

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

Henrique José Ferraz Fabrino

**CARACTERIZAÇÃO E APRIMORAMENTO DO ANTIMONIATO DE
MEGLUMINA VISANDO UM TRATAMENTO EFICAZ E SEGURO DA
LEISHMANIOSE**

Belo Horizonte
2021

UFMG/ICEx/DQ. 1.430
T. 655

Henrique José Ferraz Fabrino

**Caracterização e Aprimoramento do Antimoniato de Meglumina
Visando um Tratamento Eficaz e Seguro da Leishmaniose**

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências – Química

Orientadora: Profa. Dra. Cynthia Peres Demicheli (Departamento de Química – UFMG);

Co-orientadora: Profa. Dra. Letícia Malta Costa (Departamento de Química – UFMG);

Colaborador: Prof. Dr. Frederic Jean Georges Frezard (Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, – UFMG).

Belo Horizonte

2021

Ficha Catalográfica

F127c Fabrino, Henrique José Ferraz
2021 Caracterização e aprimoramento do antimoniato de
T meglumina visando um tratamento eficaz e seguro da
 leishmaniose [manuscrito] / Henrique José Ferraz
 Fabrino. 2021.

[x], 106 f. : il.

Orientadora: Cynthia Peres Demicheli.
Coorientadora: Letícia Malta Costa.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas
Gerais - Departamento de Química.

Inclui bibliografia.

1. Química analítica - Teses. 2. Leishmaniose -
Tratamento - Teses. 3. Antimônio - Especificação química
- Teses. 4. Ácido cítrico - Teses. 5. Planejamento
experimental - Teses. 6. Antimônio - Uso terapêutico -
Teses. 7. Espectroscopia de absorção atômica - Teses.
8. Medicamentos - Estabilidade - Teses. I. Demicheli,
Cynthia Peres, Orientadora. II. Costa, Letícia Malta,
Coorientadora. III. Título.

CDU 043

FOLHA DE APROVAÇÃO

28/01/2021

SEI/UFMG - 0530161 - Folha



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



"Caracterização e Aprimoramento do Antimoniato de Meglumina Visando Um Tratamento Eficaz e Seguro da Leishmaniose"

Henrique José Ferraz Fabrino

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profa. Cynthia Peres Demicheli - Orientadora
UFMG

Profa. Leticia Malta Costa - Coorientadora
UFMG

Prof. Marcos de Almeida Bezerra
UESB

Prof. Reinaldo Francisco Teófilo
UFV

Prof. Bruno Gonçalves Botelho
UFMG

Prof. Helvécio Costa Menezes
UFMG

Belo Horizonte, 25 de janeiro de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Reinaldo Francisco Teófilo, Usuário Externo**, em 25/01/2021, às 17:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Gonçalves Botelho, Professor do Magistério Superior**, em 25/01/2021, às 18:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Helvecio Costa Menezes, Professor do Magistério Superior**, em 25/01/2021, às 18:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cynthia Peres Demicheli, Professora do Magistério Superior**, em 25/01/2021, às 18:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leticia Malta Costa, Membro de comissão**, em 25/01/2021, às 18:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcos de Almeida Bezerra, Usuário Externo**, em 27/01/2021, às 09:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 0530161 e o código CRC 380EA4D4.

Dedico este trabalho aos meus pais, Ricardo e Vania, pelo amor, exemplo, paciência e apoio incansável para que eu tivesse uma boa educação.

E à minha esposa Carol, pelo amor, incentivo, paciência e momentos de alegria e descontração.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Minas Gerais, ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFMG por todos os recursos que permitiram a elaboração deste trabalho.

À Professora Dra. Cynthia Demicheli e à Professora Dra. Letícia Malta pela oportunidade, orientação, paciência, confiança e por não me deixarem desistir, me motivando para ter esperança e seguir em frente.

Ao Professor Dr. Frédéric Frezard pela importante colaboração e pelos conselhos valiosos em todas as etapas deste trabalho.

Ao Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB da UFMG pelas análises no osmometro, em especial ao Professor Dr. Christopher Kushmerick pela ajuda.

Aos amigos do laboratório 201 pela convivência diária, em especial, ao Bruno, Débora, Antônio, Ivina e Ariane, pela ajuda e amizade.

Aos amigos do LEAQUAA, e em especial, ao Ednilton, Roberta, Vania, Giselle, Igor e Paulo, pelo apoio e amizade.

Aos amigos do LabNANO, em especial, ao Guilherme, Nayara e Ana Carolina, pela importante colaboração e amizade.

Aos professores do DQ, por compartilharem generosamente seu conhecimento, em especial às Professoras Dra. Clésia Cristina Nascentes e Dra. Elene Cristina Pereira Maia.

Aos técnicos dos laboratórios do DQ, pelo profissionalismo e disponibilidade.

Aos demais funcionários do DQ, pela cordialidade e boa convivência.

Às secretárias da Pós Graduação pelos serviços prestados e colaboração.

A todos os meus amigos e familiares pela presença, apoio e carinho.

Aos órgãos de fomento: FAPEMIG, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para que esta conquista fosse alcançada.

*“Há épocas em que a sociedade,
tomada de pânico, se desvia da ciência
e procura a salvação na ignorância”*

Mikhail Saltykov-Stcherdrine

RESUMO

O antimoniato de meglumina (AM) é um fármaco de antimônio pentavalente (Sb^{V}) recomendado para o tratamento da leishmaniose. Sabe-se que o antimônio trivalente (Sb^{III}), presente como resíduo no AM, contribui para os efeitos colaterais e para o desenvolvimento de resistência a antimoniais. Neste trabalho, planejamento de experimentos (DOE) foi utilizado na síntese de AM para a obtenção de um fármaco com baixos níveis de Sb^{III} residual. Quatro variáveis (fonte de Sb^{V} , temperatura, volume de água e pH) e suas interações foram avaliadas preliminarmente através de um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} . O planejamento composto central (CCD) foi empregado para determinar as condições ideais de duas rotas sintéticas, usando fontes diferentes de Sb^{V} . A análise de formulações de AM sintetizadas em condições otimizadas, revelou a eficiência do DOE para reduzir os níveis de Sb^{III} residual. Além disso, o monitoramento de alguns parâmetros físico-químicos, *i.e.*, teor de Sb^{III} , pH e osmolaridade dessas formulações, mantidas a 40 °C por 90 dias, mostrou com 95% de confiança que a estabilidade não foi alterada.

Teor de Sb^{III} , em relação à quantidade de Sb total, presente nos compostos de AM foi usado como resposta no DOE e na avaliação da estabilidade de formulações de AM. Para esse fim, foi desenvolvido e validado um procedimento para especificação de Sb inorgânico em AM empregando espectrometria de absorção atômica por geração de hidretos (HG-AAS). A especificação do Sb ocorre em duas etapas: 1) quantificação de Sb total usando um agente redutor (KI); 2) quantificação de Sb^{III} pela geração seletiva de estibina (SbH_3) com o uso de ácido cítrico, em meio com elevada concentração de Sb^{V} . A concentração de ácido cítrico utilizada no método otimizado foi de 4 a 20 vezes menor do que a recomendada na literatura, evitando o entupimento do capilar da célula de quartzo T. Os limites de quantificação (LQ) foram calculados em $0,48 \mu\text{g L}^{-1}$ para Sb total e $0,17 \mu\text{g L}^{-1}$ para Sb^{III} . Os valores de desvio padrão relativo (DPR) variaram de 3,1 a 19,6% e 9,1 a 20,1%, enquanto a recuperação variou de 95,6 a 102,3% e 89,1 a 108,1%, para Sb total e Sb^{III} , respectivamente.

Palavras-chaves: leishmaniose, antimoniato de meglumina, especificação de antimônio, HG-AAS, ácido cítrico, planejamento de experimentos, estabilidade de formulação.

ABSTRACT

Meglumine antimoniate (MA) is a pentavalent antimony (Sb^{V}) drug recommended for the treatment of leishmaniasis. It is known that the trivalent antimony (Sb^{III}) present as a residue in MA contributes to the drug side effects and to the development of antimonial drug resistance. In this work, design of experiments (DOE) was used in the synthesis of MA in order to obtain a drug with low levels of Sb^{III} . Four variables (source of Sb^{V} , volume, temperature, water volume and pH) and their interactions were preliminarily evaluated by 2^{4-1} fractional factorial design. Central composite design (CCD) was used to determine the optimal conditions of two synthetic routes, using different sources of Sb^{V} . The analysis of MA formulations synthesized under optimized conditions revealed the efficiency of DOE to reduce Sb^{III} content. In addition, the monitoring of some physicochemical parameters, *i.e.*, Sb^{III} content, pH and osmolarity of these formulations maintained at 40 °C for 90 days, showed that stability was not altered at 95% confidence.

The Sb^{III} content, in relation to the amount of total Sb, present in MA compounds was used as a response in the DOE and in the evaluation of the MA formulations stability. For this purpose, a procedure for speciation of inorganic Sb in MA was developed and validated using hydride generation atomic absorption spectrometry (HG-AAS). The Sb speciation occurs in two stages: 1) quantification of total Sb using a reducing agent (KI); 2) quantification of Sb^{III} by the selective generation of stibin (SbH_3) with the use of citric acid, in medium with higher Sb^{V} concentration. The concentration of citric acid used in the optimized method was 4 to 20-fold lower than that recommended in the literature, preventing clogging of the capillary of the T quartz cell. The limits of quantification (LOQ) were calculated at 0.48 $\mu\text{g L}^{-1}$ for total Sb and 0.17 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Sb^{III} . The relative standard deviation (RSD) values ranged from 3.1 to 19.6% and 9.1 to 20.1%, while recovery ranged from 95.6 to 102.3% and 89.1 to 108.1%, for total Sb and Sb^{III} , respectively.

Keywords: leishmaniasis, meglumine antimoniate, antimony speciation, HG-AAS, citric acid, design of experiments, formulation stability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2-1: Estruturas químicas propostas para os complexos Sb-meglumina de estequiometria 1:1 (A); 2:2 (B); 1:2 (C); e 2:3 (D) em solução de AM, após seu estudo por ESI-MS.....	12
Figura 2-2: Modelo proposto para o mecanismo de ação de antimoniais pentavalentes envolvendo Sb ^{III} e biomoléculas contendo grupo sulfidríla.....	14
Figura 2-3: Esquema de funcionamento do acessório de transporte para geração de hidretos por fluxo contínuo, modelo VGA 77, da Agilent Technologies (EUA).	25
Figura 3-1: Gráficos gerados pelo planejamento fatorial completo 2 ⁴ com PC da otimização do método de quantificação de Sb total: Pareto (a) e médias marginais do efeito de interação entre [KI] e tempo (b).	46
Figura 3-2: Avaliação da faixa dinâmica linear do método de quantificação de Sb total por HG-AAS através da: (a) curva analítica clássica; (b) razão sinal/concentração vs. concentração.....	50
Figura 3-3: Gráficos exploratórios dos resíduos da regressão do método de quantificação de Sb total por HG-AAS, (a) com indicação dos valores extremos diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife, e (b) de probabilidade normal.	51
Figura 3-4: Gráficos representando (a) a independência dos resíduos e (b) a homoscedasticidade das variâncias dos resíduos nos grupos 1 e 2 para o método de quantificação de Sb total por HG-AAS.	52
Figura 3-5: Curva analítica para quantificação de Sb total por HG-AAS.	53
Figura 3-6: Gráfico de Pareto gerado pelo planejamento fatorial completo 2 ³ com PC da otimização do método de quantificação de Sb ^{III} por HG-AAS.	60
Figura 3-7: Gráficos de médias marginais dos efeitos de interação entre [ác. cítrico] e [NaBH ₄] (a), e entre [NaBH ₄] e tempo (b), gerados pelo planejamento fatorial completo 2 ³ com PC na otimização do método de quantificação de Sb ^{III} por HG-AAS.	61
Figura 3-8: Gráfico de Pareto gerado pelo planejamento fatorial incluso no CCD da otimização do método de quantificação de Sb ^{III} por HG-AAS.	65
Figura 3-9: Avaliação da faixa dinâmica linear do método de quantificação de Sb ^{III} por HG-AAS através da: (a) curva analítica clássica; (b) razão sinal/concentração vs. concentração.....	66

Figura 3-10: Gráficos exploratórios dos resíduos da regressão do método de quantificação de Sb^{III} , (a) com indicação dos valores extremos diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife, e (b) de probabilidade normal.....	67
Figura 3-11: Gráficos representando (a) a independência dos resíduos e (b) a homoscedasticidade das variâncias dos resíduos nos grupos 1 e 2 para o método de quantificação de Sb^{III}	68
Figura 3-12: Curva analítica para o método de quantificação de Sb^{III} por HG-AAS.	69
Figura 4-1: Gráfico de Pareto gerado pelo planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} da otimização da síntese de AM	83
Figura 4-2: Gráfico de médias marginais dos efeitos de interação da fonte de Sb com temperatura (a) e com volume de água (b) para o teor de Sb^{III} . As barras verticais representam intervalos de 95% de confiança.....	84
Figura 4-3: Superfície de resposta para a propriedade teor de Sb^{III} em relação a Sb total em compostos sintéticos de AM obtidos via $SbCl_5$	86
Figura 4-4: Curvas TG e DTG das amostras de (a) AM- $KSb(OH)_6$ e de (b) AM- $SbCl_5$	88
Figura 4-5: Espectros no infravermelho dos complexos AM- $KSb(OH)_6$ (a) e AM- $SbCl_5$ (b) obtidos na otimização da síntese.....	90
Figura 4-6: Resultados das medidas do teor de Sb^{III} e valores de pH para formulações orais (FO1-FO4) e tópicas (FT1-FT4) de AM durante 90 dias de estudos de estabilidade. As barras verticais representam o desvio padrão.	91
Figura 4-7: Resultados das medidas dos valores de osmolaridade para formulações orais (OF1-OF4) de AM durante 90 dias de estudos de estabilidade. As barras verticais representam o desvio padrão.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 2-1: Critérios de aceitação para repetibilidade e recuperação sugeridos pela AOAC	35
Tabela 3-1: Condições instrumentais empregadas nas determinações de Sb total e Sb ^{III} por HG-AAS	38
Tabela 3-2: Fatores e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2 ⁴ com PC para otimização do método de determinação de Sb total por HG-AAS.....	39
Tabela 3-3: Fatores e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2 ³ com PC para otimização do método de determinação de Sb ^{III} por HG-AAS	40
Tabela 3-4: Valores de absorvância para padrões de 5,0 µg L ⁻¹ de Sb ^V preparados com 1,0% (m/v) de diferentes agentes redutores.....	44
Tabela 3-5: Matriz do planejamento fatorial completo 2 ⁴ com PC da otimização do método de quantificação de Sb total por HG-AAS e valores de absorvância obtidos em cada experimento. Valores em parênteses são valores codificados	45
Tabela 3-6: Matriz CCD do método de quantificação de Sb total por HG-AAS e valores de absorvância obtidos. Valores em parênteses são valores codificados	48
Tabela 3-7: Parâmetros estatísticos obtidos a partir da ANOVA para o estudo de otimização do método de quantificação de Sb total por HG-AAS utilizando os planejamentos fatorial completo 2 ⁴ com PC e composto central (p = 0,05)	49
Tabela 3-8: Dados estatísticos obtidos na avaliação dos requisitos de normalidade, independência, homoscedasticidade, ANOVA da regressão e desvio de linearidade para a curva analítica do método de quantificação de Sb total por HG-AAS	54
Tabela 3-9: Avaliação da seletividade do método para a quantificação de 3,5 µg L ⁻¹ de Sb na ausência de interferentes e na presença de 20 µg L ⁻¹ dos interferentes Ni ^{II} , Pb ^{II} , Cu ^{II} ou As ^{III}	55
Tabela 3-10: Comparações entre as interseções e inclinações das curvas com e sem matriz para o método de quantificação de Sb total por HG-AAS.....	56
Tabela 3-11: Faixa dinâmica linear, faixa linear de trabalho, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) para o método de quantificação de Sb total empregando HG-AAS.....	57
Tabela 3-12: Valores de repetibilidade e tendência obtidos na validação do método de quantificação de Sb total por HG-AAS (n = 7).....	57

Tabela 3-13: Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 com PC da otimização do método de quantificação de Sb^{III} e valores de absorvância obtidos em cada experimento.....	59
Tabela 3-14: Primeira matriz CCD da otimização do método de quantificação de Sb^{III} por HG-AAS e valores de absorvância obtidos em cada experimento para amostras preparadas com $5 \mu g L^{-1}$ de Sb^{III} e também a absorvância para amostras preparadas com $5 \mu g L^{-1}$ de Sb^{III} e $400 \mu g L^{-1}$ de Sb^V	62
Tabela 3-15: Segunda matriz CCD da otimização do método de quantificação de Sb^{III} por HG-AAS e valores de absorvância obtidos em cada ensaio para amostras preparadas com $5,00 \mu g L^{-1}$ de Sb^{III} e também para amostras preparadas com $5,00 \mu g L^{-1}$ de Sb^{III} e $400,00 \mu g L^{-1}$ de Sb^V	63
Tabela 3-16: Parâmetros estatísticos obtidos a partir da ANOVA para a otimização do método de quantificação de Sb^{III} por HG-AAS utilizando os planejamentos fatorial completo 2^3 com PC e composto central ($p = 0,05$)	65
Tabela 3-17: Dados estatísticos obtidos na avaliação dos requisitos de normalidade, independência, homoscedasticidade, ANOVA da regressão e desvio de linearidade para a curva analítica do método de quantificação de Sb^{III} por HG-AAS	70
Tabela 3-18: Avaliação da seletividade do método de quantificação de Sb^{III} na ausência de interferentes e na presença de $20 \mu g L^{-1}$ dos interferentes Ni^{II} , Pb^{II} , Cu^{II} ou As^{III} , ou na presença de $400,0 \mu g L^{-1}$ do interferente Sb^V	71
Tabela 3-19: Comparações entre as interseções e inclinações das curvas com e sem matriz para o método de quantificação de Sb^{III} por HG-AAS	72
Tabela 3-20: Faixa dinâmica linear, faixa linear de trabalho, Limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) para o método de quantificação de Sb^{III} empregando HG-AAS	73
Tabela 3-21: Valores de repetibilidade e tendência obtidos na validação do método de determinação de Sb^{III} por HG-AAS ($n = 7$)	73
Tabela 3-22: Concentração de Sb total e Sb^{III} determinadas em amostras de Glucantime [®] usando o procedimento proposto. Resultados expressos como média \pm desvio padrão ($n = 3$); os valores entre parênteses são as porcentagens de Sb^{III} em relação a Sb total	74
Tabela 4-1: Fatores e níveis estudados no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} para a otimização da síntese de AM	80

Tabela 4-2: Matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} da otimização da síntese de AM e teores de Sb^{III} (% em relação ao Sb total) obtidos para os complexos de cada ensaio (n = 2)	82
Tabela 4-3: Matriz CCD da otimização da síntese de AM e teor de Sb^{III} obtido para os compostos de AM em cada experimento. Os valores entre parênteses são os valores codificados	85
Tabela 4-4: Parâmetros estatísticos obtidos a partir da ANOVA para o estudo de otimização da síntese de AM utilizando os planejamentos fatorial fracionário 2^{4-1} e composto central (p = 0,05).....	86
Tabela 4-5: Percentuais médios dos elementos C, H, N e Sb encontrados para os complexos de AM, e desvio padrão correspondentes (n = 2)	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AB – Anfotericina B
- ABC – Cassete de ligação ATP (*ATP-binding cassette*)
- ACR2 – Enzima arsenato redutase 2
- AQP1 – Aquagliceroporina
- AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*)
- AM – Antimoniato de meglumina
- CCCH – Proteína composta por três cisteínas e uma histidina
- CCD – Planejamento composto central (*Central composite design*)
- Cys – Cisteína
- Cys-Gly – Cisteinil-glicina
- d – Estatística de Durbin-Watson
- DNA – Ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)
- DOE – Planejamento de experimentos
- DPR – Desvio padrão relativo
- DTG – Derivada primeira da termogravimetria
- e_i – Resíduo da regressão
- EPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*U. S. Environmental Protection Agency*)
- ESI-MS – Espectrometria de massas com fonte de ionização eletrospray (*electrospray ionization mass spectrometry*)
- F – Razão entre variâncias
- FAAS – Espectrometria de absorção atômica com chama (*Flame Atomic Absorption Spectrometry*)
- FC – Fluxo contínuo
- FDA – Administração de alimentos e fármacos dos Estados Unidos (*U. S. Food and Drug Administration*)
- GSH – Glutathiona
- HEC – Hidroxietilcelulose
- HG-AAS – Espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (*Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*)

HG-AFS – Espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidretos (*Hydride Generation Atomic Fluorescence Spectrometry*)

HIV – Vírus da imunodeficiência humana (*Human Immunodeficiency Virus*)

HPLC – Cromatografia líquida de alta performance (*High Performance Liquid Chromatography*)

ICP OES – Espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (*Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry*)

IF – Injeção em fluxo

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

J_{ei} – Resíduo padronizado de Jackknife

IV – Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

LC – Leishmaniose cutânea

LDPC – Leishmaniose dérmica pós-calazar

LD – Limite de detecção

LMC – Leishmaniose mucocutânea

LQ – Limite de quantificação

LV – Leishmaniose visceral

MQM – Método dos quadrados mínimos

MQMP – Método dos quadrados mínimos ponderados

MRPA – Proteína A de resistência à múltiplos fármacos (*multidrug resistance protein A*)

RSM – Metodologia de superfície de resposta

n – Número de replicatas

NMG – N-metil-d-glucamina ou meglumina

ODC – Ornitina descarboxilase

OMS – Organização Mundial da Saúde

p – Significância

PC – Ponto Central

R – Coeficiente de correlação de Ryan-Joiner

R² – Coeficiente de determinação

R²_{máx} – Coeficiente de determinação máximo

PRP1 – Proteína 1 de resistência à pentamidina

RMN – Ressonância magnética nuclear

ROS – Espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*)
s – Desvio padrão
Sb^{III} – Antimônio trivalente
Sb^V – Antimônio pentavalente
Spd – Espermidina (*Spermidine*)
SSG – Estibogluconato de sódio (*sodium stibogluconate*)
t – Abicissa de distribuição de Student
t_L – Estatística t de Levene
TDR1 – Enzima redutase 1 tiol-dependente (*thiol-dependent reductase*)
TG – Termogravimetria
TR – Tripanotiona redutase
T(SH)₂ – Tripanotiona
UV – Ultravioleta
γGCS – Enzima γ-glutamilcisteína sintase

