através de uma bomba peristáltica a partir de um reservatório com capacidade volumétrica de 100 mL. O analito, a rodamina B e o solvente orgânico são misturados na câmara de extração, sob agitação vigorosa, durante um tempo de 100 s. Após a fase de extração, a agitação é interrompida por um período de tempo de 80 s para promover a separação de fases e o fluxo de ar é interrompido. O fluxo de água é reiniciado promovendo o deslocamento da fase orgânica em direção ao detector. Após a aquisição do sinal analítico é promovida a limpeza do sistema.

A Figura 4 mostra os detalhes da câmara de extração. A câmara foi confeccionada em vidro com capacidade para 5 mL acoplada a uma tubulação de vidro de 4 mm de diâmetro externo e 2 mm de diâmetro interno. As entrada e saída laterais da câmara consistem de tubos capilares com 0,8 mm de diâmetro. Na saída superior da câmara, após o sensor óptico está localizado o sistema de detecção constituído por um LED verde com pico de emissão em 560 nm e um fotodiodo. O tubo de vidro da saída superior da câmara possui diâmetro interno de 2 mm, determinando o caminho óptico.

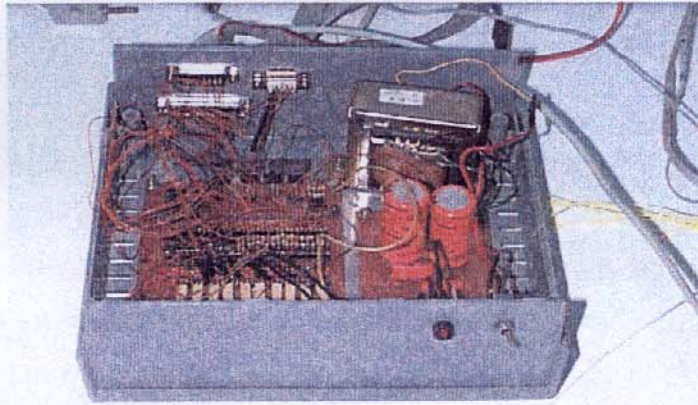


**Figura 4:** Desenho esquemático mostrando a câmara de agitação do sistema ELL-AF: detalhes dos tubos capilares, barra magnética, sistema de detecção e sensores ópticos.

Todo o sistema de fluxo foi montado utilizando tubos de Teflon<sup>®</sup>, com diâmetro interno de 0,8 mm. Uma bomba peristáltica foi utilizada para a propulsão dos reagentes. Um agitador magnético foi utilizado para promover a mistura da fase orgânica e aquosa.

### 4.3.3 – Circuito eletrônico de controle

A Figura 5 mostra uma foto do circuito eletrônico construído no laboratório, para o controle do sistema de extração líquido-líquido em fluxo.



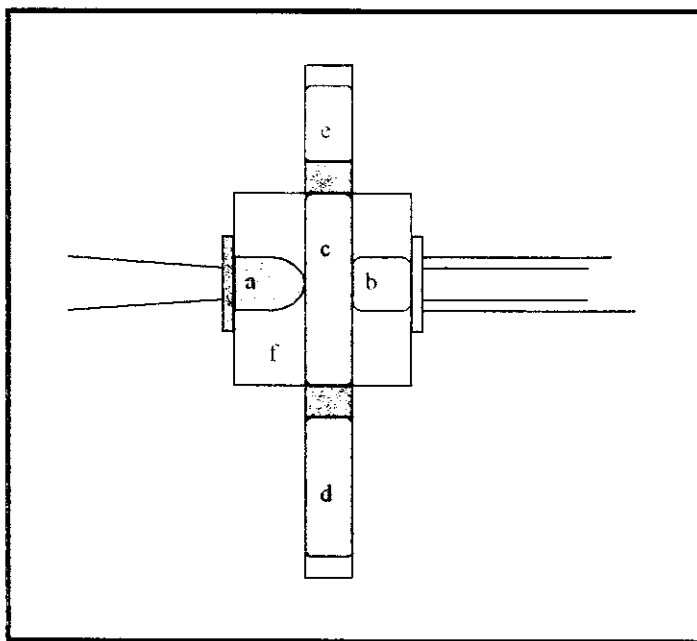
**Figura 5:** Circuito eletrônico dimensionado para o controle das 4 válvulas solenóides de três vias, 4 chaves ópticas, condicionamento do sinal do fotodiodo (amplificação e ajuste do off-set) e um relé de estado sólido para controle do agitador magnético.

O circuito eletrônico de controle pode ser dividido basicamente em 5 partes:

- Fonte de alimentação.
- Circuito para acionamento de válvulas.
- Circuito para monitoramento de optos.
- Circuito para condicionamento do sinal do fotômetro.
- Relé de estado sólido para acionamento do agitador magnético.

#### 4.3.4 – Sistema de detecção espectrofotométrico e chave óptica

O sistema de detecção utilizado (Figura 6) é constituído pela passagem do tubo de vidro dentro de um suporte de teflon grafitado. O tubo de saída superior da câmara passa pelo suporte de teflon e perpendicularmente, estão posicionados o diodo emissor de luz e o fotodiodo<sup>84</sup>. Desta forma, a luminosidade externa não interfere no sinal analítico na análise e, conseqüentemente, nos resultados obtidos. Utilizou-se um diodo emissor de luz com pico máximo de emissão de 560 nm e largura de banda de meia altura de 30 nm.



**Figura 6:** Detalhe da cela de detecção utilizada no sistema de ELL-AF para leitura do sinal analítico; a: LED verde (560 nm); b: fotodiodo; c: fase orgânica; d: fase aquosa; e: ar e f: bloco de Teflon<sup>®</sup> grafitado.

Uma chave óptica é um dispositivo formado por um diodo emissor de luz (LED), que emite luz na região do infravermelho próximo (960 nm), acoplado a um fototransistor.

As chaves ópticas foram utilizadas no sistema para monitoramento da passagem da interface ar/solução. Um circuito eletrônico foi construído para condicionar o sinal gerado pela chave óptica antes de ser enviado para o computador.

A saída deste circuito é ligada a uma entrada TTL da interface. Quando ocorrem mudanças no sinal devido a passagem de uma bolha de ar ou fluido carregador, ocorre uma transição de sinal de nível baixo (0V) para alto (5V) ou vice-versa dependendo da interface monitorada (água/ar ou ar/água). Desta forma, o programa de computador pode então controlar algum evento referente a essa informação, como ativar uma outra válvula, promover a injeção da fase orgânica ou solução salina e ligar e desligar o agitador.

Um circuito eletrônico analógico foi associado ao fotodiodo (fotômetro) com o objetivo de amplificar o sinal e ajustar o “off-set” para posteriormente enviá-lo para a entrada do conversor analógico/digital (A/D) de 12 bits pertencente a interface paralela. Desta forma, é possível fazer as leituras da variação do sinal do foto diodo pelo microcomputador, para posterior tratamento de dados.

#### **4.3.5 – Programa de controle**

Um programa computacional escrito em Visual Basic 3.0 foi utilizado para o controle do sistema proposto. Além disso, o programa apresenta também uma série de sub-rotinas que permitem controlar independentemente cada dispositivo do sistema como, por exemplo, acionar as válvulas, fazer a aquisição de dados do detector, acionar o agitador magnético, visando preparar o sistema para iniciar a rotina de análise. A tela principal do programa pode ser visualizada na Figura 8 e o fluxograma do programa de controle é mostrado na Figura 7.

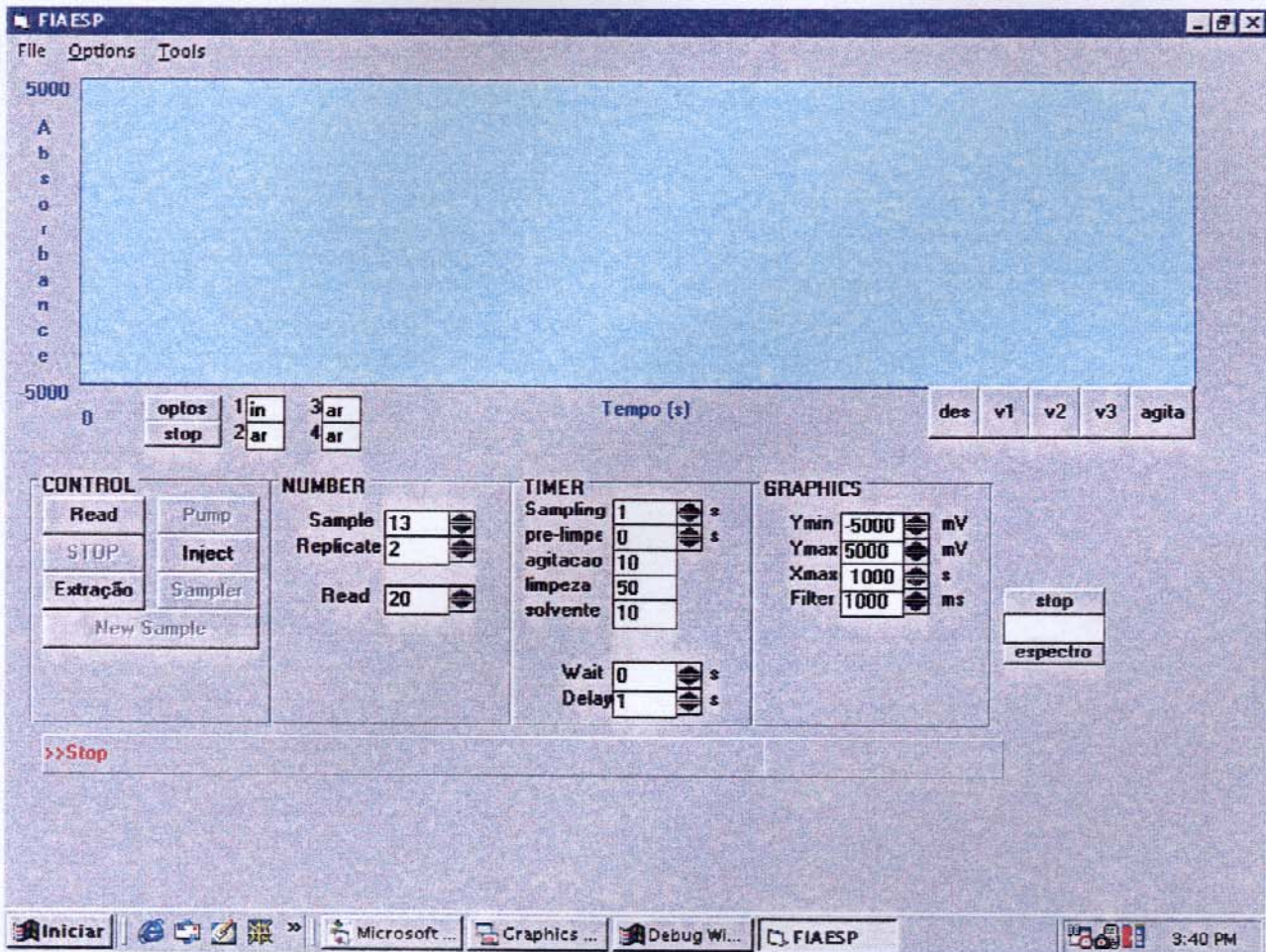


Figura 7: Tela principal do programa para controle e aquisição de dados do sistema ELL-AF.

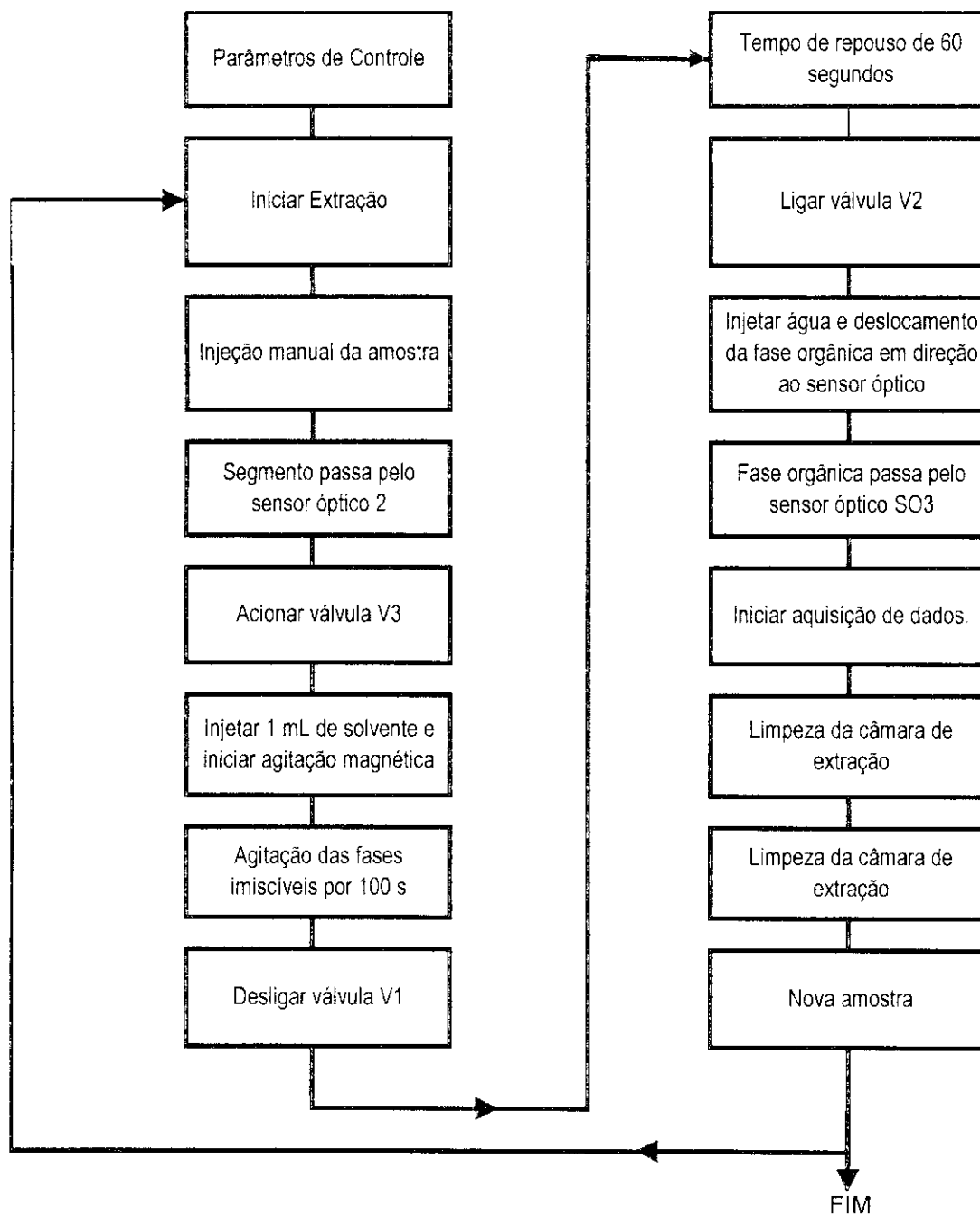


Figura 8: Fluxograma do programa de controle e aquisição de dados do sistema ELL-AF.

