

**MODULAÇÃO DA TOXICIDADE DE INJETÁVEIS DE
ANTIMONIATO DE MEGLUMINA ATRAVÉS DO ESTUDO DE
DESENVOLVIMENTO DE NOVAS FORMULAÇÕES
FARMACÊUTICAS**

VANIA NEVES MOREIRA JULIANO

Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Fundação Oswaldo Cruz

Orientadores: Prof. Dr. Lúcio Mendes Cabral
Prof. Dr. Ricardo Erthal Santelli

Rio de Janeiro
2004

MODULAÇÃO DA TOXICIDADE DE INJETÁVEIS DE ANTIMONIATO
DE MEGLUMINA ATRAVÉS DO ESTUDO DE DESENVOLVIMENTO
DE NOVAS FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

VANIA NEVES MOREIRA JULIANO

Dissertação apresentada à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovado:

Prof. _____ (UFF)

Dr. Ricardo Jorgensen Cassella

Prof. _____ (UFRJ)

Dra. Valéria Pereira de Souza

Prof. _____ (FIOCRUZ)

Dr. Lúcio Mendes Cabral

Prof. _____ (FIOCRUZ) - suplente

Dra. Maria Helena Simões Villas Boas

Orientadores: Prof. Dr. Lúcio Mendes Cabral e Prof. Dr. Ricardo Erthal Santelli

Rio de Janeiro

2004

FICHA CATALOGRÁFICA

Juliano, Vania Neves Moreira

Modulação da toxicidade de injetáveis de antimoníato de meglumina através do estudo de desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas./ Vania Neves Moreira Juliano. Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ, 2004.

xvi, 72 p., il., tab.

Dissertação em Vigilância Sanitária, Programa Pós-Graduação em Vigilância Sanitária / INCQS, 2004. Orientadores: Lúcio Mendes Cabral e Ricardo Erthal Santelli.

1. Meglumina antimoníato. 2. Especificação. ICP-OES. 3. Estabilidade. 4. Validação.
I. Título.

As dificuldades são superadas quando lembramos que Deus nos abençoa a cada instante, a mim, na forma de quatro vidas: Marcelo, Ana Carolina, Alexandre e Victor, meus filhos, aos quais dedico este trabalho.

**“Não se pode ensinar coisa alguma a
alguém; pode-se apenas auxiliá-la a
descobrir por si mesmo”.**

Galileu

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as coisas;

Ao meu esposo Alexandre pela ajuda e compreensão;

Aos meus filhos pelo carinho e compreensão;

Aos meus pais pelo incentivo;

A minha irmã Sueli pela dedicação aos meus filhos;

Ao professor Lúcio Mendes Cabral pela orientação e ensinamentos;

Ao professor Ricardo Erthal Santelli do Departamento de Geoquímica da UFF pela orientação, ensinamentos e pela cessão de espaço, equipamentos e materiais no Laboratório de Espectroanalítica, Automação e Ambiental da UFF;

Ao professor Ricardo Cassella do Departamento de Química analítica da UFF pelos ensinamentos;

Aos professores Érico Flores, Eliane Pereira e Celso Bittencourt da UFSM pela colaboração;

À Farmácia do HUAP pela gentil contribuição de materiais;

Ao Cel Haroldo e ao Laboratório Químico Farmacêutico do Exército pelo incentivo e ajuda financeira para aquisição de materiais respectivamente;

Ao Capitão Aldair Falcão do Laboratório Químico Farmacêutico do Exército pelo incentivo e empenho na compra de materiais;

Aos amigos Eliane, Fabiana, Mariana, Bruno e Silvinha do laboratório de espectroanalítica da UFF pelo incentivo e ajuda.

As amigas Salete Vellasco do Nascimento, Carla Cristina Velasco do Nascimento Freixo e Cristiane Campos pela ajuda no idioma inglês.

Ao Instituto Vital Brazil pela gentil colaboração no envase das ampolas.

A SCHOTT pela gentil contribuição no fornecimento das ampolas.

RESUMO

Neste trabalho foram realizados estudos referentes ao desenvolvimento de oito formulações de medicamentos injetáveis de antimoniato de meglumina, assim como, da metodologia analítica utilizada para determinação de Sb(III) e Sb total por HG-ICP-OES e ICP-OES respectivamente, deste ativo. O principal objetivo deste esforço visou à posterior implantação da produção deste medicamento em Laboratório da Rede Oficial, visto sua relevância estratégica para saúde pública e a negligência do setor produtivo privado em termos de sua produção e comercialização. Para este fim, foram utilizados excipientes com função antioxidante/estabilizante como metabissulfito de sódio e Na₂EDTA, ao mesmo tempo em que se avaliou o uso de tampão fosfato pH 6,5 a fim de verificar seu impacto na estabilidade da formulação. O efeito da autoclavação e da presença de veículos contendo propilenoglicol em proporções de 20:80 e 50:50 em água frente a veículos aquosos, foi também verificado com o propósito de avaliar a estabilidade dos processos de oxi-redução através da redução da constante dielétrica do meio ou degradação do ativo. As formulações foram mantidas em estufa a 40° C por 90 dias e amostras foram retiradas a cada 30 dias para que os parâmetros de pH, densidade, teor de Sb(III) e Sb total fossem medidos. Paralelamente foram realizados o desenvolvimento e validação de metodologia analítica utilizando HG-ICP-OES como técnica alternativa à preconizada pela Farmacopéia Brasileira 4ª edição. Os resultados obtidos apontaram como formulações mais adequadas, para posterior implantação em escala industrial, as formulações cujos veículos apresentavam propilenoglicol/água na proporção 20:80, pois a mesma apresentou menores valores de Sb(III) mostrando que a redução da constante dielétrica do meio é capaz de diminuir as reações tipo redox no sistema. Essas formulações também mostraram menor variação com relação aos teores de Sb(III) durante o tempo de estudo. A utilização de tampão se mostrou desnecessária para estabilizar a formulação, bem como não se verificou influência da autoclavação na qualidade do produto, indicando ser seu processo futuro de fabricação mais robusto. Quanto à metodologia analítica os resultados apontaram para o método proposto como alternativa eficiente para determinação de Sb(III) na presença de grandes quantidades de Sb(V) em soluções injetáveis de antimoniato de meglumina, de forma seletiva, linear, exata e precisa, além de apresentar baixo limite de quantificação, menor interferência de matriz e maior robustez com relação às técnicas em batelada, atualmente proposta na Farmacopéia Brasileira.

ABSTRACT

This dissertation was based on the studies of the development of eight injectable medication of Meglumine Antimoniate as well as the analytical methodology used to determine the Sb(III) and total Sb of this active principle by HG-ICP-OES and ICP – OES, respectively. The research aimed at a post-implementation of the production of this drug at a state laboratory, due to its strategic importance to public health and the negligence of private health care industries in relation to its production and commercialization. In order to achieve that objective, excipients with anti-oxidation/ stabilizing functions such as sodium metabisulfite and EDTA were used. At the same time, the use of phosphate buffer pH 6,5 was evaluated so as to verify its impact in the stability of the formulation. The effect of the autoclavation and the presence of vehicles containing propylene glycol in proportions of 20:80 and 50:50 in water, as compared to watery vehicles, were also observed with the aim of evaluating the stability of the oxi-reduction processes through the reduction of the dielectric constant of the environment or the degradation of the active substance. The formulations were kept in a heater at 40°C for 90 days and samples were withdrawn every 30 days so that the parameters of pH, density, Sb(III) and total Sb dosage were measured. Parallel to this, the development and the validation of the analytical methodology were assessed using HG-ICP-OES as alternative techniques to the one recommended by the 4th edition of the Brazilian Pharmacopeia. The obtained results pointed to the formulations whose vehicles showed propylene glycol/water in the proportion 20:80 as the most adequate to a later implementation in industrial scale since they showed inferior quantities of Sb(III). This revealed that the reduction of the dielectric constant can diminish redox reactions in the system. These formulations also showed minor variation in relation to the dosage of Sb(III) during the study time. Not only did the use of the buffer show to be useless to stabilize the formulation but the influence of the autoclavation in the product quality was not registered as well, indicating that its future process of production is more robust. In relation to the analytical methodology, the results pointed to the proposed method as an efficient alternative to the determination of Sb(III) in the presence of great quantities of Sb(V) in injectable solutions of Meglumine Antimoniate, in a selective, linear, exact and accurate way. In addition to that, it showed a low limit of quantification, less interference of the matrix and a higher robustness in relation to the techniques in batch, currently proposed by the Brazilian Pharmacopeia.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Formulações propostas para o produto Antimoniato de meglumina	23
Tabela 2- Parâmetros operacionais instrumentais relevantes do ICP-OES e HG-ICP-OES.....	25
Tabela 3- Fórmula do placebo utilizado na preparação da amostra para teste de exatidão.....	28
Tabela 4- Percentual e concentração de padrão utilizada para construção da curva para linearidade de Sb total.....	30
Tabela 5- Percentual em relação às concentrações teóricas de de Sb(V) no produto.....	30
Tabela 6- Intensidades (CPS) e seus respectivos desvios padrão para as diversas concentrações de ácido cítrico. Concentração de borohidreto de sódio=1%.....	36
Tabela 7- Valor de t calculado para cada par de concentrações de ácido cítrico $t_{\text{crítico } 0,01,4} = 4,604$	41
Tabela 8- Intensidades (CPS) e seus respectivos desvios padrão para as diversas concentrações de borohidreto de sódio.....	42
Tabela 9- Intensidades de emissão ótica (CPS) e seus respectivos desvios padrão para os diversos tamanhos de reatores helicoidais	43
Tabela 10- Intensidades (CPS) e desvios relativos aos pontos da curva de calibração.....	44
Tabela 11- Linearidade na determinação de Sb(III).....	44
Tabela 12- Exatidão do Método HG-ICP OES para determinação de Sb(III).....	45
Tabela 13- Concentrações e desvios encontrados para o teste de repetibilidade para Sb(III).....	46
Tabela 14- Concentrações e desvios padrão encontrados para o teste de precisão intermediária para Sb(III).....	47
Tabela 15- Limite de quantificação para Sb(III).....	48
Tabela 16- Intensidade (CPS) e os respectivos desvios relativos para cada ponto da curva de calibração.....	49
Tabela 17- Parâmetros de linearidade para Sb total.....	50
Tabela 18- Exatidão do Método para Sb total.....	50

Tabela 19- Concentrações e desvio encontrados para o teste de repetibilidade de Sb total.....	51
Tabela 20- Concentrações e desvios padrão encontrados para o teste de precisão intermediária para Sb total.....	52
Tabela 21- Limite de quantificação para Sb total.....	54
Tabela 22 - Valores de pH e os respectivos desvios padrão para as 8 formulações à 40°C.....	56
Tabela 23- Valores de t calculado para os seis pares de tempo. t crítico $_{0,01;2} = 9,925$ K= 6 $\alpha = 95\%(0,05)$ N= 2 $\alpha' = 0,01$	57
Tabela 24 - Valores de densidade e os respectivos desvios padrão para as 8 formulações.....	58
Tabela 25- Valores de t calculado para os seis pares de tempo. t crítico $_{0,01;2} = 9,925$; K= 6 $\alpha = 95\%(0,05)$; N= 2; $\alpha' = 0,01$	59
Tabela 26- Valores de Sb(III) (mg/mL) encontrados para as 8 formulações durante os 90 dias.....	59
Tabela 27- Valores de t calculados para os quatro pares de formulações. t crítico $_{0,05;2} = 4,303$. F1 = Formulação 1; F2 = Formulação 2; F3= Formulação 3 e F4 = Formulação 4 F5 = Formulação 5; F6 = Formulação 6; F7= Formulação 7 e F8 = Formulação 8.....	60
Tabela 28- Valores de t calculados para os dois pares de formulações. t crítico $_{0,05;2} = 4,303$. F1= Formulação 1; F2 = Formulação 2; F3 = Formulação 3 e F4 = Formulação 4.....	61
Tabela 29- Valores de Sb total (mg/mL) e Sb(III) (mg/mL) encontrados para as 8 formulações durante os 90 dias.....	63
Tabela 30- Concentração de metais (mg/L) encontrados nas três matérias-primas analisadas.....	65
Tabela 31- Concentrações de Sb(III) e Sb total encontrados nas três matérias-primas analisadas.....	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fêmea do Flebotomíneo (vetor de transmissão da leishmaniose).....	01
Figura 2- (a) Forma úlcero-vegetante extensa, acometendo nádegas e membros inferiores, (b) Lesão úlcero custosa localizada na região frontal, (c) Destruição do septo nasal com infiltração local.....	02
Figura 3- Paciente com LV (paciente com hepatoesplenomegalia).....	03
Figura 4- Reação entre composto de antimônio e dimercaprol.....	05
Figura 5- Fórmula estrutural do antimoniato de meglumina ($C_7 H_{18} N_0_8 Sb$), PM: 365,98.....	10
Figura 6 - ICP-OES modelo ULTIMA-2 (JOBIN YVON).....	20
Figura 7 - Amostrador automático modelo AS 421 (JOBIN YVON).....	20
Figura 8- Equação que expressa o limite de quantificação.....	29
Figura 9 - Diagrama dos aparatos utilizados para geração de hidretos em fluxo contínuo.....	34
Figura 10- Efeito da concentração de ácido cítrico no sinal para HG-ICP-OES.....	36
Figura 11 - Efeito da concentração do sódio borohidreto na HG-ICP-OES.....	42
Figura 12- Efeito do comprimento do reator helicoidal no HG-ICP-OES.....	43
Figura 13- Curva de calibração para verificação da linearidade na determinação de Sb(III).....	44
Figura 14- Curva obtida para determinação do limite de quantificação do Sb(III).....	48
Figura 15- Curva de calibração para linearidade de antimônio total...	49
Figura 16- Curva obtida para determinação do limite de quantificação do Sb total.....	53
Figura 17- Box Plot das oito formulações F1= Formulação 1; F2 = Formulação 2; F3 = Formulação 3; F4 = Formulação 4; F5= Formulação 5; F6 = Formulação 6; F7= Formulação 7; F8 = Formulação 8.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS OU SIGLAS.

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BPF: Boas práticas de Fabricação

CE-ICP-MS: Capillary Electrophoresis- Inductively Coupled Plasma- Mass Spectrometry

Na₂EDTA: Etileno Diamino Tetracetato dissódico

DRX: Difração de raio- X

FB: Farmacopéia Brasileira

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz

FUNASA: Fundação Nacional de Saúde

H₀: Hipótese nula

HG-AAS: Hydride Generation- Atomic Absorption Spectrometry

HG-AES: Hydride Generation- Atomic Emission Spectrometry

HG-AFS: Hydride Generation- Atomic Fluorescence Spectrometry

HG-ICP-OES: Hydride Generation- Inductively Coupled Plasma- Optical Emission Spectrometry

HG-ICP-MS: Hydride Generation- Inductively Coupled Plasma- Mass Spectrometry

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

HPLC-HG- AAS: High Performance Liquid Chromatography- Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry

HPLC-HG- AFS: High Performance Liquid Chromatography- Hydride Generation Atomic Fluorescence Spectrometry

IC: Intervalo de confiança

ICP-OES: Inductively Coupled Plasma- Optical Emission Spectrometry

INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

LC: Leishmaniose cutânea

LD: Limite de detecção

LM : Leishmaniose mucosa

LQFEx: Laboratório Químico Farmacêutico do Exército

LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana

LV: Leishmaniose visceral

nm: nanômetros

OMS: Organização Mundial de Saúde

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

RSD: Relative Standard Deviation

SD: Standard Deviation

UFF: Universidade Federal Fluminense

UFRJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro

USP: The United States Pharmacopeia

WFI: Água para injetáveis

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS OU SIGLAS.....	xii
1 INTRODUÇÃO.....	01
1. 1 Generalidades.....	01
1. 2 Epidemiologia.....	03
1. 3 Tratamento.....	04
1. 4 Farmacologia.....	05
1.4.1 Dose.....	06
1.4.1.1 Lesões Cutâneas.....	06
1.4.1.2 Lesões Mucosas.....	07
1.4.1.3 Visceral.....	07
1.4.2 Efeitos colaterais.....	07
1.4.3 Reações Adversas.....	07
1. 5 Formulações.....	08
1.5.1 Estabilidade de formulações.....	10
1.5.2 Análise de formulações.....	12
1. 6 Justificativa.....	13
2 OBJETIVOS.....	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3. 1 Materiais.....	18
3. 1.1 Formulações.....	18
3. 1.2 Metodologia analítica.....	19
3. 1.3 Caracterização do princípio ativo.....	21
3. 1.3.1 Solubilidade.....	21
3. 1.3.2 Difração de raios-x (DRX).....	21
3.1.3.3 Determinação de metais pesados.....	21
3. 2 Métodos.....	22

3. 2.1 Formulações.....	22
3. 2.2 Validação da metodologia analítica.....	24
3. 2.2.1 Determinação de Sb (III).....	25
3. 2.2.1.1 Determinação da seletividade.....	26
3. 2.2.1.2 Determinação da Linearidade.....	27
3. 2.2.1.3 Determinação da exatidão.....	28
3. 2.2.1.4 Determinação da precisão.....	28
3. 2.2.1.5 Determinação do Limite de quantificação.....	29
3. 2.2.2 Determinação de Sb (V).....	29
3. 2.2.2.1 Determinação da Linearidade.....	30
3. 2.2.2.2 Determinação da exatidão.....	31
3. 2.2.2.3 Determinação da precisão.....	31
3. 2.2.2.4 Determinação do Limite de quantificação.....	32
3. 2.3 Caracterização do princípio ativo.....	32
3. 2.3.1 Solubilidade.....	32
3. 2.3.2 Difração de raios-x (DRX).....	32
3. 2.3.3 Determinação de metais pesados.....	32
3. 2.3.4 Determinação dos teores de Sb (III) e Sb (V).....	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	34
4.1 Validação do Método analítico.....	34
4.1.1 determinação de Sb (III).....	34
4.1.1.1 Seletividade.....	35
4.1.1.1.1 O efeito da concentração do ácido cítrico.....	35
4.1.1.1.2 O efeito da concentração do borohidreto de sódio.....	41
4.1.1.1.3 O efeito do comprimento do reator helicoidal.....	42
4.1.1.2 Linearidade.....	44
4.1.1.3 Exatidão.....	45
4.1.1.4 Precisão.....	46
4.1.1.4.1 Repetibilidade.....	46
4.1.1.4.2 Precisão Intermediária.....	46
4.1.1.5 Limite de quantificação.....	48
4.1.2 determinação de Sb total.....	49
4.1.2.1 Seletividade.....	49

4.1.2.2 Linearidade.....	49
4.1.2.3 Exatidão.....	50
4.1.2.4 Precisão.....	51
4.1.2.4.1 Repetibilidade.....	51
4.1.2.4.2 Precisão Intermediária.....	52
4.1.2.5 Limite de quantificação.....	53
4.2 Formulações.....	54
4.2.1 pH.....	54
4.2.2 Densidade.....	57
4.2.3 Teor de Sb (III).....	59
4.2.4 Teor de Sb total.....	62
4.3 Caracterização do princípio ativo.....	64
4.3.1 Solubilidade.....	64
4.3.2 Difração de raios-x (DRX).....	64
4.3.3 Determinação de metais pesados.....	64
4.3.4 Determinação dos teores de Sb (III) e Sb (V).....	65
5 CONCLUSÕES.....	67
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 Generalidades

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e a Leishmaniose Visceral (Calazar) são doenças infecciosas, não contagiosas, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que acomete pele, mucosas e vísceras respectivamente. As leishmanioses são consideradas primariamente como uma zoonose podendo acometer o homem, quando este entra em contato com o ciclo de transmissão do parasito, transformando-se em uma antropozoonose. Atualmente, encontra-se entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo (BRASIL. Ministério da Saúde, 2000).

As *Leishmanias* são transmitidas entre animais silvestres ou de animais silvestres para o homem por meio da picada de insetos hematófagos *Phlebotominae* de diferentes gêneros (*Psychodopygus*, *Lutzomya*) (VIANNA, WILLIAMS & FALCÃO, 1978) (Figura 1).



Figura 1 - Fêmea do Flebotomíneo (vetor de transmissão da leishmaniose)

A *Leishmania* é um protozoário que pertence à família *Trypanosomatidae* (com duas formas principais: uma flagelada ou promastigota, e outra aflagelada ou amastigota, a primeira é encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e em alguns meios de cultura artificiais, e a segunda é vista nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (homem e outros animais superiores). No homem o período de incubação da doença é, em média, de 2 meses, podendo apresentar períodos mais curtos (duas semanas) e mais longos, (2 anos) (BRASIL. Ministério da Saúde, 2000).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA), inclui a leishmaniose cutânea (LC) e a leishmaniose mucosa (LM) (BRASIL, 2000) (Figura 2).

A leishmaniose causa incapacitação e muitas vezes lesões mutilativas, podendo levar a morte.

A leishmaniose visceral é a forma mais severa da doença e ataca baço, fígado e nodos linfáticos. (Figura 3)



(a)



(b)



(c)

Figura 2- (a) Forma úlcero-vegetante extensa, acometendo nádegas e membros inferiores, (b) Lesão úlcero crustosa localizada na região frontal, (c) Destruição do septo nasal com infiltração local.