SUMÁRIO

<i>RESUMO</i>	i
<i>ABSTRACT</i>	ii
<i>LISTA DE FIGURAS</i>	iii
<i>LISTA DE TABELAS</i>	v
<i>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</i>	viii
Capítulo 1 – Introdução e Objetivos	1
1. Introdução	1
2. Objetivos	3
2.1. Objetivo geral.....	3
2.2. Objetivos específicos	3
Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica.....	4
1. Leishmanioses	4
2. Quimioterapia e medicamentos em uso.....	5
3. Antimoniais pentavalentes	9
4. Planejamentos de experimentos (DOE).....	15
4.1. Experimentos de triagem	15
4.2. Modelos empíricos	17
4.3. Metodologia de superfície de resposta (RSM)	17
4.4. Validação do modelo	19
5. Espectrometria de absorção atômica por geração de hidretos (HG-AAS).....	20
6. Validação analítica	28
6.1. Curva analítica e linearidade	28
6.2. Seletividade	32
6.3. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	33
6.4. Precisão e tendência	33
Capítulo 3 – Desenvolvimento e Validação de Métodos Analíticos para Especificação Inorgânica de Sb em Antimoniato de Meglumina por HG-AAS	36
1. Introdução	36
2. Materiais e métodos.....	37
2.1. Materiais, reagentes e soluções	37
2.2. Instrumentação	37

2.3. Metodologia	38
2.3.1. Otimização do método de quantificação de Sb total em AM por HG-AAS	39
2.3.2. Otimização do método de quantificação de Sb ^{III} em AM por HG-AAS	40
2.3.3. Validação dos métodos analíticos	41
2.3.3.1. Linearidade	41
2.3.3.2. Seletividade e efeito de matriz	42
2.3.3.3. Limites de detecção e de quantificação	42
2.3.3.4. Tendência e precisão	42
2.3.4. Análise de amostras comerciais	43
3. Resultados e discussão	43
3.1. Desenvolvimento e validação do método de quantificação de Sb total em AM empregando HG-AAS	43
3.1.1. Planejamento de experimentos	43
3.1.2. Validação do método analítico	49
3.1.2.1. Linearidade	49
3.1.2.2. Seletividade e efeito de matriz	55
3.1.2.3. Limite de detecção, limite de quantificação	56
3.1.2.4. Tendência e precisão	57
3.2. Desenvolvimento e validação do método de quantificação de Sb ^{III} em AM empregando HG-AAS	57
3.2.1. Planejamento de experimentos	58
3.2.2. Validação do método analítico	65
3.2.2.1. Linearidade	66
3.2.2.2. Seletividade e Efeito de Matriz	71
3.2.2.3. Limite de detecção, limite de quantificação	72
3.2.2.4. Tendência e precisão	73
3.3. Quantificação de Sb total e Sb ^{III} em amostras comerciais	73
4. Conclusões	74
Capítulo 4 – Antimoniato de Meglumina: Otimização dos Métodos de Síntese, Caracterização e Estudo de Estabilidade	76
1. Introdução	76
2. Materiais e métodos	77
2.1. Reagentes e materiais	77
2.2. Equipamentos	77
2.3. Síntese do antimoniato de meglumina (AM)	78
2.4. Caracterização dos AMs sintetizados	79
2.5. Planejamento de experimentos da síntese de AM	79
2.6. Formulações de AM para tratamento oral e tópico	80
2.7. Determinação do teor de Sb ^{III} por HG-AAS	81
2.8. Estudo de estabilidade das formulações orais e tópicas	81
3. Resultados e discussão	82
3.1. Planejamento de experimentos da síntese do antimoniato de meglumina	82
3.2. Caracterização físico-química do antimoniato de meglumina (AM)	87

3.2.1. Análise Termogravimétrica (TG)	87
3.2.2. Microanálises	88
3.2.3. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)	89
3.3. Estudo de estabilidade das formulações orais e tópicas	90
4. Conclusões	92
Considerações Finais	94
Referências Bibliográficas	95

Capítulo 1 – Introdução e Objetivos

1. Introdução

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas pelo protozoário parasita *Leishmania*. A doença é endêmica em mais de 98 países, afetando principalmente pessoas pobres na África, Ásia e América Latina, e está associada à desnutrição, deslocamento da população, moradia precária, sistema imunológico fraco e falta de recursos. Estima-se que ocorram anualmente 700.000 a 1 milhão de novos casos no mundo (OMS, 2020). O Brasil é um dos países mais acometidos pelas leishmanioses. Na ausência de vacinas, o tratamento é baseado na utilização de quimioterápicos (MARSDEN, 1985; MITROPOULOS et al., 2010). Os medicamentos de primeira escolha, desenvolvidos há mais de 70 anos, contra todas as formas clínicas das leishmanioses, são os compostos antimoniais pentavalentes estibogluconato de sódio (SSG) e antimoniato de meglumina (AM), comercializados como Pentostam® e Glucantime®, respectivamente (DAVIDSON, 1999, OLLIARO et al., 2005). Apesar de sua elevada eficácia, estes compostos apresentam algumas limitações como alta toxicidade, administração parenteral prolongada, alto custo e graves efeitos colaterais. Estas características limitam a adesão dos pacientes ao tratamento e favorecem o abandono e a má utilização dos medicamentos (MITROPOULOS et al., 2010). AM e SSG são considerados equivalentes em parâmetros de eficácia clínica, efeitos adversos, farmacocinética e mecanismos de ação. Com relação ao mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes, a hipótese mais aceita compreende a conversão do Sb^V , que atua como um pró-fármaco, à forma trivalente (Sb^{III}) que interfere no metabolismo dos tióis (FREZARD et al., 2009). Por outro lado, Dzamitika e colaboradores (2006) avaliaram amostras de AM com diferentes teores de Sb^{III} residual *in vitro* e *in vivo*. Os autores concluíram que Sb^{III} residual não contribui significativamente para sua atividade antileishmania, mas é responsável por sua atividade citotóxica contra células de mamíferos e desenvolvimento de resistência a essas drogas. Outro obstáculo que dificulta o tratamento é a coexistência de doenças infecciosas, principalmente a AIDS. Neste contexto, novas estratégias terapêuticas

devem ser planejadas para reduzir esses problemas (SAVOIA, 2015; COMANDOLLI-WYREPKOWSKI *et al.*, 2017). Uma estratégia com possibilidade de implementação a médio prazo, refere-se ao desenvolvimento de novas formulações dos fármacos existentes, aumentando a sua eficácia, reduzindo a sua toxicidade e, em alguns casos, permitindo administração por via não invasiva.

Demicheli e colaboradores (2003) desenvolveram duas novas rotas sintéticas para o AM utilizando como fonte de Sb^V o pentacloreto de antimônio ($SbCl_5$) (DEMICHELI, 1999) e hexahidroxiantimonato de potássio ($KSb(OH)_6$) (DEMICHELI e FRÉZARD, 2001). Estes compostos foram analisados por espectrometria de massas (ESI-MS) e o resultado revelou que os mesmos eram constituídos de uma mistura de oligômeros com formula geral $(meglumina-Sb)_n$ -meglumina e $(meglumina-Sb)_n$, qualitativamente semelhantes àquelas encontradas no Glucantime® (DEMICHELI *et al.*, 2003). No entanto, estudos quanto à composição química, propriedades de permeação (através de membrana de celulose e monocamada de células Caco-2) e captação (por macrófagos peritoneais), identificaram os compostos sintetizados como complexos menos polimerizados de 2:2 Sb-meglumina e mais permeativos do que Glucantime®, que consistia em uma mistura de complexos 2:3 e 3:3 Sb-meglumina (KATO *et al.*, 2018). Outro estudo também realizado pelo mesmo grupo de pesquisa, demonstrou que o composto AM- $KSb(OH)_6$ produz um nível mais baixo de apoptose no fígado após a administração parenteral em camundongos, quando comparado ao Glucantime® (KATO *et al.*, 2014), o que foi relacionado ao teor mais baixo de resíduo de Sb^{III} encontrado no AM- $KSb(OH)_6$. Testes comparativos em modelos murinos de leishmaniose mostraram que os novos compostos administrados por via parenteral (DZAMITIKA *et al.* 2006), oral (KATO *et al.*, 2018) e tópica (DE OLIVEIRA, 2019) foram tão eficazes quanto o Glucantime® administrado por via parenteral.

Este trabalho abordará etapas críticas para desenvolver um tratamento com antimônio pentavalente mais seguro e aceito pelos pacientes, através da redução dos níveis tóxicos do antimônio trivalente (Sb^{III}) no medicamento. Nesse sentido, planejamentos de experimentos foram empregados para avaliar os parâmetros da reação de síntese do antimoniato de meglumina (AM) que poderiam atuar de forma significativa na conversão de Sb^V para Sb^{III} .

Para determinar os teores de Sb^{III} e Sb total nas amostras de AM, foram desenvolvidos e validados métodos de análise empregando a técnica de espectrometria de absorção atômica por geração de hidretos (HG-AAS).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O projeto visa o aprimoramento do AM utilizado no tratamento humano da leishmaniose, através da otimização de sua síntese com o objetivo de evitar a conversão de Sb^{V} para Sb^{III} . Os procedimentos para preparar as formulações de AM devem ser simples e eficientes para viabilizar a produção em larga escala com baixos custos.

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver métodos analíticos rápidos, simples, confiáveis, sensíveis e de baixo custo para quantificação de Sb total e Sb^{III} em amostras de antimoniato de meglumina empregando planejamento de experimentos.
- Validar os métodos analíticos desenvolvidos usando os guias atuais (INMETRO, 2020; BRASIL, 2017).
- Desenvolver procedimentos simples, eficientes e de baixo custo para síntese de AM.
- Fazer a caracterização físico-química das formas sintéticas de AM em relação à espécie molecular predominante e à presença de resíduo de Sb^{III} .
- Verificar a estabilidade de formulações de AM preparadas a partir da síntese otimizada para uso oral e tópico (estudo acelerado de estabilidade).

1. Leishmanioses

Leishmanioses são doenças causadas por cerca de vinte espécies de protozoários flagelados do gênero *Leishmania*, família *Tripanosomatidae* e ordem *Kinetoplastida*. São transmitidas pela picada de mosquitos fêmea da subfamília *Phlebotominae* (popularmente conhecido como mosquito-palha), principalmente por espécies do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo, e exclusivamente por espécies do gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo (DE ALMEIDA et al., 2003; OMS, 2020). Estes protozoários possuem duas formas morfológicas em seu ciclo de vida. As formas amastigotas vivem dentro de vacúolos lisossomais presentes em células fagocíticas do hospedeiro vertebrado. Já as promastigotas são formas extracelulares que podem ser encontradas livres ou ligadas à cutícula intestinal do hospedeiro invertebrado (DE ALMEIDA et al., 2003).

Existem quatro formas principais da doença: leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar; leishmaniose cutânea (LC); leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC). LC é a forma mais comum da doença, causa lesões cutâneas deixando cicatrizes permanentes, graves incapacidades ou estigma. Estima-se que ocorram anualmente entre 700.000 a 1 milhão de novos casos em todo o mundo, sendo que em 2018 mais de 85% ocorreram em 10 países, dentre eles o Brasil (OMS, 2020). LV é a forma mais grave da doença, sendo fatal se não tratada apropriadamente, e se caracteriza por episódios irregulares de febre, perda de peso, aumento do baço e do fígado e anemia. Estima-se que 50.000 a 90.000 de novos casos ocorram no mundo anualmente, sendo que em 2018 mais de 95% ocorreram em 10 países, dentre eles o Brasil (OMS, 2020). LMC leva à destruição parcial ou total das membranas mucosas do nariz, boca e garganta. Mais de 90% dos casos ocorrem na Bolívia, Brasil, Etiópia e Peru (OMS, 2020). A LDPC é geralmente uma sequela da LV que se apresenta como erupção macular, papular ou nodular. Ocorre principalmente na África Oriental e no subcontinente indiano, onde 5 a 10% dos pacientes com LV desenvolvem a doença (OMS, 2020).

Além disso, a leishmaniose pode ser classificada como antropológica ou zoonótica, dependendo se o reservatório natural do parasita é humano ou animais

mamíferos. Por exemplo, a LV é antropótica se causada por *L. donovani* ou zoonótica se causada por *L. infantum*, sendo o cão o principal reservatório neste último caso. No Brasil, o fato dos cães serem o principal reservatório e responderem apenas parcialmente aos medicamentos existentes implica na proibição do tratamento de cães com fármacos destinados ao uso humano (Brasil, 2008).

A prevenção e o controle das leishmanioses requerem uma combinação de estratégias de intervenção, pois a transmissão ocorre em um sistema biológico complexo. Em 2017, representantes dos países endêmicos nas Américas aprovaram o “Plano de Ação de Leishmanioses nas Américas 2017-2022”. O plano tem o objetivo de reduzir a morbidade e mortalidade mediante o fortalecimento do diagnóstico, tratamento, reabilitação, prevenção, vigilância e controle. O mesmo possui as seguintes metas para 2022: reduzir a letalidade por LV em 50%; reduzir as mortes por LC/LMC em 90%; reduzir a proporção de LC em crianças menores de 10 anos em 50% e reduzir a incidência de LV (OPAS, 2018).

O HIV está gradualmente se espalhando em áreas endêmicas de leishmaniose, levando ao aparecimento da coinfeção *Leishmania*/HIV. A interação dessas duas infecções acelera os dois processos de doença, piorando o prognóstico de ambos. A LV tem maior probabilidade de se desenvolver em pacientes infectados pelo HIV e prejudica sua resposta ao tratamento antirretroviral. A LC em pacientes com HIV pode apresentar lesões múltiplas, polimórficas e recidivantes (OMS, 2010).

2. Quimioterapia e medicamentos em uso

As medidas de controle das leishmanioses baseiam-se essencialmente na quimioterapia. Embora geralmente não seja aplicada em indivíduos assintomáticos ou administrado em massa, como ocorre para uma série de outras doenças tropicais negligenciadas, dada a segurança de determinados medicamentos usados nessas circunstâncias (por exemplo, praziquantel na esquistossomose e ivermectina para a filariose linfática). Os problemas combinados de administração parenteral, toxicidade e a seleção de parasitas resistentes às drogas impedem tais programas para leishmaniose (PONTE-SUCRE et al., 2017). A *Leishmania* tem um ciclo de vida intrincado e a forma amastigota aumenta o desafio de acessar os parasitas com drogas específicas, já que reside nas células imunológicas do hospedeiro mamífero.

Os antimoniais foram pioneiros e continuam sendo os principais medicamentos contra as diferentes formas de leishmaniose em várias regiões. O uso de antimônio como agente terapêutico sempre foi muito controverso desde seu emprego inicial no século XV, tendo sido praticamente abolido no século XIX em função de sua toxicidade. Já era considerado droga suprimida do arsenal terapêutico quando, em 1912, Gaspar Viana passou a utilizar Sb trivalente, tártaro emético (tartarato de potássio e antimônio), para tratar pacientes portadores de LMC (BERMAN, 1988; DE LIMA et al., 2007). Era o marco inicial da quimioterapia anti-infecciosa. Há cerca de 70 anos, os compostos menos tóxicos de antimônio pentavalente foram introduzidos no tratamento das leishmanioses, no entanto, os últimos 10 a 20 anos testemunharam um aumento na resistência clínica, como na Índia por exemplo. Isso levou ao uso de medicamentos alternativos para tratar a leishmaniose, especialmente a miltefosina, a anfotericina B e a paromomicina.

A miltefosina é um alquilfosfolípídio (hexadecilfosfocolina) e o primeiro agente antileishmania oral registrado. Substituiu os antimoniais no subcontinente indiano no contexto do programa de eliminação da LV e foi escolhido para o programa de eliminação no Nepal e Bangladesh, (SUNDAR et al., 2008). Mas a eficácia dessa droga também já havia caído dentro de uma década desde sua introdução em 2002 (SUNDAR et al., 2012). A miltefosina comumente induz efeitos colaterais gastrointestinais, como anorexia, náusea, vômito (38%) e diarreia (20%). A maioria dos episódios é breve e desaparece com a continuação do tratamento. Ocasionalmente, os efeitos colaterais podem ser graves e exigir a interrupção do tratamento. Podem ser observados alergia cutânea, concentrações elevadas de transaminases hepáticas e, raramente, insuficiência renal, é potencialmente teratogênica e não deve ser usada por mulheres grávidas ou com potencial para engravidar (OMS, 2010).

A anfotericina B (AB) é um antibiótico poliênico que atua tanto em promastigotas quanto em amastigotas e tem como alvo o ergosterol na membrana superficial do parasita, levando ao aumento da permeabilidade e ao influxo de íons (ELLIS et al., 2009). No entanto, esse medicamento tem muitos efeitos adversos, incluindo reações à infusão, nefrotoxicidade, hipocalcemia e miocardite e, portanto, precisa de monitoramento rigoroso e hospitalização por 4 a 5 semanas (MARSDEN, 1994). Para minimizar os eventos adversos, várias formulações lipídicas de AB foram

introduzidas, permitindo que a droga atinja níveis plasmáticos de pico mais elevado e exiba meia-vida de circulação mais curta. Fígado e baço recebem uma maior concentração da droga (com muito menos toxicidade), e conduzem ela para o meio intracelular, favorecendo a interação do ergosterol do parasita sobre o colesterol do hospedeiro (BERMAN, 1997). A tolerância é muito melhorada e os efeitos adversos são minimizados, o que permite a administração de grandes doses do medicamento em curtos períodos de tempo. Já o alto custo de formulações lipídicas de AB contribuiu para que sua gama de uso fosse restrita. Um acordo de preços preferenciais, entre a fabricante Gilead Sciences e a OMS de 14 de março de 2007, reduziu o preço para regiões endêmicas de países em desenvolvimento (MOON et al., 2011). Mais recentemente, fabricantes forneceram a droga gratuitamente à OMS para uso em áreas estrategicamente importantes (Gilead Sciences; até 350.000 frascos em cinco anos) (PONTE-SUCRE et al., 2017). Taxas de cura semelhantes foram obtidas após tratamento com dose única de AB lipossomal 10 mg kg⁻¹ de peso corporal, e com 15 infusões de AB convencional 1 mg kg⁻¹ administrado em dias alternados durante uma hospitalização de 29 dias (SUNDAR et al., 2010). O preço reduzido aliado a um único dia de internação, fez da AB lipossomal um dos medicamentos mais utilizados no tratamento da LV no mundo, atrás apenas dos antimoniais pentavalentes. A baixa toxicidade do preparado lipossomal também o torna a melhor opção para o tratamento da coinfeção HIV-LV. Na América, principalmente Brasil, AB lipossomal tem sido usada com sucesso no tratamento de LV em situações particulares, principalmente em pacientes idosos, crianças, receptores de transplante, e com comorbidade em pacientes com diabetes e infectadas com HIV (BRASIL, 2009). Existem poucos estudos que demonstrem a eficácia da AB lipossomal para CL, sendo mais comumente usada para LMC com excelentes resultados (PONTE-SUCRE et al., 2017).

A paromomicina é um antibiótico aminoglicosídeo-aminociclitol, que tem sido usado para o tratamento de LV em formulação parenteral e raramente para CL em formulações tópicas e parenterais. A eficácia da paromomicina sistêmica para LMC é baixa, com uma alta taxa de recidiva (ROMERO et al., 1998). A vantagem desse agente é seu custo extremamente acessível. A monoterapia com paromomicina pode levar a desenvolvimento de resistência (SUNDAR e CHAKRAVARTY, 2013). Foi aprovada pelo governo indiano em agosto de 2006 e exibiu alta eficácia para o

tratamento de pacientes com LV (DAVIDSON et al., 2009; SUNDAR e CHAKRAVARTY, 2008). Dor no local da injeção foi o evento adverso mais comum (55%), mas ototoxicidade reversível e aumento das transaminases hepáticas também foram observados. Na África Oriental, a eficácia da paromomicina foi menor e, portanto, recomenda-se que seja utilizada uma dose mais elevada ou que o medicamento seja utilizado em combinação com um antimonial pentavalente (HAILU et al., 2010). A combinação de paromomicina e antimoniais resultou em uma taxa de cura mais alta em pacientes com LV em Bihar, na Índia, do que apenas os antimoniais (OMS, 2010).

O medicamento usado para tratar a leishmaniose é escolhido com base em fatores de risco, características do paciente, área geográfica e espécies de *Leishmania*, sendo a taxa de cura acima de 90% na maioria dos casos (OMS, 2010). A resistência aos medicamentos é um determinante fundamental da falha do tratamento, embora outros fatores também contribuam para esse fenômeno, incluindo a epidemia global de HIV/AIDS com seu impacto concomitante no sistema imunológico. (PONTE-SUCRE et al., 2017). Outra complicação é o aparecimento de LDPC e alguns casos após a cura aparente de LV (ZILIJLSTRA et al., 2003). O aparecimento de LDPC não é considerado uma reincidência e é tratada com o mesmo fármaco usado para tratar a LV, mas por uma duração prolongada (OMS, 2010). Para casos de reincidência, são usados os medicamentos de segunda escolha, além de combinações de diferentes drogas. A justificativa por trás da terapia multifármaco é o aumento da atividade por meio do uso de compostos com atividade sinérgica ou aditiva agindo em diferentes locais. Os benefícios são a diminuição da dose e da duração da terapia, com redução dos custos e efeitos colaterais, e prevenindo o surgimento de resistência aos medicamentos (SUNDAR e CHAKRAVARTY, 2015).

Doenças negligenciadas, como as leishmanioses, afetam principalmente as pessoas mais pobres do mundo, e a falta de retorno comercial com medicamentos tem resultado em financiamento e comprometimento insuficientes para pesquisa e desenvolvimento nesta área (FRÉZARD et al., 2009). Estratégias para melhorar os fármacos existentes têm maiores chances de sucesso que aquelas baseadas no descobrimento de novas entidades químicas (FRÉZARD e DEMICHELI, 2010).