### 4.3.6 - Sistema de injeção de solvente com vazão constante

Para alimentação da fase orgânica necessária para a extração do analito em sistema de ELL-AF, foi construído um sistema baseado na diferença de densidade entre as fases aquosa e orgânica. Este sistema consiste em injetar no fundo do reservatório água através da bomba peristáltica proporcionando o deslocamento da fase orgânica.

O reservatório foi construído com vidro de borossilicato com diâmetro de 50 mm e altura de 175 mm. No topo do reservatório existe uma entrada para o fluxo de água e uma saída para o fluxo do solvente em direção ao sistema. A saída do reservatório foi conectada a uma válvula solenóide três vias (V3) através de um tubo de silicone resistente a solventes orgânicos e tubo de Teflon<sup>®</sup> com diâmetro de 0,8 mm. Uma representação esquemática do reservatório de solvente pode ser observada na Figura 9.

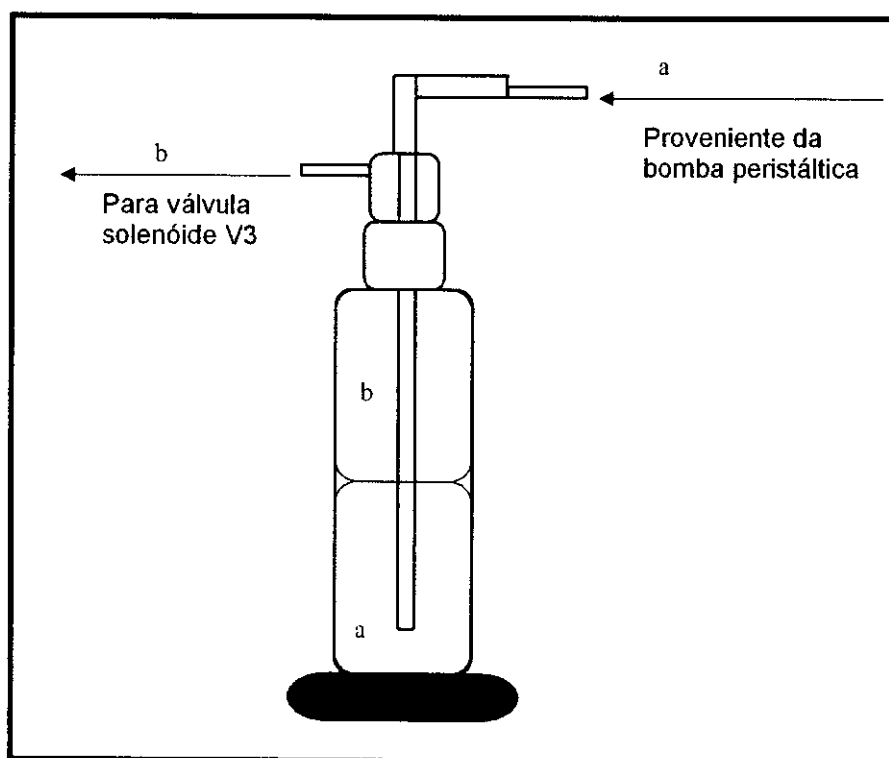
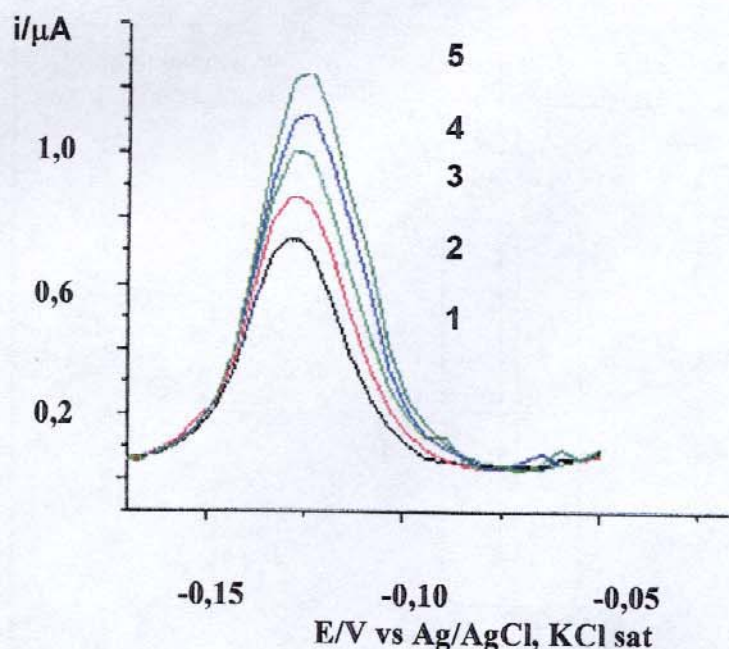


Figura 9: Sistema de injeção de solvente: a: água e b: tolueno.



#### 4.3.7 - Determinação do teor de Sb (III) em ampolas de antimoniato de metilglucamina por polarografia de pulso diferencial

A determinação Polarográfica de Sb (III) no medicamento do antimoniato de metilglucamina foi realizada através do método da adição de padrão, seguindo a método proposto por FRANCO *et al.*, 1995. Para tanto, foi adicionado à cela voltamétrica 20,0 mL do eletrólito suporte HCl 2 mol L<sup>-1</sup>. Após remoção do oxigênio, mediante passagem de N<sub>2</sub> por 10 min, foi registrada a curva de corrente vs. potencial de -0,05 a -0,17 V (Ag/AgCl, KCl 3 mol L<sup>-1</sup> como eletrodo de referência). Ao conteúdo da cela foi adicionado 1,00 mL da amostra previamente diluída e alíquotas sucessivas de 50 μL da solução padrão de Sb (III). Entre cada medida o oxigênio foi removido borbulhando N<sub>2</sub> por um período de 60 s e os polarogramas correspondentes foram registrados. Voltamogramas característicos estão apresentados na Figura 11.



**Figura 10:** Voltamograma característico. Eletrólito suporte: HCl 2 mol L<sup>-1</sup>, (1) amostra de Sb (III). Adição de padrão Sb (III): (2) 1,61x10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>, (3) 3,16 x10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>, (4) 4,65x10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> e (5) 6,08 x10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>.

#### **4.3.8 - Determinação de antimônio total por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente**

A determinação de antimônio total foi realizada mediante construção de uma curva analítica obtida empregando soluções padrão de antimônio trivalente de 40, 80, 100, 120 e 160 mg L<sup>-1</sup>. As amostras foram diluídas em HCl 0,2 % (v/v) de forma que o teor de Sb(III) se situassem aproximadamente no meio da curva analítica. Para a construção da curva analítica foram empregadas as linhas de 206,83, 217,58 e 231,14 nm.

#### **4.3.9 - Avaliação do efeito da matriz na determinação de Sb (V) no sistema de ELL-AF**

O procedimento realizado para a avaliar o efeito da matriz e a liberação do Sb (V) do antimoniato de metilglucamina foi baseado no teste de recuperação. Para tanto, foram preparadas duas amostras (A e B) de antimoniato de metilglucamina fortificadas com uma solução padrão de Sb (V). A amostra de antimoniato de metilglucamina sem fortificação foi diluída com HCl 6 mol L<sup>-1</sup> 1:100 v/v para uma concentração de 4,05x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>. As amostras fortificadas foram preparadas para conter as seguintes concentrações:

*Amostra A:* 1,22x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> de antimoniato de metilglucamina + 2,84x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> de Sb (V);

*Amostra B:* 1,62x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> de antimoniato de metilglucamina + 2,43x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> de Sb (V).

Os testes de recuperação foram realizados sem e com energia de ultra-som (55 KHz, 15 min) anterior a determinação do antimônio no sistema ELL-AF. As determinações no sistema ELL-AF foram realizadas conforme descrito em 4.3.2.

#### **4.3.10 - Eficiência de extração do procedimento em fluxo comparado com o procedimento em batelada na determinação de Sb (V)**

A extração em batelada foi realizada em um funil de separação de 125 mL com a adição de 9,5 mL de uma solução de Rodamina B de concentração de  $1,36 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , 550  $\mu\text{L}$  de uma solução de referência de Sb (V) de concentração  $8,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , ambas preparadas em HCl  $6 \text{ mol L}^{-1}$ . Estas soluções foram agitadas vigorosamente durante 60 s. Em seguida, foram adicionados 10 mL de tolueno e a solução agitada por mais 60 s. Após a promoção do contato íntimo entre as fases, o sistema foi mantido em repouso por 30 s para separação das fases. Uma alíquota da fase orgânica foi introduzida no sistema ELL-AF para monitoramento do sinal analítico.

## **5. Resultados e Discussões**

---

*Neste capítulo serão discutidos os tópicos relacionados aos seguintes itens: estabilidade do par iônico, otimização dos parâmetros analíticos para o método de extração líquido-líquido por análise em fluxo proposto, estudo de interferentes, resultados dos ensaios de recuperação, validação do método comparando os resultados obtidos pela análise de medicamentos a base de Sb (V) por ELL-AF pela análise dos mesmos medicamentos por ICP-OES para determinação de antimônio total e polarografia de pulso diferencial para determinação de Sb (III), uma descrição dos parâmetros de validação e a eficiência do procedimento em fluxo comparado com o procedimento em batelada na determinação de Sb (V).*

## 5 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

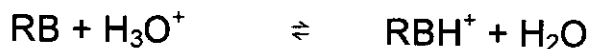
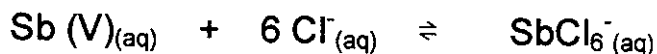
### 5.1 - Considerações iniciais

RAMETTE e SANDEL, 1955<sup>88</sup>, verificaram que o Sb (V), em meio de HCl, reage com a rodamina B formando um par iônico (PI) que pode ser extraído da fase aquosa por intermédio de solventes apolares ou baixa polaridade. O PI absorve na região do visível, com um máximo de absorbância em 560 nm. Visto que o PI e a rodamina B protonada apresentam máximo de absorbância no mesmo comprimento de onda, não é possível a determinação de Sb (V) através de seu PI diretamente na fase aquosa devido a interferência do corante.

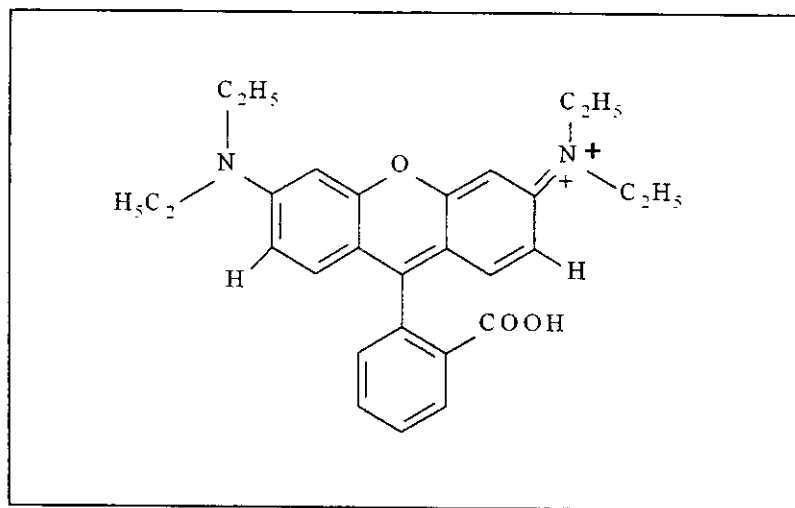
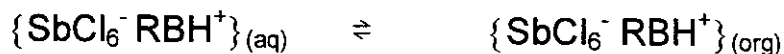
Desta forma é necessária a extração do par iônico para uma fase orgânica para posterior medida espectrofotométrica do Sb (V). Além disso, o PI sofre hidrólise na fase aquosa e decomposição na fase orgânica sendo necessário que a medida espectrofotométrica seja feita rapidamente.

### 5.2 – Formação do par iônico entre Sb (V) e rodamina B

As reações químicas que descrevem o processo de formação do hexacloroantimoniato e a posterior formação do PI com a rodamina B (RB) em solução aquosa estão representadas a seguir, bem como a estrutura da rodamina B na sua forma protonada na Figura 11.



A extração do PI é realizada mediante solvente extrator, onde se tem o seguinte equilíbrio de partição:



**Figura 11:** Estrutura molecular da rodamina B.

Espectros na região do visível foram registrados para uma solução de Rodamina B em meio de HCl 6 mol L<sup>-1</sup> e em meio aquoso para determinar o comprimento de onda de máxima absorção do corante. Os espectros de absorbância para uma solução de rodamina B de concentração 4,1x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> foram obtidos em meio aquoso e em meio ácido estão apresentados nas Figuras 12 e 13, respectivamente.