Figura 3- Paciente

com hepatoesplenomegalia)

com LV (paciente

1.2 Epidemiologia

Atualmente, segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), a leishmaniose é endêmica em 88 países, onde 72 são países em desenvolvimento, dos cinco continentes, ameaçando 350 milhões de pessoas entre mulheres, homens e crianças. Acredita-se que no mundo inteiro 12 milhões de pessoas sofrem de leishmaniose.

- 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia e Sudão;
- 90% dos casos de leishmaniose mucocutânea ocorrem na Bolívia, no Brasil e no Peru;
- 90% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem no Afeganistão, no Brasil, no Iran, no Peru, na Arábia Saudita e na Síria.

Nos últimos dez anos as regiões endêmicas têm se expandido além das zonas rurais o que vem causando um aumento significativo de casos da doença (WHO, 2004).

Somente em 33 dos 88 países afetados pela leishmaniose a notificação é obrigatória. Dos dois milhões de novos casos estimados anualmente, somente 600.000 são oficialmente relatados (WHO, 2004). No Brasil a LTA é de notificação obrigatória para os casos confirmados e a LV é de notificação obrigatória para casos suspeitos (BRASIL, 2003).

A existência de animais silvestres como fonte natural de infecções, ainda insuficientemente estudada, não explica a totalidade dos casos humanos encontrados. Este aspecto leva a supor que outros ciclos, onde o homem e animais domésticos participam,

estariam sendo instalados com risco de acometer populações bem mais numerosas do que aquelas que eventualmente penetram nas matas. Na região sudeste do Brasil, apresenta um caráter de transmissão peri-domiciliar, principalmente pela adaptação do inseto vetor aos ambientes naturais modificados possibilitando o envolvimento de animais domésticos (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994).

Em diferentes regiões do Brasil (Bahia, Amazonas, Pará, Rondônia, Mato Grosso, Minas Gerais e São Paulo) variadas espécies de *Leishmanias* têm sido isoladas de casos humanos, caninos, roedores e marsupiais, as quais apresentam características biológicas e bioquímicas distintas, estando relacionadas a aspectos clínico-epidemiológicos diferentes (BRASIL, 2000).

As leishmanioses se estendem, em nosso país, por extensas áreas das regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Centro Oeste. Enquanto a forma tegumentar é mais amplamente distribuída por quase todos os estados, a forma visceral apresenta distribuição mais restrita às áreas do Nordeste e sudeste do país (LUZ *et al.*, 2003).

O teste intradérmico de Montenegro é de grande valia no diagnóstico imunológico da LTA. É feita a aplicação intradérmica do antígeno da *Leishmania* e após 48 horas é feita à medida da resposta. Praticamente todos os indivíduos com lesão apresentam reação positiva ao teste, no entanto, pessoas provenientes de regiões endêmicas também podem apresentar reação positiva (LOUREIRO, DADALTI & GUTIERREZ, 1998).

Sempre que possível o diagnóstico deve ser clínico, epidemiológico e laboratorial. Se não houver recursos laboratoriais o diagnóstico deve ser clínico e epidemiológico (BRASIL, 2000).

1.3 Tratamento

A droga de primeira escolha é o antimonial pentavalente. A OMS recomenda que a dose deste antimonial seja calculada em mg/Sb(V)/Kg/dia.

O Stibogluconato de sódio e o antimoniato de meglumina são os dois tipos de antimonias pentavalentes que podem ser utilizados na terapêutica da leishmaniose, sendo que o primeiro é utilizado nos países de língua inglesa e o segundo na América latina, incluindo Brasil, e nos países de língua francesa (FIGUEIREDO, COSTA E SILVA & BRASIL, 1999).

O antimoniato de meglumina apresenta-se comercialmente em frascos de 5 mL que contém 1,5 g do antimoniato bruto, correspondente a 405 mg de Sb(V). Portanto, 1 ampola com 5 mL tem 405 mg de Sb(V), e cada mL contém 81 mg de Sb(V). Este antimonial é

indicado para o tratamento de todas as formas de leishmaniose tegumentar, embora as formas mucosas exijam maior cuidado, podendo apresentar respostas mais lentas e maior possibilidade de recidivas (ANTIMONIATO DE MEGLUMINA: bula, [s.d.]).

As drogas de segunda escolha são a anfotericina B e a pentamidina, que devem ser introduzidas na terapêutica caso a resposta ao antimoniato pentavalente não seja satisfatória (MARSDEN, 1999).

1.4 Farmacologia

Em 1912 se utilizou o tartarato de potássio antimônico (tártaro emético), um antimônio trivalente, na Leishmaniose cutânea com sucesso. Logo após ele foi utilizado também no tratamento da leishmaniose visceral (Calazar). Muitos outros antimônios trivalentes, em especial o tartarato de sódio antimônico, foram experimentados. Posteriormente, estes foram substituídos pelos antimônios pentavalentes, que eram tão eficazes quanto o tártaro emético e muito menos tóxicos, permitindo a utilização de doses maiores, reduzindo desta forma o tempo de tratamento. Estudos com antimônios pentavalentes “in vitro” demonstraram pouco efeito sobre os leptomônades que se desenvolvem na cultura de tecidos, esta diferença entre a sua atividade “in vitro”, sugere que a redução do antimônio para a forma trivalente é necessária para a atividade. Provas nesse sentido são fornecidas pelo fato de que o dimercaprol é antídoto para o envenenamento por antimônio e arsênio (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1982) (figura 4).

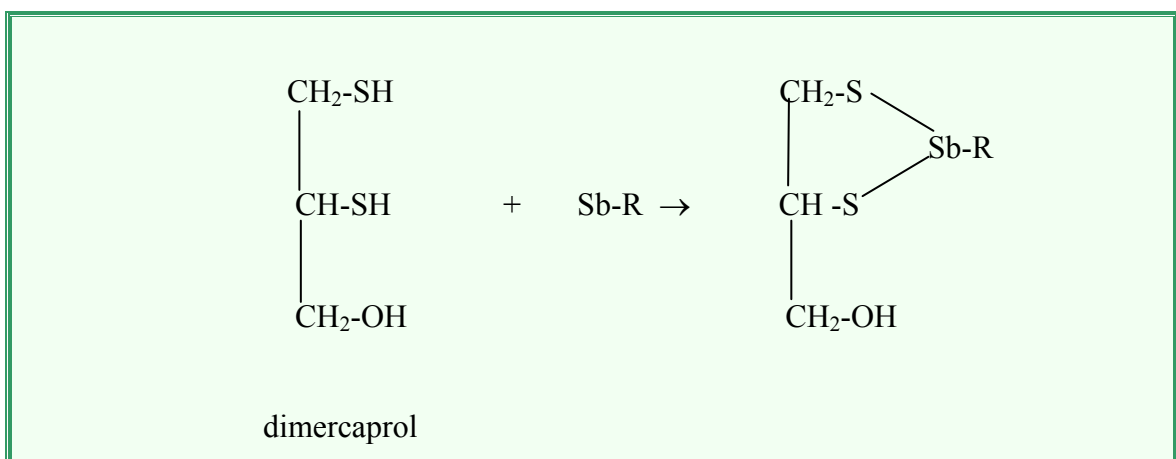


Figura 4- Reação entre composto de antimônio e dimercaprol

Os compostos antimoniais por serem pouco absorvidos no trato gastro intestinal e irritantes para mucosa intestinal, são administrados parenteralmente.

Estudos indicam que os antimoniais trivalentes inibem a fosfofrutoquinase, esta enzima catalisa a conversão da frutose-6-fosfato a frutose-1,6-difosfato nas vias glicolíticas. Agem combinando-se com grupos sulfidrilas (tais como o da cisteína) presentes na enzima, por meio de ligações covalentes reversíveis exercendo seus efeitos tóxicos nas células do parasita e dos mamíferos, entretanto a fosfofrutoquinase dos mamíferos é 80 vezes menos sensível do que as enzimas do parasita fazendo com que ele exerça seus efeitos tóxicos de forma seletiva (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1982).

Os antimoniais trivalentes possuem alta afinidade pelos eritrócitos, deixando rapidamente o plasma. No entanto continuam na circulação ligados de alguma forma aos eritrócitos onde interferem com a função da hemoglobina. A eliminação renal é baixa provavelmente devido a baixas concentrações plasmáticas. Os antimoniais pentavalentes não são ligados aos eritrócitos, atingindo concentrações muito maiores no plasma do que os compostos trivalentes. Conseqüentemente são eliminados muito mais rapidamente pelo rim (GOODMAN & GILMAN, 1983).

1.4.1. Dose:

Apresentação = Frascos com 5 mL, contendo 81 mg Sb(V) por mL.

Dose máxima diária (BRASIL, 2000):

- * Adultos: três ampolas ou 1.215 mg Sb(V).
- * Crianças até 12 anos metade da dose máxima de adultos.

1.4.1.1 Lesões Cutâneas

Para as formas cutânea localizada e disseminada a dose recomendada varia entre 10 a 20 mg Sb(V)/Kg/dia. Sugere-se 15 mg Sb(V)/Kg/dia, tanto para o adulto quanto para crianças, durante 20 dias seguidos. Nunca deve ser utilizada dose superior a três ampolas/dia ou 15 mL/dia para o adulto. Se não houver cicatrização completa após três meses (12 semanas) do término do tratamento, o esquema deverá ser repetido, prolongando-se, desta vez, a duração da série para 30 dias. Em caso de não resposta, utilizar uma das drogas de segunda escolha (BALANA-FOUCE *et al.*, 1998).

1.4.1.2 Lesões Mucosas

Em todas as formas de acometimento mucoso a dose recomendada é de 20 mg/Sb(V)/Kg/dia, durante 30 dias seguidos, de preferência em ambiente hospitalar. Se não houver cicatrização completa após três meses (12 semanas) do término do tratamento, o esquema deverá ser repetido apenas uma vez. Em caso de não resposta, utilizar uma das drogas de segunda escolha (BRASIL, 2000).

1.4.1.3 Visceral

No Brasil recomenda-se o tratamento da leishmaniose visceral com a dose de 20 mg de Sb(V) kg/dia, com aplicação endovenosa ou intramuscular, por no mínimo 20 e no máximo 40 dias, utilizando-se o limite máximo de 2 a 3 ampolas/dia do produto (BRASIL, 2003).

1.4.2. Efeitos colaterais

É possível que ocorra um ou mais efeitos colaterais, na seguinte ordem de frequência: artralgia, mialgia, inapetência, náuseas, vômitos, plenitude gástrica, epigastralgia, pirose, dor abdominal, prurido, febre, fraqueza, cefaléia, tontura, palpitação, insônia, nervosismo, choque pirogênico, edema e insuficiência renal aguda. Essas queixas são, geralmente discretas ou moderadas e raramente exigem a suspensão do tratamento. Porém, nas doses de 20 mg/Sb(V)/Kg/dia, o antimonial pode atingir o limiar de toxicidade, podendo levar a alterações cardíacas ou renais que obriguem a suspensão do tratamento. Por isso, deve-se proceder acompanhamento eletrocardiográfico semanal e avaliação da função renal, especialmente em pacientes acima de 50 anos (MARSDEN, 1985).

Em casos de lesões de laringe e faringe, podem ocorrer edema e insuficiência respiratória aguda. Por isso, é aconselhável que a medicação seja administrada por equipe especializada, em paciente hospitalizado e com possibilidade de realizar traqueotomia de urgência. Os corticóides por via sistêmica podem ser utilizados nos quadros de hipersensibilidade (BRASIL, 2000).

1.4.3 Reações Adversas

O antimoniato de N-metil meglumina é o fármaco de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses. Este fármaco é um produto que requer administração

cautelosa, sob acompanhamento clínico e laboratorial, por ser cardiotóxico, hepatotóxico e nefrotóxico.

As reações adversas dos antimoniais são produzidas mais frequentemente pelos compostos trivalentes do que pelos pentavalentes, no entanto são qualitativamente semelhantes (GOODMAN & GILMAN, 1983).

É provável que se desenvolva tosse grave acompanhada de vômitos. A artrite aguda geralmente envolvendo articulações do pulso, joelho e tornozelos, é uma reação menos comum. Pode ocorrer ocasionalmente bradicardia acentuada, ocorrem alterações significativas no ECG de pacientes tratados com antimoniais. Estas alterações estão ligadas a sintomas cardiovasculares que normalmente desaparecem de 30 a 60 dias após interrupção do tratamento (GOODMAN & GILMAN, 1983).

A função hepática poderá estar deprimida em pacientes fazendo uso de antimoniais. Estudos clínicos têm evidenciado aumento das enzimas hepáticas. São observados ainda cefaléia, desmaios, dispnéia, apnéia, edema, dor abdominal, colapso vascular e erupções brandas.

Já foram evidenciados casos de pneumonia com uso de antimoniais trivalentes, porém não foram encontrados com os pentavalentes. Estudos realizados mostraram que ocorre redução da hemoglobina nos eritrócitos, bem como a queda do nível de hematócrito. A conclusão foi que a gravidade deste efeito tóxico varia com a preparação e a dose administrada (ALKHAWAJAH, 1992).

Estudos “in vitro” têm demonstrado a presença do antimônio trivalente nos eritrócitos. Existe a hipótese de que o antimônio possa ser trocado com o ferro trivalente da hemoglobina (BERG & KNUT, 1998).

Estudos mostraram que parece existir uma correlação entre o aumento da osmolalidade do produto e a variação das respostas terapêuticas (WILLIAM, WALTER & PETRIE, 1998).

1.5 Formulações

O antimoniato de meglumina não possui uma estrutura química bem determinada, sabe-se que é formada pela síntese entre o óxido de antimônio V (Sb_2O_5) e a N-metilglucamina, podendo se apresentar na forma de oligômeros.

É solúvel em água, praticamente insolúvel em etanol, éter etílico e clorofórmio.

O produto encontrado no mercado Glucantime® do Laboratório Aventis é uma solução aquosa que possui 1,5 g de antimoniato de meglumina equivalente a 405 mg de antimônio pentavalente por ampola de 5 mL.

Estudos realizados na estrutura do produto encontrado no mercado sugerem que ela consiste numa mistura de componentes com diferentes pesos moleculares, na qual o antimônio e a metilmeglumina se alternam, e que cada antimônio se liga de forma coordenada com dois grupos hidroxilas sugerindo que esta estrutura se comporta como um acetal, e é facilmente quebrada em ácidos diluídos. Em baixos valores de pH as ligações são quebradas, com conseqüente hidrólise da estrutura e liberação do Sb(V) (CARRIÓ *et al.*, 2000).

É fundamental que a formulação mantenha seu pH na faixa de 5,5 e 7,5, pois o pH parece ter grande importância na estabilidade da preparação.

A determinação do conteúdo de antimônio no pó de antimoniato de meglumina, através do estudo da sua estrutura e composição, indicou uma razão molar de 1:1,37 de antimônio para N-metil-D-glucamina. Osmolalidade avaliada em soluções de antimoniato de Meglumina demonstrou uma média de 1,43 átomos de antimônio por molécula de antimoniato de meglumina. A osmolalidade de uma solução diluída 1:10 de antimoniato de meglumina aumentou cerca de 45% durante 8 dias, sugerindo hidrólise a espécies de complexos menores. Foi evidenciada, ainda, a presença de complexos coordenados entre antimônio e cada hidroxila do N-metil-D-glucamina. Através da utilização da espectrometria de massa, com vários procedimentos de derivação, ficou evidenciado que mais de quatro hidroxilas do N-metil-D-glucamina estão coordenadas com cada antimônio. Uma série de oligômeros foi observada, a maioria com uma massa molecular de 507 unidades de massa atômica e consiste de NMG-Sb-NMG, onde Sb representa o antimônio e NMG representa a N-metil-D-glucamina e corresponde a forma geral $(\text{NMG-Sb})_n - \text{NMG}$. Esses resultados sugerem que esse agente é uma mistura complexa que existe em equilíbrio na solução aquosa (WILLIAM, WALTER & PETRIE, 1998). A figura 5 mostra a fórmula estrutural do antimoniato de meglumina.

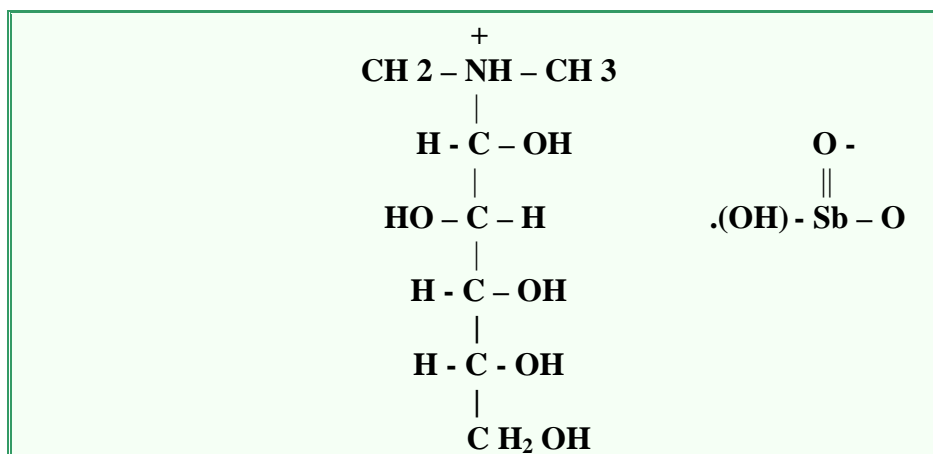


Figura 5- Fórmula estrutural do antimoniato de meglumina (C₇ H₁₈ N O₈ Sb), PM: 365,98.

1.5.1 Estabilidade de formulações

Em estudos realizados com diferentes ampolas do produto encontrado no mercado (Glucantime®) foram encontrados diferentes percentuais de Sb(III) e Sb(V) (FRANCO *et al.*, 1995).

Esses estudos sugerem grandes variações entre as formas oxidadas do Sb. Desta forma a solução deve ser estabilizada com coadjuvantes antioxidantes e estabilizadores, visando diminuir processos de oxi-redução no produto. Para aumentar a ação antioxidante às vezes é necessária a adição de mais de um agente antioxidante. Antioxidantes são materiais que agem por serem mais facilmente oxidados que os agentes que eles estão protegendo. Desta forma em sistemas fechados como em ampolas eles podem consumir todo o oxigênio presente e desta forma proteger a droga. Sistemas abertos requerem concentrações maiores de antioxidantes que sistemas fechados. Antioxidantes também podem funcionar por serem inibidores de radicais livres, ou seja, eles fornecem H⁺ ou um elétron para quebrar a cadeia de reação.

Pode-se utilizar a combinação de um antioxidante com agente quelante de metais. Metais ionizados e solubilizados na fórmula farmacêutica podem catalisar as reações de oxidação. Considerando-se que nem todos os antioxidantes são capazes de inibir a atividade catalítica dos metais, em vários casos, é necessário associar ao sistema de proteção os agentes quelantes cuja função específica é de sequestrar o íon metálico do meio de forma que ele não possa agir como catalisador. O sal di-sódico do ácido

etilenodiaminotetracético (Na_2EDTA) tem sido usado como agente quelante em formulações farmacêuticas com sucesso (CONNORS, AMIDON & STELLA, 1986).

Os agentes quelantes mais utilizados para soluções aquosas, encontrados na literatura, são (HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS, 1986):

- ácido cítrico
- etilenodiaminotetracetato di-sódico
- cisteína
- quinosol
- sorbitol
- ácido tartárico

Alguns dos agentes antioxidantes que podem ser utilizados em soluções aquosas:

- bissulfito de sódio
- ácido ascórbico
- ácido isoascórbico
- metabissulfito de sódio
- sulfito de sódio
- tioglicerol
- ácido tioglicólico
- thiosorbitol

As concentrações de antioxidantes geralmente utilizadas variam de 0,01% a 1%. Os sulfitos são comumente usados, na sua ação antioxidante os sulfitos podem dar origem a sulfatos ácidos que podem causar queda de pH (CONNORS, AMIDON & STELLA, 1986).

Outro aspecto importante é a escolha do solvente. Os solventes são necessários para a solubilização de substâncias, entretanto, eles podem acelerar ou retardar reações de decomposição. Geralmente, poliálcoois como polietilenoglicóis, propilenoglicol ou glicerol funcionam como agentes anti-hidrolíticos em formulações (TURCO; KING, 1997).

A instabilidade da forma oxidada dos antimoniais foi estudada (MARSDEN, 1986) e sabe-se que pode sofrer transformações importantes, sendo a mais perigosa a redução a Sb trivalente que constitui uma espécie química muito mais tóxica (MARSDEN, 1985). A presença inapropriada de quantidades de antimônio trivalente nos medicamentos estudados pode ser responsável em parte pela variabilidade da resposta ao tratamento com compostos antimoniais.