3. Antimoniais pentavalentes

O antimônio (Sb) está na quarta linha do grupo 5A (grupo IUPAC 15) na tabela periódica, é referido como um metaloide. Exibe quatro estados de oxidação: -3, 0, +3 e +5. Os estados de oxidação mais comuns e estáveis em soluções aquosas e fluidos biológicos são Sb^{III} e Sb^{V} , que ao sofrerem hidrólise formam os compostos $\text{Sb}(\text{OH})_3$ e $\text{Sb}(\text{OH})_6^-$, respectivamente (FILELLA et al., 2002). O Sb^{III} sob a forma de $\text{Sb}(\text{OH})_3$ não apresenta carga elétrica e atravessa mais facilmente membranas celulares, contribuindo para que sua toxicidade seja aproximadamente dez vezes maior do que Sb^{V} . Mas a mobilidade e a solubilidade do Sb^{V} são maiores do que do Sb^{III} . Também ocorrem diferenças em relação à afinidade por células e grupos químicos. Por exemplo, a maior afinidade do Sb^{III} pelas células vermelhas (hemácias) e pelos grupos sulfidrilas de constituintes celulares, enquanto que os eritrócitos são praticamente impermeáveis ao Sb^{V} (FOWLER e GOERING, 1991).

O nível normal de Sb em fluidos corpóreos humanos é estimado em partes por trilhão. Alguns órgãos podem apresentar quantidades maiores, como o cérebro com $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$, o cabelo com $0,7 \text{ mg kg}^{-1}$, fígado e rins com $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$. A análise da urina de pacientes submetidos a tratamentos com antimoniais pentavalentes, mostrou níveis de Sb na urina bem acima do normal, mesmo decorrido certo tempo após o fim do tratamento. Foram encontradas concentrações de Sb na urina de 1 mg L^{-1} depois de seis meses e $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ após um ano do fim do tratamento (EMSLEY, 2005).

Os antimoniais pentavalentes antimoniato de meglumina (AM; Glucantime[®], Sanofi-Aventis Farmacêutica LTDA), disponível em países que falam francês, espanhol e português (BERMAN, 1997; BALAÑA-FOUCE et al., 1998; DAVIDSON, 1999; OLLIARO et al., 2005); e o estibogluconato de sódio (SSG; Pentostam[®], GlaxoSmithKlein), disponível em países de língua inglesa (BALAÑA-FOUCE et al., 1998), são fármacos de primeira escolha para tratar as leishmanioses no mundo. Estes fármacos possuem eficácia equivalente, pois são da mesma classe farmacológica e apresentam mecanismos de ação e farmacocinética semelhantes (PORTO et al., 2007). O SSG e o AM têm sido medicamentos de primeira linha padrão na maioria dos países, com mais de 90% de taxa de cura geral (OMS, 2010), enquanto estes mesmos medicamentos não são efetivos em aproximadamente 60% dos casos em Bihar, na Índia, e no Nepal (ALVAR et al., 2006).

Glucantime® é apresentado em ampolas de 5 mL contendo 81 mg mL⁻¹ de Sb^V, enquanto Pentostam® é fornecido em frascos de 50 mL contendo 100 mg mL⁻¹ de Sb^V (OMS, 2010). Devido à baixa absorção oral, a OMS recomenda administrar por via parenteral, doses de Sb^V 20 mg kg⁻¹ de peso corporal (limite de 850 mg), por um período de 30 dias para LV e LMC, e de 20 dias para LC (OMS, 2010). Uma injeção intramuscular de 10 mg kg⁻¹ de Sb^V em humanos (SSG ou AM) alcança picos sanguíneos de 9-12 mg L⁻¹ após 2 horas de administração. A maior parte é eliminada rapidamente, mas a concentração aumenta gradualmente nos tecidos depois de repetidas doses (BERMAN, 1988; CHULAY et al., 1988; DAVIDSON, 1999), indicando um acúmulo do fármaco no tratamento a longo prazo (CHULAY et al., 1988). O modelo que melhor descreve a farmacocinética do Sb^V é o modelo de dois compartimentos. O primeiro, um compartimento central que inclui sangue e plasma, e o segundo um compartimento periférico no qual o fármaco é distribuído e pode ocorrer redução do Sb^V a Sb^{III}. Existe uma fase inicial com meia vida ($t_{1/2}$) de 0,85 horas, uma rápida fase de eliminação ($t_{1/2} = 2$ horas) e finaliza com uma fase lenta de eliminação ($t_{1/2} = 76$ horas) (CHULAY et al., 1988), que pode ser resultado da conversão *in vivo* de Sb^V a Sb^{III}. Pacientes em idade avançada ou com morbidade cardíaca, hepática, renal, pancreática ou hematológica pré-existente apresentam alto risco de mortalidade relacionada à toxicidade e não devem ser submetidos a tratamento sistêmico com antimoniais (OMS, 2010). Os antimoniais pentavalentes são menos seguros na gravidez, pois podem resultar em transmissão vertical, aborto espontâneo, partos prematuros e encefalopatia hepática na mãe (OMS, 2010).

Os efeitos adversos mais comuns desses tratamentos a base de drogas contendo Sb são: mialgia, artralgia, astenia, náusea, síndrome febril, anemia, leucopenia, insuficiência renal, hepatotoxicidade, cardiotoxicidade, trombocitopenia e pancreatite (BLUM et al., 2004; LAWN et al., 2006). A cardiotoxicidade, relacionada a altas doses e a duração do tratamento, tem sido apontada por alguns autores como efeito colateral mais frequente, havendo relatos de casos de morte relacionados à toxicidade dos antimoniais pentavalentes sobre a fibra cardíaca (LIMA et al., 2007).

As estruturas exatas do AM e do SSG são difíceis de determinar, principalmente por causa do estado amorfo desses compostos. Esta informação é importante já que a forma química destes compostos deve influenciar a farmacocinética, captação pelo sistema retículo-endotelial e metabolismo intracelular

do antimônio pentavalente (FRÉZARD et al., 2009). O uso de técnicas analíticas como cromatografia, espectrometria de massa e RMN, permitiu um progresso significativo, sugerindo a existência de uma mistura de estruturas oligoméricas com de fórmula geral (guconato-Sb)_n-gluconato e (gluconato-Sb)_n para SSG (BERMAN e GROGL, 1988; FRÉZARD et al., 2008) e de a fórmula geral (meglumina-Sb)_n-meglumina e (meglumina-Sb)_n para AM (ROBERTS et al., 1998). A Figura 1 mostra as estruturas propostas para os principais complexos Sb-meglumina em solução aquosa de AM.

Dados de osmolaridade mostram que as composições químicas de AM e SSG dependem da concentração e do tempo em solução. A forma mais predominante em soluções concentradas, presentes nas preparações comerciais, consiste em uma mistura de complexos Sb-meglumina (ou Sb-guconato) de estequiometria 2:2, 2:3 e 2:1 (FRÉZARD et al., 2008). Por outro lado, em soluções aquosas diluídas, como no soro de pacientes após administração, AM (ou SSG) seria convertido lentamente na forma 1:1 do complexo. A relação Sb-ligante perto de 1 após 5 horas de incubação, a 37 °C, reflete a relativa labilidade da ligação de coordenação (FRÉZARD et al., 2008). Espera-se que o complexo zwitteriônico 1:1 de Sb^V-meglumina (ou Sb^V-gluconato), sejam as formas finais do Sb^V presentes no soro humano durante o tratamento (MIEKELEY et al., 2002). O complexo 1:1 é provavelmente o complexo mais estável, com constante de estabilidade estimada em 8.600 L mol⁻¹ (DZAMITIKA et al., 2006). Demicheli e colaboradores (1999) demonstraram por medições de condutividade que o AM contém dois prótons dissociáveis que podem ser atribuídos ao grupo ácido-antimônico (pK_{a1} = 2,10) e ao grupo amino (pK_{a2} = 10,26). Entre pH 4,5 e 7,5, o complexo existe 100% na forma zwitteriônica.

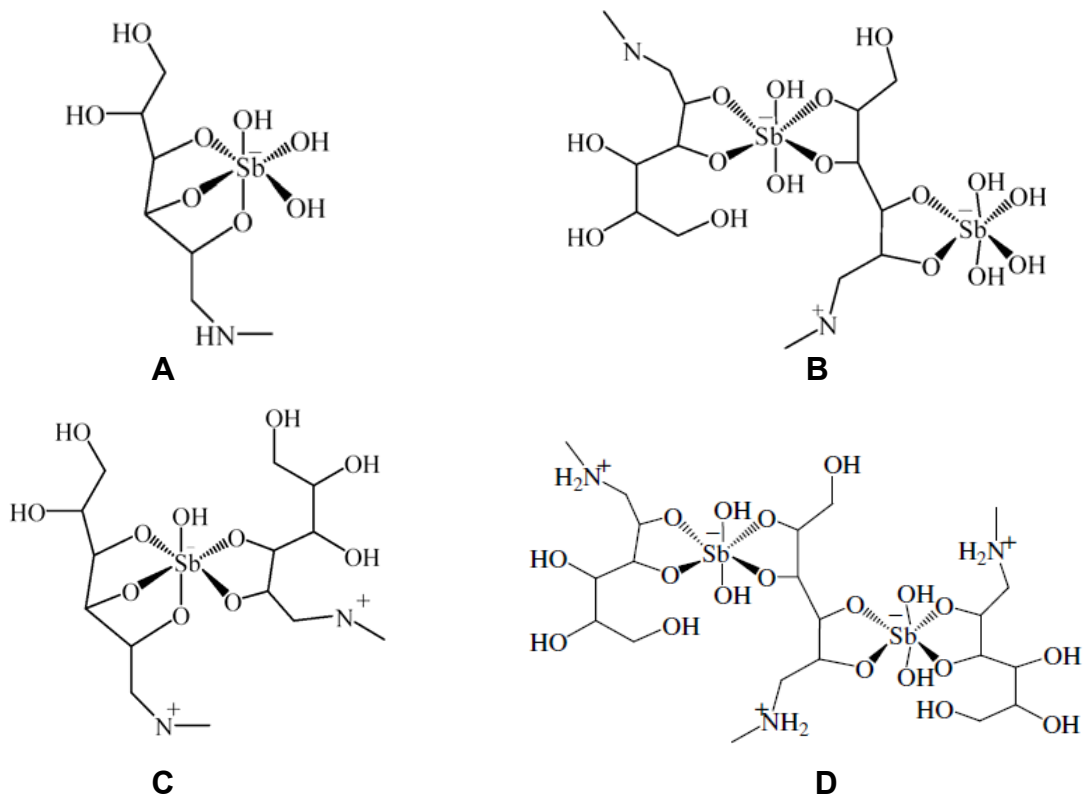


Figura 2-1: Estruturas químicas propostas para os complexos Sb-meglumina de estequiometria 1:1 (A); 2:2 (B); 1:2 (C); e 2:3 (D) em solução de AM, após seu estudo por ESI-MS.

Fonte: (FRÉZARD et al., 2008)

Apesar do uso extensivo e longo dos compostos de antimônio no tratamento das leishmanioses, seu mecanismo de ação ainda não é completamente entendido. Um dos modelos propostos indica que o Sb^V apresentaria atividade anti-leishmania intrínseca, com ribonucleosídeos sendo o alvo almejado desta espécie química para formar complexos estáveis de 1:1 e 1:2 Sb^V -ribonucleosídeo (DEMICHELI et al., 2002; DEMICHELI et al., 2006). Tal associação parece ser favorecida pelo pH ácido nos fagolisossomas (FERREIRA et al., 2006). Esses complexos podem atuar como inibidores dos transportadores de purina, ou interferir na via de recuperação da purina da *Leishmania* (FERREIRA et al., 2006).

Outra hipótese compreende a conversão do Sb^V , uma espécie de pró-fármaco, na forma trivalente (Sb^{III}), mais ativa e tóxica (KOTHARI et al., 2007; LIMA et al., 2007). Esta hipótese é sustentada pelo fato de existir alta toxicidade de antimônio trivalente aos estágios do parasito (SERENO et al., 2001) e apenas a forma amastigota ser susceptível ao antimônio pentavalente (DENTON et al., 2004). Alguns estudos

indicam quatro diferentes tióis que podem atuar como um agente redutor na conversão de Sb^V a Sb^{III} : glutationa (GSH), que é o principal tiol no citosol de células de mamíferos, cisteína (Cys) e cisteinil-glicina (Cys-Gly) encontradas predominantemente nos lisossomas (GAINEY et al., 1996), e a tripanotiona ($T(SH)_2$), principal tiol presente no parasito (FAIRLAMB e CERAMI, 1992). A Figura 2-2 mostra o mecanismo da redução de Sb^V para Sb^{III} : (1) dentro do fagolisossoma pelos tióis Cys ou Cys-Gly; (1') dentro do parasito pelo tiol $T(SH)_2$, pela enzima redutase dependente de tiol 1 (TDR1; do inglês, *thiol-dependent reductase*), ou pela enzima antimoniato redutase 2 (ACR2). Ainda não é conhecido o mecanismo pelo qual o Sb^V é transportado para o meio intracelular (FREZARD et al., 2014), já o transporte de Sb^{III} para o interior é realizado pela proteína de membrana aquagliceroporina 1 (AQP1) (GOURBAL et al., 2004).

O mecanismo de ação antileishmanial de Sb^{III} (Figura 2-2) está provavelmente relacionado à sua interação com biomoléculas contendo grupo sulfidril ($-SH$), incluindo tióis, peptídeos, proteínas e enzimas (FRÉZARD et al., 2013). A avaliação do mecanismo de citotoxicidade do tártaro emético, sugere que Sb^{III} compromete o balanço intracelular dos tióis através da depleção da glutationa (GSH) e da inibição da glutationa redutase (WYLLIE et al., 2004; WYLLIE e FAIRLAMB, 2006). Assim o Sb^{III} aumenta o estresse oxidativo e leva a apoptose devido ao aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS) (TIMERSTEIN et al., 1995). A figura 5 mostra os mecanismo de ação do Sb^{III} no parasito, sendo: (2) formação de complexos entre Sb^{III} e tióis (GSH, $T(SH)_2$); (3) sequestro dos complexos Sb^{III} -tióis pelos transportadores ABC, proteína A de resistência à múltiplos fármacos (MRPA) ou proteína 1 de resistência à pentamidina (PRP1), em organelas intracelulares (vacúolos), ou extrusão ativa dos complexos Sb^{III} -tióis por um transportador de membrana não identificado; (4) ligação de Sb^{III} ao local ativo e inibição da tripanotiona redutase (TR), aumentando a produção intracelular de ROS; (5) ejeção de Zn^{II} de proteínas “dedo de zinco” por competição com Sb^{III} , resultando na interferência da expressão gênica (FRÉZARD et al., 2013).

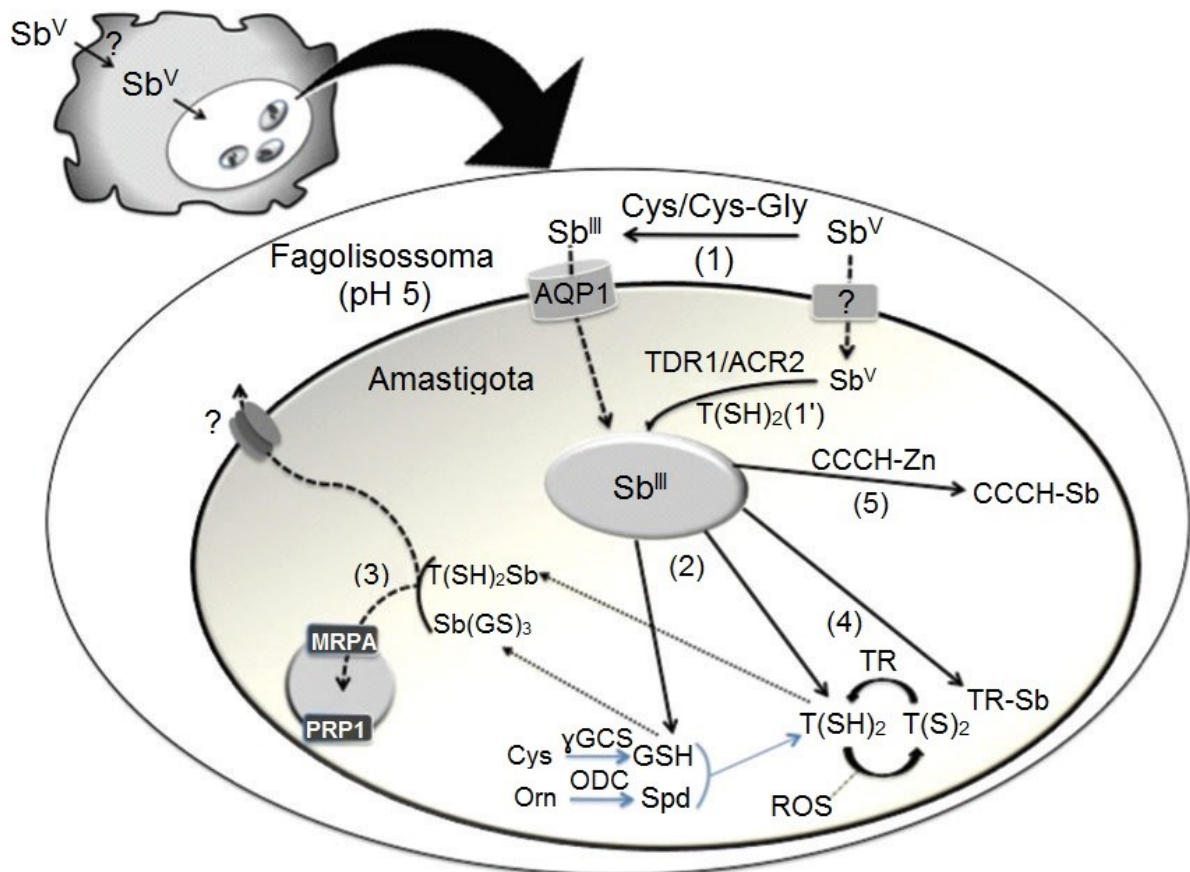


Figura 2-2: Modelo proposto para o mecanismo de ação de antimoniais pentavalentes envolvendo Sb^{III} e biomoléculas contendo grupo sulfidril. (γGCS, enzima γ-glutamil-cisteína sintase; Spd, espermidina; ODC, ornitina descarboxilase; Orn, ornitina; CCCH, proteína composta por três cisteínas e uma histidina).

(γGCS, enzima γ-glutamil-cisteína sintase; Spd, espermidina; ODC, ornitina descarboxilase; Orn, ornitina; CCCH, proteína composta por três cisteínas e uma histidina).

Fonte: (FRÉZARD et al., 2013).

Uma variedade de mecanismos diferentes pode contribuir, em graus variados, para a capacidade dos parasitas *Leishmania* resistirem ao antimônio de uma forma complexa. Sabe-se que o acúmulo de Sb é menor em parasitas resistentes (LÉGARÉ et al., 2001) e que mutantes resistentes exibem níveis significativamente maiores de tióis intracelulares (WALKER e SARAVIA, 2004) principalmente tripanotona (CUNNINGHAM e FAIRLAMB, 1995; WYLLIE et al., 2004). A superexpressão de AQP1 torna os parasitas hipersensíveis ao Sb^{III} , enquanto níveis reduzidos de expressão de AQP1 (CARTER et al., 2003) e a deleção do gene (OUELLETTE et al., 2004) se relacionam com a resistência. A superexpressão de transportadores ABC (MRPA, PRP1, ABCI4 e ABCG2) influencia no efluxo da droga como conjugados de

Sb-tiol e pode desempenhar um papel na resistência (SERENO et al., 2001). Dzamitika e colaboradores (2006) avaliaram amostras de AM com diferentes teores de Sb^{III} residual *in vitro* e *in vivo* e concluíram que o Sb^{III} residual seria responsável pela toxicidade da droga para as células de mamíferos, mas não para parasitos de *Leishmania*, e que MRP1 medeia resistência a Sb^{III} e não a Sb^V.

4. Planejamentos de experimentos (DOE)

Quando se deseja otimizar um processo com variáveis experimentais (também chamadas de fatores) e respostas definidas, os experimentos podem ser planejados e executados de forma a obter um máximo de informações a partir de um mínimo de experimentos (NETO et al., 2003). Para isso, é comum entender primeiramente o efeito das variáveis experimentais na resposta, empregando um planejamento de triagem. Em seguida, o sistema pode ser otimizado, isto é, a resposta é maximizada ou minimizada utilizando a metodologia de superfície de resposta (RSM) (MASSART et al., 1998).

4.1. Experimentos de triagem

Na construção do experimento de triagem deve-se recorrer à literatura e ao conhecimento de pessoas com experiência no processo em questão, para que a escolha correta das variáveis e de seus níveis possa levar a resultados satisfatórios (NETO et al., 2010). Quando as variáveis a serem investigadas são selecionadas, também é decidido quais variáveis não devem ser investigadas. Essas variáveis devem ser fixadas nos experimentos seguintes para garantir que elas não influenciem na alteração da resposta desejada.

A triagem pode ser feita com o uso de planejamentos fatoriais de dois níveis, que podem ser completos ou fracionários. Normalmente, os níveis dos fatores quantitativos são nomeados pelos sinais – (menos), para o nível mais baixo, e + (mais) para o nível mais alto (TEÓFILO e FERREIRA, 2006). Para fatores qualitativos fica a critério do experimentalista nomear os seus níveis.

Os sinais para os efeitos de interação de 2^a ordem e de ordens superiores, realizando-se todas as combinações possíveis, são obtidos pelo produto dos sinais originais das variáveis envolvidas. Desta maneira, é possível construir as colunas de

sinais para todas as interações e, assim, elaborar a matriz de coeficientes de contraste.

Para um planejamento fatorial com n ensaios e y_i observações individuais (quando houver replicatas, considere a resposta média \bar{y}_i), os efeitos para cada coluna da matriz de coeficientes de contraste são dados pelas seguintes equações:

$$ef_{m\u00e9dio} = \frac{\sum_{i=1}^n y_i}{n} \quad (2-1) \quad \text{e} \quad ef = \frac{\sum_{i=1}^{n/2} y_{i(+)} - \sum_{i=1}^{n/2} y_{i(-)}}{n/2} \quad (2-2)$$

A Equação 2-1 descreve o efeito para a média de todas as observações, enquanto a Equação 2-2 descreve o cálculo do efeito para as variáveis e interações.

Para determinar os intervalos de confiança, cada nível deve ser realizado em replicatas independentes para obter o erro experimental característico, ou erro padrão. Assim, podemos construir intervalos de confiança para os valores dos efeitos usando a distribuição de Student.

A avaliação de significância para os efeitos pode ser realizada empregando o teste t (distribuição de Student), através do valor p . Se o valor do teste estatístico calculado (razão entre o efeito e seu erro) apresentar um grande desvio da distribuição de Student, ele provavelmente descreve algo mais que o resíduo experimental. Desta maneira, será significativo dentro de um intervalo de confiança e assim, $|t_{calc}| \geq t_\alpha$ ou $p \leq \alpha$, para o número de graus de liberdade em questão.