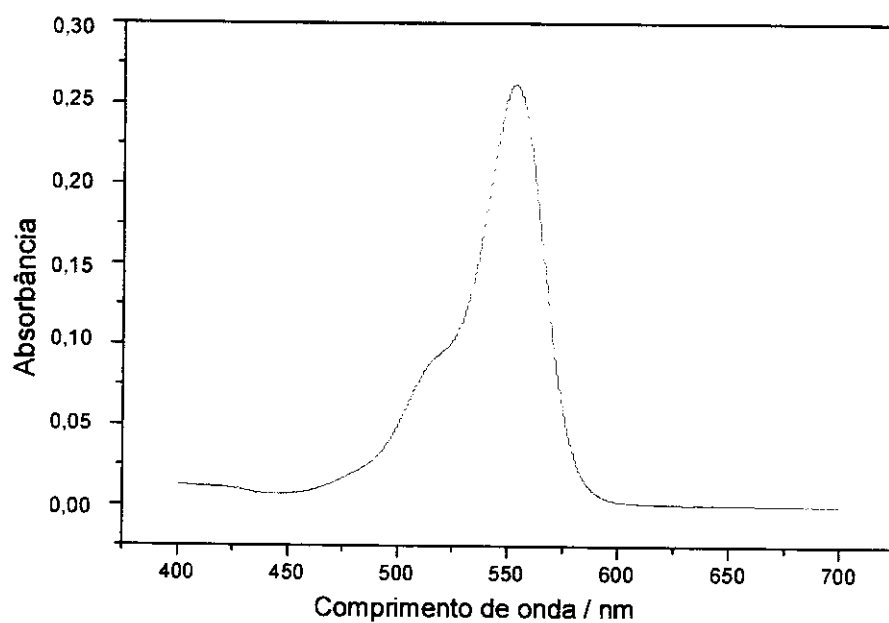


Figura 12: Espectro na região do visível de uma solução aquosa de Rodamina B de concentração  $4,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .

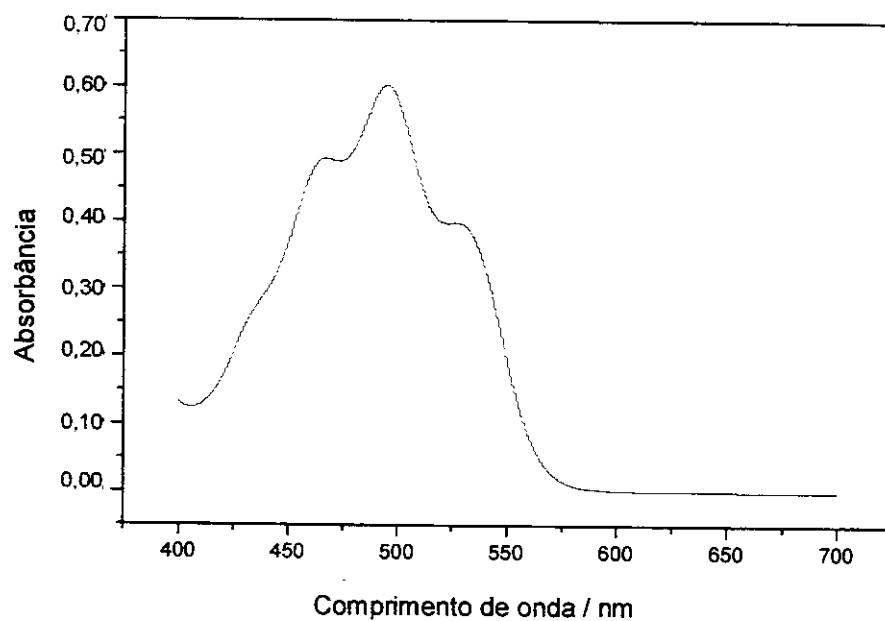
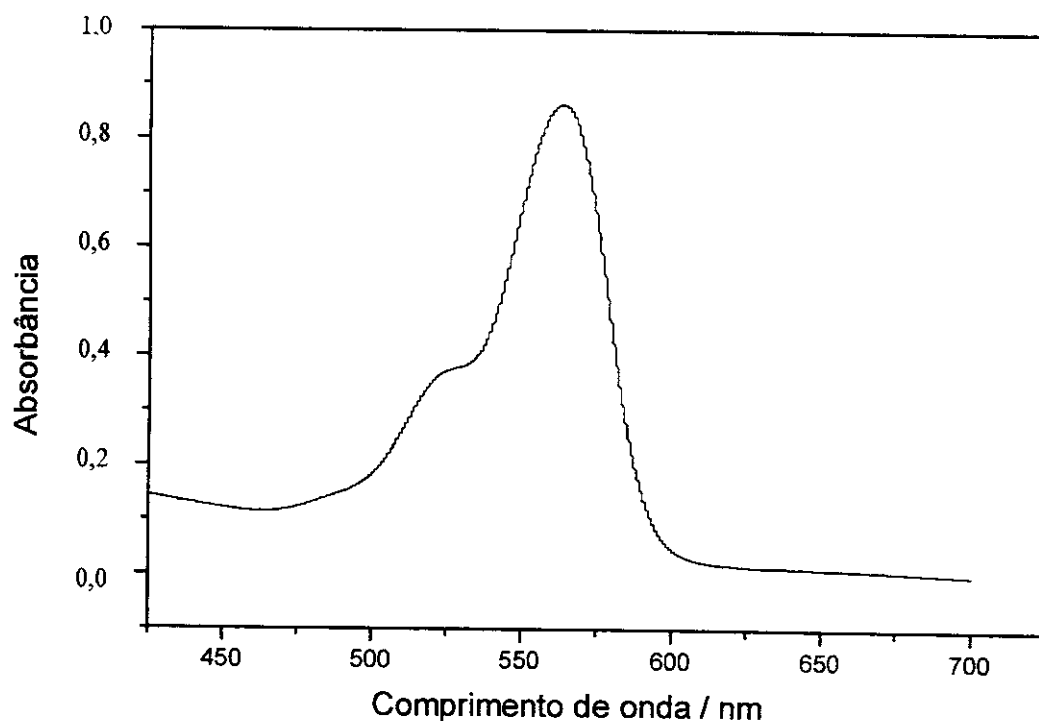


Figura 13: Espectro na região do visível de uma solução de Rodamina B de concentração  $4,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  em HCl  $6 \text{ mol L}^{-1}$ .

A rodamina B apresenta a característica de um indicador ácido-base, apresentando uma coloração alaranjada intensa em meio ácido e, em solução aquosa neutra, uma coloração rósea fluorescente. No espectro eletromagnético na região do visível, a Rodamina B apresenta uma banda intensa com absorção máxima em 560 nm em solução aquosa (Figura 13). Em solução de HCl 6 mol L<sup>-1</sup> podem ser observadas três bandas com máximos de absorbância em 465 nm, 494 nm e 523 nm (Figura 13).

O espectro no visível do par iônico extraído em tolueno apresenta uma banda intensa com máximo de absorbância em 563 nm, e uma banda menos intensa em 525 nm (Figura 14). Foi verificado que a rodamina B em água absorve no mesmo comprimento de onda do máximo de absorbância do PI (560 nm), o que impede a determinação de antimônio através do PI sem extração prévia para a fase orgânica. No espectro obtido em HCl 6 mol L<sup>-1</sup>, a banda de máximo comprimento de onda é deslocado para 500 nm e mesmo assim, ainda haverá interferência devido a sobreposição de bandas.



**Figura 14:** Espectro na região do visível do par iônico em tolueno.



### 5.3 - Estabilidade do par iônico

O hexacloroantimoniato reage com a rodamina B em meio fortemente ácido, formando um PI que pode ser extraído da fase aquosa com um solvente apolar.

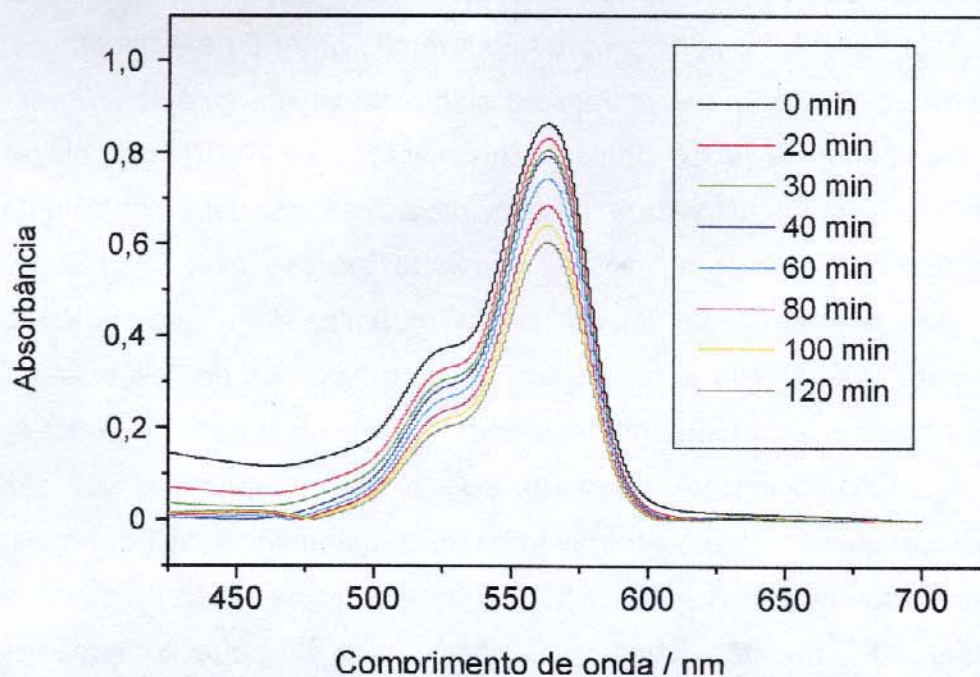
RAMETTE *et al.*, 1955, verificaram a partir de estudos realizados com a rodamina B em soluções de ácido clorídrico  $6 \text{ mol L}^{-1}$  que, além do íon  $\text{RBH}^+$ , coexistem em solução os íons  $\text{RBH}_2^{2+}$  e  $\text{RBH}_2\text{Cl}^+$ , onde RB representa a molécula de rodamina B. Os íons descritos anteriormente são importantes, pois também reagem com o hexacloroantimoniato formando, entretanto, produtos insolúveis, de coloração laranja, como o  $\text{RBH}_2(\text{SbCl}_6)_2$  e o  $\text{RBH}_2\text{ClSbCl}_6$ . Em  $\text{HCl } 6 \text{ mol L}^{-1}$  o principal produto formado entre o hexacloroantimoniato e o íon Rodamina B é o  $\text{RHSbCl}_6$  que promove a coloração violeta característica na fase orgânica e cuja absorvância é proporcional à concentração de Sb(V) em solução. No entanto, nesta elevada concentração ácida, o hexacloroantimoniato sofre hidrólise na fase aquosa em uma taxa de 1 % por minuto, formando as espécies  $\text{RBH}_2\text{Sb}(\text{OH})\text{Cl}_6$ ,  $\text{HSb}(\text{OH})\text{Cl}_5$ , que não formam o par iônico com a rodamina B, o que requer que a determinação do analito seja realizada em tempo controlado, sendo responsável pela baixa precisão observada nos métodos em batelada. Nos sistemas de análise por injeção em fluxo este problema é facilmente superado, pois a reação não necessita atingir o equilíbrio químico, visto que o tempo é controlado e constante em todas as determinações.

A reação com rodamina B é seletiva para o estado de oxidação pentavalente do antimônio, visto que o Sb (III) não forma o par iônico com o ligante cromogênico. No entanto, seria possível realizar a determinação de Sb total, mediante a introdução de uma etapa de oxidação do Sb (III) para Sb (V) no sistema. RAMETTE *et al.*, 1955 descrevem como a etapa crítica da formação do PI a conversão do Sb (III) para Sb (V), utilizando, para tanto, ácido clorídrico  $6 \text{ mol L}^{-1}$  e agentes oxidantes como Ce (IV), permanganato, dicromato, brometo ou hipoclorito, sendo estes últimos menos efetivos quando comparados à utilização de Ce (IV). Segundo os autores, após a oxidação do Sb (III) para Sb (V), se faz necessário a destruição do excesso do agente oxidante com hidroxilamina, uma vez que este acaba também oxidando a rodamina.

Para minimizar problemas relacionados à hidrólise do par iônica na fase aquosa e evitar a formação de sub-produtos insolúveis, uma solução padrão estoque de antimônio

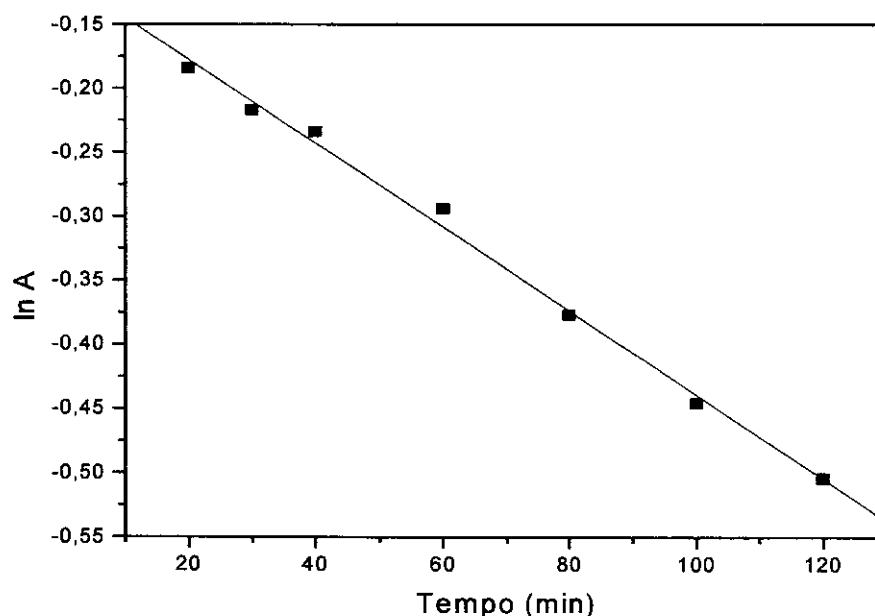
foi preparada apenas em água e as demais soluções padrões foram preparadas posteriormente pela diluição desta em ácido clorídrico  $6 \text{ mol L}^{-1}$  imediatamente antes de serem utilizadas.

Foi realizado um estudo para avaliação da estabilidade do PI no tolueno, mediante medidas espectrofotométricas em função do tempo. A Figura 15 mostra o comportamento de absorção do PI em função do tempo. Observa-se que a absorção diminui devido a instabilidade do PI na fase orgânica.



**Figura 15:** Espectros na região do visível em função do tempo para o PI (Sb (V) / rodamina B) em tolueno. Concentração de Sb (V):  $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e rodamina B:  $4,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .

A reação de decomposição do PI pode ser descrita como sendo de primeira ordem (Figura 16), cuja equação é  $\ln A = \ln A_0 - 0,00327s^{-1}$ , onde A: absorbância em 560 nm e  $A_0$ : absorbância no tempo zero.



**Figura 16:** Curva logarítmica da absorbância versus tempo para o PI em tolueno medida a 560 nm.

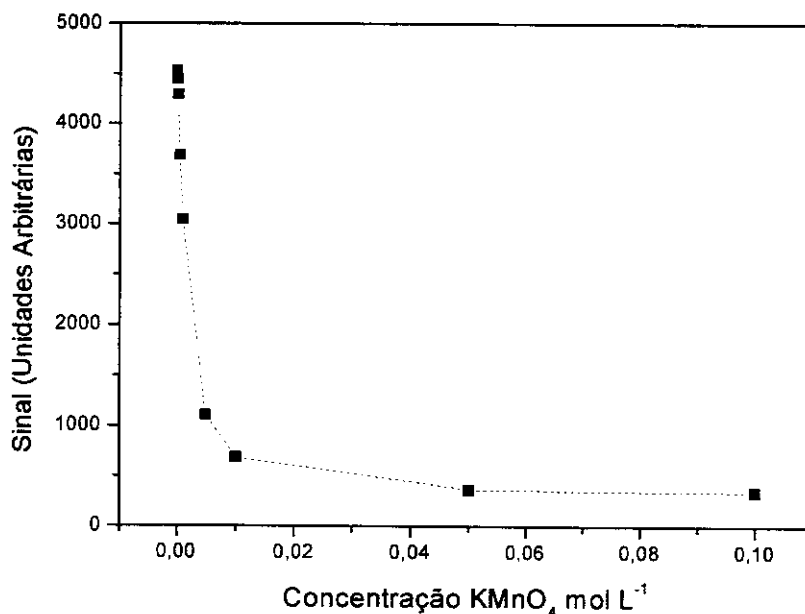
Os dados do gráfico representado na Figura 16 foram obtidos a partir do espectro da Figura 15. Esses resultados são importantes do ponto de vista analítico, pois demonstram a necessidade de se obter à medida espectrofotométrica em tempo definido, demonstrando a importância de se realizar as medidas espectrofotométricas em um sistema de fluxo.

#### 5.4 - Comportamento de resposta do detector

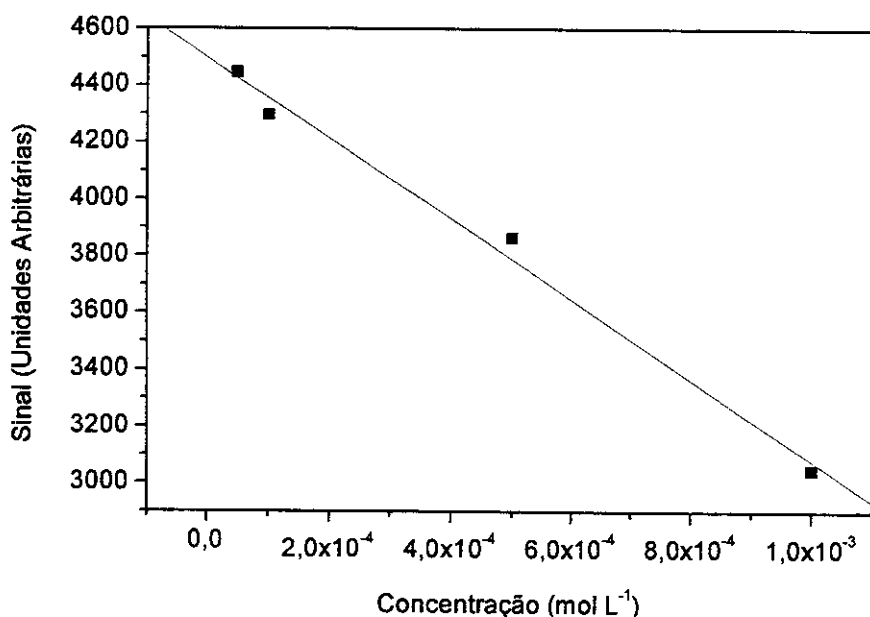
Um detector constituído por um LED e um fotodiodo foi empregado para detecção do sinal no sistema ELL-AF. Uma das principais vantagens em se utilizar este detector é a sua simplicidade<sup>84</sup>, o que permite facilmente seu acoplamento em um sistema de fluxo.

Para o estudo da faixa linear do detector LED-fotodiodo foram utilizadas soluções de  $\text{KMnO}_4$  na faixa de concentração de  $5 \times 10^{-5}$  a  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Determinações foram realizadas no sistema para verificar a faixa linear que poderia ser utilizada no desenvolvimento do método ELL-AF para extração de Sb (V). A Figura 17 mostra os sinais analíticos (unidades arbitrárias) obtidos em função da concentração de  $\text{KMnO}_4$ . A Figura

18 mostra a região linear de resposta compreendida entre  $5,0 \times 10^{-5}$  a  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> de permanganato representado pela equação descrita na página 59.



**Figura 17:** Curva do sinal analítico obtido em função de soluções de  $\text{KMnO}_4$  de concentrações na faixa de  $5 \times 10^{-5}$  a  $0,1$  mol L.

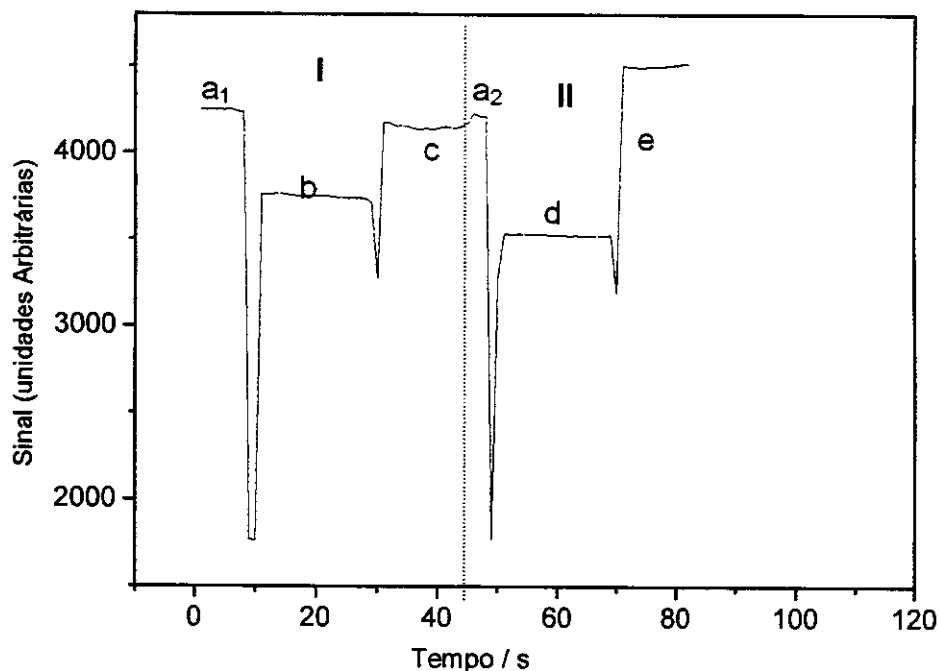


**Figura 18:** Região linear do detector LED/Fotodiodo para soluções de  $\text{KMnO}_4$  na faixa de concentração de  $5 \times 10^{-5}$  a  $0,1$  mol L<sup>-1</sup>.

O sistema de detecção apresentou resposta linear para a faixa de concentração de  $5 \times 10^{-5}$  à  $1 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, representada pela equação  $y = 4497,34 - 1,4178 \cdot 10^6 C$ , com coeficiente de regressão linear de 0,9954.

### 5.5 - Perfil do sinal analítico obtido no sistema de ELL-AF

O sinal característico obtido mediante o emprego do sistema ELL-AF é mostrado na Figura 19. A linha base representada pela letra "a" corresponde ao sinal gerado quando o caminho óptico está preenchido de ar, a região representada pela letra "b" corresponde a leitura obtida dos reagentes na fase orgânica (branco - tolueno), a letra "d" corresponde a leitura do sinal gerado pelo par iônico na fase orgânica com o analito (amostra), as letras "c" e "e" correspondem a leitura da fase aquosa ácida.



**Figura 19:** Perfil característico obtido na determinação de Sb (V) no sistema de ELL-AF.

Sinal I: a<sub>1</sub>: ar; b: branco (fase orgânica), a<sub>2</sub>: ar; c: fase aquosa. Sinal II: a: ar; d:

PI na fase orgânica - Sb (V) a  $4,1 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>; e: fase aquosa.

A diferença entre o sinal do branco e o sinal gerado pela amostra é proporcional à concentração do PI na fase orgânica e, conseqüentemente, à concentração de Sb (V) na fase aquosa.

A conversão do sinal obtido em transmitância para valores de absorbância pode ser realizada pela seguinte equação:

$$A = \log (M - ES) / (B - ES)$$

Onde, **A** = Absorbância no máximo de emissão do LED emissor, **M** = valor do sinal analítico do par iônico na fase orgânica, **B** = valor do sinal do branco (fase orgânica) e **ES** = valor zerado pelo detector no escuro ("dark").

## 5.6 - Variáveis que afetam o método de extração ELL – AF

No sistema de análise de extração líquido-líquido em fluxo proposto, as principais variáveis que afetam a eficiência de extração são: concentração de ácido clorídrico, razão entre as fases (volume da fase orgânica/volume da fase aquosa), concentração da Rodamina B, tempo de agitação e o tempo para separação de fases. Estas variáveis foram avaliadas mediante modelo univariado, partindo-se de alguns parâmetros iniciais pesquisados na determinação de Sb (V) em batelada e que estão apresentadas na Tabela 4 a seguir:

**Tabela 4:** Condições experimentais iniciais para determinação das variáveis no sistema de ELL-AF.

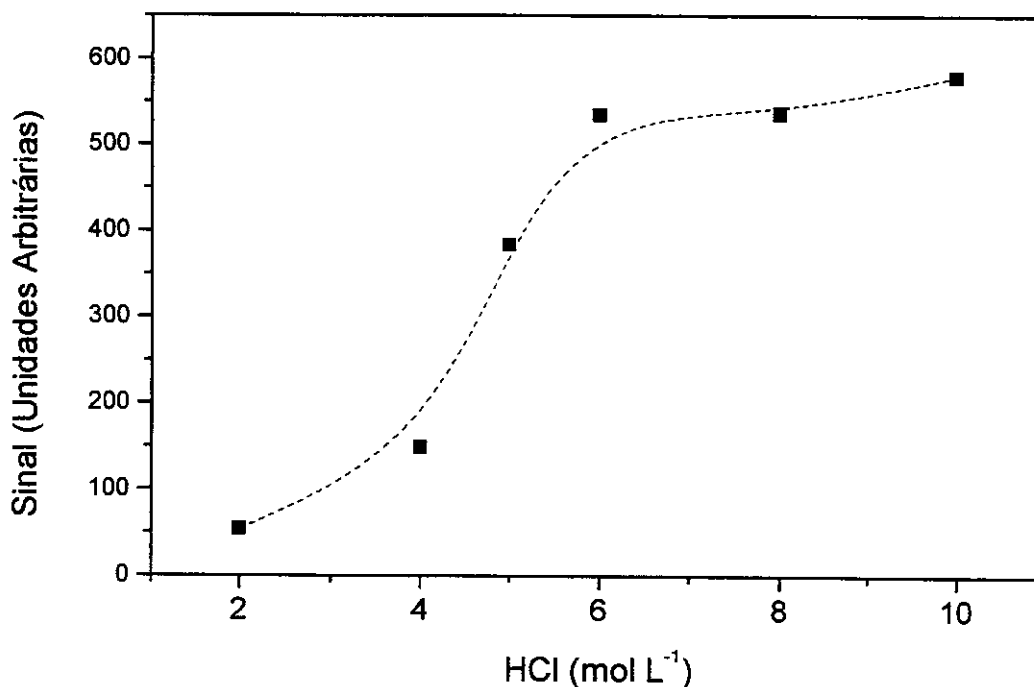
Parâmetros	Valores
• Volume da alça de amostragem	250 $\mu\text{L}$
• Volume da alça do corante	500 $\mu\text{L}$
• Volume do solvente extrator (tolueno)	1,5 mL
• Concentração de Rodamina B	$8,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$
• Concentração da solução estoque de Sb (V)*	$8,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$
• Tempo de agitação na câmara	60 s
• Tempo de separação de fases	20 s

\*A concentração de  $8,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  corresponde a uma solução de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  de Sb (V).

### 5.6.1 - Influência da concentração de HCl na formação e extração do no sistema ELL-AF

Para que ocorra a formação do PI, é necessário que o Sb (V) esteja na forma do íon  $\text{Sb}(\text{Cl})_6^-$  e a rodamina B deve estar protonada. Estas duas condições são atingidas em meio fortemente ácido.

Para avaliar a influência da concentração de ácido clorídrico na eficiência de extração do PI, foram avaliadas as seguintes concentrações de HCl: 2, 4, 5, 6, 8 e 10  $\text{mol L}^{-1}$  na solução padrão de Sb (V). Os resultados obtidos são apresentados na Figura 20.



**Figura 20:** Comportamento do sinal analítico em função da concentração de HCl. Concentração de Sb (V):  $2,05 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> em soluções de HCl 2, 4, 5, 6, 8 e 10 mol L<sup>-1</sup>, concentração da rodamina B  $4,1 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> em HCl 6 mol L<sup>-1</sup>, tempo de agitação na câmara: 60 s, razão de fases (aq/org): 0,5.

Analisando-se a curva apresentada na Figura 20, verifica-se que a eficiência máxima de extração do PI ocorre quando a concentração de HCl for maior ou igual a 6 mol L<sup>-1</sup>. Portanto, para os estudos posteriores foi empregada essa concentração.