Romero *et al.* (1996) estudaram as características físico-químicas do antimoniato de meglumina em diferentes condições de armazenamento (4° C, 37°C e temperatura ambiente) e avaliaram os parâmetros de pH e osmolaridade, concluíram que não foi demonstrada variação significativa de pH nas condições estudadas, encontrando, porém variações significativas na osmolaridade das soluções. No entanto, os autores não conseguiram obter conclusões definitivas devido ao número limitado de medições e a variabilidade da osmolaridade entre as ampolas mantidas na mesma condição de temperatura.

1.5.2 Análise das formulações

Diferentes metodologias já foram propostas para dosagem dos antimônios trivalentes e pentavalentes em preparações do antimoniato de meglumina. Níveis de antimônio total podem ser determinados pelo método iodométrico. O método é baseado na pré-redução do antimônio pentavalente a antimônio trivalente pelo excesso de iodeto; o iodeto exerce uma ação redutora sobre sistemas com maior potencial redox com a formação de quantidades equivalentes de iodo. O iodo liberado é eliminado pelo aquecimento da solução até ebulição. A solução é então titulada com solução padronizada de I₂ (FRANCO *et al.*, 1995).

O antimônio trivalente pode ser especificamente determinado por métodos polarográficos (YOUSSEF *et al.*, 1987).

O Sb(V) pode ser determinado também pelo método iodométrico. O método é baseado na redução do antimônio pentavalente a antimônio trivalente pelo iodeto; o iodeto exerce uma ação redutora sobre sistemas com maior potencial redox com a formação de quantidades equivalentes de iodo. O iodo liberado é titulado com solução padronizada de tiosulfato de sódio (FRANCO *et al.*, 1995).

As técnicas hífenadas permitem simultaneamente separar e quantificar as espécies Sb(III) e Sb(V) e organoantimoniais, onde se destaca entre essas a eletroforese capilar com espectrometria de massa 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) (KRACHLER & EMONS, 2001). Embora esses métodos sejam os mais adequados para análise de especiação do antimônio, pois é capaz de separar as espécies e quantificá-las, diminuindo desta forma o erro introduzido nas determinações indiretas, são pouco viáveis para serem

empregados na rotina do controle de qualidade de medicamentos onde se deseja métodos simples, e de custos mais acessíveis.

Existem ainda descritos na literatura outros métodos de doseamento como titulometria pelo permanganato de potássio, HPLC de fase reversa, espectrofotometria, entre outros (BRODERSEN, HASSEN & HASSAUNA, 1997).

Excelentes resultados têm se conseguido com o método de espectrometria de absorção atômica que consiste em submeter à solução de antimoniato de meglumina diluída em ácido tartárico 0,5% em chama de ar + acetileno, utilizando comprimento de onda 217,6 nm. Este método permite a dosagem do antimônio total uma vez que requer a redução das formas oxidadas do antimônio ao seu estado fundamental. O antimônio trivalente pode ser determinado pelo mesmo método através de geração de hidreto (WANG & CHAO, 2001; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2002). Este é o método descrito pela Farmacopéia Brasileira 4ª ed.

Estudos realizados para a determinação de antimônio trivalente e antimônio total utilizando espectrometria de absorção atômica por geração de hidretos em batelada e utilizando injeção em fluxo já foram realizados. O método é baseado na complexação seletiva das espécies de antimônio de forma a permitir, nas condições ótimas de análise, a formação de estibina proveniente da espécie trivalente sem a interferência do antimônio pentavalente, mesmo este em grandes concentrações (FLORES *et al.*, 2003).

1.6 Justificativa

A solução injetável de antimoniato de meglumina é distribuída pelo Ministério da Saúde para cerca de 40.000 pacientes por ano.

Em outubro de 2000 a Fundação Nacional de Saúde, FUNASA, por meio do Centro Nacional de Epidemiologia, recebeu notificações de eventos adversos de severidade grave (abscessos estéreis, intensas dores musculares e nas articulações e reações alérgicas em pacientes que se encontravam fazendo uso do antimoniato de meglumina injetável produzido por um Laboratório Nacional (X).

Estudos epidemiológicos mostraram claramente uma associação significativa entre o desenvolvimento dessas reações e o uso do produto fabricado pelo Laboratório (X). Exames laboratoriais mostraram que esse medicamento apresentava altos níveis de antimônio, pH abaixo do valor de referência e se encontrava intrinsecamente contaminado com altos níveis de Chumbo e Arsênio (REAÇÕES ADVERSAS GRAVES

ASSOCIADAS COM O USO DE ANTIMONIATO DE MEGLUMINA COTAMINADO COM ARSÊNIO E CHUMBO, 2001).

Em junho de 2002 a Anvisa divulgou alerta sobre falha terapêutica ocorrida com o antimoniato de meglumina (Glucantime®) devido a possíveis erros de posologia.

A realidade é que a indústria farmacêutica de capital estrangeiro pouco tem investido em pesquisas de desenvolvimento de fármacos e produtos destinados as chamadas “doenças órfãs”. Não existe por parte das indústrias multinacionais interesse comercial na produção de fármacos destinados a pacientes que na sua maioria são de baixa renda e recebem esses medicamentos através de programas governamentais, pois a leishmaniose é uma doença endêmica tropical que atinge populações pobres de diversas regiões de nosso País.

A solução de injetável de antimoniato de meglumina apesar de ser utilizada a mais de 60 anos, só no ano de 2003 é que sua monografia foi publicada na Farmacopéia Brasileira. Até um ano atrás não eram descritos em compêndios oficiais os limites de contaminantes permitidos deste produto nem de sua matéria-prima, nem metodologias analíticas para sua detecção.

A lei 8.078/90 (Código de Defesa do Consumidor), reafirma a responsabilidade do produtor pela qualidade do produto e do serviço. O Código introduziu a inversão do ônus da prova, isto é, em caso de alegação de impropriedade, cabe ao fabricante provar ser o produto bom para o consumo. Por outro lado, o controle sanitário de produtos se dá através de várias ações, entre as quais se inclui a submissão das indústrias a normas estabelecidas para registro de produtos destinados ao uso humano.

No fato ocorrido em outubro de 2000 com a solução injetável de antimoniato de meglumina, os Laboratórios Oficiais destinados ao controle sanitário de produtos tiveram dificuldades em comprovar a impropriedade do medicamento, pois, na ocasião, não existiam limites de contaminantes estabelecidos em compêndios oficiais para o mesmo.

As Farmacopéias constituem os códigos mais tradicionais que definem a qualidade dos insumos autorizados a serem utilizados na manipulação e produção industrial de medicamentos. O papel das farmacopéias limita-se a inscrever os insumos autorizados para uso no país, estabelecendo os ensaios que permitem controlar as impurezas e avaliar as características dos mesmos.

Os insumos farmoquímicos incluídos em farmacopéias são homologados por órgãos responsáveis pelo registro de medicamentos e de outros produtos para saúde, em

cada país. No entanto, esses mesmos órgãos durante anos, admitiram para uso na terapêutica, substâncias não incluídas nas Farmacopéias.

A Lei 6360 de 1976 e o decreto 79094 de 1977 são respectivamente a legislação e a regulamentação, em vigor no Brasil, que disciplina o registro de fármacos e a autorização de funcionamento das empresas que se dedicam à atividade de produção de matérias-primas. Na legislação consta como sinonímia os termos, matéria-prima, droga, insumo ativo, princípio ativo, farmoquímico, dentre outros. A referida legislação determina que as matérias-primas farmacêuticas sejam registradas junto a um órgão do Ministério da Saúde, da mesma forma que os medicamentos, correlatos, produtos de higiene, cosméticos, perfumes, saneantes domissanitários e outros definidos nos mesmos.

No entanto, cabe ressaltar que as Portarias e Resoluções do Ministério da Saúde, que tem por objetivo implementar o disposto na legislação, liberam a exigência do registro das matérias-primas para todas as categorias de produtos.

A Portaria nº 15, de 4 de abril de 1995 determinou a todos os estabelecimentos produtores de farmoquímicos o cumprimento das diretrizes estabelecidas pelo "GUIA DE BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO PARA INDÚSTRIAS FARMOQUÍMICAS", acordado pelo Mercosul.

No ano passado a ANVISA publicou a RDC nº 35, de 25 de fevereiro de 2003, que prevê as boas práticas de armazenagem e fracionamento para insumos farmacêuticos. Esta Resolução, juntamente com a Portaria nº 15 vieram da necessidade de regular o mercado farmoquímico no sentido de qualificá-lo. No entanto, esta recente regulamentação abrangerá apenas parte da cadeia dos insumos farmacêuticos, pois as boas práticas de fracionamento e armazenamento, bem como as boas práticas de fabricação, não garantem por si só a qualidade dos insumos farmacêuticos, pois como ocorre para os produtos farmacêuticos, os farmoquímicos também deveriam ser registrados junto a ANVISA.

Nos Países Europeus e nos Estados Unidos existe o controle da qualidade dos insumos consumidos pela indústria farmacêutica instalada. Na Europa os fabricantes certificam seus insumos apresentando documentação pertinente de suas matérias-primas – Drug Master File à Farmacopéia Européia, as quais são analisadas por peritos que as certificam quanto a sua qualidade.

A Leishmaniose Tegumentar Americana encontra-se, segundo a organização mundial de saúde (OMS), entre as seis doenças infecto-parasitárias de maior importância.

Distribui-se amplamente no continente Americano, estendendo-se do sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. No Brasil, tem sido assinalada em praticamente

todos os Estados. No Rio de Janeiro foram registrados em 2003 vários casos da doença na área urbana em Seropédica e em 2004 no município de Nova Iguaçu (NOVIS, 2004).

O perfil dos pacientes apresenta mudanças, atingindo pessoas de todos os sexos e idades (REAÇÕES ADVERSAS GRAVES ASSOCIADAS COM O USO DE ANTIMONIATO DE MEGLUMINA COTAMINADO COM ARSÊNIO E CHUMBO, 2001).

Os compostos antimoniais, sob a forma de sais pentavalentes, são as drogas de escolha a mais de 60 anos para o tratamento da Leishmaniose em todo o mundo (ALKHAWAJAH, 1992).

Em 1912 se tratou no Brasil o primeiro caso de Leishmaniose cutânea com antiemético antimonial trivalente. Em 1920, devido à alta toxicidade dos compostos antimoniais trivalentes, eles foram substituídos pelos compostos antimoniais pentavalentes, menos tóxicos (KIRK & SATI, 1947).

Existem atualmente, somente duas formulações disponíveis comercialmente: o estibugluconato de sódio e o antimoniato de meglumina, ambos na forma injetável por serem irritantes da mucosa intestinal e a sua baixa absorção por esta via (GOODMAN & GILMAN, 1983). No momento, o Ministério da Saúde adquire o antimoniato de meglumina (Glucantime®) da Aventis Pharma que se tornou o único produtor deste medicamento no Brasil desde a retirada do comércio do antimoniato de meglumina de origem nacional pela ANVISA, devido à contaminação do mesmo por metais pesados (Pb e As) (SILVA, 2001).

No passado, o Brasil já adquiriu através de licitação internacional, o estibugluconato de sódio BP88 produzido na China pela Ihandong Xinhua. Existem estudos realizados por Saldanha et. al.⁽³⁶⁾, que relatam maior número de efeitos colaterais em grupos tratados com BP88 em relação aos tratados com o antimoniato de meglumina (SALDANHA, ROMERO & GUERRA, 2000).

Goodwin e Page (1943) sugeriram que os antimoniais pentavalentes têm que se converter em trivalentes no interior dos macrófagos para poder exercer sua ação.

Reconhecendo a importância do estado de oxidação dos antimoniatos para o entendimento dos seus efeitos tóxicos e da sua ação, vislumbramos a necessidade do estudo de técnicas galênicas que visam estabilizar este produto, bem como um rigoroso estudo comparativo das metodologias analíticas a serem utilizadas em seu controle de qualidade, que permitam detectar com alto grau de precisão estas formas. Desta forma, seria possível se modular a toxicidade do produto através de formulações mais estáveis.

2 OBJETIVOS

A proposta do estudo de modulação da toxicidade de injetáveis de antimoniato de meglumina tomou por base o estudo de desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas bem como o estudo e validação de método analítico capaz de quantificar as diferentes espécies de antimônio presentes no produto, tendo a finalidade de contribuir com o desenvolvimento da formulação e controle de qualidade, para posterior produção em escala industrial, deste medicamento pelo Laboratório Químico Farmacêutico do Exército, pertencente à Rede de Laboratórios Oficiais, o qual produz medicamentos com objetivo de apoiar programas governamentais, através de convênio com o ministério da Saúde.

Visando a auto-suficiência na produção de um medicamento de grande importância para o nosso País, levando a melhoria do acesso de medicamentos antiprotozoários à população, consideraram-se como principais objetivos deste trabalho:

1. Caracterizar três princípios-ativos de origens diferentes a fim estabelecer a importância da origem do fármaco utilizado na qualidade do produto final;
2. Ajustar a formulação através da experimentação de diferentes excipientes com funções antioxidante/estabilizante e tamponantes com objetivo de evitar a redução da molécula de antimoniato de meglumina em solução.
3. Ajustar a formulação através da experimentação de diferentes veículos visando a redução da constante dielétrica do meio diminuindo desta forma reações radicalares que podem contribuir com os processos de oxi-redução no produto.
4. Estudar a otimização e validação de metodologia analítica utilizando ICP-OES para análise de especiação de antimônio como técnica alternativa à preconizada pela Farmacopéia Brasileira 4ª ed. para a implementação desta técnica na rotina de controle de qualidade.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório Químico Farmacêutico do Exército (LQFEx), no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e no Laboratório de Espectroanalítica, Automação e Ambiental da Universidade Federal Fluminense (UFF).

3.1 Materiais

3.1.1 Formulações

Toda a matéria-prima utilizada na preparação das formulações foi de grau farmacêutico das seguintes procedências:

- N-metil Glucamina antimoniato da Aventis Pharma Romainville – France lote 301754 (Glucantime®);
- Metabissulfito de sódio do fabricante BASF lote R 710201;
- Etilenodiaminotetracetato dissódico do fabricante FARMOS lote 97-9716;
- Metilparabeno (nipagim) USP PROQUÍMICA;
- Hidróxido de sódio do fabricante MERCK;
- Fosfato monobásico de potássio KH_2PO_4 do fabricante VETEC;
- Propilenoglicol do fabricante DOW QUÍMICA S.A.

A água utilizada no preparo das formulações foi a água para injetáveis (WFI) que é obtida, a partir da água purificada, por destilação ou osmose reversa com duplo passo a qual não deve conter aditivo (THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2000). Esta água foi avaliada previamente quanto à presença de metais pesados e antimônio.

As ampolas utilizadas para envase do produto foram fornecidas pela SHOTT glass made of ideas de qualidade, vidro tipo I, preconizado para envase de injetáveis pela USP XXIV.

As formulações foram preparadas em recipientes de vidro PIREX e a agitação realizada em agitador mecânico da marca FISATOM modelo 713 D.

A balança utilizada para pesar as matérias-primas foi a analítica de quatro casas decimais da marca GEHAKA AG 200.

Para a filtração esterilizante realizada em 6 formulações foi utilizado o cartucho de 0,22 μm da marca Millipore.

A autoclave utilizada para esterilização das formulações 1 e 2 foi a horizontal, dupla porta da marca SERCOM e estava devidamente qualificada e calibrada de acordo com as normas vigentes de Boas Práticas de Fabricação (BPF).

A máquina utilizada para envase do produto foi da marca Martinez taboada sem utilização de nitrogênio, pois não havia disponibilidade dessas instalações.

As ampolas contendo o produto foram colocadas para estudo acelerado de estabilidade em câmara climática da marca MS-MISTURA modelo MSM 013/RS devidamente calibrada e qualificada de acordo com normas ISO 17025 (NBR ISO/IEC 17025, 2001).

3.1.2 Metodologia analítica

Para otimização e validação do método analítico as amostras utilizadas foram os padrões inorgânicos de Sb(III) ($K(SbO)C_4H_4O_6 + 0,5 H_2O$) Merck, titrisol[®] em água ultra pura milli-Q (18.2 M Ω) e de Sb(V) $KSb(OH)_6$ Sigma-Aldrich em água Milli-Q (18.2 M Ω) e ampolas do antimoniato de meglumina do mercado, fornecidas pela Farmácia do Hospital Universitário Antônio Pedro.

Para a quantificação do antimônio total, antimônio trivalente e metais pesados, foi utilizado o espectrômetro de emissão ótica usando plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) modelo ULTIMA-2 (JOBIN YVON) (figura 6), acoplado a um amostrador automático do modelo AS 421 (JOBIN YVON) (figura 7).

A bomba peristáltica utilizada para a introdução das soluções de borohidreto de sódio e de ácido cítrico foi da marca MINIPULS 3 GILSON[®] e para drenar o líquido da câmara separadora gás/líquido para o descarte foi da marca LAB CRAFT MOD. HYDRIS 05, ambas ligadas à câmara de separação gás-líquido, destinada à geração de hidretos, através de tubos de PVC flexível.



Figura 6 - ICP-OES modelo ULTIMA-2 (JOBIN YVON)



Figura 7 - Amostrador automático modelo AS 421 (JOBIN YVON)

Reagentes de grau pró-análise foram utilizados no preparo das soluções analíticas e das amostras. Em todos os procedimentos utilizou-se água milli-Q ($> 16 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) previamente destilada e deionizada. As soluções analíticas foram preparadas a partir de solução estoque de 1000 mg/L de antimônio pentavalente KSb(OH)_6 Sigma-Aldrich e antimônio trivalente ($\text{K(SbO)C}_4\text{H}_4\text{O}_6 + 0,5 \text{ H}_2\text{O}$) Merck, titrisol[®] em água, uma vez que não existe disponível no mercado materiais de referência certificados das espécies inorgânicas de antimônio, nem tão pouco do antimoniato de meglumina.

A balança analítica utilizada para pesagem, dos padrões e reagentes foi da marca SARTORIUS BL 210 S que possui precisão de 0,2 mg.

Para determinação de Sb(III) o agente redutor usado foi NaBH_4 2% (P.A.VETEC) estabilizado com NaOH 0,01M (P.A. MERCK). Como agente complexante foi utilizado ácido cítrico a 30% (P.A. MERCK) preparados sempre no dia da análise.

Para determinação de Sb total as soluções foram diluídas em ácido tartárico 0,5% (MERCK) preparados no dia da análise.

A densidade das preparações foi medida em picnômetro de vidro da marca SCHOTT.

A determinação e controle do pH das formulações foram feitos em pHmetro da marca QUIMIS aparelhos científicos Ltda, modelo Q 400 M.

3.1.3 Caracterização do princípio ativo

3.1.3.1 Solubilidade

Para verificação da solubilidade utilizou-se água destilada, éter etílico, clorofórmio e éter etílico todos de grau analítico da marca MERCK.

3.1.3.2 Difração de raios-x (DRX)

As amostras de antimoniato de meglumina provenientes de três fabricantes diferentes foram analisadas em Difratorômetro de Raios-X operado a 40KV e 30mA. O ângulo de difração 2θ foi registrado de 2 a 10° em temperatura ambiente e a radiação CuK_α foi utilizada como fonte dos raios-X. Foi utilizado o difratômetro de raios-X da marca Philips modelo 1970 (manual) da UFRJ.

3.1.3.3 Determinação de metais pesados

Os padrões utilizados para determinação de metais pesados (Al; As; Bi; Cd; Cr; Cu; Mn; Ni; Pb; Hg e Zn) foram todos padrões de referência ASSURANCE Spex Certiprep.

Foi utilizado o banho ultra-sônico da marca THORNTON, modelo USC 700 para dissolução dos padrões e das amostras.

3.2 Métodos

3.2.1 Formulações

Para o nosso trabalho optou-se por ajustar a formulação através da experimentação de diferentes excipientes com função antioxidante/estabilizante com objetivo de evitar a redução da molécula de antimoniato de meglumina em solução. Para todas as formulações utilizamos como antioxidante o metabissulfito de sódio na concentração de 0,05% e o Na₂EDTA 0,1% como sequestrante auxiliando na redução do processo de oxidação. Para as soluções 2, 4, 6 e 8 foram utilizados tampão fosfato pH 6,5 a fim de verificar a influência deste na estabilidade do pH da solução. Em todas as formulações foi utilizado o nipagim 0,1% como conservante para evitar possíveis contaminações que poderiam interferir nos resultados. Como veículo foi utilizada a água para as formulações 1, 2, 3, 4 e para as formulações 5 e 6 uma mistura de água e propilenoglicol na proporção de 20:80 e nas formulações 7 e 8 a mesma mistura nas proporção de 50:50. A escolha do propilenoglicol se fez por ser este um veículo com menor constante dielétrica que da água, visando diminuir reações radicalares que podem contribuir com os processos de oxirredução no produto.

Foram preparadas 600 mL de cada oito formulações sendo seis diferentes de acordo com tabela 1.