Nestes estudos, os efeitos de interação de ordem linear ou de segunda ordem são comuns. Em um planejamento fatorial completo as influências de todas as variáveis experimentais e efeitos de interação na resposta são investigados.

Se considerarmos que os efeitos de interação de ordem 4, ou superior, são quase sempre não significativos, com um número menor de experimentos, é possível obter informações dos efeitos mais importantes. Os planejamentos que apresentam estas características são conhecidos como planejamentos fatoriais fracionários. Certamente há perda de informações quando se realizam os planejamentos fatoriais fracionários, mas, na maior parte dos casos, obtém-se às mesmas conclusões de um planejamento fatorial completo.

Um conceito importante em planejamentos fatoriais fracionários é a resolução do planejamento, que define a ordem em que se negligenciam os efeitos. Em um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} de resolução IV, por exemplo, seus contrastes não confundem os efeitos principais com interações de duas variáveis, e sim com interações de três variáveis, que em princípio devem ser menos significativos, mas interações de duas variáveis, por sua vez, confundem-se entre si.

4.2. Modelos empíricos

O resultado de um experimento pode ser descrito como uma função polinomial com base nas variáveis experimentais e respostas dentro de um domínio experimental limitado. A ordem deste polinômio é limitada pelo tipo de planejamento usado.

Planejamentos fatoriais de dois níveis, completos ou fracionários, proporcionam uma visão limitada do modelo polinomial que contém apenas termos lineares e permite estimar apenas efeitos principais e interações. No entanto, os planejamentos usados para o ajuste de modelos quadráticos permitem uma melhor descrição do comportamento dos dados.

Pode-se optar por incluir um nível zero, chamado de ponto central (PC), sendo o valor médio dos níveis de todas as variáveis. Assim, três níveis de cada variável são considerados, e não apenas dois. Além disso, uma boa estimativa dos erros pode ser feita realizando-se repetições autênticas apenas no PC (pelo menos duas). A inclusão de um 3º nível minimiza o risco da falta de relações não-lineares entre os intervalos e permite estimar um modelo razoável para explicar o comportamento dos dados e verificar se há falta de ajuste.

Um modelo com maior confiabilidade pode ser estimado com a inclusão de mais níveis no planejamento experimental. Os planejamentos experimentais mais usados para o ajuste de funções quadráticas são: Composto Central, Doehlert e Box-Behnken.

4.3. Metodologia de superfície de resposta (RSM)

Após a realização dos experimentos de triagem, os fatores significativos são selecionados e uma metodologia de RSM pode ser executada para otimização do

experimento. A RSM baseia-se na construção de modelos matemáticos empíricos que geralmente empregam funções polinomiais lineares ou quadráticas para descrever o sistema estudado e, conseqüentemente, dão condições de explorar (modelar e deslocar) o sistema até sua otimização. (TEÓFILO e FERREIRA, 2006).

Os planejamentos composto central (CCD), possivelmente são as classes de planejamentos mais utilizadas para ajustar modelos quadráticos através da RSM.

Algumas vantagens, como rotabilidade e blocagem ortogonal, são obtidas devido à presença das seguintes partes no planejamento (MYERS et al., 2016):

- i. um planejamento fatorial completo de dois níveis, podendo ser usado ainda, um planejamento fatorial fracionário de dois níveis;
- ii. experimentos no ponto central;
- iii. experimentos nos pontos axiais em os valores codificados das variáveis experimentais são iguais a $\pm \alpha$, sendo $\alpha = \sqrt[4]{2^k}$. Estes pontos são situados nos eixos do sistema de coordenadas com distância $\pm \alpha$ da origem e formam a parte estrela do planejamento.

Para construção de um planejamento CCD é necessário definir o número de variáveis a serem estudadas (k), qual planejamento fatorial será empregado (completo 2^k ou fracionário 2^{k-b}) e quantos experimentos serão realizados no ponto central ($2k$). O número de experimentos a ser realizado é dado por 2^k+2k+1 . Observe que neste tipo de planejamento, os níveis necessitam ser decodificados para os valores experimentais dos níveis das variáveis a serem estudadas e para isso utiliza-se a Equação 2-3:

$$x_i = \frac{z_i - \bar{z}}{\Delta z / 2} \quad (2-3)$$

sendo que x_i é o valor codificado do planejamento CCD, z_i o valor experimental do nível, \bar{z} o valor médio entre os níveis mais (+) e menos (-), que é exatamente o valor do nível zero (0) e Δz é a diferença entre os níveis mais (+) e menos (-) (TEÓFILO e FERREIRA, 2006).

4.4. Validação do modelo

O modelo obtido pode não ser exatamente aquele que descreve a região estudada do sistema e, neste caso, não pode ser usado para fazer estimativas para deslocamento e muito menos para extrair conclusões sobre a região ótima. A maneira mais confiável de se avaliar a qualidade do ajuste do modelo é empregando a análise de variância (ANOVA) (CHRISTENSEN, 1996). Na ANOVA a variação total da resposta é definida como a soma quadrática da variação total (SQ_{total}), e pode ser calculada pela adição de dois componentes: a soma quadrática da regressão (Equação 2-4) e a soma quadrática dos resíduos (Equação 2-5).

$$SQ_{regr} = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{r_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2 \quad (2-4) \quad \text{e} \quad SQ_{res} = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{r_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2 \quad (2-5)$$

Da Equação 2-4, m é o número total de níveis do planejamento; \hat{y}_i é o valor estimado pelo modelo para o nível i e \bar{y} é o valor médio das replicatas (r). No entanto, como há somente replicatas no PC, a média das replicatas nos outros níveis é o próprio valor observado do ensaio naquele nível. A Equação 2-5 indica que o quadrado da diferença entre o valor de cada observação (y_i) e o valor estimado (\hat{y}_i) e, inclusive das replicatas (y_{ij}) em cada nível (m), fornece a soma quadrática residual de todos os níveis. Quando algum modelo é ajustado aos dados, SQ_{res} pode ser calculado pela adição da soma quadrática do erro puro (Equação 2-6) com a soma quadrática da falta de ajuste (Equação 2-7).

$$SQ_{ep} = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{r_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2 \quad (2-6) \quad \text{e} \quad SQ_{faj} = \sum_{i=1}^m (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2 \quad (2-7)$$

A divisão da soma quadrática de cada fonte de variação pelo seu respectivo número de grau de liberdade fornece a média quadrática (MQ), sendo que o número de graus de liberdade para SQ_{total} , SQ_{regr} , SQ_{res} , SQ_{ep} e SQ_{faj} são $n - 1$, $p - 1$, $n - p$, $n - m$ e $m - p$, respectivamente (NETO et al., 2003; MASSART et al, 1998), em que n

é o número total de observações (ensaios), p é o número de variáveis experimentais (coeficientes) do modelo e m é o número de níveis do planejamento.

A razão entre MQ_{reg} e MQ_{res} , que nada mais é do que a razão entre duas variâncias, pode ser usada para comparar tais fontes de variação através do teste F (*distribuição de Fisher*), levando em consideração seus respectivos números de graus de liberdade. O mesmo pode ser feito para a razão entre MQ_{faj} e MQ_{ep} . Assim, podemos avaliar a significância da regressão e da falta de ajuste do modelo.

Outro parâmetro para observar se toda variação em torno da média foi explicada pela regressão é o valor do coeficiente de determinação R^2 (Equação 8). Como o erro puro não explica nada do modelo, então o valor máximo possível de R^2 pode ser calculado pela Equação 2-9. Quanto mais próximo de 1 melhor estará o ajuste do modelo às respostas observadas.

$$R^2 = \frac{SQ_{regr}}{SQ_{total}} \quad (2-8) \quad \text{e} \quad R_{máx}^2 = \frac{SQ_{total} - SQ_{ep}}{SQ_{total}} \quad (2-9)$$

Uma boa prática é examinar a distribuição dos resíduos, pois ajuda a verificar se não há nada de errado com o modelo. Neste caso, pode-se fazer um gráfico dos valores estimados pelo modelo com os valores da diferença entre os valores observados experimentalmente e seus respectivos valores estimados, isto é, (\hat{Y}_i) versus $(y_i - \hat{Y}_i)$ (TEÓFILO e FERREIRA, 2006). Se os resíduos não estiverem aleatoriamente distribuídos, pode-se desconfiar do modelo e investir em outros recursos para sua melhoria.

5. Espectrometria de absorção atômica por geração de hidretos (HG-AAS)

A passagem de radiação policromática ultravioleta ou visível através de um meio constituído por partículas monoatômicas, como o antimônio no estado gasoso não excitado, resulta da absorção em poucas frequências muito bem definidas (VOGEL, 2002). Este fenômeno é denominado absorção atômica. O uso desse fenômeno visando a detecção e quantificação dos analitos é chamado de espectrometria de absorção atômica (AAS). A simplicidade relativa desses espectros

é explicada pelo pequeno número de estados energéticos possíveis, por exemplo, vapor de antimônio exibe 4 picos de absorção bem definidos na região do espectro ultravioleta (UV) (206,8; 212,7; 217,6 e 231,2 nm) (VOGEL, 2002).

O sucesso da espectrometria atômica depende, frequentemente, do procedimento de introdução da amostra, sendo que o modo mais comum se baseia na formação de um aerossol líquido, por meio de nebulizadores pneumáticos, que transformam menos de 10% da solução introduzida em aerossol útil. Além disso, dificuldades com esses nebulizadores surgem quando são usadas soluções muito viscosas, com alto teor salino, ou quando se dispõe somente de micro-volumes de amostra. Uma alternativa que se apresenta é a reação da espécie de interesse para formar um hidreto volátil, e seu posterior transporte para a célula de atomização. Este processo é conhecido como geração de hidretos (HG).

Entre as principais vantagens e características da técnica de HG estão (TAKASE et al., 2002): (i) como, geralmente, apenas o analito forma a espécie volátil, este passa a ser o único componente da amostra a ser transferido para a célula de atomização, evitando possíveis interferências no sinal analítico; (ii) o transporte do vapor de hidretos formado pode carregar 100% do analito presente na solução introduzida, dependendo do rendimento da reação, da eficiência da purga e do transporte ao atomizador; (iii) apresenta melhor sensibilidade, efeito da maior eficiência de transporte e do confinamento do vapor atômico no volume definido pela célula de quartzo que aumenta a densidade atômica no caminho ótico, assim como seu tempo de residência e a eficiência de atomização que pode alcançar 100%.

Por outro lado, algumas limitações podem incluir (TAKASE et al., 2002): (i) interferências causadas por concomitantes presentes na solução, que podem impedir a reação do analito para formar hidretos, ou a separação eficiente do hidreto formado da solução; (ii) a cinética da HG pode ser afetada por fatores físicos associados à solução (densidade, viscosidade, volume, etc).

O processo de determinação espectrométrica por geração química de hidreto pode ser dividido em três partes: 1) reação e consequente liberação do hidreto volátil; 2) transporte do hidreto volátil para o atomizador; e 3) atomização/quantificação do analito.

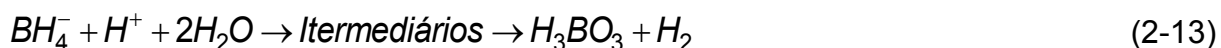
Segundo Dedina e Tsalev (1995), o processo de geração de hidretos pode ser dividido em duas etapas. A primeira etapa da reação consiste em liberar hidrogênio

atômico, ou “hidrogênio nascente”, e a segunda etapa ocorre a reação do hidrogênio com o analito para formar o hidreto. No início da técnica, utilizava-se um sistema metal/ácido, quase sempre Zn/HCl, conhecido como reação de Marsh. Atualmente a reação BH_4^- /ácido é a mais comumente utilizada. A primeira tentativa de descrever o mecanismo de geração do hidreto foi feita por Robbins e Caruso (1979), que se inicia com a formação do hidrogênio atômico através da hidrólise ácida do agente redutor (Equações 2-10 e 2-11). O processo de formação do hidreto ocorre a partir da evolução de hidrogênio atômico, ou “hidrogênio nascente”, que é formado (Equação 2-12).



onde m e n são as valências do analito A na solução da amostra e no hidreto, respectivamente.

Outros mecanismos foram propostos por autores que discordam com a hipótese de formação do hidreto a partir do hidrogênio nascente (PERGANTIS et al., 1997; D'ULIVO, 2004). Uma proposta para o mecanismo de formação do hidreto bastante aceita, ocorre através da ação do hidrogênio ligado diretamente ao boro na molécula de BH_4^- ou em possíveis intermediários que, em soluções ácidas ou neutras, seriam: H_2-BH_3 , H_2O-BH_3 , $(H_2O)_2-BH_2^+$, H_2O-BH_2-OH e $H_2O-BH-OH_2$ (D'ULIVO, 2004). De acordo com essa hipótese, o processo pode ser escrito da seguinte maneira:

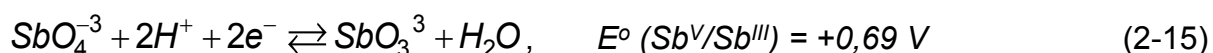


A concentração de $NaBH_4$ na solução tem variado de 0,25% (m/v) a 10% (m/v) (DEDINA e TSALEV, 1995), dependendo do tipo de amostra, do tipo de atomizador, do separador gás-líquido e do tipo de sistema empregado. Geralmente concentrações

mais elevadas de NaBH₄ são utilizadas em sistema em batelada. Em concentrações muito elevadas do agente redutor, apesar de aumentar o sinal do analito, torna a reação turbulenta, devido à grande produção de H₂, resultando em uma pobre reprodutibilidade da análise e altos valores do branco analítico (DEDINA e TSALEV, 1995).

A decomposição de tetraidroborato entre pH 3,8 e 14 é uma reação de segunda ordem com uma taxa constante de 1,22 x 10⁸ mol L⁻¹ min⁻¹ (30 °C), e em pH ≤ 1, a decomposição é completada dentro de alguns microssegundos (AGTERDENBOS et al., 1986a; NARSITO et al., 1990). Para evitar a rápida decomposição, a solução de tetraborato deve ser estabilizada com hidróxido de potássio ou de sódio. Por outro lado, a concentração deve ser adequada para não causar supressão do sinal analítico (ANDREAE e FROELICH, 1984). A concentração de KOH ou NaOH utilizada para estabilizar a solução tem variado entre 0,1 e 2,0% (m/v) (STURGEON e MESTER, 2002), dependendo da concentração de NaBH₄ utilizada. Recomenda-se que a solução redutora seja preparada no dia da utilização, contudo, Narsito et al. (1990) não encontrou qualquer alteração na concentração de tetraidroborato depois de 4 dias, e quanto maior o pH mais estável é a solução.

O NaBH₄ é capaz de reduzir o Sb^V em meios ácidos, mas a velocidade da reação de redução é mais lenta do que a de formação do hidreto. Já o Sb^{III} pode ser reduzido rápido e facilmente em meio fortemente ácido para quase neutro (DEDINA e TSALEV, 1995). Por isso, na determinação de Sb total o Sb^V deve ser convertido para Sb^{III} como descrito pela seguinte reação química:



Alegria e colaboradores (1990) concluíram que o Sb^V não pode ser completamente reduzido a Sb^{III} sem o uso de agentes redutores. Deve-se utilizar pré-redutores com potencial padrão de redução menor do que E^o (Sb^V/Sb^{III}), sendo os mais utilizados o iodeto de potássio, o brometo de potássio, a L-cisteína e a tiuréia (FERREIRA et al., 2014). Iodeto é o pré-redutor mais comumente usado para antimônio (DEDINA e TSALEV, 1995), e suas reações apresentam potencial de redução padrão adequado para redução do Sb^V, como pode ser visto abaixo:



Se o KI for escolhido como agente redutor, recomenda-se a utilização de ácido ascórbico de forma a evitar que o íon instável de tri-iodeto se decomponha com o tempo para iodeto e iodo, e que o iodo deposite nas paredes do recipiente e absorva o analito (RONDÓN et al., 1995). Concentrações mais elevadas de HCl ($\geq 1 \text{ mol L}^{-1}$) podem favorecer a pré-redução de Sb^V pelo KI, além de ser favorável na redução de interferências causadas pela fase líquida por metais de transição (DEDINA e TSALEV, 1995).

A determinação seletiva de Sb^{III} pode ser feita explorando-se a pH-dependência do $NaBH_4$ (ANDREAE et al., 1981; CALLE-GUNTIÑAS, et al., 1992). Outra opção é preparar a amostra na presença de certos ácidos orgânicos com capacidade de formar complexos com Sb^V e, assim, prevenir a formação de estibina. Os α -hidroxiácidos, classe de compostos químicos com um ácido carboxílico substituído por um grupo hidroxila no carbono adjacente, são frequentemente utilizados para esta finalidade. Yamoto et al. (1981) relataram pela primeira vez que a presença de ácido cítrico (40%) ou ácido tartárico (30%) suprime o sinal de Sb^V na análise por HG-AAS. Ácido oxálico foi utilizado para suprimir a formação estibina a partir do Sb^V na determinação seletiva de Sb^{III} (FUENTES et al., 2003). Guy et al. (1998) demonstraram indiretamente, com o uso de espectroscopia de RMN, ESI-MS e HPLC-ICP OES, que a supressão pelo ácido cítrico ocorre devido à formação de um complexo Sb^V -citrato. Potin-Gautier et al. (2005) mostraram, com o uso de HPLC-HG-AFS, que o complexo Sb^V -citrato não fornece nenhum sinal detectável. Hansen e Pergantis (2007), demonstraram por meio de experimentos de adição (*spiking*) de Sb^V , que amostras de iogurte e suco de laranja com alto teor de α -hidroxiácidos (ou seja, ácidos láctico e cítrico) têm um efeito supressor na formação de hidretos. Ácido cítrico é o α -hidroxiácido mais encontrado na literatura sendo utilizado para suprimir a formação de estibina a partir do Sb^V (YAMOTO et al., 1981; MOHAMMAD et al., 1990; CALLE-GUNTIÑAS et al., 1991; URICH et al., 2000; ZHENG et al., 2001; FLORES et al., 2002; FLORES et al., 2003; CABRAL et al., 2008). Analisando-se Sb^{III} em uma etapa e Sb total em outra (utilizando agentes redutores), a determinação da concentração de Sb^V é dada pela diferença

entre as concentrações encontradas nas duas etapas. Na análise seletiva de Sb^{III} deve-se observar a estabilidade dos padrões, já que soluções padrão de Sb^{III} em baixas concentrações, preparadas por diluição com água, são facilmente oxidados a Sb^{V} , dentro de algumas horas. Ariza e colaboradores (2000) demonstraram a estabilidade do Sb^{III} em soluções aquosas com ácido cítrico $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, armazenadas em garrafas de polietileno durante 12 meses a $40 \text{ }^\circ\text{C}$.

Os hidretos de analito gerados na reação podem ser diretamente transportados para o atomizador por três maneiras diferentes: fluxo contínuo (FC), injeção em fluxo (IF) e batelada.

Um gerador de hidretos por batelada é um recipiente feito de vidro ou plástico que serve como reator e também como separador de gás-líquido. No transporte por FC (Figura 2-3), um fluxo constante da solução da amostra é misturado com fluxos constantes da solução de tetraidroborato, da solução ácida e do gás de purga (geralmente argônio). O arranjo experimental do transporte por IF é similar ao FC com a diferença de que ao invés de utilizar um canal com fluxo constante da amostra, uma alíquota de volume conhecido é injetada no canal do ácido.

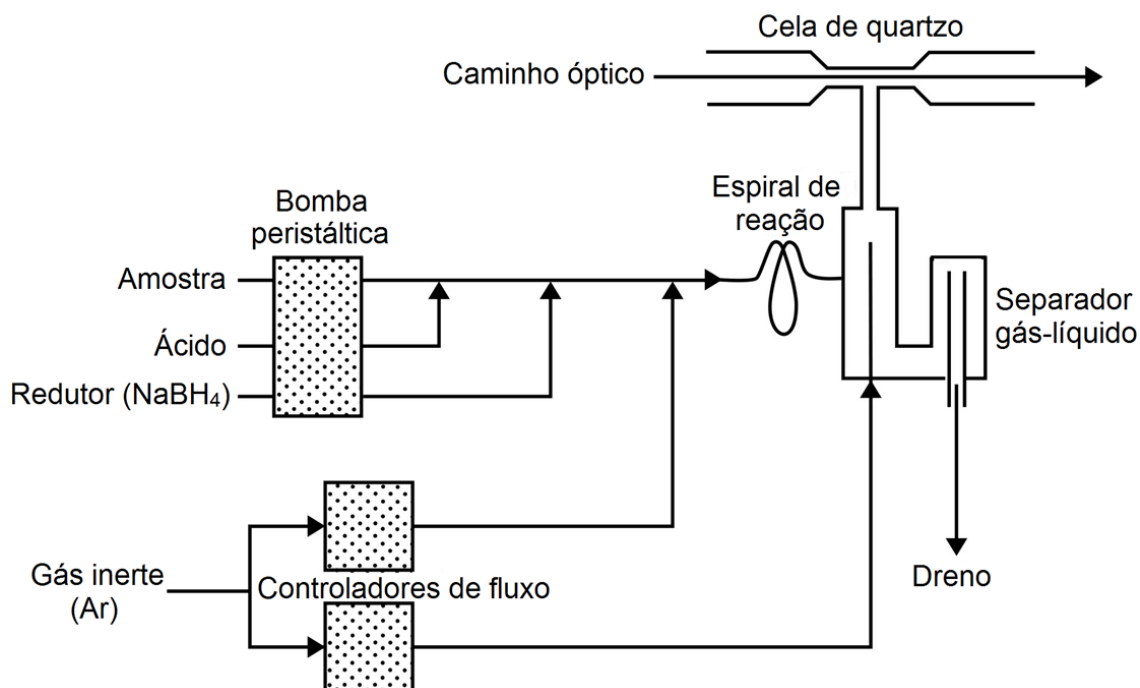


Figura 2-3: Esquema de funcionamento do acessório de transporte para geração de hidretos por fluxo contínuo, modelo VGA 77, da Agilent Technologies (EUA).

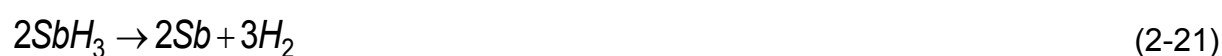
Após a reação, líquido e gás são separados, o hidreto gasoso com o hidrogênio são transportados pelo fluxo de gás de purga para o atomizador, e o efluente líquido é drenado.