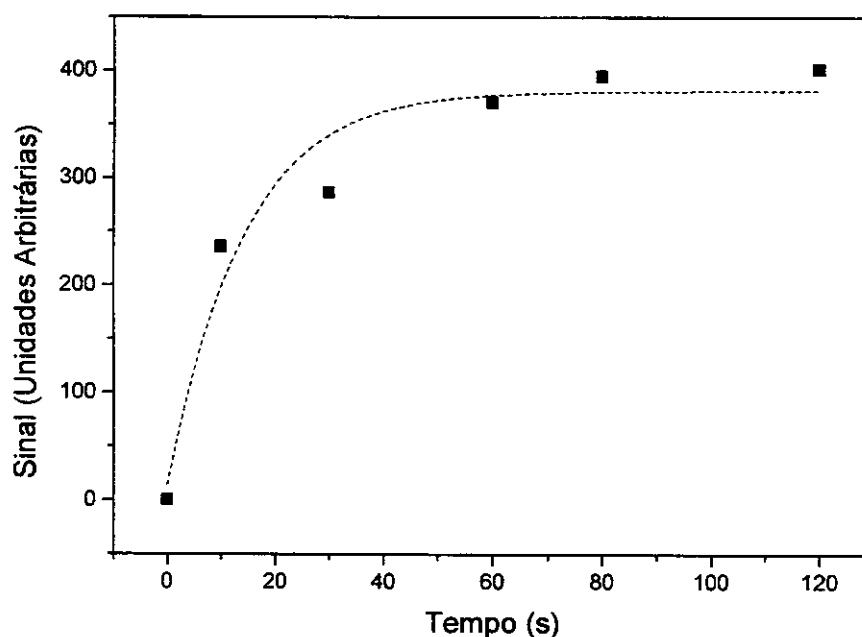
### 5.6.2 - Influência do tempo para separação de fases na extração de Sb (V) no método ELL-AF

No processo de extração líquido-líquido ocorre partição do analito entre duas fases imiscíveis aquosa e outra orgânica. A concentração das espécies nas duas fases após a extração é governada pelo coeficiente de distribuição (K). Após agitação do sistema é



necessário deixa-lo em repouso, por um tempo definido, para que o equilíbrio seja estabelecido e para que ocorra a completa separação de fases.

A razão de distribuição é importante, pois relaciona a concentração do analito na fase orgânica e na fase aquosa. Moléculas na forma não ionizadas ou de caráter apolar têm afinidade pela fase apolar e substâncias ionizadas ou polares têm maior afinidade pela fase polar. Estas reações de equilíbrio de substâncias entre as duas fases imiscíveis podem ser uma ferramenta importante na determinação de analitos por processos de extração líquido-líquido. Cabe ressaltar, que a eficiência da extração é independente da concentração original do analito. Para este estudo, o tempo para separação de fases foi variado entre 10 a 120 s. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 21.



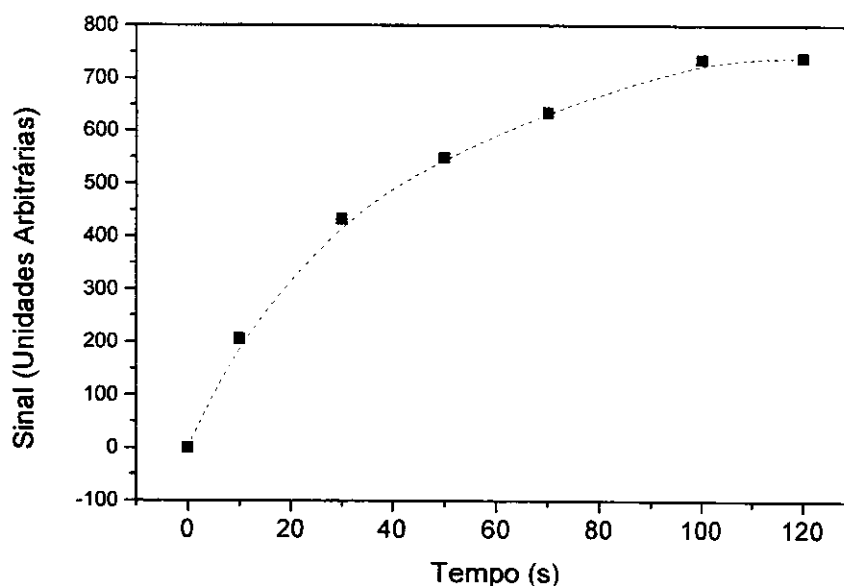
**Figura 21:** Comportamento do sinal analítico em função do tempo de equilíbrio após extração do PI. Concentração de Sb (V):  $2,05 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> em solução de HCl 6 mol L<sup>-1</sup>, concentração da rodamina B:  $4,1 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> em HCl 6 mol L<sup>-1</sup>, tempo de agitação: 60 s, razão de fases (aq/org): 0,5.

De acordo com a curva da Figura 21, após 60 s o sinal atinge um valor máximo, evidenciando que o equilíbrio foi atingido e que a concentração nas duas fases passa a ser constante. Para estudos posteriores foi estabelecido como tempo para a separação de

fases de 80 s. Tempos maiores do que 80 s não são adequados, pois comprometem a frequência analítica e podem permitir a hidrólise do Sb (V).

### 5.6.3 - Tempo de agitação sobre a eficiência de extração

A eficiência de extração depende do tempo e da velocidade de agitação na câmara de extração. A agitação promove um contato íntimo entre as fases proporcionando portanto, uma maior velocidade de transferência do PI da fase aquosa para a fase orgânica. Para estudar o efeito do tempo de agitação sobre a eficiência de extração, foram avaliados os seguintes tempos: 10, 30, 50, 70, 100 e 120 s. A velocidade de agitação foi mantida constante e no maior valor permitido pelo agitador magnético empregado. A partir da Figura 22 pode-se observar que o sinal analítico aumenta em função do tempo de agitação até um tempo de 100 s, quando então passa a ser independente do mesmo. Para estudos posteriores foi definido um tempo de agitação de 100 s para a extração do Sb (V) na forma do PI.



**Figura 22:** Comportamento do sinal analítico em função do tempo de agitação na câmara de extração no sistema ELL-AF. Concentração de Sb (V):  $2,05 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> em solução de HCl 6 mol L<sup>-1</sup>, concentração da rodamina B:  $4,1 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> em HCl 6 mol L<sup>-1</sup>, tempo de separação de fases: 80 s, razão de fases (aq/org): 0,5.

#### 5.6.4 - Influência da razão volumétrica das fases sobre a eficiência de extração

A eficiência da extração líquido-líquido ( $\eta$ ) depende do coeficiente de partição ( $K$ ) e da razão de fases ( $\beta$ ), conforme equação (1).

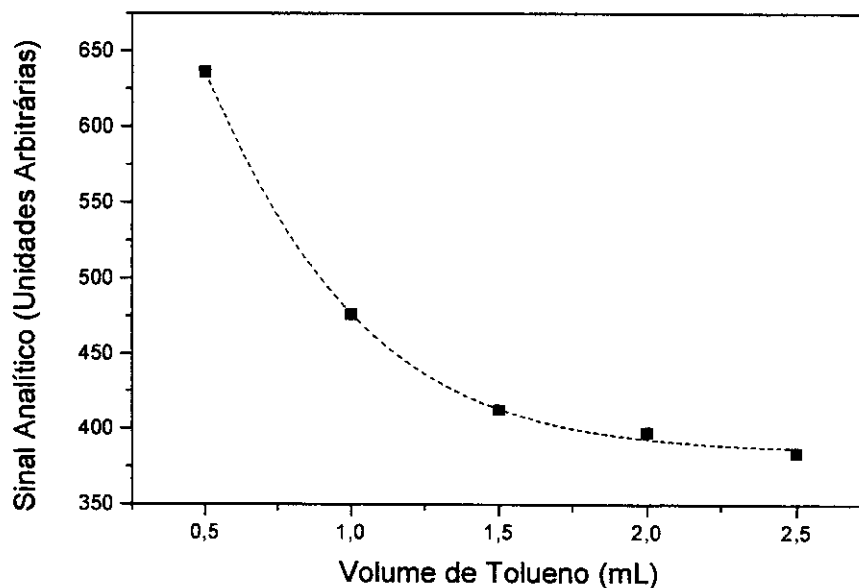
$$\eta = K/(K + \beta) \quad (1)$$

A razão de fases pode ser descrita pela equação (2), onde  $V_{org}$  é o volume da fase extratora (solvente orgânico) e  $V_{aq}$  o volume da fase a ser extraída (aquosa).

$$\beta = V_{aq}/V_{org} \quad (2)$$

O coeficiente de partição depende basicamente das propriedades físico-químicas do solvente, da polaridade do analito, da temperatura e da força iônica do meio. Embora, a diminuição da razão de fases, ou seja, o aumento do volume extrator em relação à fase aquosa, propicie um ganho na eficiência de extração, ocorre diluição do analito na fase extratora e, conseqüentemente, uma diminuição na sensibilidade do método. Quando existe a necessidade da determinação do analito em concentrações muito baixas, faz-se necessário a pré-concentração do analito e, neste caso, é recomendado empregar volumes grandes da solução a ser extraída e um volume pequeno da solução extratora. Ainda, para obter um ganho de sensibilidade do método podem ser realizadas extrações múltiplas. Cabe ressaltar, que devido à concentração elevada de Sb (V) no medicamento a ser analisado, não há necessidade da realização de extrações sucessivas ou etapas de pré-concentração.

Neste estudo foi empregada uma câmara de extração de capacidade de 5 mL e o volume da solução aquosa a ser extraída foi fixada em 0,75 mL. Os volumes da fase orgânica (tolueno) foram variados em 0,5; 1; 1,5; 2,0; e 2,5 mL, representando uma razão de fases de 1,50; 0,75; 0,50; 0,38 e 0,30, respectivamente. A variação do sinal analítico em função da fase orgânica é apresentada na Figura 23.



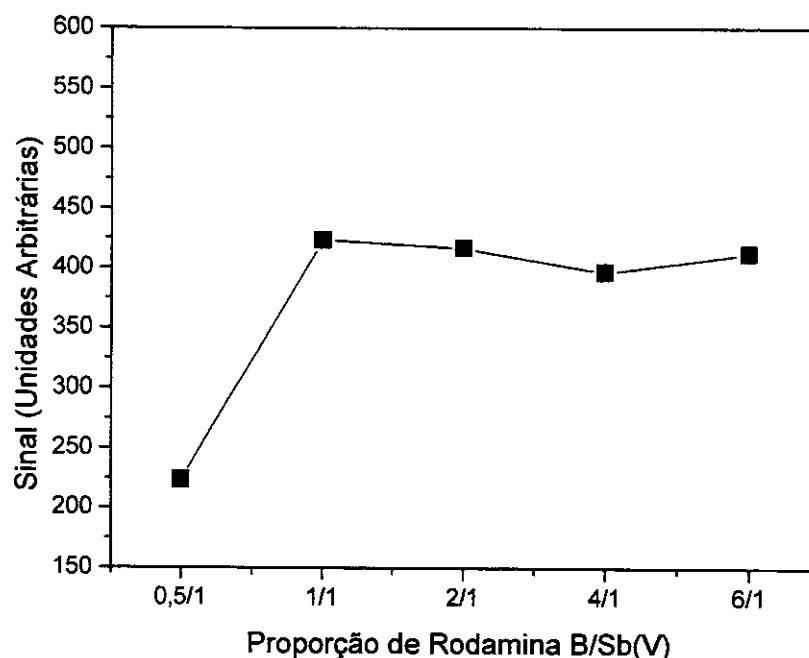
**Figura 23:** Comportamento do sinal analítico em função do volume da fase orgânica empregada no sistema de ELL-AF. Concentração de Sb (V):  $2,05 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> em solução de HCl 6 mol L<sup>-1</sup>, concentração da rodamina B:  $4,1 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> em HCl 6 mol L<sup>-1</sup>, tempo de extração sob agitação: 60 s, tempo de separação de fases: 80 s.

Analisando-se a curva apresentada na Figura 23 verifica-se que o sinal analítico diminui com o aumento do volume de tolueno, ou seja, diminui com a diminuição dos valores das razões de fases calculadas. Tendo em vista que não é necessário a pré-concentração do analito, foi definido como faixa adequada para extração do PI, uma razão volumétrica das fases no intervalo de 1,50 a 0,75, o que corresponde para um volume de 0,75 mL de fase aquosa de 0,5 e 1,0 mL de tolueno, respectivamente. Volumes maiores afetam a sensibilidade e volumes menores do solvente extrator levam a uma diminuição da faixa linear da curva analítica, visto que a partir de concentrações de Sb (V) maiores que

$5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  foi observado desvio da lei de Beer para o sistema de detecção empregado no sistema proposto.

### 5.6.5 – Influência da concentração da rodamina na formação e PI

RAMETTE *et al.*, 1955, verificaram que a estequiometria para formação do par iônico é de 1:1 e, para a formação do PI na fase aquosa é necessário que o reagente par iônico (rodamina B) esteja em excesso em relação à concentração de Sb (V) em meio ácido. Sendo assim, foi estudada a influência da concentração de rodamina B na formação do PI. Para tanto, foram empregadas as seguintes proporções de rodamina B /Sb (V): 0,5/1; 1/1; 2/1; 4/1 e 6/1. A concentração de Sb (V) foi fixada em  $4,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 24.



**Figura 24:** Comportamento do sinal analítico referente ao estudo da concentração ótima de Rodamina B para formação e extração do PI. Concentração de Sb (V):  $4,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  em solução de HCl  $6 \text{ mol L}^{-1}$ , concentrações de Rodamina B em solução de HCl  $6 \text{ mol L}^{-1}$ :  $2,05 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $4,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $8,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $1,65 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $2,45 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , tempo de agitação na câmara: 100 s, volume de solvente: 1 mL; tempo de separação de fases: 80 s.

De acordo a Figura 24, verifica-se que o sinal analítico aumenta em função do aumento da razão de rodamina B/ Sb (V) até uma razão de 1/1, quando então o sinal analítico passa a independe desta razão. Estes resultados indicam que, o PI monitorado no comprimento de onda de 560 nm, possui uma estequiometria rodamina B:Sb (V) de 1:1. Ainda, foi verificado que o excesso de rodamina B em relação a concentração de Sb (V) não interfere na determinação, ou seja, no meio ácido não há transferência do composto da fase aquosa para a fase orgânica.