Tabela 1- Formulações propostas para o produto Antimoniato de Meglumina

MATÉRIA-PRIMA	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Antimoniato de meglumina	29,78	29,78	29,78	29,78	29,78	29,78	29,78	29,78
Metabissulfito de sódio	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
EDTA	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Nipagim	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
NaOH	—	0,09	—	0,09	—	0,09	—	0,09
KH ₂ PO ₄	—	1,05	—	1,05	—	1,05	—	1,06
Propilenoglicol	—	—	—	—	14,0	13,83	34,83	34,4
Água	69,97	68,83	69,97	68,83	56,0	55,17	34,83	34,4

As formulações 1 e 2 foram feitas em duplicatas. Metade foi submetida a autoclavação a 121°C por 15 minutos e metade foi submetida à filtração esterilizante para que pudéssemos avaliar a influência da autoclavação na estabilidade das preparações. As formulações foram preparadas em escala farmacotécnica utilizando-se recipiente de vidro a fim de minimizar a incorporação de metais pesados que poderia por ventura ser cedido pelo recipiente de aço inox.

Para o preparo das formulações 1 e 3 aqueceu-se 200 mL de água para dissolução do nipagim, em outro recipiente foi dissolvido o metabissulfito e o Na₂EDTA em 50 mL de água. A solução do metabissulfito e Na₂EDTA foi adicionada à solução de nipagim após a mesma atingir a temperatura ambiente. Logo em seguida foi adicionado, sob agitação, o antimoniato de meglumina até completa dissolução.

Para o preparo das formulações 2 e 4 procedimento semelhante ao preparo das formulações 1 e 3 foram tomados, sendo o NaOH e o KH₂PO₄ foram dissolvidos em 20 mL de água e adicionados a solução de nipagim.

Para o preparo da formulação 5 procedeu-se da seguinte maneira: dissolveu-se o nipagim em parte do propilenoglicol (40 mL). O Na₂EDTA e o metabissulfito foram dissolvidos em parte da água (160 mL). Uma mistura propileno/água foi feita com o restante da água e propilenoglicol (44 mL/176 mL). As soluções iniciais foram

adicionadas à parte desta mistura. Logo após o antimoniato de meglumina foi adicionado sob constante agitação até completa dissolução para então ser avolumado com o restante da mistura propilenoglicol/água.

A formulação 6 foi preparada de forma semelhante à formulação 5, sendo que em uma parte da água (60 mL) foi adicionado o metabisulfito de sódio e o Na₂EDTA e em outra parte (100 mL) foi adicionado o NaOH e o KH₂PO₄.

As formulações 7 e 8 foram preparadas de forma semelhante às formulações 5 e 6, sendo que a proporção propilenoglicol/água variou de 20:80 para 50:50.

As formulações 1 e 2 foram autoclavadas a 121°C por 15 minutos e as demais foram submetidas à filtração esterilizante. Logo após as formulações foram envasadas em ampolas de vidro incolor do tipo I. No processo de envase houve perda de cerca de 30% das ampolas.

Logo após as formulações foram identificadas e colocadas na câmara climática a 40° C por 90 dias. A cada 30 dias, amostras de cada formulação foram retiradas e os parâmetros de pH, densidade e teor de Sb (III) e Sb total foram avaliados. Quatro ampolas de cada formulação foram retiradas para cada teste.

Os teores de Sb (III) e Sb total nas formulações foram determinados no laboratório de Química ambiental da Universidade Federal de Santa Maria. O método utilizado foi o HG-AAS e AAS respectivamente descritos na Farmacopéia Brasileira 4^a ed. (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2002). A terceirização foi necessária uma vez que a metodologia proposta por este trabalho ainda se encontrava em fase de validação e não se dispunha de tempo útil para proceder as análises após o término da validação.

O programa Microsoft Excel foi utilizado para obtenção dos cálculos estatísticos deste trabalho. O Box Plot foi utilizado como ferramenta auxiliar na avaliação das formulações. Para construção do Box Plot foi utilizado o Softwear Statsoft company.

3.2.2 Validação da metodologia analítica

Para validação analítica foi seguido o Guia para validação de metodologia analítica segundo RE n° 899, 29 de maio de 2003 da ANVISA.

O instrumento utilizado (ICP-OES), para determinação de Sb (III) e Sb total, possui resolução na ordem de 4 a 6 picômetros o que permite a obtenção de seletividade espectral e baixos limites de detecção. O equipamento foi otimizado e avaliado quanto ao sistema dispersivo (medida de resolução UV e VIS) através da relação do sinal das linhas Mg II/Mg I; quanto à colimação (limpeza da lente) através da medida do fundo

nas linhas do Ba 455/233; quanto a nebulização (medida de eficiência do nebulizador) através da relação do sinal Mg 285/fundo 285; quanto à precisão (medidas de repetibilidade e reprodutibilidade) através das medidas dos RSD e RSD Mg (I) 285, respectivamente, e avaliação do sistema ICP-OES (medida de limite de detecção), através do LD Ba 233 e Zn 206.

Os parâmetros operacionais instrumentais relevantes são mostrados na tabela 2.

Tabela 2-Parâmetros operacionais instrumentais relevantes do ICP-OES e HG-ICP-OES

	ICP (nebulização convencional)	HG-ICP-OES
Potência (w)	1200	1200
Vazão de argônio (L/min)		
Nebulizador:	0,48	–
Gás de arraste:	–	0,2
Plasma:	15	1,5
Gás auxiliar:	0	0
Sheath gas:	0,2	0,4
Nebulizador	Meinhard com câmara ciclônica	–
Pressão de nebulização (bar)	2,73	–
Vazão do ácido cítrico (mL/min)	–	0,6
Vazão do borohidreto de sódio (mL/min)	–	1,7
Vazão da amostra (mL/min)	–	1,3

3. 2.2.1 Determinação de Sb(III)

Para determinação da espécie Sb(III) nas formulações das soluções injetáveis de antimoniato de meglumina o método escolhido para validação foi o de geração de hidretos por espectrometria de emissão ótica usando plasma indutivamente acoplado (HG-ICP-OES). Este método consiste, na formação de estibina (SbH_3), através da redução do

Sb(III) pelo borohidreto de sódio (NaBH₄) em meio ácido, o qual por ser volátil é facilmente transportado pelo argônio para o plasma.

Thompson, Pahlavanpour e Kierkbright, (1978) relataram o uso da geração de hidretos para a determinação de As, Bi, Se e Te por ICP-OES, tendo sido os hidretos continuamente gerados pela reação com o NaBH₄, introduzidos diretamente no plasma e os elementos detectados simultaneamente. Nesta técnica, os limites de detecção são melhores em pelo menos uma ordem de grandeza em relação a nebulização convencional.

Sistemas de fluxo são preferidos aos de batelada no que se refere a estabilização contínua do fundo gerado pelos subprodutos da reação (H₂ e H₂O) pois esses são produzidos em fluxo constante no primeiro, ao contrário do que ocorre no segundo sistema (CÂMARA & GUNTINAS, 1991).

Em relação às interferências na cinética de redução sabe-se, por exemplo, que o Sb, pode existir, em solução, em dois estados de oxidação: Sb(III) e Sb(V) e que estados de oxidação mais altos apresentam velocidade de redução mais lenta. No caso do grupo 15 da tabela periódica (As, Sb e Bi), o estado +5 leva a sinais menores que o estado +3. Estas propriedades distintas dos diferentes estados de oxidação são úteis na especiação química, permitindo, por exemplo, determinações seletivas Sb(III) e Sb(V), por diferença (APTE & HOWARD, 1986).

Como na solução de antimoniato de meglumina pode ocorrer à presença das espécies Sb(III) e Sb(V) onde a espécie pentavalente poderá estar presente em proporções de até 40 vezes maior que a anterior, testes de seletividade, tiveram que ser realizados a fim de verificarmos a interferência do elemento pentavalente na quantificação do trivalente.

Neste método o ácido cítrico foi utilizado para promover a complexação seletiva da espécie pentavalente permitindo que o Sb(III) fique livre para formar a estibina de forma seletiva (MOHAMMAD *et al.*, 1990).

Como o tempo de contato entre a amostra e o ácido cítrico é fundamental para que ocorra a complexação, nós utilizamos um reator helicoidal construído com tubo de polietileno.

3. 2.2.1.1 Determinação da seletividade:

Inicialmente foram realizadas medidas com soluções de ácido cítrico nas concentrações de 2%; 4%; 10%; 15%; 20%; 25%; e 30% e a média das intensidades de

emissão das três medidas para cada concentração foram registradas para avaliação da influência das concentrações do ácido cítrico no método proposto. Soluções de borohidreto de sódio nas concentrações de 1%; 2%, 3%; 4%; 5% e 6% foram preparadas a fim de avaliarmos a sua influência nas intensidades de emissão medidas, nesta etapa a concentração de ácido cítrico empregada foi mantida em 30%.

Por último, comprimentos de reatores confeccionados com tubos de polietileno de 1m; 2m; 5m e 6m, foram testados utilizando-se ácido cítrico 30% e borohidreto de sódio 2% em NaOH 0,01M com a finalidade de avaliarmos a influência do tempo de contato entre a amostra e a solução de ácido cítrico nas intensidades de emissão.

Para estes testes foram utilizados padrões inorgânicos de Sb(III) (tartarato de antimônio e potássio) na concentração de 0,5 mg/L em água, padrão inorgânico de Sb(V) (hexamonato de antimônio e potássio) na concentração de 20 mg/L e uma solução contendo os dois padrões de Sb(III) e Sb(V) nas concentrações de 0,5 mg/L e 20 mg/L respectivamente.

Para os testes do comprimento dos reatores foi utilizada além dos padrões inorgânicos de Sb(III) 0,5 mg/L e Sb(V) 20 mg/L, amostra comercial diluída 4000 vezes.

Através dos resultados obtidos no teste de seletividade, os parâmetros da análise foram estabelecidos. Utilizando estes, foram então avaliadas a linearidade, exatidão precisão e limite de quantificação a fim de validarmos o método.

3. 2.2.1.2 Determinação da Linearidade:

Foi determinada pela análise de cinco concentrações diferentes compreendendo zero como nível de Sb(III) esperado até 120% do limite máximo especificado que é de 4000 mg/L, conforme Farmacopéia Brasileira 4ª edição. Considerando-se a diluição utilizada nos trabalhos de 5000 vezes.

$$4000 \text{ mg/L} / 5000 = 0,8 \text{ mg/L}$$

$$0,8 \text{ mg/L} \times 120\% = 0,96 \text{ mg/L}$$

As concentrações utilizadas para construção da curva foram: zero; 0,1; 0,25; 0,5 e 1 mg/L, correspondendo a 0, 12,5%; 31,2%; 62,5% e 125% do valor máximo. Este intervalo de concentração compreende o menor valor esperado de Sb(III) até 120% do valor máximo que é 0,96 mg/L.

Os valores das intensidades compreendem a média de três medidas para cada concentração.

Para verificação da linearidade, métodos estatísticos foram utilizados para determinação do coeficiente de correlação, interseção com o eixo Y, coeficiente angular, e desvio padrão relativo.

3. 2.2.1.3 Determinação da exatidão:

A exatidão foi determinada a partir da adição de quantidade conhecida de Sb(III) na forma do padrão inorgânico tartarato de antimônio e potássio a uma mistura dos componentes do medicamento incluindo a adição de quantidades de Sb(V) na forma do padrão inorgânico hexahidróxido de antimônio e potássio na proporção de 20 vezes mais a quantidade de Sb(III) adicionada, (placebo contaminado). A fórmula do placebo encontra-se na tabela 3.

Tabela 3- Fórmula do placebo utilizado na preparação da amostra para teste de exatidão

EXCIPIENTE	QUANTIDADE
Metabissulfito de sódio	0,25 g
Na ₂ EDTA	0,5 g
Nipagim	0,5 g
Água para injetáveis qsp	500 mL

A exatidão foi calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida de Sb(III) adicionado ao placebo.

A exatidão do método foi verificada a partir de nove determinações, ou seja, três concentrações com três replicatas cada, quais sejam: 3,200mg/mL (80%), 4,000 mg/mL (100%) e 4,800 mg/mL (120%) do valor declarado como máximo pela FB 4^a ed.

Aos resultados encontrados foi aplicado o teste t de Student para verificar se as concentrações encontradas eram estatisticamente iguais às concentrações esperadas pela adição do padrão. Foi verificado ainda se o valor teórico esperado se encontrava dentro do intervalo de confiança (IC) encontrado para os resultados.

3. 2.2.1.4 Determinação da precisão:

Para determinação da precisão do método foi utilizada amostra do produto injetável antimoniato de meglumina encontrado no mercado. A precisão do método foi considerada em dois níveis: repetibilidade (precisão intracorrída) e precisão intermediária (precisão intercorrída).

Para verificação da repetibilidade foram feitas 6 (seis) determinações da amostra na concentração de 100% e o desvio padrão relativo foi calculado, este não deverá ser superior a 5% para que o método seja considerado repetitivo, segundo RE nº 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA . A concordância entre os resultados foi verificada através do teste t de Student.

Para determinação da precisão intermediária foram realizadas 6 (seis) determinações da amostra a 100% em intervalo de 15 dias realizadas no mesmo laboratório, no mesmo equipamento, mas com analistas diferentes.

A concordância entre os resultados foi verificada através do teste F de Snedecor (para verificar se as variâncias eram estatisticamente iguais) e teste t para variâncias agrupadas.

3. 2.2.1.5 Determinação do Limite de Quantificação:

Foi obtido do desvio padrão a partir da curva de calibração proveniente das análises de 8 (oito) amostras do branco. Ele representa a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinado com precisão e exatidão aceitáveis sob condições experimentais estabelecidas (Figura 8).

$$LQ = \frac{SD_a \times 10}{\text{Coef.ang}}$$

Figura 8- Equação que expressa o limite de quantificação

3. 2.2.2 Determinação de Sb(V)

O teor de Sb(V) na amostra foi determinado pela diferença entre o teor de Sb total e Sb(III) .

Para determinação de Sb total foi empregada a técnica de ICP-OES que é uma técnica que se baseia na medida da emissão de luz por átomos e íons excitados. A excitação ocorre em plasma de argônio a uma temperatura de até 10000° K. A intensidade da radiação luminosa emitida no λ de 206,833 nm permite a quantificação do Sb total.

Para nebulização da amostra foi empregado nebulizador Mira-Mist acoplado a uma câmara ciclônica. O comprimento de onda para medida foi escolhido analisando-se as linhas livres de interferências espectrais para o Sb.

Para validação deste método foi dada ênfase aos parâmetros de linearidade, exatidão, precisão e limite de quantificação.

3. 2.2.2.1 Determinação da Linearidade:

Para determinação da linearidade foi utilizado padrão inorgânico de Sb(III) (tartarato de antimônio e potássio) e não o padrão de Sb(V), pois o primeiro apresenta solubilidade em água superior ao segundo facilitando o trabalho, uma vez que tivemos que partir de altas concentrações para realização dos testes. A escolha é irrelevante, pois o método determina a quantidade de Sb total presente na amostra. Para construção da curva de calibração cinco concentrações diferentes foram utilizadas, 0; 2,5 mg/L; 5 mg/L; 7,5 mg/L e 10 mg/L (tabela 4). Esta faixa compreende os valores de 80% a 120% da concentração teórica de 81000 mg/L considerando-se a diluição utilizada de 20000 vezes em solução de ácido tartárico 0,5%, conforme tabela 5.

Tabela 4- Percentual e concentração de padrão utilizado para construção da curva para linearidade de Sb total

Porcentagem da concentração teórica esperada (%)	Concentração (mg/L)	Concentração final (mg/L)
0	0	0
61,7	50000	2,5
123,5	100000	5,0
185,2	150000	7,5
246,9	200000	10,0

Tabela 5- Percentual em relação às concentrações teóricas de de Sb(V) no produto

Porcentagem (%)	Concentração (mg/L)	Concentração final (mg/L)
80	64800	3,24
100	81000	4,05
120	97200	4,86

As concentrações escolhidas para construção da curva de calibração foram: zero mg/L; 2,5 mg/L; 5,0 mg/L; 7,5 mg/L e 10 mg/L. Para construção da curva de calibração foram consideradas as médias de três leituras realizadas para cada concentração.

Para verificação da linearidade, métodos estatísticos foram utilizados para determinação do coeficiente de correlação, interseção com o eixo Y, coeficiente angular e desvio padrão relativo.

3. 2.2.2.2 Determinação da exatidão:

Para determinação da exatidão do método quantidades conhecidas de Sb(III) foram adicionadas a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado).

A exatidão foi calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida de Sb(III) adicionado ao placebo.

A exatidão do método foi verificada a partir de nove determinações, ou seja, três concentrações com três replicatas cada, quais sejam: 64800 mg/L (80%), 81000 mg/L (100%) e 97200 mg/L (120%) do valor teórico declarado pela FB 4ª ed. (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2002).

Aos resultados encontrados foi aplicado o teste t de Student para verificar se as concentrações encontradas eram estatisticamente iguais às concentrações esperadas pela adição do padrão ao placebo. Foi verificado ainda se o valor teórico esperado se encontrava dentro do intervalo de confiança (IC) encontrado para os resultados.

3. 2.2.2.3 Determinação da precisão:

Para determinação da precisão do método foi utilizada amostra do produto (glucantime). A precisão do método foi considerada em dois níveis: Repetibilidade (precisão intracorrída) e Precisão intermediária (precisão intercorridas).

Para verificação da repetibilidade foram feitas 6 (seis) determinações da amostra na concentração de 100%.

A concordância entre os resultados foi verificada através do teste t de Student.

Para determinação da precisão intermediária foram realizadas 6 (seis) determinações da amostra a 100% em intervalo de 15 dias realizadas no mesmo laboratório, no mesmo equipamento, mas com analista diferente.

A verificação da concordância entre os resultados foi verificada através do teste F de Snedecor (para verificar se as variâncias são iguais) e teste t para variâncias agrupadas, uma vez que o primeiro verificou que as variâncias eram estatisticamente iguais.

3. 2.2.2.4 Determinação do Limite de Quantificação:

Foi obtido do desvio padrão a partir da curva de calibração proveniente das análises de 8 (oito) amostras do branco. Ele representa a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinado com precisão e exatidão aceitáveis sob condições experimentais estabelecidas.(ver figura 8, pág.29).

3.2.3 Caracterização do princípio ativo

3. 2.3.1 Solubilidade

Foi verificada a solubilidade das matérias primas de três procedências diferentes em água, etanol, éter etílico e clorofórmio, de acordo com Farmacopéia Brasileira 4^a ed.

3. 2.3.2 Difração de raios-x (DRX)

Na DRX, a interação entre o vetor elétrico de radiação X e os elétrons do material a ser analisado resultam em uma dispersão. Então, quando os raios-X sofrem dispersão devido à estrutura organizada presentes no cristal, ambas interferências, construtivas e destrutivas, surgem entre os raios dispersos uma vez que as distâncias entre os centros de dispersão são de mesma ordem de magnitude do comprimento de onda da radiação, resultando deste modo na difração. Quando um feixe de raios-X atinge uma superfície cristalina a um mesmo ângulo θ , uma parte destes raios é dispersa pela camada de átomos na superfície. A porção do feixe que não sofreu dispersão penetra na segunda camada de átomos onde novamente é dispersa, sendo que uma parte remanescente passa para uma terceira camada. O efeito cumulativo desse espalhamento nos centros regularmente espaçados do cristal resulta na difração do feixe em sua grande parte, do mesmo modo que a radiação visível é difratada pela reflexão reticular. Os requisitos para difração de raios-X são: (1) o espaçamento entre as camadas de átomos deve ser aproximadamente o mesmo que o comprimento de onda da radiação e (2) os centros de dispersão devem ser espacialmente distribuídos numa direção altamente regular (SKOOG, HOLLER & NIEMAN, 1998).

3. 2.3.3 Determinação de metais pesados

Para determinação de metais pesados utilizou-se a técnica de ICP-OES com sistema ótico do tipo seqüencial onde foram analisados os elementos alumínio, arsênio, bismuto, cádmio, chumbo, cobre, cromo, manganês, mercúrio, níquel e zinco, e o limite de no máximo 10 mg/L na solução de antimoniato de meglumina a 30% (P/V), correspondente a

33,33 µg/g de metais pesados na substância analisada não deverá ser excedido, de acordo com Farmacopéia Brasileira 4ª ed.

A determinação dos elementos, exceto do Hg, foi realizada utilizando-se nebulização convencional enquanto que para o Hg foi utilizado o método de geração de vapor frio devido a maior sensibilidade.

As amostras das matérias-primas foram diluídas a 3% em água, pois as mesmas não apresentam solubilidade em HNO₃ 2%. As amostras foram preparadas em triplicata imediatamente antes da análise.

As curvas de calibração foram obtidas a partir da preparação de solução contendo concomitantemente concentrações de 0, 0,1 mg/L, 0,5 mg/L e 1 mg/L de todos os elementos a partir de padrão de referência 1000 mg/L estabilizado em HNO₃ 2%.

Para determinação de Hg foi utilizado o método de geração de vapor frio empregando NaBH₄ 1% estabilizado em NaOH 0,01 M como agente redutor. A curva de calibração foi traçada a partir das concentrações de zero, 5, 25 e 50 µg/L de padrão de Hg obtidos da diluição do padrão de referência de Hg 1000 mg/L estabilizado em solução de K₂Cr₂O₇ 20% em HNO₃ 1:1.

As amostras foram diluídas a 3% em água. Todas amostras foram medidas em triplicata.