Um tipo de atomizador amplamente utilizado baseia-se em um tubo de quartzo aquecido externamente por uma chama ar-acetileno. O desenho consiste de um tubo T, as duas saídas do tubo são abertas e ficam alinhadas no caminho ótico, com o braço central servindo de passagem ao hidreto e ao gás carreador para o interior da parte aquecida do tubo. Recomenda-se uma concentração mínima de oxigênio no interior do atomizador para melhorar a sensibilidade.

O mecanismo de atomização em tubos de quartzo via decomposição térmica não resiste a uma análise termodinâmica, dadas suas temperaturas relativamente baixas (< 1000 °C) e os valores do ΔG de formação da estibina. De acordo com cálculos termodinâmicos, as únicas espécies gasosas que podem ser esperadas nesta temperatura são moléculas dímeras e não átomos (DEDINA e TSALEV, 1995). Assim, acredita-se que a atomização dos hidretos gasosos no tubo de quartzo aquecido é catalisada por átomos livres de H, O e OH (BAX et al., 1986; NARSITO e AGTERDENBOS, 1987). Embora o mecanismo de formação destes radicais não seja bem entendido, traços de oxigênio parecem desempenhar um papel importante, de acordo com as seguintes reações (AGTERDENBOS et al., 1986b):



O mecanismo de atomização da estibina catalisado por radicais H, O e OH, pode ser descrito de forma semelhante ao mecanismo proposto para a atomização da arsina (AsH_3), de acordo com as reações (BAX et al., 1986):



Como já mencionado, HG tende a ser um método de introdução de amostras que minimiza interferência por implicar na separação do analito da matriz. Entretanto, as interferências são encontradas e estão relacionadas às diferentes fases do processo. As mais importantes são interferências de fase condensada, relacionadas à reação de geração e liberação do vapor da solução, e interferências na fase gasosa, associadas ao transporte do vapor e ao processo de atomização/leitura. Smith (1975) publicou um extenso estudo sobre íons interferentes na HG, após estudar a interferência causada por 48 elementos na determinação de As, Sb, Se, Bi, Sn, Te e Ge. Ele sugeriu que a interferência se dá pela redução preferencial do íon metálico interferente, presente na solução, para a forma elementar coloidal, causando a coprecipitação do analito ou a adsorção do hidreto volátil formado e sua decomposição catalítica. Metais alcalinos e alcalinos terrosos não interferem, mas íons que podem ser facilmente reduzidos pelo NaBH_4 como Ni^{II} , Cu^{II} e Pb^{II} podem interferir no sinal da maioria dos hidretos. As interferências na fase gasosa podem ser divididas em dois grupos: 1) interferências que ocorrem ao longo do transporte do hidreto para o atomizador, causando prejuízo na cinética e/ou na eficiência de transporte; 2) interferências que acontecem no processo (mecanismo) de atomização, principalmente devido a interferências mútuas dos elementos formadores de hidretos. Essas interferências mútuas podem diminuir a concentração dos radicais no interior do atomizador, ou acelerar o decaimento dos átomos livres do analito no atomizador, via reações analito-interferente, que podem resultar na formação de moléculas diatômicas estáveis, tais como AsSb (VERLINDEN e DULSTRA, 1979; DRITTRICH e MANDRY, 1986a; DRITTRICH e MANDRY, 1986b).

Sabe-se que o tipo e a concentração dos reagentes usados na HG (ácido, redutor e pré-redutor) têm bastante influência na eficiência e na estabilidade da reação, e conseqüentemente nas figuras de mérito do método analítico. Entretanto, é difícil obter uma descrição clara de como estes fatores influenciam na sensibilidade das medidas, devido à variedade de configurações de sistemas de HG. Assim, para cada situação uma otimização deve ser considerada.

6. Validação analítica

A validação analítica é a avaliação sistemática de um método por meio de ensaios experimentais de modo a confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para seu uso pretendido são atendidos. Deve demonstrar que o método analítico produz resultados confiáveis e é adequado à finalidade a que se destina, de forma documentada e mediante critérios objetivos.

O principal guia para validação de métodos de ensaios químicos, em geral, utilizado no Brasil é o DOQ-CGCRE-008 (INMETRO, 2020), publicado pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO).

No caso específico aplicável a métodos analíticos empregados em insumos farmacêuticos e medicamentos, uma nova resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária foi publicada (BRASIL, 2017).

Os parâmetros mínimos de desempenho analítico requeridos como evidência objetiva da validação são: seletividade, linearidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), tendência / recuperação, e precisão (INMETRO, 2020).

6.1. Curva analítica e linearidade

A curva analítica, ou curva analítica, é uma abordagem estatístico-matemática frequentemente usada em métodos instrumentais. Consiste em ajustar uma função linear aos sinais analíticos obtidos pela medida de uma série de soluções padrão de concentrações conhecidas de um dado analito, abrangendo a faixa de concentração de interesse no trabalho. São necessários vários níveis de concentração uniformemente distribuídos na faixa de trabalho pretendida (no mínimo cinco), para construir a curva analítica (INMETRO, 2020; BRASIL, 2017).

A linearidade de um método deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra (INMETRO, 2020; BRASIL, 2017). As técnicas de se adequar a reta aos dados e verificar o quanto a reta descreve os dados chamam-se regressão e correlação, respectivamente (CHASIN et al, 1998).

A equação matemática que descreve a proporcionalidade entre o sinal analítico (variável dependente y) e sua concentração (variável independente x), é a equação

da curva analítica, ou curva analítica (Equação 2-29), que normalmente é ajustada pelo método dos quadrados mínimos (MQM) (SOUZA, 2007; RIBEIRO et al., 2008, INMETRO, 2020).

$$y = ax + b + e_i \quad (2-23)$$

em que a e b são os parâmetros estimados da equação (coeficiente angular e linear, respectivamente) e e_i o resíduo da regressão.

No estudo da linearidade são recomendados testes de premissas para uso apropriado do MQM, como normalidade, homoscedasticidade, independência, significância da regressão e desvio da linearidade (SOUZA e JUNQUEIRA, 2005; SOUZA 2007).

Antes de fazer a regressão linear, deve ser verificada a ausência de valores anômalos, *i.e.*, *outliers* para cada nível de concentração e a homocedasticidade (igualdade das variâncias) dos dados. A verificação de *outliers* pode ser feita com base nos resíduos padronizados Jackknife, que avalia como valores extremos os resíduos padronizados J_{ei} (Equação 2-30) fora do intervalo $\pm t_{(1-\alpha/2; n-2)} \cdot S_{res}$.

$$J_{ei} = r_i \sqrt{\frac{n-p-1}{n-p-r_i^2}} \quad (2-24)$$

onde, p é o número de parâmetros do modelo, $r_i = \frac{e_i}{s_{ei}}$ é o resíduo padronizado,

$s_{ei} = s_{res} \sqrt{1-h_i}$ é o erro padrão do resíduo, $h_i = \frac{1}{n} + \frac{(x_i - \bar{x})^2}{S_{xx}}$ é o ponto de alavanca,

também conhecido como *leverage*.

Valores de J_{ei} maiores que o valor de t crítico devem ser removidos, exceto quando a porcentagem de dados excluídos for superior a 22,2 % do número original de dados, ou quando o ponto for a terceira e última replicata de um nível de concentração estudado. Para cada exclusão o MQM é novamente aplicado aos dados (SOUZA, 2007).

A normalidade dos resíduos é verificada pelo teste de Ryan-Joiner, no qual os resíduos são ordenados e plotados contra os pontos percentuais correspondentes da distribuição normal padrão (quantis normais). Um gráfico de probabilidade normal,

também conhecido como gráfico quantil-quantil normal (QQ), é produzido plotando e_i contra c_i . Sendo que e_i são resíduos ordenados para uma amostra de tamanho n , e c_i é o ponto percentual esperado da função de distribuição normal padrão (SOUZA, 2007). Os quantis normais são obtidos pela Equação 2-31:

$$c_i = \phi^{-1} \left\{ \frac{(i - 3/8)}{(n + 1/4)} \right\}, \quad i = 1, \dots, n \quad (2-25)$$

onde ϕ^{-1} é o inverso da função de distribuição normal padrão.

Se os dados seguirem uma distribuição normal eles formam uma linha aproximadamente reta e o coeficiente de correlação (R) será próximo de 1. Se o valor de R ficar abaixo de um valor crítico apropriado, a dúvida será lançada sobre a hipótese nula de normalidade. Os coeficientes de correlação crítica (R_{crit}) aproximados para o gráfico de probabilidade para diferentes níveis de significância α são dados pelas Equações 2-32 e 2-33:

$$R_{crit(\alpha=0,10)} \approx 1,007 - \frac{0,1371}{\sqrt{n}} - \frac{0,3682}{n} + \frac{0,7780}{n^2} \quad (2-26)$$

$$R_{crit(\alpha=0,05)} \approx 1,0063 - \frac{0,1288}{\sqrt{n}} - \frac{0,6118}{n} + \frac{1,3505}{n^2} \quad (2-27)$$

A homocedasticidade, pode ser avaliada pelo teste de Levene com modificações feitas por Brown e Forsythe (SOUZA e JUNQUEIRA, 2005; SOUZA 2007). Deve-se calcular o t de Levene (t_L), e caso o valor seja menor do que t crítico, os dados podem ser considerados homocedásticos e a regressão pode ser feita pelo MQM. Caso seja heterocedástico, deve-se calcular a equação da regressão linear simples usando o método dos quadrados mínimos ponderados (MQMP).

Os resíduos são divididos em dois grupos n_1 e n_2 de concentrações x_i . Deve-se equilibrar a distribuição dos pontos entre os grupos em função dos níveis de concentração x_i estudados, sem separar as replicatas de um mesmo nível em grupos diferentes. As medianas dos resíduos de cada grupo \hat{e}_1 e \hat{e}_2 são calculadas. Os valores absolutos das diferenças entre os resíduos e as medianas dos respectivos

grupos $d_{1j} = |\hat{e}_1 - e_{1j}|$ e $d_{2j} = |\hat{e}_2 - e_{2j}|$ são obtidos. A diferença das médias \bar{d}_k e a soma dos quadrados dos desvios SQD_k dos valores d_{kj} de cada grupo são calculados. A estatística t_L é obtida pela Equação 2-34:

$$t_L = \frac{\bar{d}_1 - \bar{d}_2}{s_p^2 \sqrt{1/n_1 + 1/n_2}} \quad (2-28)$$

sendo que, $\bar{d}_k = \sum |\hat{e}_k - e_{kj}|/n_k$ é a média dos módulos das diferenças entre o j-ésimo resíduo e a mediana de cada grupo $k=1$ e $k=2$, n_k é o número de observações de cada grupo, \hat{e}_k é a mediana de cada grupo, $s_p^2 = (SQD_1 + SQD_2)/(n_1 + n_2 - 1)$ é a variância combinada, $SQD_k = \sum_{j=1}^{n_k} (\hat{e}_k - e_{kj})^2$ é a soma dos quadrados dos desvios de cada j-ésimo resíduo e a mediana de seu k-ésimo grupo para cada grupo.

Se a estatística t_L calculada não exceder o valor crítico $t_{(1-\alpha/2; n_1 + n_2 - 2)}$, há indicação de homoscedasticidade.

Uma correlação serial dos resíduos, chamada de autocorrelação, afeta a variância das estimativas de mínimos quadrados e pode levar a uma subestimação de σ^2 e dos intervalos de confiança (SOUZA, 2007). Assumindo que os resíduos e_i são variáveis independentes, todas as correlações seriais são $\rho_s = 0$. A estatística Durbin–Watson d é utilizada para verificar a independência dos resíduos, e é definida pela Equação 2-35:

$$d = \frac{\sum_{i=1}^n (e_i - e_{i-1})^2}{\sum_{i=1}^n e_i^2} \quad (2-29)$$

Para cada conjunto de dados, há dois limites para d (d_L é o limite inferior, d_U é o limite superior). Se d estiver dentro desses limites, o teste é inconclusivo, mas se $d < d_L$ ou $d > 4d_U$ existe autocorrelação. No entanto, se $d_U < d < 4d_U$ não há autocorrelação e há independência dos resíduos. Os valores limites de d podem ser estimados para diferentes níveis de significância α , conforme as equações abaixo (SOUZA, 2007):

$$d_{L(\alpha=0,05)} \approx 1,9693 - \frac{2,8607}{\sqrt{n}} - \frac{3,4148}{n} + \frac{16,6400}{n^2} \quad (2-30)$$

$$d_{U(\alpha=0,05)} \approx 1,9832 - \frac{3,0547}{\sqrt{n}} - \frac{1,3862}{n} + \frac{16,3662}{n^2} \quad (2-31)$$

$$d_{L(\alpha=0,025)} \approx 1,9845 - \frac{3,6875}{\sqrt{n}} - \frac{2,6136}{n} + \frac{20,6393}{n^2} \quad (2-32)$$

$$d_{U(\alpha=0,025)} \approx 1,9480 - \frac{3,1647}{\sqrt{n}} - \frac{0,6472}{n} + \frac{31,5772}{n^2} \quad (2-33)$$

A independência pode ser demonstrada graficamente plotando cada valor e_i contra o valor e_{i-1} , sendo indicado por um padrão aleatório dos resíduos da regressão.

Para algumas técnicas analíticas, o modelo linear não pode ser aplicado e os modelos não lineares ou polinomiais são mais bem adaptados. Uma falta de ajuste significativa indica que o modelo linear parece ser inadequado. A maneira mais confiável de se avaliar a qualidade do ajuste do modelo é empregando ANOVA, conforme descrito no item 1.5. Assim, podemos avaliar a significância da regressão e da falta de ajuste do modelo empregando o teste F , através do valor p . A avaliação da linearidade também pode ser realizada pela determinação do coeficiente linear (R), ou pelo coeficiente de determinação (R^2) que deve estar acima de 0,980 (BRASIL, 2017).

6.2. Seletividade

Seletividade é o grau em que o método pode quantificar o analito na presença de outros analitos, matrizes ou de outro material potencialmente interferente (AOAC, 2002). Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo.

A seletividade pode ser testada analisando-se amostras contendo vários possíveis interferentes na presença do analito de interesse para demonstrar se a presença de interferente, em vários graus de concentração, acentua ou inibe a detecção ou quantificação do analito de interesse (INMETRO, 2020).

A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição. A magnitude desse efeito pode depender da concentração. Logo, no

estudo de seletividade é necessário verificar também a existência de efeito de matriz (INMETRO, 2020). Para realizar o estudo de efeito de matriz deve-se preparar dois grupos de amostras de teste com a concentração do analito idêntica em cada nível de concentração de interesse, um grupo com a matriz e o outro sem. Toda a faixa de estudo deve ser testada (baixa, média e alta), com no mínimo 3 replicatas por nível de concentração. Após a coleta de dados, realiza-se uma avaliação por nível de concentração de homogeneidade de variâncias e de comparação de médias, através do teste F (Snedecor) e teste t (Student), respectivamente (INMETRO, 2020).

6.3. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, e limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. É fundamental assegurar-se de que todas as etapas de processamento do método analítico sejam incluídas na determinação desses valores.

No caso de técnicas instrumentais como HG-AAS, LQ pode ser estimado com base na relação de 10 vezes o ruído da linha de base e pela sensibilidade da curva analítica (INMETRO, 2020), através da equação:

$$LQ = \frac{10 \times s_B}{b} \quad (2-34)$$

onde s_B é o desvio padrão obtido pela medição de brancos independentes, e b é a inclinação da curva analítica estimada por meio da curva analítica do analito construída na avaliação da linearidade.

O LD pode ser determinado a partir do LQ, por meio da relação: $LD = LQ / 3,3$.

6.4. Precisão e tendência

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão pode ser expressa por meio da repetibilidade que é a condição de medição num conjunto de condições. As quais incluem o mesmo procedimento de medição, os mesmos

operadores, o mesmo sistema de medição, as mesmas condições de operação e o mesmo local, durante um curto período de tempo.

A precisão pode ser expressa pelo desvio padrão relativo (DPR), expresso em %, calculado da seguinte forma:

$$DPR\% = \frac{s}{\bar{C}} \times 100 \quad (2-35)$$

onde s é o desvio padrão e \bar{C} a concentração média determinada.

A avaliação da tendência de um método pode ser realizada por meio de ensaios de recuperação. Quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos.

A determinação da tendência total com relação aos valores de referência apropriados é importante no estabelecimento da rastreabilidade aos padrões reconhecidos. A tendência pode ser expressa como recuperação analítica (valor observado/valor esperado). Deve ser corrigida ou demonstrada ser desprezível, mas em ambos os casos, a incerteza associada com a determinação da tendência permanece como um componente essencial da incerteza global.

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras com adição de quantidades conhecidas do analito, definida como:

$$Recuperação (\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad (2-36)$$

onde: C_1 = concentração determinada na amostra adicionada; C_2 = concentração determinada na amostra não adicionada; C_3 = concentração esperada.

A repetibilidade e a tendência do método devem ser verificadas por no mínimo 3 concentrações, baixa, média e alta, contemplando o intervalo linear do método, realizando-se, no mínimo, 6 determinações independentes por concentração (BRASIL, 2017; INMETRO, 2020).

A exatidão do método é avaliada numericamente por meio da tendência. É importante estabelecer critérios de aceitação para o DPR e para a recuperação, normalmente atrelados ao nível de concentração. Na Tabela 2-1 temos como exemplo os critérios sugeridos pela AOAC (2012).

Tabela 2-1: Critérios de aceitação para repetibilidade e recuperação sugeridos pela AOAC

Analito, %	Razão do analito	Unidade	DPR, %	Recuperação, %
0,0000001	10^{-8}	10 ppb	21	60 –115
0,00000001	10^{-9}	1 ppb	30	40 –120

Fonte: (AOAC, 2012).

Capítulo 3 – Desenvolvimento e Validação de Métodos Analíticos para Especiação Inorgânica de Sb em Antimoniato de Meglumina por HG-AAS

1. Introdução

Neste capítulo serão apresentados o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos para especiação inorgânica de Sb em drogas de AM usadas no tratamento da leishmaniose. A especiação de Sb inorgânico ocorre em duas etapas: (i) uma porção da amostra é usada para quantificar o Sb total usando iodeto de potássio (KI) para pré-reduzir Sb^V a Sb^{III} ; (ii) outra porção da amostra é submetida à quantificação de Sb^{III} na presença de citrato que forma um forte complexo com Sb^V , impedindo-o de formar hidretos, mas não reage com Sb^{III} . No entanto, o uso de ácido cítrico pode contribuir para o efeito de memória, exigindo uma leitura em branco a cada determinação de Sb^{III} (FLORES et al., 2002). O ácido cítrico também contribui para contaminação da parede interna da célula de quartzo T, exigindo limpeza periódica por imersão em solução de ácido nítrico/fluorídrico para manter a sensibilidade (FLORES et al., 2002; 2003).

Planejamentos experimentais foram empregados no desenvolvimento dos métodos analíticos e permitiu atingir as condições de maior intensidade dos sinais analíticos com um número reduzido de ensaios, além de fornecer informações sobre as interações entre as variáveis avaliadas. Isto foi crucial para encontrar a condição ideal de análise do método de quantificação de Sb^{III} . O método desenvolvido sugere o uso de uma concentração de ácido cítrico menor que aquela descrita na literatura, diminuindo ou eliminando os problemas relatados. Não houve perda na frequência analítica expressa como amostra/min (45 s de *delay* e 15 s de leitura em triplicata) e, mesmo em concentrações mais baixas, o ácido cítrico manteve a capacidade de suprimir os sinais de Sb^V presentes em concentrações aproximadamente 2.000 vezes maiores do que o Sb^{III} .

Os métodos otimizados e validados foram utilizados na determinação dos teores de Sb^{III} residual (quantidade de Sb^{III} em relação à Sb total) em amostras comerciais e sintetizadas de AM (Capítulo 4).

2. Materiais e métodos

2.1. Materiais, reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico. No preparo das soluções aquosas foi utilizada água ultrapura, obtida em um sistema Direct-Q 3 (Millipore, Burlington, EUA) com resistividade de 18,2 MΩ cm. Todos os materiais, vidrarias e recipientes para amostras utilizados ao longo deste trabalho foram previamente limpos em solução de ácido nítrico 10% (v/v) (Merck, Rio de Janeiro, Brasil), imersos em banho ácido por pelo menos 16 h, enxaguados com água ultrapura e secos em um ambiente livre de poeira.

Uma solução estoque de Sb^V 1000 mg L⁻¹ foi preparada diluindo 0,1091 g de KSb(OH)₆ (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) em 50,0 mL de água ultrapura contendo HCl 5% (m/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), e uma solução estoque de Sb^{III} 500 mg L⁻¹ foi preparada pela dissolução de 0,1385 g de K₂(C₄H₂O₆Sb)₂.3H₂O (Neon Comercial Ltda, São Paulo, Brasil) em 50,0 mL de água ultrapura contendo ácido cítrico 0,05 mol L⁻¹ (Neon Comercial Ltda, São Paulo, Brasil). Os padrões intermediários foram preparados diariamente diluindo alíquotas das soluções estoques em água ultrapura. As soluções de trabalho foram preparadas diariamente preparando uma mistura de HCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), KI (Êxodo Científica, Sumaré, Brasil) e ácido ascórbico (Carlo Erba Reagents, Vexin, França) para determinação de Sb total, e uma solução de ácido cítrico (Neon Comercial Ltda, São Paulo, Brasil) para a determinação de Sb^{III}. As soluções de referência para calibração instrumental do HG-AAS foram preparadas diariamente a partir de alíquotas adequadas de padrão intermediário adicionadas às soluções de trabalho respectivas. As soluções de tetrahidroborato foram preparadas diariamente pela dissolução de NaBH₄ (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, Brasil) e NaOH (Isofar Ltda, Capivari, Brasil) em água ultrapura.

2.2. Instrumentação

Reagentes e amostras foram pesados em balança analítica (Shimadzu, modelo AUW220D, Japão) com uma incerteza de ± 0,0001 g.

As determinações de Sb total e Sb^{III} foram realizadas em um espectrômetro de absorção atômica com chama (FAAS) SpectrAA-240 (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA) equipado com um gerador de hidreto de fluxo contínuo, localizado no Laboratório do LEAQUAA, no Departamento de Química da UFMG. Argônio de alta pureza foi usado como gás de purga a uma taxa de fluxo de 90 mL min⁻¹. Uma célula de tubo de quartzo T foi aquecida sob a chama e usada para atomização de Sb. Um esboço do sistema HG é mostrado na Figura 2-3. As condições instrumentais empregadas nas determinações de Sb total e de Sb^{III} por HG-AAS, utilizando 3 replicatas de leitura, estão na Tabela 3-1.