### 5.7 - Estudo de interferentes

Nos últimos anos foi verificada a contaminação do antimoniato de metilglucamina com diversos elementos entre esses, Sb (III), As, e Pb (KEPPLER *et al.*, 2001), sendo que, por este motivo, vários lotes do medicamento foram retirados do mercado nacional pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde do Brasil.

Com base nesta observação foram selecionados para o estudo de interferentes os íons Sb (III), As (III), As (V) e Pb (II). Estes íons foram adicionados a solução de Sb (V) de concentração de  $2,73 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> na proporção de 1 e 10% (n/n) em relação a concentração da solução de Sb (V); o que corresponde a uma concentração de  $2,73 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> e  $2,73 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> dos respectivos íons em cada solução padrão analisada. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5:** Resultados da influência do interferente na determinação de Sb (V).

Interferente	Concentração Interferente <sup>a</sup>	Concentração Sb (V) ( $\times 10^{-4}$ mol L <sup>-1</sup> )	Concentração Sb (V) recuperada $\pm$ s ( $\times 10^{-4}$ mol L <sup>-1</sup> )	Erro relativo (%)
Sb (III)	1%*	2,73	2,81 $\pm$ 0,03	2,9
	10%*	2,73	2,79 $\pm$ 0,05	2,2
As (III)	1%	2,73	2,61 $\pm$ 0,08	-4,4
	10%	2,73	2,78 $\pm$ 0,05	1,8
As (V)	1%	2,73	3,10 $\pm$ 0,03	13,6
	10%	2,73	3,86 $\pm$ 0,04	40,1
Pb (II)	1%	2,73	2,85 $\pm$ 0,02	4,4
	10%	2,73	2,66 $\pm$ 0,01	-2,6

a: Relação da concentração do interferente em relação à concentração de Sb (V).

\*1% =  $2,73 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>

\*\*10% =  $2,73 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>

s: estimativa do desvio padrão (n=3).

Pelos resultados obtidos verifica-se que o Sb (III), As (III) e Pb (II) praticamente não causam interferência significativa na determinação de Sb (V) até uma proporção de 10 % do interferente em relação a concentração do analito. No entanto, o As (V) provoca um aumento do sinal analítico do Sb (V), já para uma relação de 1 % do elemento em relação ao analito. A interferência do As (V) na determinação do Sb (V) pode ser decorrente de uma possível interação do arsênio pentavalente com a rodamina B, visto que o erro observado é superior a 13% e devidos aos dois elementos Sb (V) e As (V) possuírem propriedades químicas semelhantes.

Apesar da interferência do As (V) no método de extração ELL-AF, não foi observado em medicamentos comerciais (KEPPLER *et al.*, 2001) a concentração deste elemento que ultrapasse a relação de 0,1 % em relação a concentração de Sb (V). Portanto, a presença

deste elemento, embora tenha consequências toxicológicas relevantes, não acaba sendo um interferente potencial para o método.

## 5.8 Estudo do efeito matriz

Foi verificado por KEPLER *et al.*, 2002<sup>89</sup> através da técnica de espectrometria de massas em tandem (MS/MS), mediante ionização por eletrospray, que a solução injetável do antimoniato de metilglucamina é composta por várias espécies complexas de antimônio em solução, cujas estruturas podem envolver mais de um átomo de antimônio. A composição e a massa molar das espécies de maior importância são SbGlu ( $C_7H_{15}O_5N$ )Sb ( $m/z$  314), SbGlu<sub>2</sub> ( $C_{14}H_{30}O_{10}N_2$ )Sb ( $m/z$  507), Sb<sub>2</sub>Glu<sub>3</sub> ( $C_{21}H_{45}O_{15}N_3$ )Sb<sub>2</sub> ( $m/z$  818) e Sb<sub>3</sub>Glu<sub>4</sub> ( $C_{28}H_{60}O_{20}N_4$ )Sb<sub>3</sub> ( $m/z$  1129), onde Glu: metilglucamina. O método proposto por KEPLER *et al.*, 2001 para a determinação de Sb(V) por FIA através da redução com iodeto e quantificação do iodo gerado requer uma etapa prévia de preparo de amostra com energia ultra-som para liberar o Sb (V) do antimoniato de metilglucamina.

A produção do ultra-som é um fenômeno físico baseado no processo de criar, aumentar e implodir cavidades de vapor e gases, denominado cavitação, em um líquido promovendo efeitos de ativação em reações químicas. Relata-se que a temperatura de implosão no interior da cavidade é em média 2400°C e pressão é estimada em torno de 500 atm. Esses valores são alcançados em pontos localizados por período de tempo muito curto, durante a implosão da cavidade, provocando assim um efeito não usual em reações químicas. Transformações químicas podem ocorrer devido à interação da radiação com a matéria. A exposição prolongada de soluções contendo macromoléculas em ultra-som de alta energia ( $>10\text{ W cm}^{-2}$ ) produz redução permanente na viscosidade da solução. Esta degradação é devida ao aumento das forças de fricção desenvolvidas entre o rápido movimento das moléculas grandes e com menor mobilidade. Sugere-se que a degradação pode ser causada por forças hidrodinâmicas, tensão de cisalhamento ou efeito térmico.

Para avaliar, se também no método de ELL-AF, a liberação do antimônio da molécula orgânica é necessária foi verificado o efeito do ultra-som (55 kHz) na



determinação de Sb (V) no antimoniato de metilglucamina. Para tanto, foram realizados estudos de recuperação, mediante fortificação de dois diferentes medicamentos de antimoniato de metilglucamina com e sem o emprego de ultra-som em dois níveis de fortificação (procedimento descrito no item 4.3.9 da parte experimental). Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6:** Recuperação média de Sb (V) em amostras comerciais de antimoniato de N-metilglucamina por ELL-AF.

Energia Ultra-som (55 kHz)	Recuperação média de Sb (V) $\pm$ s (%)	
	Amostra A*	Amostra B**
Sim	97 $\pm$ 1	92 $\pm$ 1
Não	39 $\pm$ 2	72 $\pm$ 4

s: estimativa do desvio padrão (n=3).

\*Amostra A:  $2,43 \cdot 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de Sb (V) +  $1,62 \cdot 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de antimoniato de metilglucamina.

\*\*Amostra B:  $1,21 \cdot 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de Sb (V) +  $2,83 \cdot 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de antimoniato de metilglucamina.

Através deste estudo verifica-se que a energia ultra-som favorece a liberação do Sb (V) do composto orgânico, uma vez que foi encontrada uma recuperação de 97 e 92% para os dois níveis de fortificação. Sem a exposição da amostra à energia ultra-som, a recuperação foi bastante inferior e não adequada para fins analíticos. Esses resultados sugerem que apenas o Sb (V) livre reage com a rodamina B formando o PI.

Cabe destacar, que o teste de recuperação é um parâmetro de validação, que pode ser empregado para avaliar a exatidão do método.

## 5.9 – Validação do método

Uma vez estabelecidas as condições ótimas do método analítico proposto para a determinação de Sb (V), através da formação do PI com rodamina, e extração do PI no sistema ELL-AF, elaborou-se o protocolo de validação.

A qualidade e a credibilidade de um resultado analítico fundamentam-se nos cuidados com os quais o analista se cerca para produzir dados que expressem o valor real da medida obtida. O primeiro passo para obtenção de um resultado confiável está na validação do método analítico. A validação do método ELL-AF foi realizada segundo as recomendações do ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 1994)<sup>85</sup>. Os parâmetros selecionados para a validação do método compreendem: faixa linear, linearidade, sensibilidade, repetibilidade, seletividade, limite de detecção, limite de determinação e exatidão.

As condições analíticas empregadas no sistema ELL-AF para a validação do método proposto estão resumidas na Tabela 7.

**Tabela 7:** Parâmetros utilizados na obtenção da curva analítica para o Sb (V).

Parâmetros	Valores
• Volume do analito	150 $\mu\text{L}$
• Volume da alça de amostragem do corante	900 $\mu\text{L}$
• Volume de solvente orgânico (tolueno)	1 mL
• Concentração de Rodamina B em HCl 6 mol L <sup>-1</sup>	8,2x10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup>
• Concentração da solução estoque de Sb (V)	8,2x10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup>
• Concentração da Solução de Ácido Clorídrico	6 mol L <sup>-1</sup>
• Tempo de Agitação	100 s
• Tempo de Separação de Fases	80 s

A razão de fases foi mantida em 1, ou seja, volumes iguais de fase aquosa e fase extratora.

### 5.9.1 - Faixa linear

A faixa linear é definida como a faixa de concentração onde a sensibilidade do método, pode ser mantida constante. Esse parâmetro é avaliado pela curva analítica, a qual está apresentada na Figura 25.

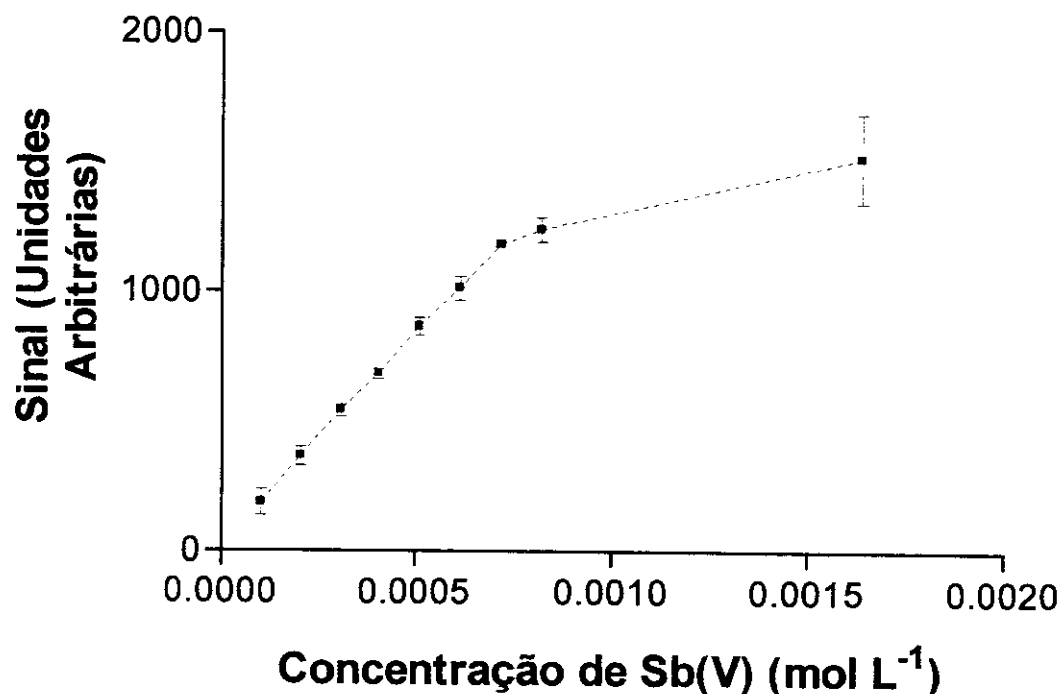


Figura 25: Curva analítica obtida para Sb (V) no sistema de ELL-AF. As condições empregadas estão descritas na Tabela 7.

A faixa linear da curva analítica representada na Figura 25 pode ser descrita pela seguinte equação:  $\text{Sinal (u.a.)} = 32,81 + 1,61 \times 10^6 C$ , onde  $C$  é a concentração de Sb (V) em  $\text{mol L}^{-1}$ . O intervalo de confiança para o coeficiente linear e angular ( $P < 0,05$ ) é de 7,50 e  $16,40 \times 10^3$ , respectivamente. A estimativa do desvio padrão da curva é 15,39.

Nas condições experimentais estabelecidas, a faixa linear é  $7,0 \times 10^{-5}$  a  $7,2 \times 10^{-4}$   $\text{mol L}^{-1}$  de Sb (V).

### 5.9.2 – Linearidade

A linearidade é determinada pela habilidade do método em fornecer resultados que são diretamente proporcionais a concentração ou quantidade do analito dentro da faixa linear da curva analítica (ICH, 1994). Para expressar a linearidade do método é empregado o coeficiente de correlação da curva analítica (obtido em 4.7.1), o qual foi calculado em 0,9989.

### 5.9.3 - Sensibilidade

A sensibilidade é um parâmetro que descreve como a resposta varia em função da variação da concentração do analito (ICH, 1994). Pode ser expressa pelo coeficiente angular da reta obtida a partir da regressão linear da curva analítica. Para a curva analítica obtida em 4.7.1 a sensibilidade foi calculada em  $(1,61 \cdot 10^6 \pm 2)$  u.a. L mol<sup>-1</sup>, para (P<0,05).

### 5.9.4 – Repetibilidade

A repetibilidade é definida através da determinação de como os resultados independentes são obtidos utilizando o mesmo método, para análise da mesma amostra, no mesmo laboratório, pelo mesmo analista, utilizando o mesmo equipamento, em um curto espaço de tempo. Esse parâmetro de validação é expresso pelo desvio padrão das determinações (ICH, 1994). Para tanto, uma mesma amostra contendo uma concentração de Sb (V) de  $4,1 \cdot 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> foi analisada em um mesmo dia por 5 vezes consecutivas (n= 5), e o desvio padrão relativo foi de 3,5 %.

### 5.9.5 - Seletividade

A seletividade é a capacidade de um método detectar o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz. Para determinar a seletividade de um método, o analito, a matriz com e sem o analito, as impurezas provenientes da matéria-prima ou do processo, subprodutos, produtos de degradação ou metabólitos, devem ser avaliados para

verificar se interferem ou não com o sinal analítico (ICH, 1994). Esse estudo foi realizado na avaliação de interferentes (item 5.7) onde se verificou que o método carece de seletividade na presença de concentrações de arsênio em torno de 1 % em relação a concentração de Sb (V).

#### 5.9.6 - Limite de detecção

O limite de detecção (LOD) é a menor concentração do analito em uma amostra, que pode ser diferenciado do sinal de fundo (ruído) do instrumento utilizado para medida. De modo geral, para análises espectrométricas e cromatográficas, é determinado pela razão sinal/ruído igual a 2 ou 3. Pode também ser calculado a partir da curva analítica ( $LOD = k s_{y/x}/m$ ; onde  $k$ =constante igual a 3,  $S_{y/x}$  estimativa do desvio padrão da curva e  $m$  o coeficiente angular da curva analítica - ICH, 1994).