3. 2.3.4 Determinação dos teores de Sb(III) e Sb(V)

Os teores de Sb(III) e Sb(V) nas matérias-primas foram determinados pelas técnicas de espectrometria de absorção atômica usando geração de hidretos (HG-AAS) e espectrometria de absorção atômica (AAS), respectivamente.

O Programa Microsoft Excel foi utilizado para obtenção dos cálculos estatísticos deste trabalho.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Validação do Método Analítico

Neste item serão apresentados os resultados obtidos quanto aos estudos da validação das metodologias para a determinação de Sb(III) e Sb total.

4.1.1 Determinação de Sb(III)

A figura 9 mostra o diagrama dos aparatos utilizados para geração de hidretos em fluxo contínuo.

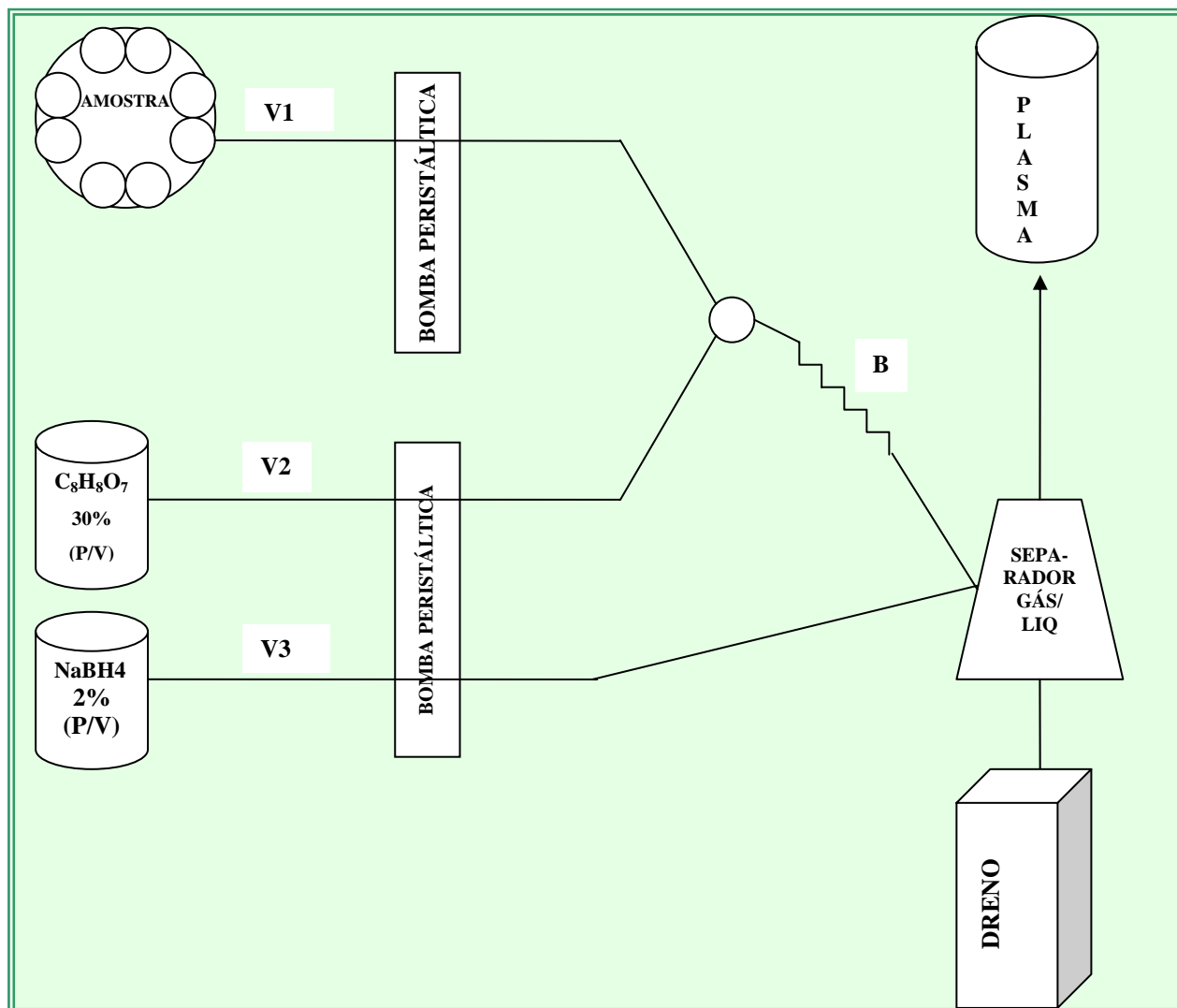


Figura 9 - Diagrama dos aparatos utilizados para geração de hidretos em fluxo contínuo.

B (volume do tubo) = 390 μ L

V1 (vazão da amostra) = 1,3 mL/min

V2 (vazão do ácido cítrico) = 0,6 mL/min

V3(vazão do borohidreto de sódio) = 1,7 mL/min

4.1.1.1 Seletividade

Vários parâmetros, como a concentração de ácido cítrico, concentração de borohidreto de sódio e tamanho do reator, foram avaliados a fim de que pudéssemos determinar a seletividade do método, ou seja, a determinação da espécie Sb(III) na presença de grandes quantidades da espécie Sb(V) sem que esta última interferisse no método.

4.1.1.1.1 O efeito da concentração do ácido cítrico

A princípio foi avaliada a influência da concentração do ácido cítrico na formação de estibina (SbH_3) a partir do Sb(III) e Sb(V). As concentrações foram variadas de 2, 4, 10, 15, 20, 25 e 30% e a concentração de borohidreto de sódio foi fixada em 1%. Verificou-se que com aumento da concentração de ácido cítrico houve um aumento no sinal de emissão para o Sb(III), tanto para solução de Sb(III) quanto para solução contendo as duas espécies, Sb(III) e Sb(V). Isso se deve provavelmente a diminuição do pH da solução, o qual deve contribuir para aumentar a velocidade de redução do Sb(III) pelo borohidreto de sódio e que a partir de 20% tende a se estabilizar. Nesse momento, o pH da solução, já bem baixo, não causa tanto impacto na velocidade de reação. Mohammad *et al.* (1990) já haviam observado que o sinal de emissão para o Sb (V) tende a diminuir em baixo pH, provavelmente por em baixo pH a reação de dissociação do ácido cítrico tende para formação de citrato o qual deve se complexar com o Sb(V). O estudo também mostrou que com o aumento da concentração de ácido cítrico o sinal da emissão para o Sb(V) tende a ser suprimido a partir da concentração de 10% provavelmente pela complexação do Sb(V) com o citrato formado em baixo pH, diminuindo ainda mais a velocidade de redução desta espécie, para estibina. Inicialmente observa-se um leve aumento na intensidade, que pode ser atribuído a queda de pH da solução, Mohammad *et al.* (1990) já haviam relatado a influência do pH no aumento do sinal de absorvância, tanto para Sb(III) quanto para Sb(V), quando estudaram a influência do pH na especiação de Sb(III) e Sb(V) usando HG-AAS. A queda da intensidade não é observada na solução contendo as duas espécies, na qual o sinal aumenta devido à presença de Sb(III) conforme mostra a figura 10. A concentração escolhida de ácido cítrico para os trabalhos subseqüentes foi de 30%. A tabela 6 mostra as intensidades para cada concentração e seus respectivos desvios-padrão.

Tabela-6 Intensidades (CPS) e seus respectivos desvios padrão para as diversas concentrações de ácido cítrico. Concentração de borohidreto de sódio=1%

Conc. ácido cítrico % (p/v)	Intensidade (cps) para Sb(III)	SD	(RSD) (%)	Intensidade (cps) para Sb(V)	SD	(RSD) (%)	Intensidade (cps) para Sb(V)/Sb(III)	SD	(RSD) (%)
2	11734	2054	17,5	2907	549	18,9	8563,34	2219	25,9
4	20450,17	626	3,06	5041,17	971	19,3	24678,5	4481	18,2
10	58475,92	4675	7,99	2375,67	262	11,0	66779,67	3617	5,4
15	73912,83	1743	2,36	934,33	157	16,8	72856,83	1720	2,4
20	76794,33	6624	8,63	763,66	162	21,2	75290,83	217	0,3
25	81723,67	2014	2,46	741,67	90,27	12,2	86699,67	3933	4,5
30	83953,33	3161	3,77	755,83	61,6	8,1	88192,33	6735	7,6

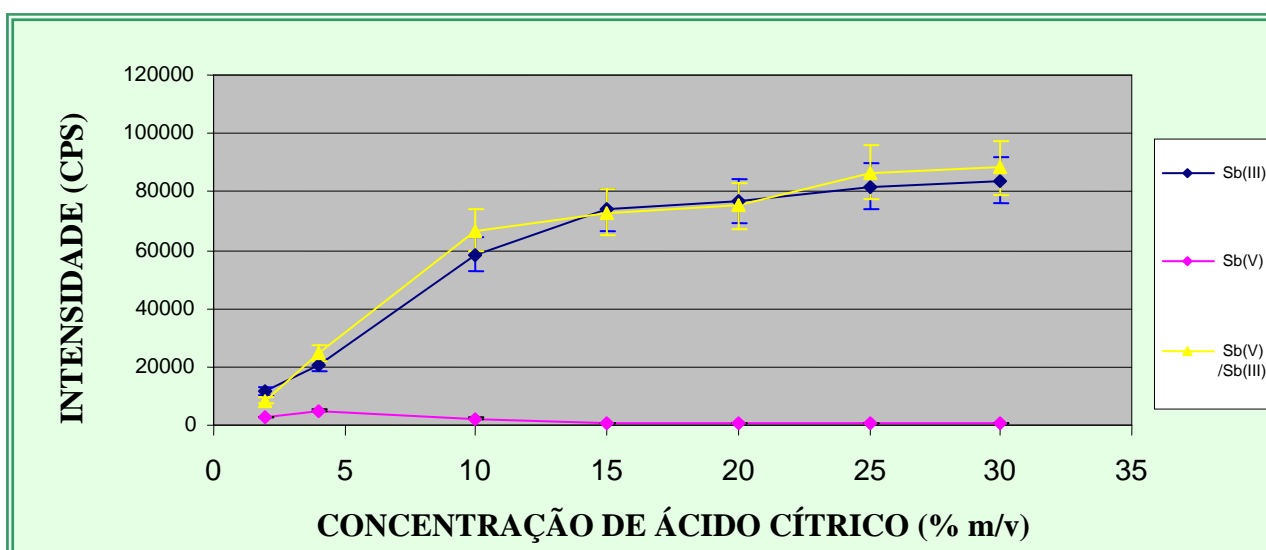


Figura 10- Efeito da concentração de ácido cítrico no sinal para HG-ICP-OES, n= 3.

Para verificar se as intensidades para o Sb(III) com ácido cítrico a 15%, 20% , 25% e 30% são comparáveis utilizamos o teste t de comparação múltipla com a correção de Bonferroni. Antes de calcularmos t realizamos o teste F de Snedecor para verificar se as variâncias eram comparáveis. F calculado foi menor que F crítico para todos os pares.

Para concentrações de 15/20%

Teste F:

$$H_0 \rightarrow S^2_1 = S^2_2$$

F crítico = 39

$$F \text{ calculado} = \frac{43877376}{3038049} = 14,44$$

Logo: F calculado < Fcrítico e as variâncias não são diferentes.

Teste t com variâncias agrupadas:

$$H_0 = x_1 = x_2, n = 3$$

$$x_1 = 73912,83 \quad x_2 = 76794,33$$

$$\text{Graus de liberdade} = (3+3-2) = 4$$

Calculando as variâncias (S^2) agrupadas:

$$S^2 = \frac{(3-1) \times 1743^2 + (3-1) \times 6624^2}{4} = 23457713$$

$$S = 4843,3163$$

Calculando t:

$$t_{\text{calc}} = \frac{76794,33 - 73912,83}{4843,3163 \sqrt{1/3 + 1/3}} = 0,728$$

$$t_{\text{crítico } 0,01,4} = 4,604 \text{ utilizando a correção de Bonferroni } (\alpha' = 0,05)$$

6

Para concentrações de 15/25%

Teste F:

$$H_0 \rightarrow S_1^2 = S_2^2$$

$$F_{\text{crítico}} = 39$$

$$F_{\text{calculado}} = \frac{4056196}{3038049} = 1,3351$$

Logo: $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$ e as variâncias não são diferentes.

Teste t com variâncias agrupadas:

$$H_0 = x_1 = x_2, n = 3$$

$$x_1 = 73912,83 \quad x_2 = 81723,67$$

$$\text{Graus de liberdade} = (3+3-2) = 4$$

Calculando as variâncias (S^2) agrupadas:

$$S^2 = \frac{(3-1) \times 1743^2 + (3-1) \times 2014^2}{4} = 3547122,5$$

$$S = 1883,3806$$

Calculando t:

$$t_{\text{calc}} = \frac{81723,67 - 73912,83}{1883,3806 \sqrt{1/3 + 1/3}} = 5,0793$$

$$t_{\text{crítico } 0,01,4} = 4,604 \text{ utilizando a correção de Bonferroni } (\alpha' = 0,05)$$

6

Para concentrações de 15/30%

Teste F:

$$H_0 \rightarrow S^2_1 = S^2_2$$

$$F \text{ crítico} = 39$$

$$F \text{ calculado} = \frac{9991921}{3038049} = 3,2889$$

Logo: $F \text{ calculado} < F \text{ crítico}$ e as variâncias não são estatisticamente diferentes.

Teste t com variâncias agrupadas:

$$H_0 = x_1 = x_2, n = 3$$

$$x_1 = 73912,83 \quad x_2 = 83953,33$$

$$\text{Graus de liberdade} = (3+3-2) = 4$$

Calculando as variâncias agrupadas:

$$S^2 = \frac{(3-1) \times 1743^2 + (3-1) \times 3161^2}{4} = 6514985$$

$$S = 2552,44$$

Calculando t:

$$t_{\text{calc}} = \frac{83953,33 - 73912,83}{2552,44 \sqrt{1/3 + 1/3}} = 4,817$$

$$t_{\text{crítico } 0,01,4} = 4,604 \text{ utilizando a correção de Bonferroni } (\alpha' = 0,05)$$

6

Para concentrações de 20/25%

Teste F:

$$H_0 \rightarrow S^2_1 = S^2_2$$

$$F \text{ crítico} = 39$$

$$F \text{ calculado} = \frac{43877376}{4056196} = 10,82$$

Logo: $F \text{ calculado} < F \text{ crítico}$ e as variâncias não são diferentes.

Teste t com variâncias agrupadas:

$$H_0 = x_1 = x_2, n = 3$$

$$x_1 = 76794,33 \quad x_2 = 81723,67$$

$$\text{Graus de liberdade} = (3+3-2) = 4$$

Calculando as variâncias agrupadas:

$$S^2 = \frac{(3-1) \times 6624^2 + (3-1) \times 2014^2}{4} = 23966786$$

$$S = 4895,59$$

Calculando t:

$$t_{\text{calc}} = \frac{81723,67 - 76794,33}{4895,59 \sqrt{1/3 + 1/3}} = 1,23$$

$$t_{\text{crítico } 0,01,4} = 4,604 \text{ utilizando a correção de Bonferroni } (\alpha' = \underline{0,05})$$

6

onde 6 é o nº de comparações 2 a 2 realizadas.

Para concentrações de 20/30%

Teste F:

$$H_0 \rightarrow S^2_1 = S^2_2$$

$$F_{\text{crítico}} = 39$$

$$F_{\text{calculado}} = \frac{43877376}{9991921} = 4,3912$$

Logo: F calculado < F crítico e as variâncias não são diferentes.

Teste t com variâncias agrupadas:

$$H_0 = x_1 = x_2; n = 3$$

$$x_1 = 76794,33 \quad x_2 = 83953,33$$

$$\text{Graus de liberdade} = (3+3-2) = 4$$

Calculando as variâncias (S^2) agrupadas:

$$S^2 = \frac{(3-1) \times 6624^2 + (3-1) \times 3161^2}{4} = 269346$$

$$S = 5189,86$$

Calculando t:

$$t_{\text{calc}} = \frac{83953,33 - 76794,33}{5189,86 \sqrt{1/3 + 1/3}} = 1,6894$$

$$t_{\text{crítico } 0,01,4} = 4,604 \text{ utilizando a correção de Bonferroni } (\alpha' = \underline{0,05})$$

6

onde 6 é o nº de comparações 2 a 2 realizadas

Para concentrações de 25/30%

Teste F:

$$H_0 \rightarrow S^2_1 = S^2_2$$

$$F \text{ crítico} = 39$$

$$F_{\text{calculado}} = \frac{9991921}{4056196} = 2,46$$

Logo: F calculado < F crítico e as variâncias não são diferentes.

Teste t com variâncias agrupadas:

$$H_0 = x_1 = x_2; n = 3$$

$$x_1 = 81723,67 \quad x_2 = 83953,33$$

$$\text{Graus de liberdade} = (3+3-2) = 4$$

Calculando as variâncias (S^2) agrupadas:

$$S^2 = \frac{(3-1) \times 2014^2 + (3-1) \times 3161^2}{4} = 7024058,5$$

$$S = 2650,30$$

Calculando t:

$$t_{\text{calc}} = \frac{83953,33 - 81723,67}{2650,30 \sqrt{1/3 + 1/3}} = 1,030$$

$$t_{\text{crítico } 0,01,4} = 4,604 \text{ utilizando a correção de Bonferroni } (\alpha' = \underline{0,05})$$

6

onde 6 é o nº de comparações 2 a 2 realizadas.

Verificamos que para concentração de 15% as intensidades não são comparáveis, no entanto as intensidades a 20%, 25% e 30% são comparáveis e podemos trabalhar nessa faixa de concentração sem alterar os resultados (tabela 7).

Tabela 7 - Valor de t calculado para cada par de concentrações de ácido cítrico

$t_{\text{crítico } 0,01,4} = 4,604$; $n = 3$

Concentração de ácido cítrico	t calculado
15%-20%	0,73
15%-25%	5,08
15%-30%	4,82
20%-25%	1,23
20%-30%	1,69
25%-30%	1,03

4.1.1.1.2 O efeito da concentração do borohidreto de sódio

Para o estudo da otimização da concentração do redutor NaBH_3 , o mesmo foi testado para as concentrações 1%, 2%, 3%, 4%, 5% e 6% estabilizado em solução de NaOH 0,01M. O estudo mostrou que um aumento na concentração do borohidreto de sódio aumenta significativamente o sinal de emissão do Sb(III) , tanto na solução de Sb(III) quanto na solução contendo as duas espécies Sb(III)/Sb(V) , devido provavelmente a presença da espécie trivalente, e que concentrações acima de 3% tendem a aumentar ligeiramente o sinal do Sb(V) , tanto na solução de Sb(V) quanto na solução contendo as duas espécies Sb(III)/Sb(V) , mostrando que nessas concentrações o ácido cítrico não tem o mesmo poder de diminuir a formação de estibina a partir do Sb(V) na concentração de ácido cítrico empregada no estudo (tabela 8). Os resultados são concordantes com os obtidos por Flores *et al.* (2003) quando da avaliação da influência da concentração do redutor na formação de estibina usando HG-AAS por injeção em fluxo, exceto quanto a concentrações acima de 4% em que os autores observaram uma diminuição no sinal de Sb(III) ao contrário do encontrado no nosso estudo. Com base nos resultados acima, preferiu-se trabalhar com borohidreto de sódio na concentração de 2%, pois nesta o sinal para Sb(III) é bem maior que em concentrações menores e a interferência do Sb(V) não tem significado conforme mostra figura 11.