Tabela 3-1: Condições instrumentais empregadas nas determinações de Sb total e Sb^{III} por HG-AAS

λ (nm)	Resolução espectral (nm)	Corrente da Lâmpada (mA)	Tempo de integração do sinal (seg)	Tempo de <i>delay</i> (seg)	Chama–Fluxo dos gases (L min ⁻¹)	
					Oxidante (ar)	Acetileno
217,6	0,5	7,0	5,0	45,0	13,50	2,10

O processo de otimização multivariada foi realizado usando o software Statistica versão 10 (2010).

2.3. Metodologia

Na quantificação de Sb total, todas as espécies de Sb^V devem ser convertidas em Sb^{III} pela adição de uma alíquota de padrão analítico intermediário (ou amostra de AM) a uma solução de trabalho contendo HCl 1,0 mol L⁻¹ e um agente redutor. O iodeto de potássio (estabilizado com ácido ascórbico) foi o agente redutor selecionado entre L-cisteína, KBr e tioureia. Esta seleção foi realizada em um teste para avaliar a melhor resposta instrumental para uma solução de referência de Sb^V 5,0 µg L⁻¹ analisada segundo condições operacionais recomendadas pelo fabricante do equipamento. Uma solução de HCl e uma solução de NaBH₄ e NaOH foram utilizadas no canal do ácido e no canal do redutor do acessório VGA-77, respectivamente (Figura 2-3).

Na quantificação seletiva de Sb^{III} , uma alíquota de padrão analítico, ou amostra de AM, foi adicionada a uma solução de trabalho contendo ácido cítrico. O ácido cítrico forma um complexo estável com o Sb^{V} presente e não permite que o mesmo interfira no sinal do Sb^{III} . Ácido cítrico, na mesma concentração da solução de trabalho, também foi utilizado no canal do ácido, enquanto uma solução de NaBH_4 e NaOH foi utilizada no canal do redutor do acessório VGA-77 (Figura 2-3).

2.3.1. Otimização do método de quantificação de Sb total em AM por HG-AAS

Na etapa de triagem, um planejamento fatorial de dois níveis completo 2^4 com PC foi construído com base em alguns estudos da literatura (RONDÓN et al., 1995; FLORES et al., 2002) e nas condições recomendadas pelo fabricante do equipamento. Foram estudados os comportamentos simultâneos de quatro variáveis: concentração do agente pré-redutor KI; concentração do redutor NaBH_4 ; concentração de HCl utilizada no canal do ácido e tempo de contato do analito com a solução de trabalho, de acordo com a Tabela 3-2.

Tabela 3-2: Fatores e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2^4 com PC para otimização do método de determinação de Sb total por HG-AAS

Variáveis	Nível baixo (-1)	PC (0)	Nível alto (+1)
[KI], % (m/v)	1,0	5,5	10,0
[NaBH_4], % (m/v)	0,6	1,3	2,0
[HCl], mol L ⁻¹	5,0	7,5	10,0
Tempo, s	0	60	120

Após a triagem e seleção das variáveis significativas ($p = 0,05$), uma matriz CCD foi elaborada na tentativa de se encontrar a condição ótima.

Experimentos foram conduzidos em ordem aleatória. O software Statistica Versão 10 (2010) foi usado para modelar o projeto experimental.

2.3.2. Otimização do método de quantificação de Sb^{III} em AM por HG-AAS

Para avaliar a determinação seletiva de Sb^{III} e verificar a ocorrência de sinais relacionados ao Sb^V em cada ensaio dos planejamentos experimentais, foram analisadas duas soluções de trabalho, uma contendo Sb^{III} 5,0 µg L⁻¹, e a outra com uma mistura de Sb^{III} 5,0 µg L⁻¹ e Sb^V 400,0 µg L⁻¹. Os ensaios de cada planejamento foram conduzidos em ordem aleatória.

Inicialmente, para otimização do método de quantificação de Sb^{III} em AM por HG-AAS, foi feito um planejamento fatorial completo 2³ com PC para triagem das variáveis com base em alguns estudos da literatura (FLORES et al., 2002; 2003). As variáveis consideradas nesta etapa foram: concentração de ácido cítrico; concentração do redutor NaBH₄ e tempo de contato do analito com a solução de trabalho (Tabela 3-3). O agente redutor NaBH₄ foi escolhido por ser o agente redutor mais eficiente na formação de estibina. Orientando-se pela recomendação do fabricante, foram avaliadas as concentrações de 0,6% e 2,0% (m/v) como níveis inferior e superior, respectivamente. Os valores de concentração de ácido cítrico e tempo de contato da amostra com a solução de trabalho foram baseados nos trabalhos de Flores e colaboradores (2002 e 2003). Como limite inferior utilizou-se o tempo de 0 segundos, ou seja, após a adição da alíquota contendo o analito, a solução foi aspirada imediatamente pelo acessório de fluxo contínuo para análise no HG-AAS, enquanto para o limite superior foi utilizado um tempo de espera de 120 segundos após a adição da alíquota para realização da análise.

Tabela 3-3: Fatores e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2³ com PC para otimização do método de determinação de Sb^{III} por HG-AAS

Variáveis	Nível baixo (-1)	PC (0)	Nível alto (+1)
[Ác. cítrico], % (m/v)	4,0	12,0	20,0
[NaBH ₄], % (m/v)	0,6	1,3	2,0
Tempo, s	0	60	120

Em seguida, as variáveis significativas (p = 0,05) foram selecionadas e CCD foi aplicado na tentativa de encontrar a condição ótima de análise

2.3.3. Validação dos métodos analíticos

Os métodos analíticos foram validados seguindo as recomendações do INMETRO (2016), da ANVISA (2017) e dos trabalhos publicados por Souza e Junqueira (2005) e Souza (2007). Os parâmetros de validação estimados foram: linearidade, seletividade (efeito de matriz), sensibilidade, limites de detecção e quantificação, precisão (repetibilidade) e tendência.

Para a quantificação de Sb total em AM utilizando HG-AAS, validou-se o método otimizado que se baseou na utilização de solução de trabalho contendo HCl 1,0 mol L⁻¹, KI 1,0 % (m/v) e ácido ascórbico 0,02 % (m/v); solução utilizada no canal do ácido contendo HCl 1,0 mol L⁻¹; solução utilizada no canal do redutor contendo NaBH₄ 0,90 % (m/v) e NaOH 0,45 mol L⁻¹; tempo de contato de 40 segundos do analito com a solução de trabalho.

Para a quantificação de Sb^{III} em AM utilizando HG-AAS, validou-se o método otimizado que se baseou na utilização de solução de trabalho contendo ácido cítrico 1,0 % (m/v); solução utilizada no canal do ácido contendo ácido cítrico 1,0 % (m/v); solução utilizada no canal do redutor contendo NaBH₄ 0,80 % (m/v) e NaOH 0,40 mol L⁻¹; tempo de contato de 100 segundos do analito com a solução de trabalho.

Após as medidas, o tratamento estatístico dos dados foi feito utilizando as planilhas do programa Excel da Microsoft Office (2013).

2.3.3.1. Linearidade

As avaliações da linearidade foram realizadas preparando-se três curvas analíticas preparadas com padrões externos adicionados às respectivas soluções de trabalho dos métodos otimizados, com seis pontos igualmente espaçados, sendo três replicatas independentes de cada nível. Brancos de cada curva analítica foram preparados como ferramenta de verificação do sinal-ruído do equipamento, e os valores de seus sinais analíticos foram descontados dos sinais analíticos de cada concentração da curva analítica correspondente. As soluções foram analisadas em ordem aleatória e no mesmo dia. Valores discrepantes foram verificados e removidos até o limite permitido pelo teste de resíduos Jackknife. Os parâmetros da regressão linear foram estimados pelo método dos quadrados mínimos (MQM) após a

verificação das premissas de normalidade, homoscedasticidade e independência dos resíduos da regressão.

2.3.3.2. Seletividade e efeito de matriz

Para avaliar a seletividade do método, foram preparadas triplicatas independentes de soluções de trabalho preparadas conforme os métodos otimizados, enriquecidas com analito (Sb^{V} ou Sb^{III}), e também triplicatas independentes de amostras idênticas com acréscimo dos interferentes Ni^{II} , Pb^{II} , Cu^{II} , As^{III} ou Sb^{V} (este último apenas para o método de quantificação de Sb^{III}). Os sinais analíticos dos dois grupos (ausência ou presença de cada um dos interferentes) foram comparados por meio do teste F (Snedecor) de homogeneidade das variâncias, e do teste- t (Student) de comparação das médias.

A seletividade também foi avaliada em termos de efeito de matriz, através de duas curvas de calibração preparadas em triplicatas independentes: uma contendo apenas o analito e a outra contendo a mesma quantidade de analito mais a meglumina. As inclinações e as intercepções dos dois grupos de curvas de calibração (com ou sem meglumina) foram comparadas utilizando o teste F e o teste- t .

2.3.3.3. Limites de detecção e de quantificação

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados a partir do valor médio de absorbância das medidas de sete replicatas de brancos preparados de forma independente, e dos valores de inclinação obtidos na avaliação de linearidade, usando a equação 2-40 e a relação $\text{LD} = \text{LQ} / 3,3$.

2.3.3.4. Tendência e precisão

A veracidade e a precisão, sob condições de repetibilidade, foram determinadas através de ensaios de adição e recuperação para três níveis de concentração (1º, 3º e 6º pontos das curvas de calibração), com sete replicatas independentes em cada nível.

2.3.4. Análise de amostras comerciais

Foram utilizadas neste trabalho três amostras de Glucantime® de diferentes lotes (L78259; L205105; L246882) com concentração nominal de Sb^V de 81 g L⁻¹. Foram preparados dois padrões intermediários diluindo as amostras em água ultrapura. Alíquotas destes padrões intermediários foram adicionadas às soluções de trabalho, preparadas de acordo com os métodos otimizados, para que as concentrações esperadas de Sb fossem próximas de 4,0 µg L⁻¹ e abaixo de 400,0 µg L⁻¹, para os métodos de quantificação de Sb total e Sb^{III}, respectivamente. O fator de diluição utilizado foi de 22.500.000 para Sb total e 275.000 para Sb^{III}. As quantificações de Sb total e Sb^{III} foram realizadas em condições otimizadas.

3. Resultados e discussão

3.1. Desenvolvimento e validação do método de quantificação de Sb total em AM empregando HG-AAS

A técnica HG-AAS foi escolhida para quantificação de Sb total em AM por apresentar bom desempenho, baixo custo e simplicidade de uso. Entretanto, as condições experimentais devem ser avaliadas para obter máxima sensibilidade e confiabilidade.

3.1.1. Planejamento de experimentos

Um teste foi realizado para selecionar a melhor opção de agente pré-redutor para incluir no planejamento, comparando as leituras de padrões de Sb^V 5,0 µg L⁻¹ preparados com cada um dos agentes pré-redutores (Tabela 3-4). Selecionou-se para este teste os agentes pré-redutores mais utilizados na literatura: tioureia, brometo de potássio, L-cisteína e iodeto de potássio. A mesma quantidade de 1,0% (m/v) foi utilizada para todos os pré-redutores avaliados, assim como a mesma concentração de 1,0 mol L⁻¹ de HCl. Foi adicionado 0,02% (m/v) de ácido ascórbico nos padrões preparados com KI.

Tabela 3-4: Valores de absorvância para padrões de 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Sb^{V} preparados com 1,0% (m/v) de diferentes agentes redutores

Agente redutor	Absorvância \pm desvio padrão (n = 3)
Tioureia	0,2174 \pm 0,0085
Brometo de potássio	0,2089 \pm 0,0073
L-cisteína	0,2339 \pm 0,0096
Iodeto de potássio + ác. ascórbico 0,02% (m/v)	0,2314 \pm 0,0030

Os maiores valores de absorvância foram obtidos para os padrões de Sb^{V} 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ preparado com KI e preparado com L-cisteína, sendo muito similares entre si.

Optamos por selecionar o KI com adição de ácido ascórbico por ser o agente pré-redutor utilizado na literatura de referência (Flores et al., 2002; 2003). Os valores de concentração de 1,0% (m/v), como nível inferior, e de 10,0%, como nível superior, foram selecionados para o planejamento com base nestas mesmas referências.

Empregou-se, inicialmente, um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} com ponto central (PC) para triagem dos fatores, porém obteve-se um modelo com falta de ajuste. Uma nova tentativa foi realizada, porém desta vez empregando-se um planejamento fatorial completo 2^4 com PC de acordo com a Tabela 3-5.

Tabela 3-5: Matriz do planejamento fatorial completo 2^4 com PC da otimização do método de quantificação de Sb total por HG-AAS e valores de absorvância obtidos em cada experimento. Valores em parênteses são valores codificados

Ensaio	[KI], % (m/v)	[NaBH ₄], % (m/v)	[HCl], mol L ⁻¹	Tempo, s	Absorvância
1	1,0(-1)	0,6(-1)	5,0(-1)	0(-1)	0,2312
2	10,0(+1)	0,6(-1)	5,0(-1)	0(-1)	0,2120
3	1,0(-1)	2,0(+1)	5,0(-1)	0(-1)	0,2259
4	10,0(+1)	2,0(+1)	5,0(-1)	0(-1)	0,1643
5	1,0(-1)	0,6(-1)	10,0(+1)	0(-1)	0,2393
6	10,0(+1)	0,6(-1)	10,0(+1)	0(-1)	0,2221
7	1,0(-1)	2,0(+1)	10,0(+1)	0(-1)	0,2186
8	10,0(+1)	2,0(+1)	10,0(+1)	0(-1)	0,1258
9	1,0(-1)	0,6(-1)	5,0(-1)	120(+1)	0,2571
10	10,0(+1)	0,6(-1)	5,0(-1)	120(+1)	0,2015
11	1,0(-1)	2,0(+1)	5,0(-1)	120(+1)	0,2162
12	10,0(+1)	2,0(+1)	5,0(-1)	120(+1)	0,1984
13	1,0(-1)	0,6(-1)	10,0(+1)	120(+1)	0,2352
14	10,0(+1)	0,6(-1)	10,0(+1)	120(+1)	0,2705
15	1,0(-1)	2,0(+1)	10,0(+1)	120(+1)	0,1983
16	10,0(+1)	2,0(+1)	10,0(+1)	120(+1)	0,2225
PC	5,5(0)	1,3(0)	7,5(0)	60(0)	0,1769
PC	5,5(0)	1,3(0)	7,5(0)	60(0)	0,1852
PC	5,5(0)	1,3(0)	7,5(0)	60(0)	0,1601
PC	5,5(0)	1,3(0)	7,5(0)	60(0)	0,1684
PC	5,5(0)	1,3(0)	7,5(0)	60(0)	0,1942

Onde: PC = ponto central.

O gráfico de Pareto (Figura 3-1.a) mostra que as variáveis [NaBH₄], [KI] e tempo de contato tiveram efeito significativo, dentro dos níveis estudados, na resposta instrumental com nível de confiança de 95%, sendo que [NaBH₄] apresentou o maior efeito. O sinal negativo dos efeitos indica que o uso de menores concentrações de NaBH₄ e KI levou a um aumento da resposta instrumental ($p = 0,05$). Podemos supor que uma concentração alta de NaBH₄ pode estar gerando uma reação excessivamente vigorosa na formação e liberação de estibina, sem que ocorra formação eficiente de uma nuvem atômica do analito no caminho ótico, o que acarreta em perda de sinal. Em relação ao KI, podemos inferir que uma alta concentração pode estar interferindo na formação e/ou liberação da estibina. O sinal positivo do efeito do tempo mostra um aumento da resposta pelo tempo de contato ($p = 0,05$). Analisando-se a interação significativa entre [KI] e tempo, pelo gráfico de médias marginais (Figura 3-1.b), observamos que quando se emprega o nível baixo (-) da variável [KI] não há diferença significativa na sensibilidade analítica para a interação com o tempo de contato. Não houve efeito significativo para a concentração de ácido na resposta, com isso, decidiu-se pelo menor valor de concentração (5,0 mol L⁻¹).

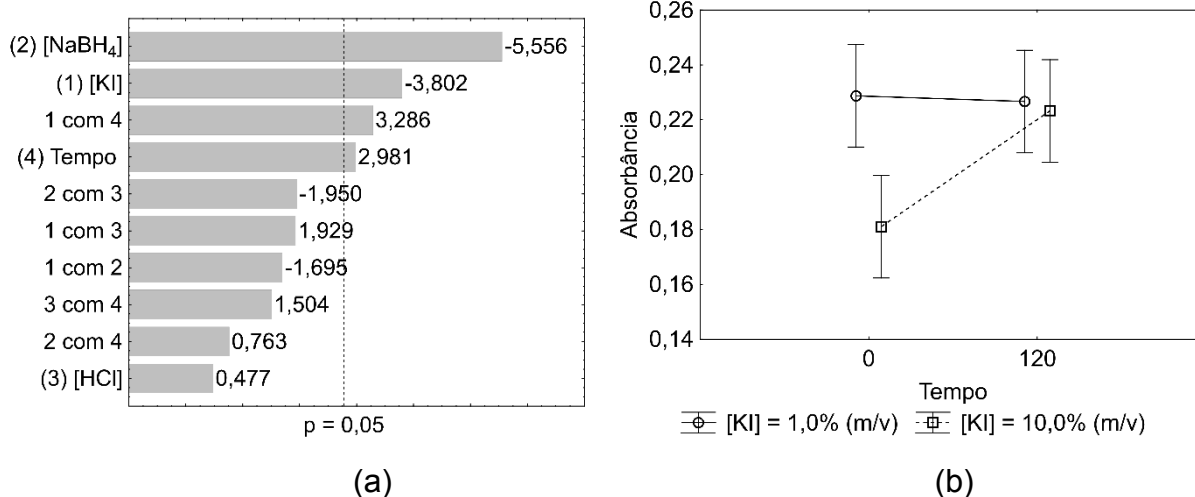


Figura 3-1: Gráficos gerados pelo planejamento fatorial completo 2⁴ com PC da otimização do método de quantificação de Sb total: Pareto (a) e médias marginais do efeito de interação entre [KI] e tempo (b).

Onde: p = significância; barras verticais = intervalo de 95% de confiança.

Pela segunda vez seguida o modelo obtido apresentou falta de ajuste. Considerando que o planejamento está sendo usado apenas para indicar tendências,

não há problema em o modelo apresentar falta de ajuste nesse momento. Sendo assim, optamos por utilizar as informações produzidas por ele na avaliação dos efeitos, e seguimos para a próxima etapa da otimização.

O CCD foi executado com a finalidade de se obter a condição ótima por meio da RSM, definida pelas variáveis significativas selecionados após o planejamento fatorial: concentração de agente pré-reduzidor KI, concentração do agente redutor NaBH_4 e tempo de contato da alíquota da solução padrão de Sb com a solução de trabalho. A Tabela 3-6 mostra a matriz CCD com oito experimentos no planejamento fatorial (2^k), seis experimentos nos pontos axiais ($2k$) e com cinco repetições no ponto central (n), resultando em um total de dezenove experimentos.

Tabela 3-6: Matriz CCD do método de quantificação de Sb total por HG-AAS e valores de absorvância obtidos. Valores em parênteses são valores codificados

Ensaio	[KI], %(m/v)	[NaBH ₄], %(m/v)	Tempo, s	Absorvância
1	0,8(-1)	0,7(-1)	25(-1)	0,1916
2	0,8(-1)	0,7(-1)	95(+1)	0,1728
3	0,8(-1)	1,1(+1)	25(-1)	0,2385
4	0,8(-1)	1,1(+1)	95(+1)	0,1601
5	1,6(+1)	0,7(-1)	25(-1)	0,2036
6	1,6(+1)	0,7(-1)	95(+1)	0,1788
7	1,6(+1)	1,1(+1)	25(-1)	0,1916
8	1,6(+1)	1,1(+1)	95(+1)	0,1418
9	0,5(- α)	0,9(0)	60(0)	0,1973
10	1,9(+ α)	0,9(0)	60(0)	0,1675
11	1,2(0)	0,6(- α)	60(0)	0,2107
12	1,2(0)	1,2(+ α)	60(0)	0,1678
13	1,2(0)	0,9(0)	0(- α)	0,1944
14	1,2(0)	0,9(0)	120(+ α)	0,2002
PC	1,2(0)	0,9(0)	60(0)	0,1953
PC	1,2(0)	0,9(0)	60(0)	0,1929
PC	1,2(0)	0,9(0)	60(0)	0,2043
PC	1,2(0)	0,9(0)	60(0)	0,2064
PC	1,2(0)	0,9(0)	60(0)	0,1825

Onde: PC = ponto central; $\alpha = 1,682$.

A ANOVA do modelo obtido no CCD apresentou regressão não significativa. Além disso, apenas a variável tempo de contato foi significativa com efeito negativo, dentro dos níveis estudados. Assim, alterações nas variáveis [KI] e [NaBH₄] não mudam significamente a resposta, e uma diminuição do tempo de contato leva a um aumento na resposta com uma confiabilidade de 95%. Diante disso, selecionamos os dois ensaios que apresentaram maiores valores de absorvância (ensaios 3 e 11), e escolhemos uma região intermediária. Chegamos ao resultado da condição ótima

para determinação de Sb total por HG-AAS que foi: concentração de KI = 1,00 % (m/v); concentração de NaBH₄ = 0,90 % (m/v) e tempo de contato da alíquota com a solução de trabalho = 40 segundos.

Os parâmetros de qualidade dos modelos fatorial 2⁴ e CCD podem ser vistos na Tabela 3-7.

Tabela 3-7: Parâmetros estatísticos obtidos a partir da ANOVA para o estudo de otimização do método de quantificação de Sb total por HG-AAS utilizando os planejamentos fatorial completo 2⁴ com PC e composto central (p = 0,05)

Planejamento	R ²	R ² _{máx}	Falta de ajuste (valor de p)	Regressão (valor de p)
Fatorial 2 ⁴ com PC	0,60	0,97	0,031	0,275
Composto Central	0,66	0,96	0,065	0,165

3.1.2. Validação do método analítico

O método otimizado para quantificação de Sb total em AM empregando HG-AAS foi validado seguindo as recomendações do INMETRO (2016), da ANVISA (2017) e dos trabalhos publicados por Souza e Junqueira (2005) e Souza (2007). Os parâmetros de validação estimados foram: linearidade, seletividade (efeito de matriz), sensibilidade, limites de detecção e quantificação, precisão (repetibilidade) e tendência.