No presente trabalho, o LOD foi calculado a partir da curva analítica, construída a partir de 21 pontos, tendo sido estabelecido um valor para o LOD de  $2,9 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> de Sb (V).

#### 5.9.7 - Limite de determinação

O limite de determinação ou quantificação (LOQ) é definido como o nível mínimo que o analito pode ser medido com exatidão e precisão. De modo geral é considerado como o nível de concentração determinado por um sinal que exceda dez vezes o desvio padrão relativo do ruído ou do ruído observado para o branco. Igualmente ao limite de detecção, pode também ser calculado a partir da curva analítica ( $LOQ = k s_{y/x}/m$ ; onde  $k$ = constante igual a 10,  $s_{y/x}$  estimativa do desvio padrão da curva e  $m$  o coeficiente angular da curva analítica- ICH, 1994).

O LOQ também foi determinado a partir da curva analítica e levando em consideração de que a amostra do medicamento é diluída 1:1 (v/v) com HCl no preparo de amostra, o LOQ foi calculado em  $9,6 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> de Sb (V).

### 5.9.8 Exatidão

O termo exatidão expressa como os resultados obtidos a partir de um método se aproximam do valor verdadeiro. Pode ser determinado: (i) por comparação dos resultados obtidos pelo novo método com os obtidos por um método de referência; (ii) por análise de material de referência certificado; (iii) por adição de padrão ou (iv) através de testes de recuperação.

Um dos principais problemas relacionados ao medicamento antimoniato de metilglucamina é a falta de um padrão que permita avaliar a qualidade do produto, visto que a estrutura do composto ainda não é totalmente conhecida. As indústrias têm-se preocupado apenas com a determinação do teor de antimônio total, relegando a especiação do elemento, bem como a identificação de contaminantes. Esses fatos são bem evidentes quando se acompanha o número elevado de lotes de antimoniato de metilglucamina que têm sido retirados do mercado pela ANVISA nestes últimos anos.

Tendo em vista que não existe disponível um padrão de identidade e qualidade do medicamento, bem como material de referência adequado, a exatidão foi avaliada mediante comparação de resultados obtidos na análise de medicamentos pelo método proposto com os obtidos por ICP-OES e polarografia. Cabe destacar, que mediante o emprego do ICP-OES apenas é possível a determinação de antimônio total e, portanto, a polarografia de pulso diferencial foi empregada para determinação de Sb (III). O Sb (V) não é eletroativo no eletrodo de mercúrio. A diferença entre o Sb total e o Sb (III) forneceu o valor do Sb (V) presente nas amostras de medicamento, e foram utilizados na validação do método de ELL-AF proposto. A Tabela 8 apresenta os resultados de Sb (V) referentes às técnicas de ELL-AF e OES-ICP (antimônio total) e polarografia (Sb (III)).

**Tabela 8:** Resultados obtidos para os medicamentos anti-leishmanióticos comerciais pelo sistema de ELL-AF e ICP-OES (antimônio total) e Polarografia de Pulso Diferencial [Sb (III)].

Amostra (n=8)	Valor médio de Sb (V) $\pm$ s Diferença entre ICP-OES e Polarografia (mg mL <sup>-1</sup> )	ELL-AF Teor médio de Sb (V) $\pm$ s (mg mL <sup>-1</sup> )
1	109 $\pm$ 6	110 $\pm$ 2
2	114 $\pm$ 6	108 $\pm$ 2
3	94 $\pm$ 5	93 $\pm$ 1
4	85 $\pm$ 4	89 $\pm$ 1
5	112 $\pm$ 5	112 $\pm$ 1
6	121 $\pm$ 6	100 $\pm$ 2
7	104 $\pm$ 5	105 $\pm$ 5
8	102 $\pm$ 5	98 $\pm$ 3

ELL-AF: Extração Líquido-Líquido em sistema mecanizado em análise em fluxo;  
ICP-OES: Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Acoplado Indutivamente.  
s: estimativa do desvio padrão (n=3).

Antimoniato de metilglucamina (valor nominal declarado) por ampola: 85 mg mL<sup>-1</sup>

Através do teste "t" pareado verifica-se que não existe diferença significativa, a um nível de confiança de 95%, entre as concentrações de antimônio pentavalente determinados pelos métodos ICP-OES e polarografia e o método proposto (ELL-AF), ou seja, as diferenças entre as médias obtidas são consequência apenas da presença de erros aleatórios. Cabe ressaltar que ambas metodologias, ICP-OES e polarografia, foram previamente validadas mediante emprego de soluções padrões certificadas Aldrich (item 4.1 - Reagentes e Soluções). O teor de antimônio total foi determinado por ICP-OES, onde



foi verificado que esse método também é adequado para a quantificação de antimônio no fármaco.

### **5.10 – Eficiência de extração do procedimento em fluxo comparado com o procedimento em batelada na determinação de Sb (V)**

Foram realizados procedimentos de extração líquido-líquido em batelada para verificar a eficiência de extração do método para determinação de Sb (V) empregando o sistema de ELL-AF. Os experimentos foram realizados em duplicata com a análise de três soluções de Sb (V) de concentração conhecida. O procedimento empregado está descrito no item 3.3.11 da parte experimental. A fase orgânica (tolueno) contendo o PI foi injetada no sistema ELL-AF para aquisição do sinal analítico no mesmo caminho óptico do procedimento em fluxo. Tendo em vista, que no sistema ELL-AF foi empregada extração única, também os procedimentos em batelada foram realizados apenas com uma única extração da fase aquosa com tolueno. A razão de fases foi mantida constante para os dois estudos.

O resultado obtido indica uma eficiência de extração de 50,5 % para análise de três soluções em duplicata com um desvio padrão de 7,7%. O alto valor do desvio padrão calculado pode ser atribuído a uma repetibilidade baixa do método de extração em batelada, devido as reações de hidrólise e as diversas operações unitárias realizadas pelo analista.

## ***6. Conclusões***

---

## 6 - Conclusões

O método de extração líquido-líquido em análise em fluxo (ELL-AF) proposto é adequado para a determinação de Sb (V) em medicamentos anti-leishmanióticos a base de antimoniato de metilglucamina.

O sistema miniaturizado proposto permite o controle de todas as etapas referentes a extração por solvente como: (i) mistura efetiva entre as fases orgânica e aquosa, (ii) separação de fases, (iii) detecção do analito na fase orgânica de forma reprodutível e em escala menor quando comparado com o método clássico em batelada.

A mecanização do método de extração líquido-líquido em batelada para extração em menor escala permite ganhos significativos na extração do Sb (V) com rodamina B em meio ácido, ganhos devido a redução do uso de solventes orgânicos e geração de resíduos, menor tempo de análise, frequência analítica satisfatória, menor contato do analista químico com os reagentes e com vidrarias, menor custo quando comparados, por exemplo, com técnicas analíticas hifenadas, além de minimizar erros provenientes do analista durante o processo de extração.

Num processo de extração líquido-líquido em batelada, etapas como a agitação manual do funil de separação para extração do analito de interesse, retirada da fase orgânica do funil de separação, a adição de uma alíquota em uma cubeta de quartzo para a determinação espectrofotométrica e o descarte da alíquota após análise são necessárias. Muitas vezes, o uso de solventes orgânicos voláteis e perigosos inviabiliza ou dificulta a extração em batelada de algumas espécies químicas de interesse, pois ocorre a necessidade de realizar as operações em ambientes adequados para a realização do processo como capelas com exaustão e a utilização de equipamentos de segurança como luvas e máscaras de proteção. Todas as etapas citadas anteriormente se não puderem ser excluídas poderão ser minimizadas em processos mecanizados de extração líquido-líquido.

O método proposto atende a demanda atual de redução em relação a custos, processos mais simples, geração de resíduos e manutenção dos recursos naturais, muito importantes em todas as áreas do conhecimento humano (exatas, biológicas e humanas). Atualmente, todo o conhecimento interdisciplinar acumulado entre as diferentes áreas do

conhecimento acadêmico deve ser aplicado para a melhoria dos processos, resultados e manutenção dos recursos para as futuras gerações. Partindo das premissas anteriores, o objetivo do trabalho proposto atende as necessidades atuais de melhoria dos processos analíticos, com objetivo de simplificar, minimizar e melhorar os processos de extração em batelada, utilizando a mecanização e os conhecimentos das seguintes áreas: química, eletrônica e programação para atingir o objetivo proposto.

O método desenvolvido é viável para ser aplicada no Controle de Qualidade de Medicamentos em Indústrias Farmacêuticas. Há de se considerar que para a implementação de um método como o proposto, os conhecimentos em química, eletrônica e programação são indispensáveis na resolução de problemas. Este é o principal fator que dificulta a utilização dos sistemas mecanizados na indústria e mostra o abismo que existe entre o número de artigos publicados em análise em fluxo nas revistas especializadas e a real utilização no cotidiano da indústria, pois a interdisciplinaridade é facilmente encontrada nos meios acadêmicos, o que não é comum no mercado industrial (principalmente no Brasil) no qual as pesquisas e o desenvolvimento ainda se encontram em um estado avançado apenas na academia e alguns centros de pesquisa do governo.

## ***7. Referências Bibliográficas***

---

## 7 - Referências Bibliográficas

- 1 GOLDMAN, L., "Pre-Columbian Leishmaniosis". *Arch. Dermatol.*, **119**(7): 540, 1983.
- 2 FIOCRUZ, "<http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/indice.html>". Acessada em setembro de 2002.
- 3 SCOTT, H.; TAYLOR, J.; & MANSONBAHR, P.; "Recent Research on Kala-zar in India: Discussion". *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **39**(1): 31-42, 1945.
- 4 WHO, World Health Organization, "<http://www.who.int/emc/diseases/leish/leisgeo1.html>". Acessada em maio de 2002.
- 5 SUCEN, Superintendência de Controle de Endemias, "<http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/index.htm>". Acessada em maio de 2002.
- 6 BERMAN, J.D., "Chemotherapy for Leishmaniasis: Biochemical Mechanism, Clinical Efficacy and Future Strategies". *Reviews of Infectious Diseases*, **10**(3): 560-686, 1988.
- 7 FUNASA, Fundação Nacional da Saúde, "<http://www.funasa.gov.br/pub/GVE/GVE0517A.htm>". Acessada em maio de 2002.
- 8 GRIMALDI, G.; TESH, A.B. & McMAHON, P.D.; "A review of the geographic distribution and epidemiology of Leishmaniasis in the new world". *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **41**(6): 687-725, 1989.
- 9 ZORZETTO, R., "Os vilõezinhos da Leishmaniose". *Revista Pesquisa FAPESP*, **68**: 53, setembro de 2001.
- 10 CVE, Centro de Vigilância Epidemiológica no Estado de São Paulo, "<http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/leishvis.htm>". Acessada em maio de 2002.
- 11 CVE, Centro de Vigilância Epidemiológica no Estado de São Paulo, "[http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/inf\\_lva2000.htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/inf_lva2000.htm)". Acessada em maio de 2002. Informe técnico, Junho 2000.
- 12 FALQUETO, A. & SESSA, P. A., "Leishmaniose Tegumentar Americana: Doenças Infecciosas e Parasitárias". Editora Guanabara Koogan, RJ, p. 750-759, 8ª edição, 1991.

- 13 LEÃO, R. N. Q., "Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico". CEJUP, Belém, p. 885, 1997.
- 14 NEVES, D. P., "Parasitologia Humana". Editora Atheneu, p. 428, 10ª edição, 2000.
- 15 VIANNA, G.O., "Tratamento da leishmaniose tegumentar por injeções intravenosas de tartaro emético". *Anais do 7º Congresso Brasileiro de Medicina e Cirurgia*, 4: 426-428, 1912.
- 16 CHRISTINA G. & CARONIA, G.; "Sulla terapia della leishmanioi interna". *Full. Soc. Pathol. Exot.*, 8: 63, 1915.
- 17 MARSDEN, P.D., "Pentavalent antimonials: old drugs for new diseases". *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 18(3), 187-198, 1985.
- 18 MOORE, E., O'FLAHERTY, D., HEUVELMANS, H., SEAMAN, J., VEEKEN, H., WIT, S., & DAVIDSON, R.N., "Comparision of generic and proprietary sodium stibogluconate for the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya". *Bulletin of the World Health Organization*, 79(5), 388-393, 2001.
- 19 RATH, S., TRIVELIN, L.A., REBECCA, T.I., TOMAZELA, D.M., JESUS, M.N.J., & MARZAL, P.C., "Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte". *Química Nova*, 26(4): 550-555, 2003.
- 20 BALAÑA-FOURCE, R., REQUERA, R.M., CUBRÍA, C. & ORDÓÑEZ D., "The pharmacology of Leishmaniasis". *Gen. Pharmacol.*, 30(4): 435, 1998.
- 21 SERENO, D., CAVALEYRA, M., ZEMZOUMI, K., MAQUAIRE, S., OUAISSI, A., & LEMESRE, J.L., "Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(12): 3097-31012, 1998.
- 22 BERMAN, J.D. & WYLER, D.J., "Analysis *in vitro* Model for Investigation of chemotherapeutic agents in leishmnaiasis" *J. Inf. Diseases*, 83: 142, 1980.
- 23 LIMONGI, J.P. & CORBETTI, C.E., "Farmacodinâmica". Editora Livraria Artes Médicas: São Paulo, cap.61, 1973.