Tabela 8- Intensidades (CPS) e seus respectivos desvios padrão para as diversas concentrações de borohidreto de sódio

Concentração de NaBH ₄ (% m/v)	Intensidade (cps) para Sb(III)	SD	(RSD) (%)	Intensidade (cps) para Sb(V)	SD	(RSD) (%)	Intensidade (cps) para Sb(V)/Sb(III)	SD	(RSD) (%)
1	48027,33	3317	6,91	5417,34	413	7,62	76710,34	2899	3,78
2	138394,34	7035	5,08	10776,67	539	5,00	159300,67	7965	5,00
3	157116,67	6284	4,00	14135	707	5,00	168225,34	6729	4,00
4	149791,67	5992	4,00	22797,67	1367	6,00	170150	8507	5,00
5	169843,33	6793	4,00	24793,33	1239	5,00	190725,67	7629	4,00
6	171054,66	8552	5,00	30322,33	1213	4,00	209170,66	8366	4,00

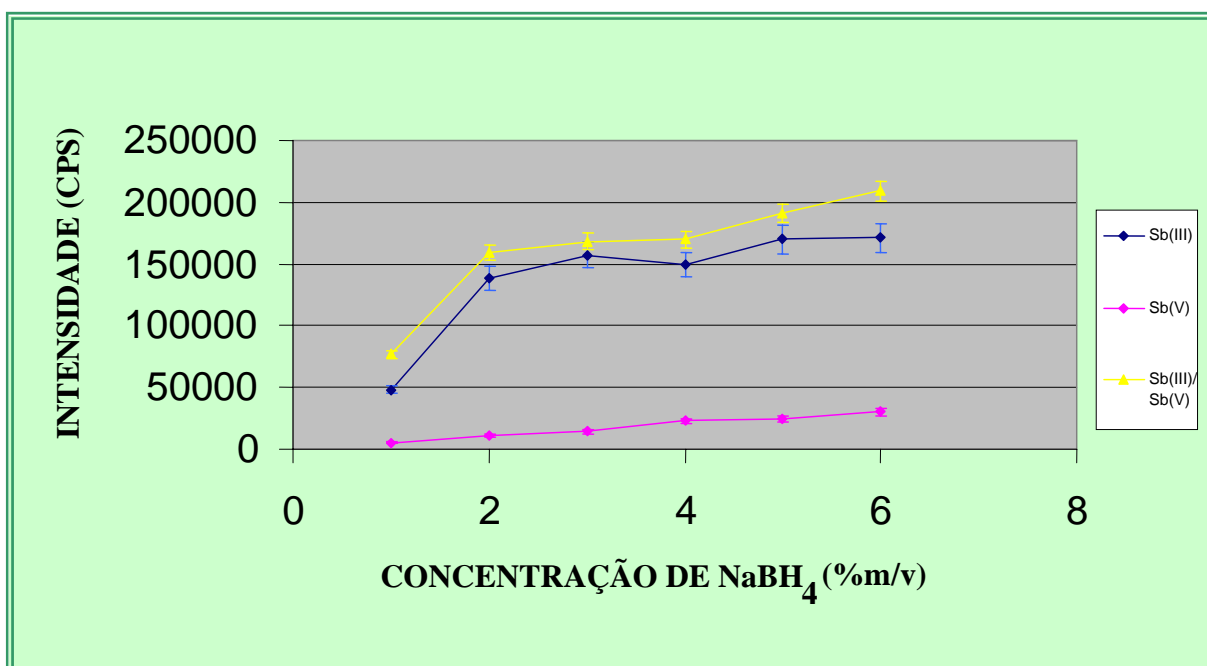


Figura 11 - Efeito da concentração do sódio borohidreto na HG-ICP-OES

4.1.1.1.3 O efeito do comprimento do reator helicoidal

O tamanho do reator utilizado na reação tem importância uma vez que o tempo de contato entre a amostra e o ácido cítrico interfere no processo de complexação e, portanto nos resultados (FLORES *et al.*, 2003), o que se torna difícil de mensurar quando do uso da técnica em batelada. Para esse estudo foram utilizados reatores com os seguintes comprimentos 0,1 m, 2 m, 5 m e 6 m. Os resultados mostraram que bobinas com tamanho acima de 1 metro suprimem significativamente o sinal de Sb(V) e diminuem muito pouco o sinal do Sb(III) na solução padrão e na amostra e que esta queda se dá de forma proporcional. Provavelmente o ácido cítrico passa a complexar tanto o Sb(V) quanto o Sb(III). Os resultados mostram que usando bobina com menos de 1 m ainda encontramos

interferência do Sb(V), pois provavelmente o tempo de contato não é suficiente para complexar totalmente o Sb(V) (figura 12). Os resultados concordam com o comportamento das espécies encontradas por Flores *et al.* (2003) ao estudar a influência do tempo de contato entre as soluções contendo as espécies de antimônio e a solução de ácido cítrico através do tamanho da bobina empregada. Foi determinada a bobina de 2 metros como sendo a ideal para a análise. (tabela 9).

Tabela 9- Intensidades (CPS) e seus respectivos desvios relativos para os diversos tamanhos de reatores helicoidais

Bobina (m)	Intensidade (cps) Sb(III)	(RSD) (%)	Intensidade (cps) Sb(V)	(RSD) (%)	Intensidade (cps) Amostra	(RSD) (%)	Relação amostra/Sb(III)
0	553943,3	0,95	74996,67	3,81	332940	1,28	1,7
1	449090	3,26	20107	4	183743	1,72	2,4
2	361940	3,66	15653	2	151170	0,84	2,4
5	337426	1,55	11227	1	142150	2,88	2,4
6	182150	1,68	4640	22	76733	4,40	2,4

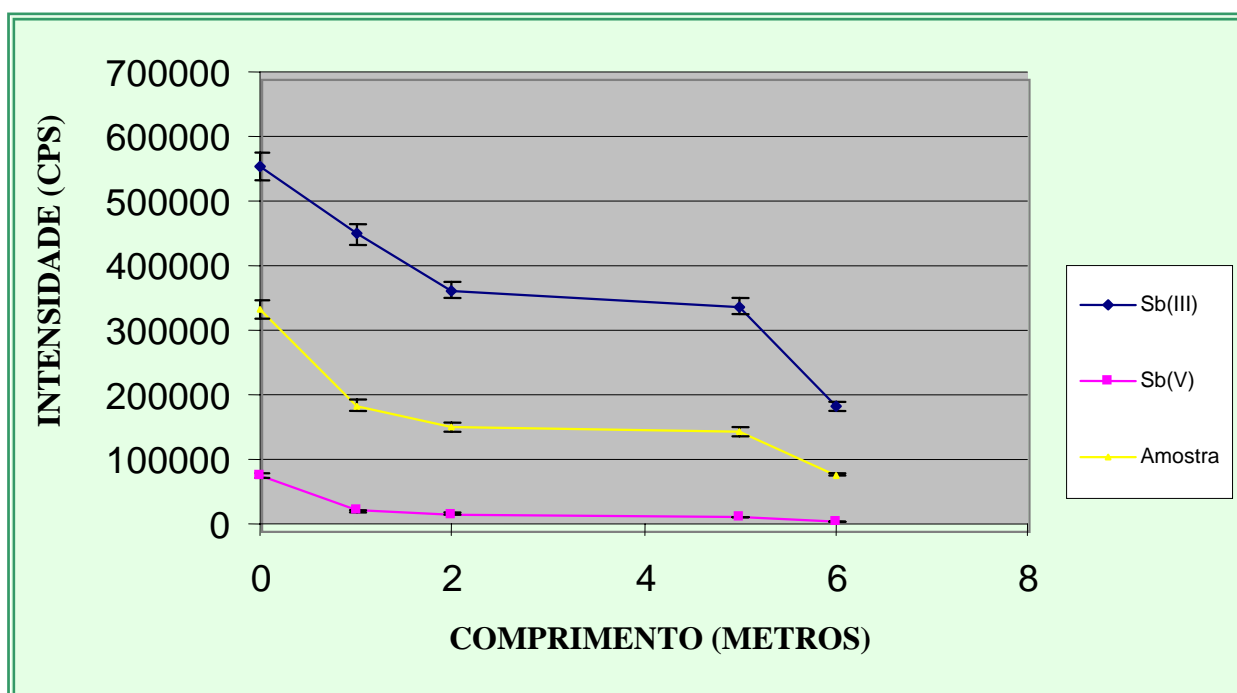


Figura 12- Efeito do comprimento do reator helicoidal no HG-ICP-OES.

4.1.1.2 Linearidade

A curva de calibração obtida apresentou-se linear conforme figura 13. A curva foi obtida através dos resultados apresentados na tabela 10. O coeficiente de correlação foi igual a 0,9998, ou seja 99,98% da distribuição dos pontos obtidos ajustam-se a uma reta. Os resultados obtidos a partir da curva encontram-se listados na tabela 11.

Tabela 10- Intensidades (CPS) e desvios relativos aos pontos da curva de calibração

Percentual da concentração máxima permitida (%)	Conc. (mg/L)	Intensidade (CPS)	(RSD) (%)
0	0	747,33	7,77
12,5	0,1	46884	4,30
31,2	0,25	122405,67	1,93
62,5	0,5	254394,33	1,29
125	1	502889,67	0,17

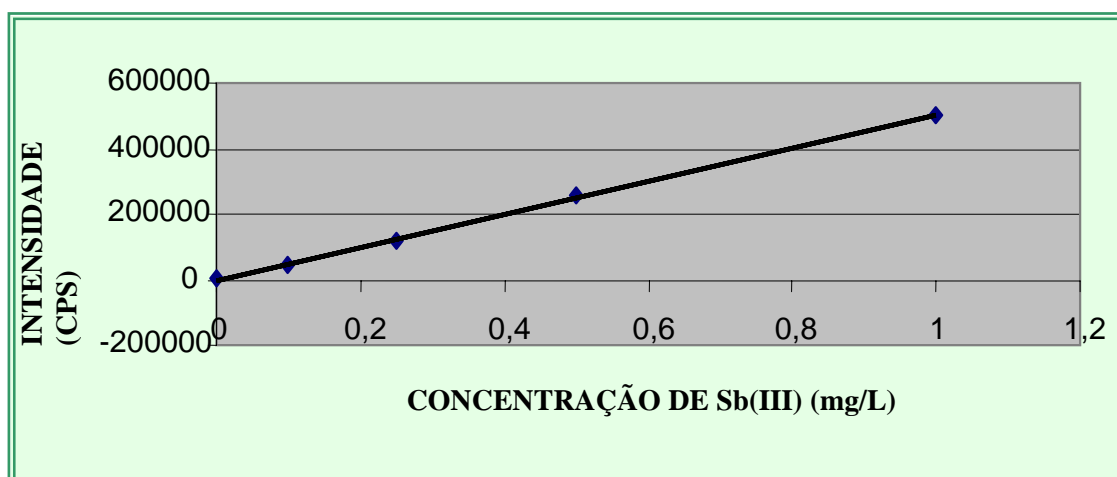


Figura 13- Curva de calibração para verificação da linearidade de Sb(III)

Tabela 11- Linearidade para Sb(III)

PARAMETROS	RESULTADOS
Coeficiente de correlação	0,9998
Interseção com o eixo Y	1431
Coeficiente angular	505122

O método se mostrou linear na faixa de concentração estudada.

4.1.1.3 Exatidão

O método apresentou uma taxa de recuperação (%TR) média de 101,31% nos três níveis de concentração. O desvio padrão relativo (RSD) das replicatas de cada nível de concentração não excedeu 5% (Tabela 12).

Tabela 12- Exatidão do Método HG-ICP-OES para determinação de Sb(III)

Nível %	Teórico (mg/mL)	Valor encontrado (mg/mL)	(RSD) (%)	TR (%)	IC
80	3,203	3,201	3,73	99,9	0,296
100	4,000	4,087	3,15	102,2	0,146
120	4,799	4,887	4,6	101,8	0,254

Teste $t_{0,025;2}$

Para o nível de 80%

$H_0 = \mu = x = 3,203$ mg/mL para $n = 3$ $x = 3,201$ $SD = 0,119$ t crítico = 4,3

$$t_{0,025;2} = \frac{(3,201 - 3,203) \times \sqrt{3}}{0,119} = 0,034$$

Para o nível de 100%

$H_0 = \mu = x = 4,000$ mg/mL para $n = 3$ $x = 4,087$ $SD = 0,129$ t crítico = 4,3

$$t_{0,025;2} = \frac{(4,087 - 4,000) \times \sqrt{3}}{0,129} = 1,167$$

Para o nível de 120%

$H_0 = \mu = x = 4,799$ mg/mL para $n = 3$ $x = 4,887$ $SD = 0,225$ t crítico = 4,3

$$t_{0,025;2} = \frac{(4,887 - 4,799) \times \sqrt{3}}{0,225} = 0,675$$

Nos três níveis de concentração, $t_{exp} < t$ crítico $\rightarrow H_0$ (hipótese nula) é aceita ou seja não existe evidência de erro sistemático no método e as médias encontradas são

estatisticamente iguais aos valores teóricos esperados. Verificamos ainda que o valor teórico esperado encontra-se dentro do intervalo de confiança dos resultados encontrados. Baseado no teste de recuperação, o método é exato.

Cabe ressaltar que este estudo foi realizado com padrões inorgânicos de antimônio, pois infelizmente ainda não existe disponível no mercado padrões de referência do antimoniato de meglumina.

4.1.1.4 Precisão

4.1.1.4.1- Repetibilidade

O método apresentou (RSD) de 3,53 para as concentrações encontradas das seis replicatas conforme mostra a tabela 13.

Tabela 13- Concentrações e desvios encontrados para o teste de repetibilidade para Sb(III)

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO (mg/mL)	MÉDIA DAS CONC. (mg/mL)	SD	(RSD) (%)	S²
Replicata 1	0,4300				
Replicata 2	0,4376				
Replicata 3	0,4565	0,4045	0,016	3,53	0,000242
Replicata 4	0,4260				
Replicata 5	0,4296				
Replicata 6	0,4630				

4.1.1.4.2 Precisão Intermediária

Os resultados encontrados após a análise do produto realizada 15 dias após a primeira com analista diferente encontra-se na tabela 14.

Tabela 14- Concentrações e desvios padrão encontrados para o teste de precisão intermediária para Sb(III)

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO (mg/mL)	MÉDIA DAS CONC.	SD	(RSD) (%)	S ²
Replicata 1	0,4679				
Replicata 2	0,4494				
Replicata 3	0,4244	0,4411	0,017	3,92	0,000299
Replicata 4	0,4210				
Replicata 5	0,4455				
Replicata 6	0,4388				

Aos resultados encontrados, conforme tabelas 17 e 18, foram aplicados o teste F de Snedecor para verificar se as variâncias eram iguais para saber se o teste t poderia ser aplicado utilizando-se as variâncias agrupadas. O teste F mostrou que as variâncias entre os resultados obtidos em dias diferentes com analistas diferentes eram estatisticamente iguais.

Teste F:

$$H_0 \rightarrow S^2_1 = S^2_2$$

$$F \text{ crítico} = 7,146$$

$$F \text{ calculado} = \frac{0,000299}{0,000242} = 1,2355$$

Logo: F calculado < F crítico e as variâncias não são diferentes.

Teste t com variâncias agrupadas:

$$H_0 = x_1 = x_2$$

$$x_1 = 0,40446 \quad x_2 = 0,44115$$

$$\text{Graus de liberdade} = (6+6-2) = 10$$

Calculando as variâncias (S²) agrupadas:

$$S^2 = \frac{(6-1) \times 0,0156^2 + (6-1) \times 0,017^2}{10} = 0,0002715$$

$$S = 0,01644$$

Calculando t:

$$t \text{ calc} = \frac{0,44115 - 0,40446}{0,01644 \sqrt{1/6 + 1/6}} = 0,0726$$

$$t_{0,05;5} \text{ crít} = 2,228$$

Logo : $t_{cal} < t_{crítico} \rightarrow H_0$ (hipótese nula) é aceita e as médias encontradas nas análises dos dias diferentes com analistas diferentes são estatisticamente iguais, logo o método é preciso.

4.1.1.5 Limite de quantificação:

Os resultados encontrados para o limite de quantificação obtido a partir da curva descrita na figura 14 encontram-se na tabela 15.

$$LQ = \frac{SD_{branco} \times 10}{\text{coef. Ang}}$$

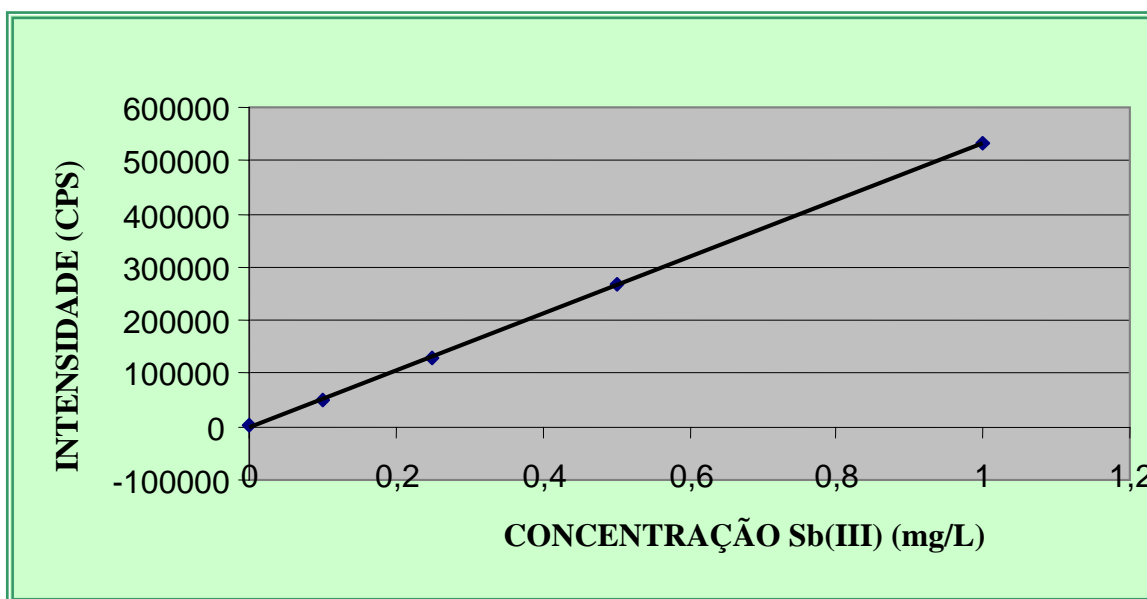


Figura 14- Curva obtida para determinação do limite de quantificação do Sb(III)

Tabela 15- Limite de quantificação para Sb(III)

Amostras	CONC. (mg/mL)	MÉDIA DAS CONC.	SD	Coef. angular	LQ (mg/L)	LQ (µg/L)
BRANCO 1	0,0023					
BRANCO 2	0,0019	0,00175	0,0004209	535277	0,00595	5,95
BRANCO 3	0,0023					
BRANCO 4	0,0017					
BRANCO 5	0,0011					
BRANCO 6	0,0014					
BRANCO 7	0,0015					
BRANCO 8	0,0018					

4.1.2 Determinação de Sb total

4.1.2.1 Seletividade

Teste de resolução espectral realizado no equipamento utilizado (ICP-OES) mostrou que o mesmo possui altíssima resolução, na ordem de 5 picômetros, de modo a não existir interferências espectrais no comprimento de onda escolhido.

4.1.2.2 Linearidade

A curva de calibração obtida apresentou-se linear conforme figura 15. A curva foi obtida através dos resultados apresentados na tabela 16. Os resultados obtidos a partir da curva encontram-se listados na tabela 17.

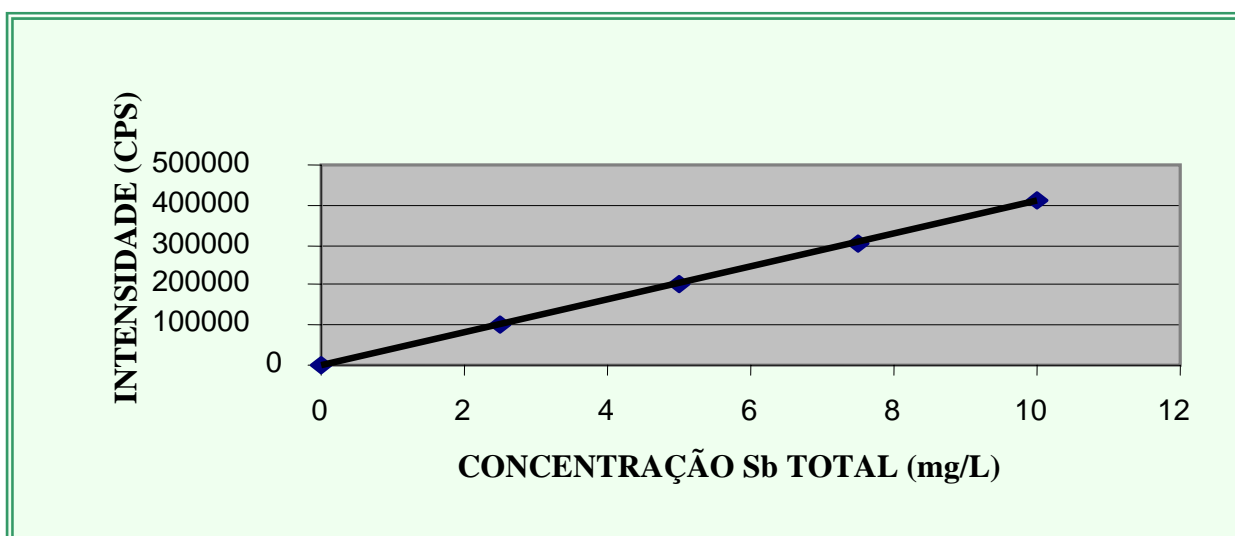


Figura 15- Curva de calibração para linearidade de antimônio total

Tabela 16- Intensidade (CPS) e os respectivos desvios relativos para cada ponto da Curva de calibração

Porcentagem da concentração teórica esperada (%)	CONCENTRAÇÃO (mg/L)	INTENSIDADE (CPS)	(RSD) (%)
0	0	273,55	45,66
61,7	2,5	104414,07	1,24
123,5	5	205067,51	1,03
185,2	7,5	305197,74	1,01
246,9	10	412693,63	1,94

Tabela 17- Parâmetros de linearidade para Sb total

PARÂMETROS	RESULTADOS
Coefficiente de correlação	0,9999
Interseção com o eixo Y	404,53
Coefficiente angular	41025

O método se mostrou linear na faixa de concentração estudada.