3.1.2.1. Linearidade

A faixa dinâmica linear foi avaliada realizando-se leituras de padrões, preparados conforme método otimizado, com concentração de Sb aumentada em intervalos de 3,0 µg L⁻¹ para verificar em que ponto ocorre desvio de linearidade. Pode-se verificar na curva analítica obtida (Figura 3-2.a) que houve desvio de linearidade em uma concentração de Sb superior a 12,0 µg L⁻¹. A Figura 3-2.b mostra o gráfico que relaciona a resposta relativa (razão sinal/concentração) com a concentração. Utilizamos como critério de linearidade a faixa de 95 ou 105% (linhas pontilhadas) da

média geométrica das respostas relativas (linha contínua). Observa-se linearidade até o ponto de concentração igual a $12,0 \mu\text{g L}^{-1}$, representado pelos círculos pretos.

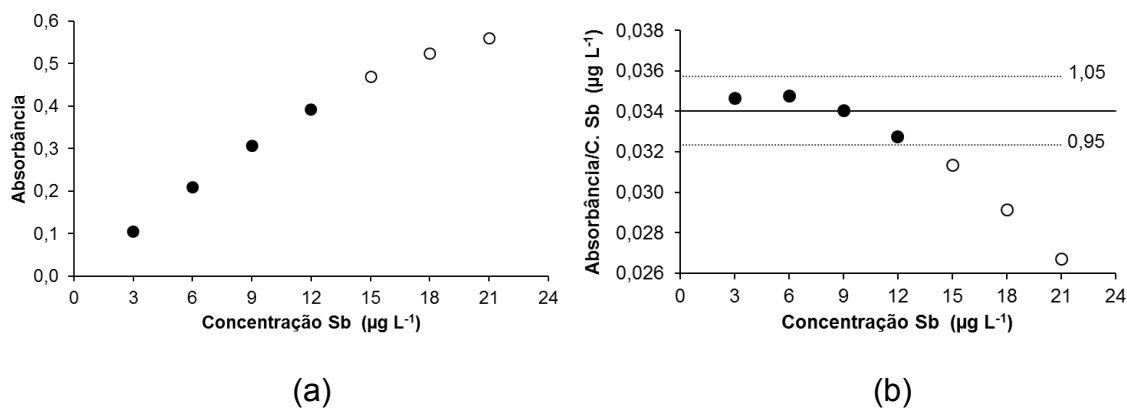


Figura 3-2: Avaliação da faixa dinâmica linear do método de quantificação de Sb total por HG-AAS através da: (a) curva analítica clássica; (b) razão sinal/concentração vs. concentração.

Onde: linha contínua = média geométrica das respostas relativas (3 a $12 \mu\text{g L}^{-1}$); linhas pontilhadas = intervalo de 95% a 105% da média geométrica das respostas relativas.

Avaliamos que não seria necessário toda esta extensão na definição da faixa de trabalho, já que para o método de controle de qualidade de AM não se espera uma variação tão expressiva nas respostas. Desta forma, definimos a faixa de trabalho até $8,0 \mu\text{g L}^{-1}$, que atende ao objetivo proposto e sugere uma melhor linearidade e sensibilidade para o método.

A linearidade foi avaliada com base nos resultados dos ensaios em função da concentração do analito. Os sinais analíticos dos ensaios para as concentrações nos pontos da curva analítica, foram obtidos com padrões externos em solução aquosas de HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, KI 1,0% (m/v) e ácido ascórbico 0,02% (m/v), corrigidos da solução em branco. As curvas analíticas foram preparadas em seis níveis de concentração de Sb igualmente espaçados com três replicatas independentes de cada nível nos valores de 0,50; 2,00; 3,50; 5,00; 6,50 e $8,00 \mu\text{g L}^{-1}$. Após as medidas, o tratamento estatístico dos dados foi feito utilizando as planilhas do programa Excel da Microsoft Office (2013). A presença de valores discrepantes (*outliers*) foi avaliada como os pontos fora do intervalo $\pm t_{(1-\alpha / 2; n-2)} \cdot S_{res}$ e confirmada pelo método dos resíduos padronizados Jackknife (J_{ei}), calculado para cada ponto da curva analítica. O gráfico de resíduos da regressão, com indicação dos valores extremos detectados e

removidos, é apresentado na Figura 3-3.a. Quatro valores extremos foram identificados, correspondente ao limite máximo de 22,2% dos dezoito dados originais, sendo um no nível $0,50 \mu\text{g L}^{-1}$, um no nível $3,50 \mu\text{g L}^{-1}$, e dois no nível $6,50 \mu\text{g L}^{-1}$. Tendências não foram observadas pela inspeção visual do gráfico exploratório dos resíduos da regressão, após a tratamento dos valores discrepantes. O teste de Ryan-Joiner foi aplicado para verificar a premissa de que os resíduos da regressão seguem a distribuição normal e, assim, permitir o uso dos testes de hipóteses t e F . O coeficiente de correlação obtido foi 0,9777, com valor crítico de 0,9481, indicando que o desvio da normalidade não foi significativo ($p > 0,10$). O gráfico de probabilidade normal pode ser visto na Figura 3-3.b.

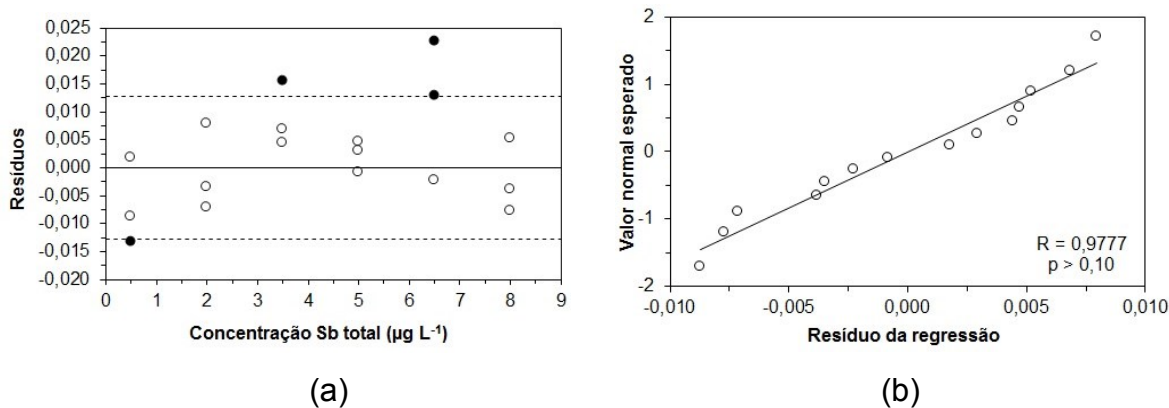


Figura 3-3: Gráficos exploratórios dos resíduos da regressão do método de quantificação de Sb total por HG-AAS, (a) com indicação dos valores extremos diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife, e (b) de probabilidade normal.

Onde: • = valor extremo; --- = $\pm t_{(1-\alpha/2; n-2)} \cdot S_{res}$; R = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner; p = significância.

A independência dos resíduos da regressão foi evidenciada pelo teste de Durbin-Watson. Como pode ser visto na Figura 3-4.a, a distribuição dos pontos nos quatro quadrantes do gráfico de Durbin-Watson foi homogênea, não apresentando tendências positivas ou negativas. A estatística d calculada foi 1,832 e se encontra entre os limites d_U e $4-d_U$, o que indica não haver autocorrelação ($p > 0,10$). A homoscedasticidade dos resíduos da regressão foi avaliada pelo teste de Brown-Forsythe, ou Levene modificado, que comparou a variabilidade dos resíduos de dois

grupos, um formado pelos 3 níveis inferiores de concentração e o outro contendo os 3 níveis superiores de concentração (Figura 3-4.b). A estatística t de Levene (t_L) não foi significativa ($p > 0,05$), demonstrando homoscedasticidade. Com as confirmações de homoscedasticidade e independência, há adequação do uso do MQM para estimativa dos parâmetros da regressão, sem ponderações.

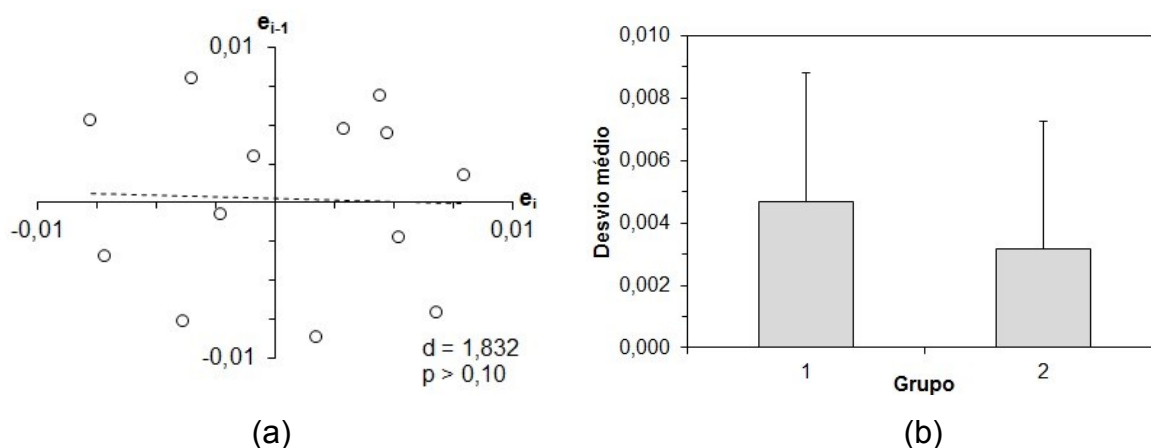


Figura 3-4: Gráficos representando (a) a independência dos resíduos e (b) a homoscedasticidade das variâncias dos resíduos nos grupos 1 e 2 para o método de quantificação de Sb total por HG-AAS.

Onde: e_i = resíduo da regressão; d = estatística de Durbin-Watson; p = significância; Grupo 1 = 0,5; 2,0 e 3,5 $\mu\text{g L}^{-1}$; Grupo 2 = 5,0; 6,5 e 8,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

A curva analítica com sua equação e coeficiente de determinação é apresentada na Figura 3-5. O modelo da regressão apresentou alta significância ($p < 0,001$) com desvio de linearidade não significativo ($p > 0,05$). A Tabela 3-8 mostra estes e os demais dados estatísticos de avaliação da linearidade.

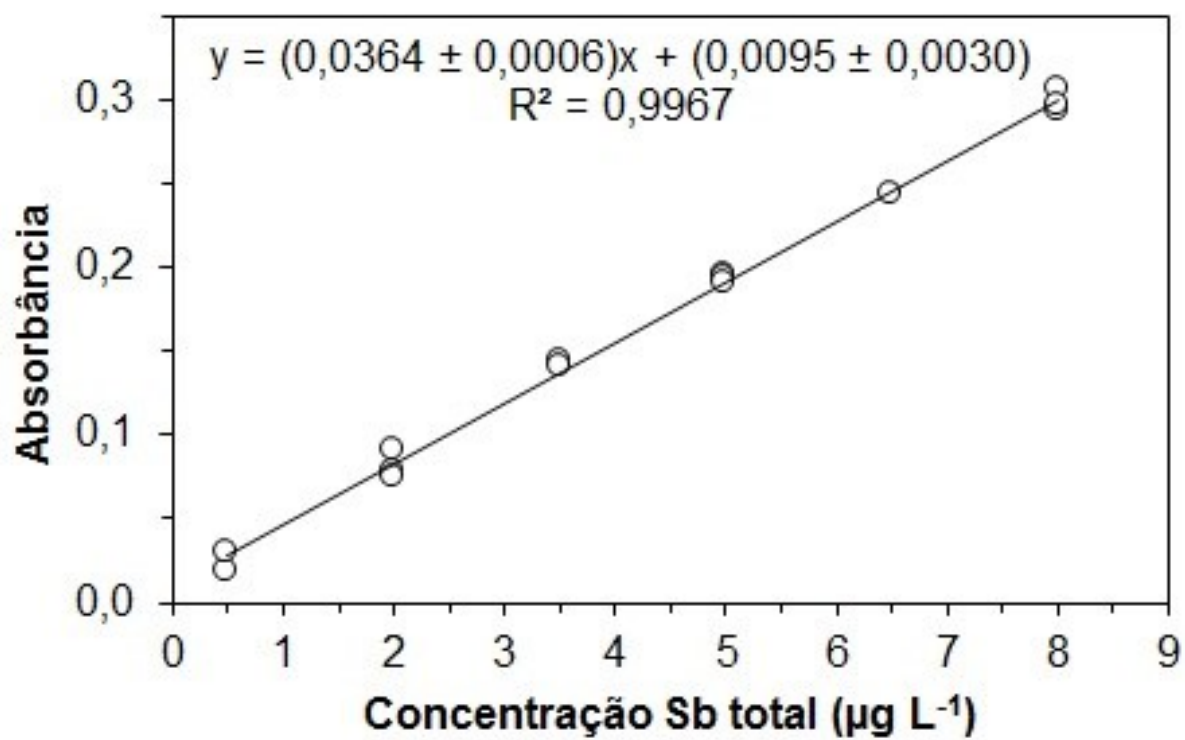


Figura 3-5: Curva analítica para quantificação de Sb total por HG-AAS.

Tabela 3-8: Dados estatísticos obtidos na avaliação dos requisitos de normalidade, independência, homoscedasticidade, ANOVA da regressão e desvio de linearidade para a curva analítica do método de quantificação de Sb total por HG-AAS

Estatística	Curva Sb total por HG-AAS
Número de observações	
n	14
Normalidade	
R	0,9777
R _{crítico}	0,9481
p	p > 0,10
Independência	
d	1,832
Não há autocorrelação	1,349 < d < 2,651
p	p > 0,10
Homoscedasticidade	
t _L	0,813
p	0,432
Regressão	
R ²	0,9967
F	3614
p	2,97 x 10 ⁻¹⁶
Desvio da linearidade	
F	0,869
p	0,522

Onde: n = número de observações; R = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner; p = significância; d = estatística de Durbin-Watson; t_L = estatística t de Levene; R^2 = coeficiente de determinação; F = razão entre variâncias.

3.1.2.2. Seletividade e efeito de matriz

Para avaliar a seletividade do método, foram preparados dois grupos de triplicatas independentes de amostras de soluções aquosas de HCl, KI e ácido ascórbico, diluídos nas mesmas concentrações do método otimizado, enriquecidas com Sb na concentração $3,5 \mu\text{g L}^{-1}$. O primeiro grupo não teve adição de interferentes, já no segundo grupo foram realizadas adições de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ dos interferentes Ni^{II} , Pb^{II} , Cu^{II} ou As^{III} . Os sinais analíticos obtidos na ausência dos interferentes foram comparados com os sinais analíticos obtidos na presença de cada um dos interferentes por meio do teste F (Snedecor) de homogeneidade das variâncias, e do teste t (Student) de comparação das médias. Os dados apresentados na Tabela 3-9 mostram que os resultados não foram significativos ($p > 0,05$) para nenhum dos interferentes analisados, demonstrando que a sua presença nas concentrações analisadas não afeta a precisão ou a exatidão dos resultados.

Tabela 3-9: Avaliação da seletividade do método para a quantificação de $3,5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb na ausência de interferentes e na presença de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ dos interferentes Ni^{II} , Pb^{II} , Cu^{II} ou As^{III}

Estatística	Ni^{II}	Pb^{II}	Cu^{II}	As^{III}
Teste F (Snedecor) de homogeneidade das variâncias				
F	34,74	1,57	3,49	1,43
p	0,107	0,428	0,313	0,443
Teste t (Student) de comparação das médias				
t	1,78	0,72	1,78	4,09
p	0,217	0,545	0,217	0,055

Onde: F = razão entre variâncias; p = significância; t = estatística t de Student.

A seletividade também foi avaliada pelo efeito da matriz no método. Foram preparados dois grupos de triplicatas independentes de curvas analíticas do método otimizado, um na ausência de matriz e outro na presença $25,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de meglumina. As seis curvas, três com matriz e três sem matriz, foram avaliadas quanto à linearidade e todas as premissas relativas ao MQM foram confirmadas. O teste F indicou homogeneidade das variâncias dos resíduos das curvas com e sem matriz ($p > 0,05$).

Com as premissas de linearidade e de homogeneidade das variâncias confirmadas, o teste t com variâncias combinadas foi adotado para comparar os parâmetros interseção e inclinação e avaliar o efeito de matriz. Os valores deste teste estão dispostos na Tabela 3-10. Não foram identificadas diferenças significativas entre as interseções e entre as inclinações das curvas com ou sem matriz ($p > 0,05$). Com base nestes resultados foi possível concluir que a curva sem matriz fornece resposta que não diferencia significativamente daquela obtida para curva com matriz.

Tabela 3-10: Comparações entre as interseções e inclinações das curvas com e sem matriz para o método de quantificação de Sb total por HG-AAS

Estatística	Comparação da interseção	Comparação da inclinação
Teste F (Snedecor) de homogeneidade das variâncias		
F	31,31	8,19
p	0,113	0,214
Teste t (Student) de comparação das médias		
t	0,69	1,63
p	0,561	0,245

Onde: t = estatística t de Student; p = significância.

3.1.2.3. Limite de detecção, limite de quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram estimados a partir da curva analítica pelo método simplificado (Capítulo 2, item 6.3). O valor de desvio padrão foi obtido pela leitura de sete brancos independentes, e o valor de coeficiente angular foi dado pela média de três curvas independentes após avaliação de linearidade. A faixa linear de trabalho deste método, considerando o LQ e o último nível de concentração da curva analítica, é de 0,48 a 8,00 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os parâmetros são reportados na Tabela 3-11.

Tabela 3-11: Faixa dinâmica linear, faixa linear de trabalho, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) para o método de quantificação de Sb total empregando HG-AAS

Parâmetro	Valor ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Faixa dinâmica linear	0,48 – 12,0
Faixa linear de trabalho	0,48 – 8,00
LD	0,15
LQ	0,48

3.1.2.4. Tendência e precisão

A tendência do método foi avaliada pela realização de ensaios de recuperação, já a precisão do método foi medida por meio da repetibilidade, sendo expressa pelo DPR. A tendência e a repetibilidade foram avaliadas em três níveis de concentração, baixo, médio e alto. Para cada concentração foram preparadas 7 replicatas independentes. Na Tabela 3-12 pode-se observar os valores obtidos que estão de acordo com os valores aceitáveis pela AOAC dentro da faixa de concentração analisada.

Tabela 3-12: Valores de repetibilidade e tendência obtidos na validação do método de quantificação de Sb total por HG-AAS (n = 7)

[Sb total], $\mu\text{g L}^{-1}$	Tendência, %	Critério de aceitação*, %	Repetibilidade, DPR%	Critério de aceitação*, DPR%
0,5	95,6	40 – 120	19,6	30
3,5	102,3	60 – 115	7,3	21
8,0	96,5	60 – 115	3,1	21

* Fonte: AOAC, 2012.

3.2. Desenvolvimento e validação do método de quantificação de Sb^{III} em AM empregando HG-AAS

A técnica HG-AAS foi escolhida para quantificação de Sb^{III} em AM por apresentar bom desempenho, baixo custo e simplicidade de uso. Entretanto, as

condições experimentais devem ser avaliadas para obter máxima sensibilidade e confiabilidade.

3.2.1. Planejamento de experimentos

Na execução dos planejamentos experimentais da otimização do método, dois padrões foram preparados para leitura em cada ensaio, um contendo apenas Sb^{III} na concentração de $5 \mu\text{g L}^{-1}$, cujas resposta de absorvância foram utilizadas no planejamento, e outro contendo a mesma quantidade de Sb^{III} com $400 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb^{V} . Com isso foi possível analisar a eficiência da supressão de sinal proveniente do Sb^{V} em cada ensaio. Soluções preparadas com ácido cítrico resultavam em um valor de pH próximo a 1,9.

Três variáveis foram avaliadas inicialmente usando um planejamento fatorial 2^3 com PC. A matriz deste planejamento e os valores de absorvância obtidos são apresentados na Tabela 3-13.

Tabela 3-13: Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 com PC da otimização do método de quantificação de Sb^{III} e valores de absorvância obtidos em cada experimento

Ensaio	[Ác. Cítrico], % (m/v)	[NaBH ₄], % (m/v)	Tempo, s	Absorvância ^a	Absorvância ^b
1	4(-1)	0,6(-1)	0(-1)	0,1854	0,1812
2	20(+1)	0,6(-1)	0(-1)	0,0979	0,1043
3	4(-1)	2(+1)	0(-1)	0,1846	0,1921
4	20(+1)	2(+1)	0(-1)	0,2315	0,1633
5	4(-1)	0,6(-1)	120(+1)	0,1870	0,1881
6	20(+1)	0,6(-1)	120(+1)	0,1222	0,1286
7	4(-1)	2(+1)	120(+1)	0,1837	0,1885
8	20(+1)	2(+1)	120(+1)	0,1753	0,1791
PC	12(0)	1,3(0)	60(0)	0,1779	0,2103
PC	12(0)	1,3(0)	60(0)	0,1777	0,1637
PC	12(0)	1,3(0)	60(0)	0,1872	0,2030
PC	12(0)	1,3(0)	60(0)	0,1955	0,2018
PC	12(0)	1,3(0)	60(0)	0,1826	0,2023

^aPadrão de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb^{III} ; ^bPadrão de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb^{III} e $400 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb^V .

Durante os experimentos, o capilar da célula de quartzo T ficou obstruído devido ao uso de altas concentrações de ácido cítrico em alguns ensaios. Foi necessário interromper a análise para realizar a limpeza da célula de quartzo T por imersão em solução de ácido nítrico/fluorídrico por 30 segundos. Este fato indica que o uso de menores concentrações de ácido cítrico poderia evitar o entupimento da célula de quartzo T e, com isso, preservar a robustez e a frequência analítica.

Um teste *t*-pareado foi realizado para comparar as duas absorvâncias obtidas nos ensaios. O teste mostrou que não existe diferença significativa ($p = 0,05$) para as absorvâncias obtidas na presença ou ausência de $400,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb^V .