- 24 DÓREA, J.G., COSTA, J.M.L., HOLZBECHER, J. & MARSDEN, P.D., "Antimony accumulation in hair during treatment of Leishmaniasis". *Clin. Chem.*, **33**, 2081-2082, 1987.
- 25 ROBERTS, W.L., MCMURRAY, W.J., & RAINEY, P.M., "Characterization of the antimonial antileishmanial agent meglumine antimoniate (glucantime)". *Antimicrob. Agents Chemother.*, **42**(5): 1076-1082, 1998.
- 26 MARSDEN, P.D., "Mucosal leishmaniasis due to leishmania (viannia) braziliensis L(V)b in Tres Braços, Bahia-Brazil". *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, **27**(2): 93-101, 1994.
- 27 DEMICHELI, C., FIGUEIREDO, T.L., CARVALHO, S., SINESTERRA, R.D., LOPES, J.C.D. & FREZARD, F., "Physico-chemical characterization of meglumine antimoniate". *BioMetals*, **12**(1): 63-66, 1999.
- 28 BANGS, J.D., RANSOM, D.A., NIMICK, M., CHRISTIE, G. & HOOPER, N.M., "In vitro cytotoxic effects on trypanosoma brucei and inhibition of Leishmania major GP63 by peptidomimetic metalloprotease inhibitors". *Mol Biochem Parasitol*, **25**: 114, 2001.
- 29 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**(3): 495-502, 2002.
- 30 GERHARDSSON, L., BRUNE, D., NORDBERG, G.F. & WESTER, P.O., "Antimony in lung, liver and kidney tissue from deceased smelter workers". *Scand. J. Work Environ. Health*, **8**: 201-201, 1982.
- 31 GEBEL, T., "Arsenic and antimony: comparative approach on mechanistic toxicology". *Chemico-Biological Interactions*, **107**: 131-144, 1997.
- 32 FELICETTI, S.A., THOMAS, R.G. & McCLELLAN, R.O., "Metabolism of two valence states of inhaled antimony in hamsters". *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, **35**: 292-300, 1974.
- 33 CHULAY, J.D., FLECKENSTEIN, L. & SMITH, D.H., "Pharmacokinetics of antimony during treatment of visceral leishmaniasis with sodium stibogluconate or meglumine antimoniate". *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **82**: 69-72, 1988.



- 34 REES, P.H., KEATING, M.I., KAGER, P.A., HOCKMEYER, W.T., "Renal clearance of pentavalent antimony (sodium stibogluconate)". *Lancet*, **2**: 226-229, 1980.
- 35 PAMPLIN, C.L., DESJADINS, R., CHULAY, J., TRAMONT, E., HENRICKS, L., & CANFIELD, C., "Pharmakokinetics of antimony during sodium stibogluconate therapy for cutaneous leishmaniasis". *Clin. Pharm. Ther.*, **29**: 270-271, 1981.
- 36 GUNTIÑAS, M. B. C., MADRID, Y. & CÁMARA, C., "Determination of total antimony in marine sediments by slurry formation-hydride generation atomic absorption spectrometry. Applicability to the selective determination of antimony(III) and antimony(V)". *Analyst*, **116**: 1029-1032, 1991.
- 37 CONSTANTINI, S., GIORDANO, R., RIZZICA, M., BENEDETTI, F., "Applicability of anodic stripping voltammetry and graphite furnace atomic-absorption spectrometry to the determination of antimony in biological matrices: a comparative study". *Analyst*, **110**: 1355-1359, 1985.
- 38 BURGUERA, J. L., BURGUERA M., PETIT DE PEÑA, Y., LUGO, A. & AÑEZ, N., "Selective determination of antimony(III) and antimony(V) in serum and urine and of total antimony in skin biopses of patients with cutaneous leishmaniasis treated with meglumine antimoniate". *Trace Elements in Medicine*, **10**(2): 66-70, 1993.
- 39 DELVES, H. T., SIENIAWSKA, C. E., FELL, G. S., LYON, T. D. B., DEZATEUX, C., CULLEN, A., VARIEND, S., BONHAM, J. R. & CHANTLER, S. M., "Determination of antimony in urine, blood and serum and in liver and lung tissues of infants by inductively coupled plasma mass spectrometry". *Analyst*, **122**(11): 1323-1329, 1998.
- 40 TAMBA, M. G. & VANTINI, N. "Polarographic determination of antimony in steels and cast irons". *Analyst*, **97**: 542-548, 1972.
- 41 BLOOMFIELD, M.S., DOW, D.A. & PREBBLE, K.A., "The determination of pentavalente antimony in sodium stibogluconate in a pharmaceutical formulation by flow injection analysis". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **10**: 779-783, 1992.
- 42 RATH, S., JARDIM, W.F., DÓREA, J.G., "A simple spectrophotometric procedure for the determination of antimony (III) and (V) in antileishmanial drugs". *Fresenius J. Anal. Chem.*, **358**: 548-550, 1997.

- 43 FLORES, E. M. D., PAULA, F. R., DA SILVA, F. E. B., DE MORAES, D. P., PANIZ, J. N. G., DOS SANTOS, E. P., DRESSLER, V. L. & BITTENCOURT, C. F., "Selective Determination of Sb (III) in drugs by flow injection hydride generation AAS". *Atomic Spectroscopy*, **24**(1), 15-21, 2003.
- 44 FLORES, E. M. D., DA SILVA, F. E. B., DOS SANTOS, E. P., PAULA, F. R., BARIN, J. S., ZANELLA, R., DRESSLER, V. L. & BITTENCOURT, C. F., "Determination of total arsenic by batch hydride generation atomic absorption spectrometry in injectable drugs containing high levels of Sb (V) as N-methylglucamine antimonate". *Spectrochimica Acta Part-B Atomic Spectroscopy*, **57**(12): 2095-2102, 2002.
- 45 FLORES, E. M. D., DOS 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 Leishmaniosis treatment". *Journal of analytical Atomic Spectrometry*, **17**(8): 819-823, 2002.
- 46 DE GREGORI, I., PINOCHET, H., FUENTES, E., POTIN-GAUTIER, M., "Determination of antimony in soils and vegetables by hydride generation atomic fluorescence spectrometry and electrothermal atomic absorption spectrometry. Optimization and comparison of both analytical techniques", *J. Anal. Atomic Spectrometry*, **16**(2): 172-178, 2001.
- 47 KRACHLER, M.; SHOTYK, W. & EMONS, H., "Digestion procedures for the determination of antimony and arsenic in small amounts of peat samples by hydride generation-atomic absorption spectrometry". *Anal. Chim. Acta*, **432**(2): 303-310, 2001.
- 48 KOROLKOVAS, A. & BURCKHALTER, J. H., "Química Farmacêutica, Editora Guanabara Dois, RJ, p. 516-521, 469-474, 1982.
- 49 WIFLADT, A. M., WIBETOE, G. & LUND, W., "Determination of antimony in wine by hydride generation graphite furnace atomic absorption spectrometry". *Fresenius J. Anal. Chem.*, **357**: 92-96, 1997.
- 50 KRACHLER, M. & EMONS, H., "Extraction of antimony and arsenic from fresh and freeze-dried plant samples as determined by HG-AAS". *Fresenius J. Anal. Chem.*, **368**(7), 702-707, 2000.

- 51 KRACHLER, M. & EMONS, H., "Urinary antimony speciation by HPLC-ICP-MS". *J. Anal. Atomic Spectrometry*, **16**(1): 20-25, 2001.
- 52 BOND, A. M., KRATSIKIS, S., NEWMAN, M. O., "Determination of antimony (III) and antimony (V) in copper plant electrolyte by anodic stripping voltammetry". *Electroanalysis*, **9**: 681-684, 1997.
- 53 FARMACOPÉIA BRASILEIRA. Editora Atheneu, 4ª edição, São Paulo.
- 54 BLOOMFIELD, M.S., DOW, D.A. & PREBBLE, K.A., "The determination of pentavalente antimony in sodium stibogluconate in a pharmaceutical formulation by flow injection analysis". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **10**: 779-783, 1992.
- 55 KEPLER, AF., IMBRUNITO, T.R., JESÚS, M.N., TRIVELIN, L.A., BARONE, J.S., BUENO, M.I.M.S., TEMPONE, A.G., ANDRADE J.H.F. & RATH, S., "Antileishmanial drugs: speciation of antimony and identification of toxic contaminants". I. Simpósio Brasileiro de Química Medicinal, Caxambu, 2001.
- 56 FRANCO, A., BARBOSA, A.C., RATH, S., & DÓREA, J.G., "Antimony oxidation states in Antileishmanial drugs". *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **52**(5): 435-437, 1995.
- 57 UFSM, Universidade Federal de Santa Maria, "<http://www.ufsm.br/farmacopeia/html>". Acessada em setembro de 2002.
- 58 HUDAK, A., KOSTURIAK A., MELUCH P. & REIFFOVA K., "Spectrophotometric determination of low amounts of antimony with crystal violet em metals, alloys and some reagents". *Ckemicke Listy*, **91**(9): 702-703, 1997.
- 59 HUDAK, A. & BENO, A., "Extraction-Spectrophotometric determination of low amounts of antimony in metals and alloys". *Ckematical Paper-Chemicke Zvesti*, **47** (3): 179-182, 1993.
- 60 VOGEL, A., JEFFERY, G.H., BASSETT, J., MENDHAM, J., & DENNEY, R. C., Traduzido por MACEDO, H., "Análise Química Quantitativa". Guanabara Koogan, 5ª edição, 324, 1992.
- 61 VOGEL, A.I., Traduzido por GIMENO, A., "Análise Química Qualitativa". Editora Mestre Jou, 5ª edição, 261, 1981.
- 62 MAREN, T. H., "Colorimetric microdetermination of antimony with rhodamine-B". *Analytical Chemistry*, **19**(7): 487-491, 1996.

- 63 VANAMAN, R.E., HOLLIBAUGH, F.D., KANZELMEYER, J.H., "Spectrophotometric determination of antimony with rhodamine-B". *Analytical Chemistry*, **31**(11): 1793-1785, 1959.
- 64 GREENHALGH, R. & RILEY, J.P., "Nitrite as an Oxidant for antimony in its Spectrophotometric Determination with rhodamine B". *Analytica Chimica Acta*, **27** (3): 305-306, 1962.
- 65 BURNS, D.T., CHIMPALEE. D. & BULLICK, H. J., "Spectrophotometric determination of antimony after extractions of brilliant green hexachloroantimoniate (V) with microcrystalline 1,4-dichlorobenzene". *Analytica Chimica Acta* **284**(1): 195-198, 1993.
- 66 WASHINGTON, R.A., "The absorptiometric determination of antimony: extinction coefficient for the tetraiodoantimoniate (III) ion". *Analyst*, **90**: 502, 1965.
- 67 MATULIUS, R.M. & GUYON, J.C. "Spectrophotometric determination of antimony". *Anal. Chem.* **37**: 1391-1395, 1965.
- 68 CHRISTOPHER, D.H. & WEST, T.S., "Spectrophotometric determination of antimony with bromopyrogallol red". *Talanta*, **13**: 507-513, 1966.
- 69 SATO, S., "Diferential determination of antimony (III) e (V) by solvent extraction-spectrophotometry with mandeli acid and malachite green based on the difference in reactions-rates". *Talanta*, **32**(5): 341-344, 1995.
- 70 FACCHIN, I., & PASQUINI, C., "Extração líquido-líquido em sistemas de fluxo". *Química Nova*, **21**(1): 60-68, 1998.
- 71 CHRISTIAN, G. D., *Analytical Chemistry*, Editora Wiley, 5<sup>th</sup> edition, p. 484-504, 1997.
- 72 KUBAN, V.; "Determination of octan-1-ol water partition coefficients by flow-injection extraction without phase-separation" *Anal Chim Acta* **248**(2): 493-499, 1991.
- 73 SKEGGS, JR. L. T., "An automatic method for colorimetric analysis". *Am. J. Clin. Pathol.*, **28**: 311-322, 1957.

- 74 VAN G., "Automated wet chemical analysers and their applications". *Talanta*, **29**: 1045, 1973.
- 75 RUZICKA J & HANSEN E. H., "Flow injection analysis. A new concept of fast continuous flow analysis". *Anal. Chim. Acta*, **78**: 145-147, 1975.
- 76 KALBERG B & THELANDER S., "Extraction based on the flow injection principle. Description of the extraction system". *Anal. Chim. Acta*, **98**: 1-7, 1978.
- 77 BERGAMIN H. F., MEDEIROS J. X. REIS, B. F. and ZAGATO, E.A., "Solvent extraction in continuous flow injection analysis. Determination of molybdenum in plant material". *Anal. Chim. Acta*, **101**: 9-16, 1978.
- 78 FACCHIN, I., MARTINS, J.W., ZAMORA, P.G.P. & PASQUINI, C., "Single-phase liquid-liquid extraction in monosegmented continuous-flow systems". *Analytica Chimica Acta*, **285**: 287-292, 1994.
- 79 FACCHIN, I., "Extração líquido-líquido em sistemas de fluxo monossegmentado". Campinas: Instituto de Química, Universidade de Campinas, Tese de Doutorado, 189 p., 1996.
- 80 ALONSO, A., ALMENDRAL, M.J., PORRAS, M.J., CURTO, Y & GARCIA DE MARÍA, C., "Flow Injection solvent Extraction with and without phase separation. Fluorimetric determination of aluminium in water". *Anal. Chim. Acta*, **447**: 211, 2001.
- 81 NORD, L. & KARLBERG, L., "Extraction based on the flow-injection principle: Part 6. Film formation and dispersion in Liquid-Liquid segmented-flow extraction systems". *Anal. Chim. Acta*, **164**: 233, 1984.
- 82 LUO, Y., AL-OTHMAN, R., RUZICKA, J. & CHRISTIAN, G. D., "Solvent extraction-sequential without segmentation and phase separation based on the wetting film formed on a teflon tube wall". *Analyst*, **121**: 601, 1996.
- 83 DINIZ, M.C.T., "Desenvolvimento e avaliação de métodos para determinação de fosfato empregando sistemas automatizados". São Carlos: Faculdade de Química, Universidade Federal de São Carlos, Tese de Doutorado, 89 p., 2002.
- 84 PASQUINI, C. & JUNIOR, I.R., "Um fotômetro simples para análise por injeção em fluxo". *Química Nova*, 24-28, 1984.

- 
- 85 ICH, INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE, "<http://www.ich.org>". Acessada em outubro de 2003.
- 86 BRITISH PHARMACOPHEIA, 3ª edição, 1410-1411, 2000.
- 87 PAULA, F. R., "Metodologia para a determinação de antimônio (III) por FI-HG em antimoniais pentavalente empregados para o tratamento da Leishmaniose". Santa Maria: Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Santa Maria, Dissertação de Mestrado, 96 p., 2002.
- 88 RAMETTE, R. W. & SANDELL, E. B.; "Rationale of the rhodamine B method for antimony". *Analytica Chimica Acta*, **13**: 455-458, 1955.
- 89 KLEPPLER, A. F. & RATH, S., "Síntese e caracterização do antimoniato de metilglucamina". Campinas: Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Relatório de Iniciação Científica, 26 p., 2002.