4.1.2.3 Exatidão

O método apresentou uma taxa de recuperação (%TR) média de 101,51% nos três níveis de concentração. O desvio padrão relativo (RSD) das replicatas de cada nível de concentração não excedeu 2,56% (tabela 18).

Tabela 18- Exatidão do Método para Sb total

Nível (%)	Teórico (mg/mL)	Valor encontrado (mg/mL)	(RSD) (%)	TR (%)	IC
80	66,25	67,20	0,977	101,43	0,743
100	81,00	82,17	1,652	101,45	1,536
120	97,20	98,80	2,562	101,65	2,865

Teste $t_{0,025;2}$

Para o nível de 80%

$H_0 = \mu = x = 66,25 \text{ mg/mL}$ para $n = 3$ $x = 67,20$ $SD = 0,657$ $t_{\text{crítico}} = 4,3$

$$t_{0,025;2} = \frac{(67,20 - 66,25) \times \sqrt{3}}{0,657} = 2,505$$

Para o nível de 100%

$H_0 = \mu = x = 81,00 \text{ mg/mL}$ para $n = 3$ $x = 82,17$ $SD=1,357$ $t \text{ crítico} = 4,3$

$$t_{0,025;2} = \frac{(82,17-81,00) \times \sqrt{3}}{1,357} = 1,499$$

Para o nível de 120%

$H_0 = \mu = x = 97,20 \text{ mg/mL}$ para $n = 3$ $x = 98,80$ $SD=2,532$ $t \text{ crítico} = 4,3$

$$t_{0,025;2} = \frac{(98,80-97,20) \times \sqrt{3}}{2,532} = 1,095$$

Nos três níveis de concentração, $t_{\text{exp}} < t_{\text{crítico}} \rightarrow H_0$ (hipótese nula) é aceita, ou seja, não existe evidência de erro sistemático no método e as médias encontradas são estatisticamente iguais aos valores teóricos esperados. Verificamos ainda que o valor teórico esperado encontra-se dentro do intervalo de confiança dos resultados encontrados, logo o método é exato.

4.1.2.4 Precisão

4.1.2.4.1 Repetibilidade

O método apresentou (RSD) de 2,54% para as concentrações encontradas das seis replicatas conforme mostra a tabela 19.

Tabela 19- Concentrações e desvios padrão encontrados para o teste de repetibilidade para Sb total

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO (mg/mL)	MÉDIA DAS CONC. (mg/mL)	SD	(RSD) (%)	S ²
Replicata 1	72,904				
Replicata 2	70,612				
Replicata 3	72,414	70,53	1,79	2,54	3,21
Replicata 4	69,626				
Replicata 5	68,972				
Replicata 6	68,628				

4.1.2.4.2 Precisão Intermediária

A tabela 20 mostra os resultados encontrados nas análises de seis replicatas do produto, realizadas 15 dias após as primeiras análises, utilizando-se o mesmo equipamento e analista diferente.

Tabela 20- Concentrações e desvios padrão encontrados para o teste de precisão intermediária para Sb total

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO (mg/mL)	MÉDIA DAS CONC. (mg/mL)	SD	(RSD) (%)	S ²
Replicata 1	71,67				
Replicata 2	70,83				
Replicata 3	70,24	70,64	0,94	1,33	0,88
Replicata 4	71,25				
Replicata 5	68,99				
Replicata 6	70,86				

Aos resultados encontrados, conforme tabelas 19 e 20, foram aplicados o teste F de Snedecor para verificar se as variâncias eram estatisticamente iguais para saber se o teste t poderia ser aplicado utilizando-se as variâncias agrupadas. O teste F mostrou que as variâncias entre os resultados obtidos em dias diferentes com analistas diferentes eram estatisticamente iguais.

Teste F:

$$H_0 \rightarrow S^2_1 = S^2_2$$

$$F \text{ crítico} = 7,146$$

$$F \text{ calculado} = \frac{3,21}{0,88} = 3,65$$

Logo: F calculado < F crítico e as variâncias não são diferentes.

Teste t com variâncias agrupadas:

$$H_0 = x_1 = x_2$$

$$x_1 = 70,53 \quad x_2 = 70,64$$

$$\text{Graus de liberdade} = (6+6-2) = 10$$

Calculando as variâncias agrupadas:

$$S^2 = \frac{(6-1) \times 1,79^2 + (6-1) \times 0,94^2}{10} = 2,044$$

$$S = 1,43$$

Calculando t:

$$t_{\text{calc}} = \frac{70,64 - 70,53}{1,43 \sqrt{1/6 + 1/6}} = 0,133$$

$$t_{0,05;5} \text{ cr\u00edt} = 2,228$$

Logo : $t_{\text{calc}} < t_{\text{cr\u00edtico}} \rightarrow H_0$ (hip\u00f3tese nula) \u00e9 aceita e as m\u00e9dias encontradas nas an\u00e1lises dos dias diferentes com analistas diferentes s\u00e3o estatisticamente iguais, logo o m\u00e9todo \u00e9 preciso.

4.1.2.5 Limite de quantifica\u00e7\u00e3o

Os resultados encontrados para o limite de quantifica\u00e7\u00e3o obtida a partir da curva descrita na figura 16 encontram-se na tabela 21.

$$LQ = \frac{SD_{\text{branco}} \times 10}{\text{coef. Ang}}$$

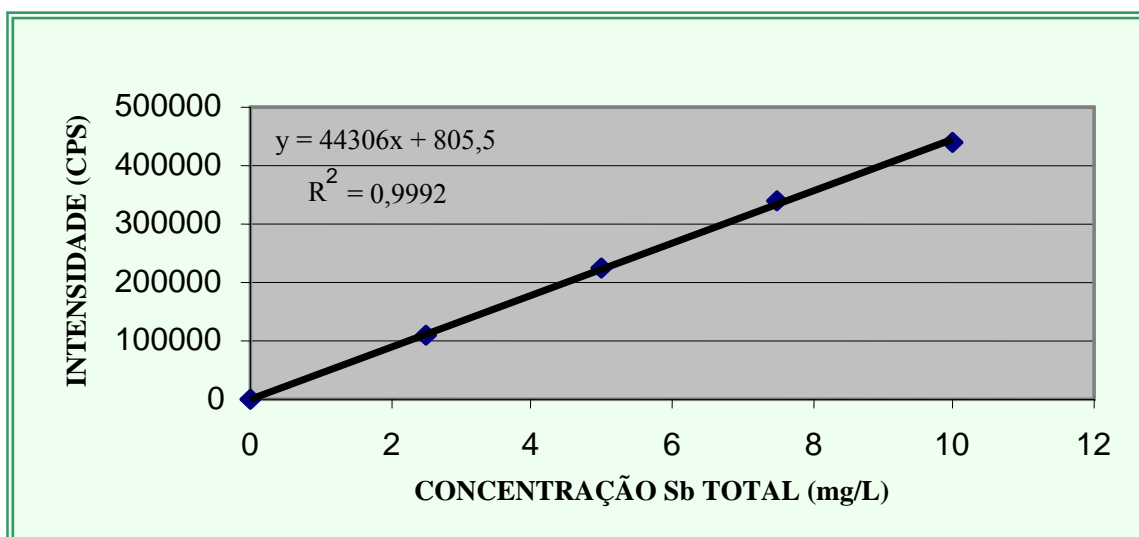


Figura 16- Curva obtida para determina\u00e7\u00e3o do limite de quantifica\u00e7\u00e3o do Sb total

Tabela 21- Limite de quantificação para Sb total

RESULTADOS	CONC. (mg/L)	MÉDIA DAS CONC.	SD	Coef. angular	LQ (mg/L)	LQ (µg/L)
BRANCO 1	0,0026					
BRANCO 2	0,0045					
BRANCO 3	0,0043	0,0029	0,00138	44306	0,01674	16,74
BRANCO 4	0,0014					
BRANCO 5	0,0044					
BRANCO 6	0,0016					
BRANCO 7	0,0031					
BRANCO 8	0,0013					

O Brasil é o único país que descreve uma metodologia analítica para soluções injetáveis de antimoniato de meglumina em compêndio oficial. A Farmacopéia Brasileira no seu 4º fascículo da sua 4ª edição publicado no ano de 2003 recomenda a análise por HG-AAS com sistema em batelada (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2002). A HG-OES em fluxo contínuo é mais adequada que a primeira, pois esta elimina as interferências químicas na fase gasosa encontradas na AAS, diminui o efeito de matriz além de ser mais eficiente, pois permite análise automatizada (BARRA, SANTELLI & ABRÃO, 2000).

4.2 Formulações:

Os resultados obtidos nas análises dos diversos parâmetros das formulações propostas, pH, densidade, teor de Sb(III), teor de Sb(V), estão apresentados em quatro períodos diferentes: período inicial, após 30 dias, após 60 dias e após 90 dias.

4.2.1 pH

Os resultados obtidos encontram-se na tabela 22. Os valores do teste t para comparações múltiplas utilizando correção de Bonferroni (comparação de seis pares de tempo: 0-30; 0-60; 0-90; 30-60; 30-90 e 60-90 dias para cada formulação), mostraram que t calculado é menor que t crítico para todos os pares das formulações 1, 2, 3, 4, 5 e 6 e que portanto não houve variação nas médias de pH ao longo dos 90 dias e que t calculado é maior que t crítico para as formulações 7 e 8, logo houve variação nas médias dos pH dessas formulações ao longo dos 90 dias. As formulações 1 e 2 sofreram processo de autoclavação a temperatura de 121°C por 15 minutos mostrando que nessas condições não

há variação no pH das formulações independente da adição de tampão (tabela 23). As formulações 3 e 4 semelhantes as 1 e 2, respectivamente (porém sem sofrerem autoclavação), mostraram que o pH se manteve estável à 40°C independente da adição de tampão. As formulações 5 e 6 cujo veículo é o propilenoglicol/água na proporção 20:80 se mostraram estáveis ao longo dos 90 dias. As formulações 7 e 8 por possuírem como veículo propilenoglicol/água na proporção 50:50 não conseguiram manter o sistema estável, nem mesmo com a presença de tampão, conforme mostra tabela 22. Cabe ressaltar, no entanto, que em nenhuma das formulações a medida de pH excedeu os limites preconizados pela Farmacopéia Brasileira 4ª ed. de 5,5 a 7,5. Romero *et al.* (1996) haviam concluído que não havia diferença estatisticamente significativa entre as médias das medições de pH quando estudou as características físico-químicas do antimoniato de meglumina em diferentes condições de armazenamento (4°C, 37°C e temperatura ambiente), no período de 60 meses.

Face ao exposto, pode-se apontar uma maior deficiência das formulações 7 e 8, em termos da maior variação comparativa de pH, o que pode ser desfavorável quando da estabilização de um sistema redox (CONNORS, AMIDON & STELLA, 1986).

Tabela 22 - Valores de pH e os respectivos desvios padrão para as 8 formulações á 40°C

Tempo (dias)	pH															
	F1	SD	F2	SD	F3	SD	F4	SD	F5	SD	F6	SD	F7	SD	F8	SD
0	6,14	0,0495	6,44	0,0071	6,12	0,0141	6,44	0,0141	5,95	0,0141	6,44	0,1202	6,72	0,0141	6,72	0,0283
30	5,86	0,0141	6,57	0,0141	6,23	0,0495	6,54	0,0141	5,81	0,0424	6,29	0,2333	5,97	0,0566	6,36	0,0778
60	5,75	0,1556	6,58	0,0282	6,25	0,0354	6,525	0,0495	5,76	0,0566	6,39	0,0566	6,04	0,1343	6,32	0,0071
90	5,69	0,0283	6,54	0,0283	6,54	0,0420	6,23	0,0283	5,77	0,0141	6,03	0,4808	5,90	0,0283	6,37	0,0141

Tabela 23- Valores de t calculado para os seis pares de tempo. $t_{0,01;2} = 9,925$; $K = 6$; $\alpha = 95\%$ (0,05); $N = 2$; $\alpha' = 0,01$

TEMPO (DIAS)	T calculado							
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
0-30	5,439	8,222	2,234	5,000	3,130	0,571	12,862	4,410
0-60	2,389	4,802	3,545	1,651	3,258	0,339	5,071	13,891
0-90	7,893	3,430	9,468	6,641	9,000	0,817	25,931	11,068
30-60	0,562	0,081	0,161	0,291	0,707	0,437	0,446	0,512
30-90	1,391	0,245	2,418	9,803	0,894	0,477	1,107	0,1897
60-90	0,491	0,327	2,259	5,174	0,171	0,744	0,983	3,4785

4.2.2 Densidade

A densidade é representada pela relação entre a massa de uma substância e o volume que ela ocupa, uma variação pode indicar a incorporação de ar ou a perda de ingredientes voláteis (CONNORS, AMIDON & STELLA, 1986). Os resultados obtidos encontram-se na tabela 24. Os dados foram tratados estatisticamente pelo teste t com correção de Bonferroni para comparações de 6 pares de tempo (0-30; 0-60; 0-90; 30-60; 30-90 e 60-90, para cada formulação) a fim de verificar se os resultados são estatisticamente iguais. Todos os valores de t calculado para todos os pares de todas as formulações foram menores que t crítico, logo podemos concluir que não foi observada diferença significativa nas densidades das formulações durante os 90 dias à 40°C. Os valores de t encontram-se na tabela 25.

Tabela 24 - Valores de densidade e os respectivos desvios padrão para as 8 formulações

Tempo (dias)	Densidade															
	F1	SD	F2	SD	F3	SD	F4	SD	F5	SD	F6	SD	F7	SD	F8	SD
0	1,1639	0,0306	1,1680	0,0304	1,1628	0,0321	1,1684	0,0287	1,1710	0,0326	1,1797	0,0337	1,1834	0,0304	1,1989	0,03605
30	1,1640	0,0306	1,1684	0,0296	1,1633	0,0316	1,1722	0,0319	1,1715	0,0319	1,1840	0,0254	1,1917	0,0315	1,1962	0,02968
60	1,1646	0,0314	1,1697	0,0301	1,1624	0,0316	1,1737	0,0305	1,1694	0,0288	1,1801	0,0300	1,1889	0,0302	1,1919	0,03639
90	1,1643	0,0306	1,1704	0,0312	1,1729	0,0328	1,1652	0,0306	1,1795	0,0419	1,1776	0,0376	1,1920	0,0316	1,1990	0,03120

Tabela 25- Valores de t calculado para os seis pares de tempo. t crítico $t_{0,01;2} = 9,925$; K= 6
 $\alpha = 95\%(0,05)$; N= 2; $\alpha' = 0,01$

TEMPO (DIAS)	t calculado							
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
0-30	0,00208	0,00872	0,01065	0,08782	0,01096	0,10183	0,19010	0,05696
0-60	0,01573	0,03811	0,00932	0,12595	0,03812	0,00775	0,12991	0,13549
0-90	0,00994	0,05482	0,21950	0,07769	0,15924	0,04279	0,19658	0,00231
30-60	0,00488	0,01027	0,00731	0,01230	0,01765	0,03220	0,02250	0,03441
30-90	0,00277	0,01643	0,07782	0,05725	0,06313	0,05180	0,00244	0,02253
60-90	0,00212	0,00618	0,08511	0,06955	0,08026	0,02013	0,02487	0,05734

4.2.3 Teor de Sb(III)

Os valores encontrados para os teores de Sb(III) nas formulações propostas encontram-se na tabela 26. Os valores representam a média e o desvio-padrão de três replicatas para cada amostra.

Tabela 26- Valores de Sb(III) (mg/mL) encontrados para as 8 formulações durante os 90 dias

AMOSTRAS	Sb(III) (mg/mL) INICIAL	Sb(III) (mg/mL) 30 DIAS	Sb(III) (mg/mL) 60 DIAS	Sb(III) (mg/mL) 90 DIAS
Formulação 1	2,27 ± 0,18	3,22 ± 0,26	2,53 ± 0,19	1,58 ± 0,10
Formulação 2	2,33 ± 0,34	3,46 ± 0,08	1,19 ± 0,04	1,26 ± 0,14
Formulação 3	2,98 ± 0,30	3,48 ± 0,14	1,83 ± 0,11	2,03 ± 0,09
Formulação 4	2,49 ± 0,26	2,95 ± 0,08	2,02 ± 0,28	0,93 ± 0,16
Formulação 5	1,57 ± 0,16	2,26 ± 0,11	1,03 ± 0,16	1,09 ± 0,09
Formulação 6	0,97 ± 0,10	2,31 ± 0,24	1,37 ± 0,04	1,09 ± 0,24
Formulação 7	1,28 ± 0,25	1,80 ± 0,11	0,89 ± 0,08	0,93 ± 0,16
Formulação 8	1,33 ± 0,34	2,07 ± 0,08	1,75 ± 0,01	1,17 ± 0,10

Os dados encontrados foram tratados estatisticamente para que pudéssemos avaliar vários aspectos entre as formulações.

Para avaliação da influência do tampão nos teores da espécie trivalente nas formulações, comparamos as médias das formulações 1 e 2; 3 e 4; 5 e 6 e 7 e 8 ao longo dos 90 dias através do teste t pareado.

Os valores de t experimental foram menores que os valores de t crítico para todos os pares de formulações mostrando que a variação das médias são equivalentes, portanto não existe interferência do tampão nas quantidades de Sb (III) encontradas nas formulações (tabela 27).

Tabela 27- Valores de t calculados para os quatro pares de formulações. t crítico $t_{0,05;2} = 4,303$. F1 = Formulação 1; F2 = Formulação 2; F3= Formulação 3 e F4 = Formulação 4 F5 = Formulação 5; F6 = Formulação 6; F7= Formulação 7 e F8 = Formulação 8

PARES DE FORMULAÇÕES	t CALCULADO
F1/F2	1,284
F3/F4	1,828
F5/F6	1,317
F7/F8	2,016

Para avaliação da influência da autoclavação na variação dos resultados encontrados para o Sb(III) nas formulações, comparamos as médias das formulações 1 e 3 e 2 e 4 ao longo de 90 dias os dados encontrados foram tratados estatisticamente através do teste t pareado.

Os valores de t experimental para os dois pares comparados foram menores que t crítico, mostrando que a autoclavação não interfere no comportamento das espécies nos 90 dias à 40°C nas formulações elaboradas (tabela 28). No entanto verificamos que as formulações submetidas a autoclavação ficaram muito mais amareladas que as não autoclavadas, possíveis alterações na parte orgânica da molécula podem estar ocorrendo, o que não seria adequado para seu processamento industrial.

Tabela 28- Valores de t calculados para os dois pares de formulações. t crítico $t_{0,05;2} = 4,303$; F1= Formulação 1; F2 = Formulação 2; F3 = Formulação 3 e F4 = Formulação 4

PARES DE FORMULAÇÕES	t CALCULADO
F1/F3	0,585
F2/F4	0,125

A matéria-prima utilizada na produção das formulações possuía teor de Sb(III) de 0,4% e Sb total de 27,2%, considerando-se o peso das mesmas em cada formulação e os teores de Sb total encontrado inicialmente para as formulações verificamos que todas as formulações cujo veículo era somente água o teor de Sb(III), logo após o preparo, estava acima do esperado, esse fenômeno provavelmente se deve a maior constante dielétrica do veículo aquoso. Nas formulações cujos veículos eram propilenoglicol os teores de Sb(III) encontraram-se dentro dos valores esperados. O propilenoglicol utilizado como co-solvente além de reduzir a constante dielétrica do meio, reduzindo desta forma reações do tipo redox, por ser uma substância facilmente oxidável poderá sofrer oxidação preferencial com relação à molécula de metil meglumina o que colabora para estabilidade da formulação. Carrió *et al.* (2000) já haviam sugerido que a estrutura do antimoniato de meglumina teria grande tendência a reações de desidratação à temperatura elevada levando a formação de estrutura semelhante a um acetal, e que essa suposta estrutura poderia se quebrar com conseqüente hidrólise da estrutura e liberação do Sb(V) no meio, o qual estaria livre para sofrer reações de redução a Sb(III) dependendo das condições do meio. Como já descrito anteriormente, o propilenoglicol funciona como agente anti-hidrolíticos em formulações, o que poderia evitar o fenômeno descrito. Cabe ressaltar ainda a ação conservante do propilenoglicol o que ajuda a reduzir a contaminação microbológica do produto. A comparação das formulações feita através do Box Plot mostrou que as formulações cujos veículos possuíam propilenoglicol apresentavam menores valores para Sb(III) e menor variação desses valores no período estudado (menor tamanho da caixa) (figura 17).

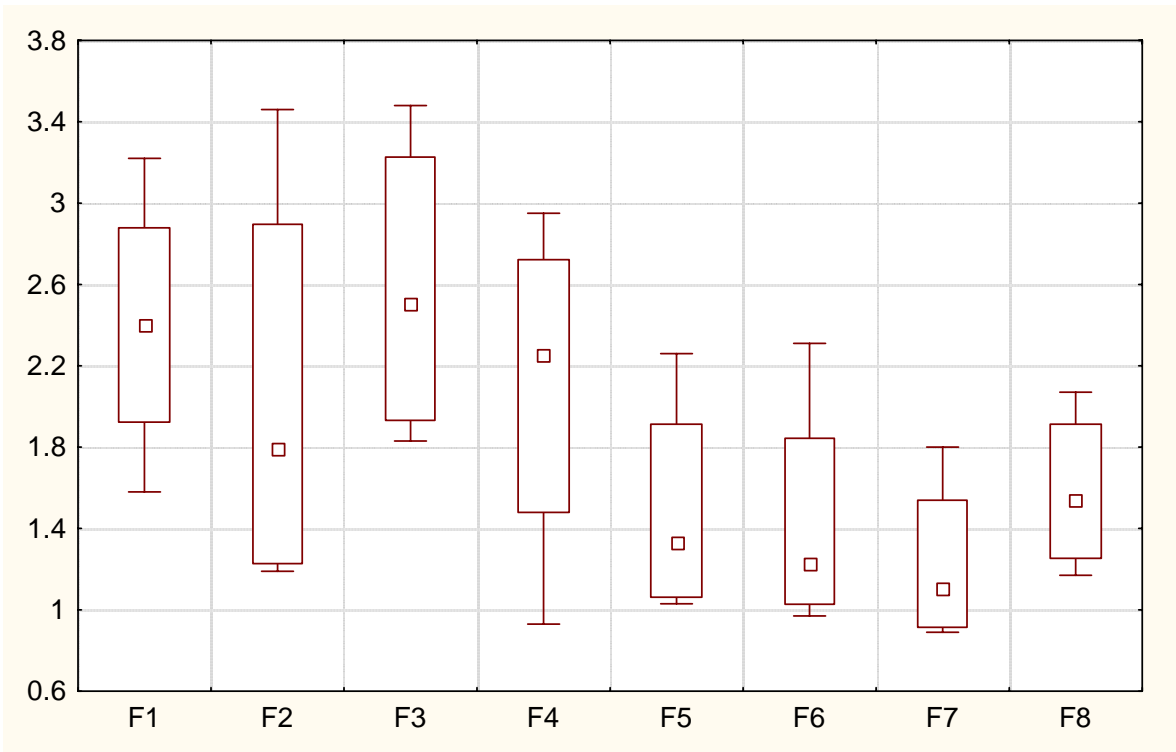


Figura 17- Box Plot das oito formulações. F1= Formulação 1; F2 = Formulação 2;
 F3 = Formulação 3; F4 = Formulação 4; F5= Formulação 5;
 F6 = Formulação 6; F7= Formulação 7; F8 = Formulação 8. No eixo das ordenadas estão as concentrações de Sb(III) em mg/L.

4.2.4 Teor de Sb total

Os valores encontrados para os teores de Sb total nas formulações propostas encontram-se na tabela 29. Os valores representam a média e o desvio-padrão de três replicatas para cada amostra.

Tabela 29- Valores de Sb total (mg/mL) e Sb(III) (mg/mL) encontrados para as 8 formulações durante os 90 dias

AMOSTRAS	Sb total (mg/mL) INICIAL	Sb (III) (mg/mL) INICIAL	Sb total (mg/mL) 30 DIAS	Sb (III) (mg/mL) 30 DIAS	Sb total (mg/mL) 60 DIAS	Sb (III) (mg/mL) 60 DIAS	Sb total (mg/mL) 90 DIAS	Sb (III) (mg/mL) 90 DIAS
Formulação 1	75,7 ± 1,2	2,27 ± 0,18	76,62 ± 0,95	3,22 ± 0,26	77,04 ± 0,70	2,53 ± 0,19	76,78 ± 0,64	1,58 ± 0,10
Formulação 2	75,2 ± 2,3	2,33 ± 0,34	76,22 ± 0,27	3,46 ± 0,08	77,13 ± 0,16	1,19 ± 0,04	72,78 ± 0,95	1,26 ± 0,14
Formulação 3	77,7 ± 1,1	2,98 ± 0,30	76,20 ± 0,87	3,48 ± 0,14	75,93 ± 0,52	1,83 ± 0,11	72,63 ± 0,67	2,03 ± 0,09
Formulação 4	77,4 ± 0,6	2,49 ± 0,26	77,70 ± 0,37	2,95 ± 0,08	76,60 ± 0,63	2,02 ± 0,28	76,28 ± 1,55	0,93 ± 0,16
Formulação 5	77,1 ± 1,3	1,57 ± 0,16	79,02 ± 0,97	2,26 ± 0,11	75,58 ± 0,42	1,03 ± 0,16	75,68 ± 0,97	1,09 ± 0,09
Formulação 6	77,9 ± 1,2	0,97 ± 0,10	80,15 ± 1,07	2,31 ± 0,24	77,05 ± 0,41	1,37 ± 0,04	75,40 ± 1,22	1,09 ± 0,24
Formulação 7	79,4 ± 1,4	1,28 ± 0,25	73,92 ± 0,45	1,80 ± 0,11	76,91 ± 0,55	0,89 ± 0,08	71,99 ± 1,39	0,93 ± 0,16
Formulação 8	78,9 ± 0,6	1,33 ± 0,34	79,62 ± 0,65	2,07 ± 0,08	76,89 ± 0,86	1,75 ± 0,01	77,23 ± 1,09	1,17 ± 0,10

Em todos os casos, não se verificam alterações significativas nos teores de Sb total, no entanto, como era de se esperar, o valor de Sb(V) diminui a medida que aumenta o teor de Sb(III) e vice-versa. Somando-se estes resultados, ao exposto anteriormente pode-se apontar as formulações 5 e 6 como as mais estáveis entre as estudadas.

De antemão, se ressalta a maior adequabilidade do processo de filtração esterilizante para o processo de fabricação dos injetáveis de antimoniato de meglumina, assim como, se torna recomendável a filtração em carvão ativado como medida complementar para prevenir a eventual contaminação por metais pesados e prováveis processos de decomposição da molécula do produto.

4.3 Caracterização do princípio ativo

4.3.1 Solubilidade:

As três matérias-primas analisadas mostraram-se solúveis em água, no entanto somente a de origem francesa é solúvel a frio, ao contrário das outras que necessitam de aquecimento. Observa-se que o aquecimento dessa substância tende a provocar uma coloração amarela intensa na solução aquosa. Ambas são praticamente insolúveis em etanol, éter etílico e clorofórmio.

4.3.2 Difração de raios-x (DRX)

Nenhuma das matérias-primas analisadas mostrou cristalinidade, o que corrobora a proposta de uma estrutura química indefinida e oligomérica. Em termos de sua distribuição de tamanho, tanto o material francês quanto o argentino e o nacional apresentaram distribuição alargada com diâmetro médio de 15 a 20 micras. As partículas dos três se mostraram amorfas e de geometria indefinida.

4.3.3 Determinação de metais pesados

Os resultados obtidos após análise de metais pesados para as três matérias-primas provenientes de fabricantes diferentes encontram-se na tabela 30. A Farmacopéia Brasileira IV ed. especifica um valor máximo de metais pesados de 10 mg/L para o somatório dos metais analisados (Al, As, Bi, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn, Hg) na amostra a 30%.

Verificamos pelos resultados que a matéria prima de origem nacional apresentou resultados fora da especificação, o que a torna inapropriada para elaboração de medicamento uma vez que os metais pesados acima das concentrações especificadas

tornam-se extremamente tóxicos ao organismo humano. Os altos teores de Cr e Ni na amostra de origem nacional sugerem contaminação durante o processo pelo recipiente utilizado, uma vez que recipientes de aço inox contem em sua liga consideráveis quantidades de Cr e Ni, o que torna recomendável o uso de reatores vitrificados. Ao contrário desta as matérias-primas de origem francesa e argentina apresentaram, no somatório das concentrações de metais pesados, valores abaixo do limite máximo especificado pela Farmacopéia Brasileira, tornando-as, neste aspecto adequadas para elaboração do produto injetável.

Flores *et al.* (2000) relacionaram diversas vantagens das técnicas espectrométricas em relação as técnicas de ensaio limite preconizada pelas farmacopéias para detecção de metais pesados. A primeira além de apresentar maior especificidade e exatidão, fornece ainda, informações acerca do grau de contaminação por determinado elemento, ao contrário da segunda que não discrimina os elementos contaminantes da amostra.

Tabela 30- Concentração de metais (mg/L) encontrados nas três matérias-primas analisadas

METAIS	AMOSTRA 1 FRANCESA (30%)	AMOSTRA 2 ARGENTINA (30%)	AMOSTRA 3 NACIONAL (30%)
Al	0,4070	1,0500	1,2763
As	1,5543	0,4430	0,9787
Bi	0,1557	0,8851	0,0145
Cd	0,0214	0,0197	0,0058
Cr	0,1630	1,3121	4,3284
Cu	0,1046	0,2780	0,6253
Mn	0,0322	0,2925	0,2928
Ni	0,6496	1,2044	2,2315
Pb	0,0585	0,1472	0,0171
Zn	0,1158	0,8405	0,6340
Hg	0,4500	0,0740	0,0400
TOTAL	3,7121	6,5464	10,4444

4.3.4 Determinação dos teores de Sb(III) e Sb(V)

Os resultados da determinação dos teores de Sb(III) e Sb(V) nas matérias-primas provenientes de três diferentes fabricantes encontram-se na tabela 31. Os resultados mostram que o percentual de Sb(III) na matéria-prima de origem francesa é menor que nas demais analisadas, e que na de origem nacional está em maior quantidade, o que é de máxima importância na escolha da matéria-prima empregada, pois o Sb(III) é cerca de dez vezes mais tóxico que a espécie pentavalente. Cabe ressaltar a importância da qualidade

de matérias-primas na produção de medicamentos, pois a não conformidade das mesmas implica na obtenção de medicamentos de baixa qualidade podendo mesmo causar sérios danos à saúde do paciente, além de aumentar o custo de produção da indústria farmacêutica acarretados por reprocessos e aumento no número de análises.

Tabela 31- Concentrações de Sb(III) e Sb total encontrados nas três matérias-primas analisadas

AMOSTRAS	Sb(III) (%)	Sb(V) (%)	Sb total (%)
Francesa	0,49 ± 0,08	27,2 ± 0,3	27,7 ± 0,3
Argentina	0,73 ± 0,04	30,6 ± 0,4	31,3 ± 0,3
Nacional	2,60 ± 0,2	27,4 ± 0,5	30,0 ± 0,5

5 CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos no estudo de desenvolvimento e validação do método analítico para determinação do teor de Sb(III) e Sb(V) em formulações injetáveis de antimoniato de meglumina sem separação das espécies, podemos concluir que o método HG-ICP-OES em sistema de fluxo contínuo constitui-se uma alternativa segura para avaliação da qualidade desses produtos na rotina dos laboratórios de controle de qualidade. Apesar do fato de possuir limites de quantificações menores não ser relevante, pois trabalhamos com altas concentrações das espécies, este método é mais rápido mais preciso e mais robusto que as técnicas em batelada.

Os resultados sobre a caracterização da matéria-prima empregada na produção da solução injetável de antimoniato de meglumina apontam para a de origem francesa como sendo a mais adequada.

Quanto as formulações os resultados obtidos nos estudos realizados apontam para as formulações 5 e 6, cujo veículo foi uma mistura de propilenoglicol/água na proporção 20:80, como sendo as mais adequadas, confirmando a idéia inicial do aumento da estabilidade através da redução da constante dielétrica do meio. As formulações 7 e 8 cujo veículo foi uma mistura de propilenoglicol/água na proporção 50:50 apesar de também apresentar maior estabilidade em relação ao Sb(III) que as preparações de veículo aquoso, no entanto apresentou o inconveniente de maior variação de pH.

Levando-se em consideração o fato que soluções injetáveis devam possuir uma menor quantidade de aditivos possíveis e através dos resultados obtidos verificamos não ser necessária à presença de tampão para estabilizar o produto, desta forma a formulação 5 seria a mais adequada.

O sistema antioxidante escolhido se torna necessário uma vez que possíveis reações de oxi-redução na molécula de meglumina antimoniato podem ocorrer na ausência daquele. É necessário que estudos posteriores sejam realizados a fim de melhor esclarecerem uma provável formação de produtos indesejáveis provenientes da decomposição da parte orgânica da molécula.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALKHAWAJAH, A. Subacute toxicity of pentavalent antimony compounds in rats. **Human Exp. Toxicol.**, v. 11, n. 4, p. 283-288, 1992.

ANTIMONIATO de meglumina: bula. São Paulo: Laboratório Aventis Pharma, [s.d.]

APTE, S. C.; HOWARD, A. G. J. Determination of dissolved inorganic antimony (V) and antimony (III) species in natural waters by hydride generation atomic absorption spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 1, p. 221-225, 1986.

BALANA-FOUCE, R.; REGUERRA, R. M.; CUBRIA, C.; ORDONÉZ, D. The pharmacology of leishmaniasis. **Gen. Pharmacol.**, v. 30, n.4, p. 435-43, 1998.

BARRA, C. M.; SANTELLI, R. E.; ABRÃO, J. J.; GUARDIA, M. Especificação de arsênio - uma revisão. **Quim.Nova**, 23, 58, 2000.

BERG, J. E.; KNUT, S. **The Nordic Expert group for criteria documentation of health risks from chemicals.** [S.l.: s.n.], 1998. II.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de controle da leishmaniose tegumentar Americana:** organização gerência técnica de doenças transmitidas por vetores e antropozoonoses. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2000. 62 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral.** Brasília: Ministério da saúde, 2003. 120 p. (Série A. Normas e manuais técnicos).

BRODERSEN, K.; HASSEN, M. E. M.; HASSAUNA, I. H. I. Determination of antibilharzial antimony compounds by direct current, differential pulse, square-wave and alternating current anodic stripping voltammetry. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 358, p. 745-748, 1997.

CÂMARA, C.; GUNTINAS, M. B. C. Flow-injection and continuous-flow systems to determine antimony(III) and antimony(V) by hydride generation atomic absorption spectrometry. **Anal. Chem. Acta**, v. 252, p. 161-166, 1991.

- CARRIÓ, J.; COLMENARES, M.; RIERA, C.; GÁLLEGO, M.; ARBOIX, M.; PORTUS, M. Leishmania infantum: Stage- specific Activity of pentavalent Antimony related with the assay conditions. **Experim Parasitol.**, v. 95, n. 3, p. 209-214, 2000.
- CONNORS, K. A.; AMIDON, G. L.; STELLA, V. J. **Chemical stability of pharmaceuticals**. New York: John Wiley & Sons, 1986. 847 p.
- FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2002. 4 fac. p. 175.
- FIGUEIREDO, E. M.; COSTA E SILVA, J.; BRASIL, R. P. Experimental treatment with sodium stibogluconate of hamsters infected with Leishmania (Leishmania) chagasi and Leishmania (Leishmania) amazonensis / Tratamento experimental com stibogluconato de sódio em hamsters infectados com Leishmania (Leishmania) chagasi e Leishmania (Leishmania) amazonensis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 32, n. 2, p. 191-3, mar./abr. 1999.
- FLORES, E. M. M., BITTENCOURT, C.; FIGUEIREDO, L. P.; BARIN, J. S. Controle de metais pesados em produtos farmacêuticos: aspectos analíticos relevantes. **Pharmaceutical Technology.**, v. 4, p. 9-13, 2000.
- FLORES, E. M.; PAULA, F. R.; SILVA, F. E. B.; MORAES, D. P.; PANIZ, J. N. G.; SANTOS, E. P.; DRESSLER, V. L.; BITTENCOURT, V. L. Selective Determination of Sb (III) in Drugs by Flow Injection Hydride Generation AAS. **Atomic Spectroscopy**, v. 24, n. 1, p. 15-21, 2003.
- FLORES, E., M.; PEREIRA, E. S.; BARIN, J. S.; ZANELLA, R.; DRESSLER, R.; BITTENCOURT, V. L. Determination of antimony (III) and total antimony by hydride generation atomic absorption spectrometry in samples of injectable drugs used for leishmaniasis treatment. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 17, p. 819-823, 2002.
- FRANCO, M. A.; BARBOSA, A. C.; SUSANNE, R.; DOREA, J. G. antimony oxidation states in antileishmonial drugs. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.52, n.5, p.435-437, 1995.
- GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. p. 900-902.
- GOODWIN, L. G.; PAGE, J. E. A Study of the excretion of organic antimonials using a polarographic procedure. **Biochem. J.**, v. 37, p. 198-209, 1943.

HANDBOOK of pharmaceutical excipients. Washington, DC: American Pharmaceutical Association & The Pharmaceutil Society of Great Britain, 1986. 375 p.

KIRK, R.; SATI, M. H. Observation on the use of sodium antimony gluconate (sodium stibogluconate) in the treatment of Kala-azar. **Ann. Trop. Med. Hyg.**, v. 52 , p. 199-204, 1947.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1982. p. 469-473.

KRACHLER, M.; EMONS, H. Urinary antimony speciation by HPLC-ICP-MS. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 16, p. 20, 2001.

LOUREIRO, C. C. P.; DADALTI, P.; GUTIERREZ, M. C. G. Leishmaniose: métodos diagnósticos. **A Folha Médica**, v. 117, n. 2, p. 131-4, set./out. 1998.

LUZ, Z. M. P.; PIMENTA, D. N.; REBELLO, A.; SCHALL, V. Avaliação de material informativo sobre Leishmanioses distribuido no Brasil: critérios e subsídios para elaboração e o aperfeiçoamento de materiais educativos para saúde. **Cad. Saúde Pública**, v. 19, n. 2, p. 561-569, abr. 2003.

MARSDEN, P. D. Pentavalent antimonial: old drugs for new diseases. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 18, p. 187-198, 1985.

_____. The Discovery of urea stibamine. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 19, p. 115, 1986.

_____. Current concepts in parasitology. Leishmaniasis. **New England Journal of Medicine.**, v.15, p. 350-352, 1999.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil emerging antropozoonosis and possibilities for their control. **Cad. Saúde Pública**, v. 10, n. 2, p. 359-375, 1994.

MOHAMMAD, B.; URE, A. M.; REGLINSKI, J.; LITTLEJOHN, D. Speciation of antimony in natural waters: the determination of Sb (III) and Sb (V) by continuous flow hydride generation-atomic absorption spectrometry. **Chem. Spec. Biovail.**, v. 3, p. 117, 1990.

NBR ISO/IEC 17025. Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. 2001.

NOVIS, R. Surto de leishmaniose assusta. **O Dia**, Rio de Janeiro, 21 ago. 2004. Caderno Nosso Rio, p. 3.

REAÇÕES adversas graves associadas com o uso de antimoniato de meglumina cotaminado com arsênio e chumbo. Boletim eletrônico epidemiológico, n. 1, v. 1, mar. 2001. Investigação de surto. Disponível em:<<http://www.funasa.org.br>>. Acesso em: 29 set. 2004.

ROMERO, G. A. S.; OLIVEIRA, M. R. F.; CORREIA, D.; MARSDEN, P. D. Características físico-químicas do antimoniato de meglumina em diferentes condições de armazenamento. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 29, n. 5, p. 461-465, 1996.

SALDANHA, A. C. R.; ROMERO, G. A. S.; GUERRA, C. Estudo comparative ente Estibogluconato de sódio BP 88 ® e antimoniato de meglumina no tratamento da Leishmaniose cutânea II. Toxicidade bioquímica e cardíaca. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 33, n. 4, p. 383-388, 2000.

SILVA, J. J. B. **Antimoniato de meglumina**. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, vol.34, no.1, p.103-105, 2001.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Principles of instrumental Analysis**. 5. ed. Philadelphia: Harcourt Brace College Publ, 1998. 849 p.

THE UNITED States Pharmacopeia. 24. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convencion, 2000. 1 v.

THOMPSON, M.; PAHLAVANPOUR, B.; WALTON, S.; KIERKBRIGHT, G. F. Simultaneous determination of trace concentrations of As, Sb, Bi, Se and Te in aqueous solution by introduction of the gaseous hydrides into an inductively coupled plasma source for emission spectrometry. **Analyst Part 1**, v. 103, p.568-579; **Part 2**, v. 103, p.705-713, 1978.

TURCO, S.; KING, R. E. **Sterile dosage forms, their preparation and clinical application**. 3. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1997. 409 p.

VIANNA, M. A.; WILLIAMS, P.; FALCÃO, A. L. **American sandflies** (Díptera, Psychodidae, Phlebotominae). Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1978. 195 p.

WANG, S. M.; CHAO, Y. X. Experimental Institute of mineral, ulumugi, peop. Rep. China. Determination of Sb in antimoniate by flame atomic absorption spectrophotometry. **Fenxi Shiyanshi**, v. 20, n. 1, p. 95-96, 2001.

WHO. **Programme for the surveillance and control of Leishmaniasis**. Disponível em: <<http://www.who.int/emc/diseases/leish/index.html>>. Acesso em: 29 set. 2004.

WILLIAM, L. R.; WALTER, J. M.; PETRIE, M. R. Characterization of the Antimonial antileishmanial agent meglumine antimonate (Glucantime) **Antimicrob. Agents Chemotherapy**, v. 42, n. 5, p. 1076-1082, 1998.

YOUSSEF, A.; GAWARGRAUS, N.; TADROS, A. B.; BESADA, A.; LOUIS, F. I. Polarographic Determination of Antibilharzial Organic Antimony compounds. **Analyst**, v. 112, 1987.