O gráfico de Pareto (Figura 3-6) mostra que as variáveis [NaBH₄] e [ácido cítrico] tiveram efeito significativo na resposta instrumental com confiabilidade de 95%, nos níveis analisados. Os sinais dos efeitos indicam que o aumento da concentração de NaBH₄ e a diminuição da concentração de ácido cítrico afetam positivamente a resposta instrumental. A interação entre essas duas variáveis também teve efeito positivo na resposta, assim como a interação entre [NaBH₄] e tempo. Podemos observar no gráfico de médias marginais que a interação entre [NaBH₄] e [ác. cítrico] só é significativa quando se utiliza o nível superior da variável [ác. cítrico] (Figura 3-7.a), e que a interação entre [NaBH₄] e tempo é pouco significativa, mas se obtém sinais analíticos mais elevados quando se utiliza o nível superior para a variável [NaBH₄] e o nível inferior para a variável tempo (Figura 3-7.b).

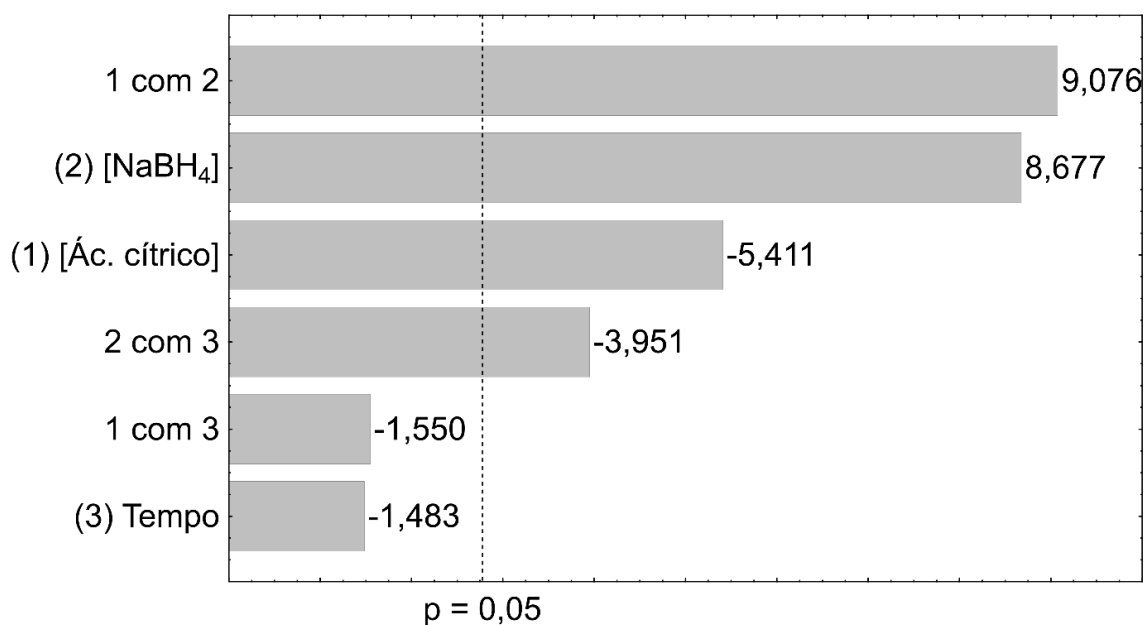


Figura 3-6: Gráfico de Pareto gerado pelo planejamento fatorial completo 2³ com PC da otimização do método de quantificação de Sb^{III} por HG-AAS. Onde: *p* = significância.

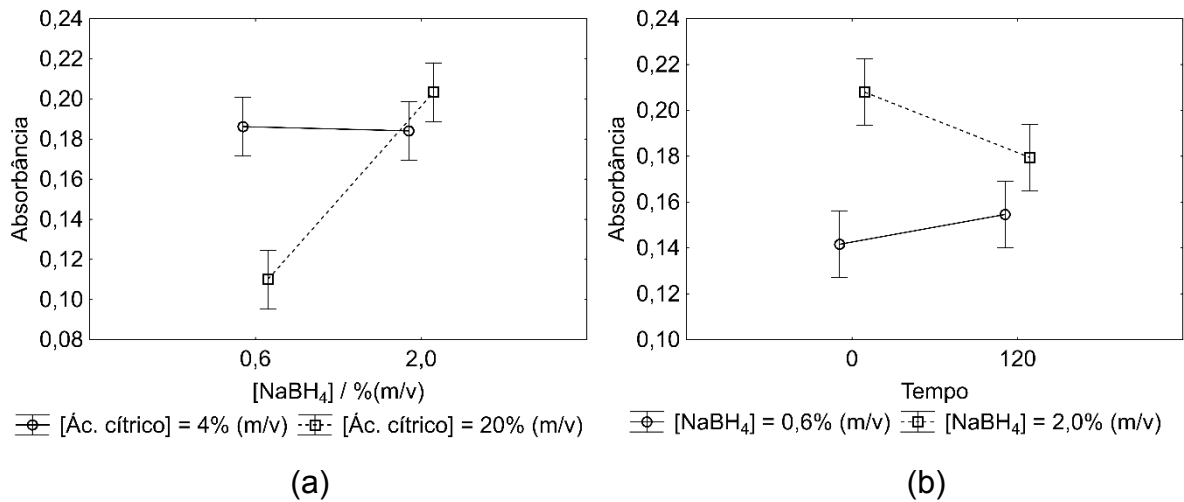


Figura 3-7: Gráficos de médias marginais dos efeitos de interação entre [ác. cítrico] e [NaBH₄] (a), e entre [NaBH₄] e tempo (b), gerados pelo planejamento fatorial completo 2³ com PC na otimização do método de quantificação de Sb^{III} por HG-AAS. P.S.: As barras verticais levam em conta um intervalo de confiança de 95%.

Com base na avaliação dos efeitos das variáveis e interações significativas do planejamento fatorial, uma matriz CCD foi feita com intuito de se obter a condição ideal de análise. A tabela 3-14 mostra, além das condições deste planejamento, os valores de absorbância obtidos para padrões de 5 µg L⁻¹ de Sb^{III} e também a absorbância para padrões de 5 µg L⁻¹ de Sb^{III} e 400 µg L⁻¹ de Sb^V. Foi observado que em concentrações baixas de ácido cítrico era necessário um tempo de pelo menos 100 segundos para que o sinal do Sb^V fosse completamente suprimido. Assim, passou-se a utilizar um tempo de 100 segundos em todos os ensaios seguintes.

Tabela 3-14: Primeira matriz CCD da otimização do método de quantificação de Sb^{III} por HG-AAS e valores de absorvância obtidos em cada experimento para amostras preparadas com 5 µg L⁻¹ de Sb^{III} e também a absorvância para amostras preparadas com 5 µg L⁻¹ de Sb^{III} e 400 µg L⁻¹ de Sb^V

Ensaio	[Ác. Cítrico], % (m/v)	[NaBH ₄], % (m/v)	Absorvância ^a	Absorvância ^b
1	2(-1)	3(+1)	0,1620	0,2231
2	6(+1)	3(+1)	0,1825	0,1860
3	2(-1)	1(-1)	0,1960	0,2283
4	6(+1)	1(-1)	0,1828	0,2187
5	1,2(-α)	2(0)	0,2016	0,2247
6	4(0)	3,4(+α)	0,1945	0,2044
7	6,8(+α)	2(0)	0,1998	0,1975
8	4(0)	0,6(-α)	0,1771	0,1751
PC	4(0)	2(0)	0,1639	0,1891
PC	4(0)	2(0)	0,1823	0,1981
PC	4(0)	2(0)	0,1746	0,1919
PC	4(0)	2(0)	0,1994	0,2042
PC	4(0)	2(0)	0,1936	0,2099

^a[Sb^{III}] = 5 µg L⁻¹; ^b[Sb^{III}] = 5 µg L⁻¹ e [Sb^V] = 400 µg L⁻¹.

Verifica-se uma diferença significativa entre os dois valores de absorvância obtidos no ensaio 1. Como esta diferença não foi observada para outros ensaios em que se utilizou a mesma concentração de ácido cítrico, decidimos realizar o teste *t*-pareado excluindo os valores do ensaio 1 da comparação, e observamos que não há diferença significativa entre os dois grupos de absorvâncias (*p* = 0,05).

Podemos verificar que houve pouca variação na resposta, diante disso, o modelo obtido no CCD não apresentou regressão significativa com confiabilidade de 95%. Observamos que, apesar da pouca variação, os resultados obtidos no planejamento indicavam uma boa resposta para valores baixos de [ác. cítrico], como

o ensaio 5, por exemplo. Visando evitar contratempos causados por entupimento do tubo de quartzo T, que compromete a robustez e a frequência analítica, realizamos um segundo CCD, com o mesmo número experimentos do anterior, explorando uma região com menores concentrações de ácido cítrico (Tabela 3-15).

Tabela 3-15: Segunda matriz CCD da otimização do método de quantificação de Sb^{III} por HG-AAS e valores de absorvância obtidos em cada ensaio para amostras preparadas com 5,00 µg L⁻¹ de Sb^{III} e também para amostras preparadas com 5,00 µg L⁻¹ de Sb^{III} e 400,00 µg L⁻¹ de Sb^V

Ensaio	[Ác. Cítrico], % (m/v)	[NaBH ₄], % (m/v)	Absorvância ^a	Absorvância ^b
1	1,0(-1)	2,0(+1)	0,1413	0,1795
2	4,0(+1)	2,0(+1)	0,0093	0,0026
3	1,0(-1)	1,0(-1)	0,1904	0,2100
4	4,0(+1)	1,0(-1)	-0,0067	-0,0068
5	0,4(-α)	1,5(0)	0,1658	0,2919
6	2,5(0)	2,2(+α)	0,1357	0,1309
7	4,6(+α)	1,5(0)	0,1839	0,1775
8	2,5(0)	0,8(-α)	0,2276	0,2404
PC	2,5(0)	1,5(0)	0,1872	0,1971
PC	2,5(0)	1,5(0)	0,2059	0,2130
PC	2,5(0)	1,5(0)	0,1926	0,2034
PC	2,5(0)	1,5(0)	0,1928	0,1998
PC	2,5(0)	1,5(0)	0,1913	0,2467

^a[Sb^{III}] = 5 µg L⁻¹; ^b[Sb^{III}] = 5 µg L⁻¹ e [Sb^V] = 400 µg L⁻¹.

Este planejamento foi executado após o equipamento ter sido utilizado para analisar Sb total. Alguns brancos apresentaram sinais altos de absorvância. Em função disso, para alguns resultados de absorvância corrigida da leitura do branco, obteve-se valores próximos de zero, incluindo um valor negativo (ensaio 4). Para

controlar estes efeitos, nas análises seguintes passou-se a utilizar uma tubulação exclusiva para cada método, e também, quando ocorria uma troca de método, adotou-se uma etapa de condicionamento do equipamento deixando-se a bomba peristáltica ligada por cerca de 5 minutos antes de iniciar a análise passando a solução redutora no seu canal respectivo, e a solução ácida no canal do ácido e da amostra.

Novamente o modelo obtido no CCD não apresentou regressão significativa com confiabilidade de 95%. Diante deste fato não podemos utilizar o modelo para fazer previsões, mas podemos avaliar os efeitos das variáveis na resposta. O gráfico de Pareto (Figura 3.8) gerado pelo planejamento fatorial incluso no CCD, indica com confiabilidade de 95%, que as variáveis foram significativas com efeitos negativo na resposta, enquanto a interação foi significativa com efeito positivo na resposta. Isto quer dizer que o emprego de concentrações mais baixas destes reagentes leva a um aumento do sinal analítico. No entanto, se observarmos os valores de absorbância obtidos no ensaio 5, podemos notar que a concentração de ácido cítrico igual a 0,4% (m/v) não foi suficiente para suprimir o sinal do Sb^{V} . Já a concentração de ácido cítrico igual a 1,0% (m/v) permitiu a análise seletiva do Sb^{III} com boa sensibilidade. Um teste *t*-pareado de comparação das absorbâncias, excluindo-se os valores do ensaio 5 da comparação, revelou que não há diferença significativa entre os dois grupos ($p = 0,05$). Isso demonstra que concentrações de 1,0% (m/v) de ácido cítrico foram eficientes na supressão de sinal do Sb^{V} . Em relação ao NaBH_4 , uma concentração igual a 0,8% (m/v), como a utilizada no ensaio 8, proporcionou a obtenção de um alto valor de absorbância. Portanto, a condição selecionada para o método otimizado utiliza ácido cítrico e NaBH_4 nas concentrações iguais a 1,00% (m/v) e 0,80% (m/v), respectivamente.

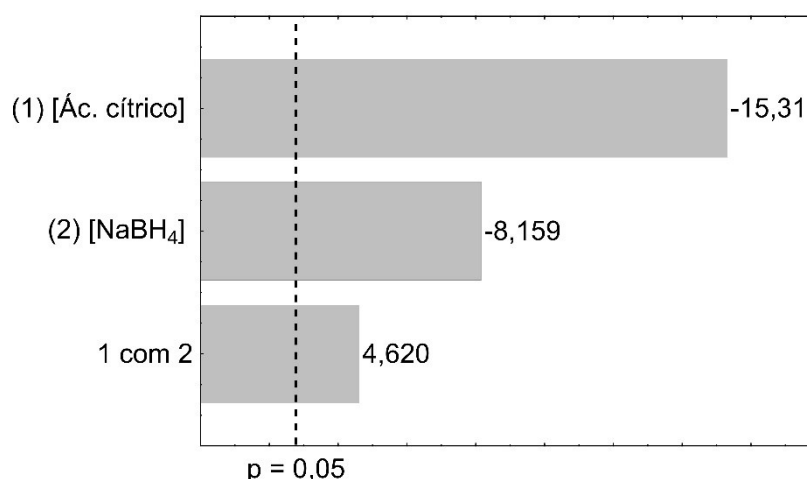


Figura 3-8: Gráfico de Pareto gerado pelo planejamento fatorial incluso no CCD da otimização do método de quantificação de Sb^{III} por HG-AAS.

A Tabela 3-16 mostra os parâmetros estatísticos de avaliação da qualidade dos modelos. Como podemos observar, os modelos matemáticos obtidos não apresentaram qualidade desejável para fazer previsões empregando RSM.

Tabela 3-16: Parâmetros estatísticos obtidos a partir da ANOVA para a otimização do método de quantificação de Sb^{III} por HG-AAS utilizando os planejamentos fatorial completo 2³ com PC e composto central ($p = 0,05$)

Planejamento	R ²	R ² _{máx}	Falta de ajuste (valor de p)	Regressão (valor de p)
Fatorial 2 ³ com PC	0,88	0,98	0,021	0,031
1º Composto Central	0,28	0,62	0,407	0,760
2º Composto Central	0,46	1,00	0,00006	0,409

3.2.2. Validação do método analítico

O método otimizado para quantificação de Sb^{III} em AM empregando HG-AAS foi validado seguindo as recomendações do INMETRO (2016), da ANVISA (2017) e dos trabalhos publicados por Souza e Junqueira (2005) e Souza (2007). Os parâmetros de validação estimados foram: linearidade, seletividade (efeito de matriz), sensibilidade, limites de detecção e quantificação, precisão (repetibilidade) e tendência.

3.2.2.1. Linearidade

Na avaliação da faixa dinâmica linear, leituras de padrões preparados conforme método otimizado com aumento na concentração de Sb^{III} em intervalos de $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ foram realizadas. A Figura 3-9.a mostra a curva analítica obtida e a ocorrência de desvio de linearidade no ponto com concentração de Sb^{III} igual a $8,0 \mu\text{g L}^{-1}$. Na Figura 3-9.b, observamos este desvio de linearidade através do valor da resposta relativa que apresenta uma queda expressiva nesta concentração e ultrapassa o limite utilizado como critério de linearidade (faixa de 95 ou 105% da média geométrica das respostas relativas). Observa-se linearidade até o ponto de concentração igual a $12,0 \mu\text{g L}^{-1}$, representado pelos círculos pretos.

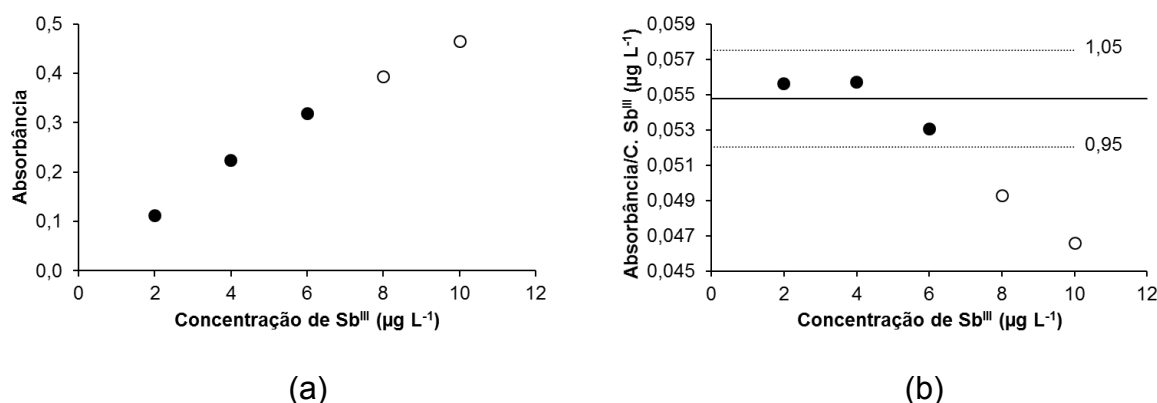


Figura 3-9: Avaliação da faixa dinâmica linear do método de quantificação de Sb^{III} por HG-AAS através da: (a) curva analítica clássica; (b) razão sinal/concentração vs. concentração.

Onde: linha contínua = média geométrica das respostas relativas (2 a $6 \mu\text{g L}^{-1}$); linhas pontilhadas = intervalo de 95% a 105% da média geométrica das respostas relativas.

Como a quantificação de traços de Sb^{III} em AM está relacionada com uma alta concentração de Sb^{V} , existe a necessidade de diluição que diminui ainda mais a concentração do analito. Portanto, não há necessidade de se utilizar uma faixa muito extensa de concentração. Optamos por delimitar a faixa de trabalho até $3,7 \mu\text{g L}^{-1}$, favorecendo, assim, uma região de melhor linearidade e sensibilidade para o método.

A linearidade da faixa de trabalho foi avaliada através de ensaios em função da concentração do analito. Os sinais analíticos dos ensaios para as concentrações nos pontos da curva analítica foram obtidos com padrões externos em soluções aquosas

de ácido cítrico 1,00% (m/v), corrigidos da solução em branco. As curvas de calibração foram preparadas em seis níveis de concentração de Sb^{III} igualmente espaçados com três replicatas independentes de cada nível nos valores de 0,20; 0,90; 1,60; 2,30; 3,00 e 3,70 $\mu\text{g L}^{-1}$. O método dos resíduos padronizados Jackknife (J_{ei}) foi utilizado para detectar a presença de *outliers* fora do intervalo $\pm t_{(1-\alpha/2; n-2)} \cdot S_{\text{res}}$, calculado para cada ponto da curva analítica, como pode ser visto no gráfico de resíduos da regressão, com indicação dos valores extremos detectados e removidos (Figura 3-10.a). Foram removidos quatro valores, correspondente ao limite máximo de 22,2% dos dezoito dados originais, sendo um no nível 2,30 $\mu\text{g L}^{-1}$, um no nível 3,00 $\mu\text{g L}^{-1}$, e dois no nível 3,70 $\mu\text{g L}^{-1}$. A inspeção visual do gráfico exploratório dos resíduos da regressão não indicou tendências após a remoção dos valores discrepantes. A premissa de que os resíduos da regressão seguem a distribuição normal foi confirmada pelo teste de Ryan-Joiner, permitindo o uso dos testes de hipóteses t e F . O coeficiente de correlação obtido foi 0,9852, com valor crítico de 0,9481, indicando que o desvio da normalidade não foi significativo ($p > 0,10$). O gráfico de probabilidade normal pode ser visto na Figura 3-10.b.

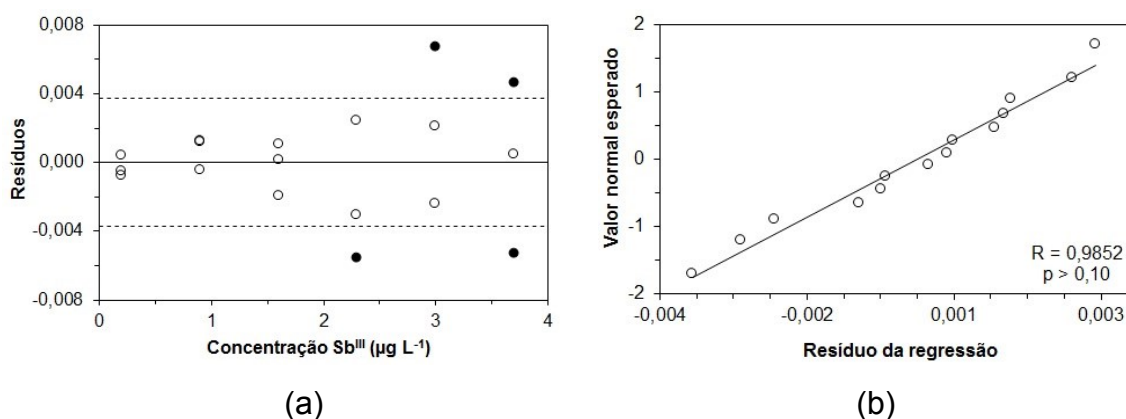


Figura 3-10: Gráficos exploratórios dos resíduos da regressão do método de quantificação de Sb^{III} , (a) com indicação dos valores extremos diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife, e (b) de probabilidade normal.

Onde: • = valor extremo; --- = $\pm t_{(1-\alpha/2; n-2)} \cdot S_{\text{res}}$; R = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner; p = significância.

Como pode ser visto na Figura 3-11.a, a distribuição dos pontos nos quatro quadrantes do gráfico de Durbin-Watson foi homogênea, não apresentando tendências positivas ou negativas, indicando a independência dos resíduos da

regressão. A estatística d calculada foi 2,717, entre os limites d_U e $4-d_U$, e confirmou não haver autocorrelação ($p > 0,05$). O teste de Brown-Forsythe (Levene modificado) comparou a variabilidade dos resíduos de dois grupos contendo 3 níveis de concentração cada (Figura 3-11.b). A estatística t de Levene (t_L) não foi significativa ($p > 0,05$), demonstrando homoscedasticidade. As confirmações de homoscedasticidade e independência indicam adequação sem ponderações para uso do MQM na estimativa dos parâmetros da regressão.

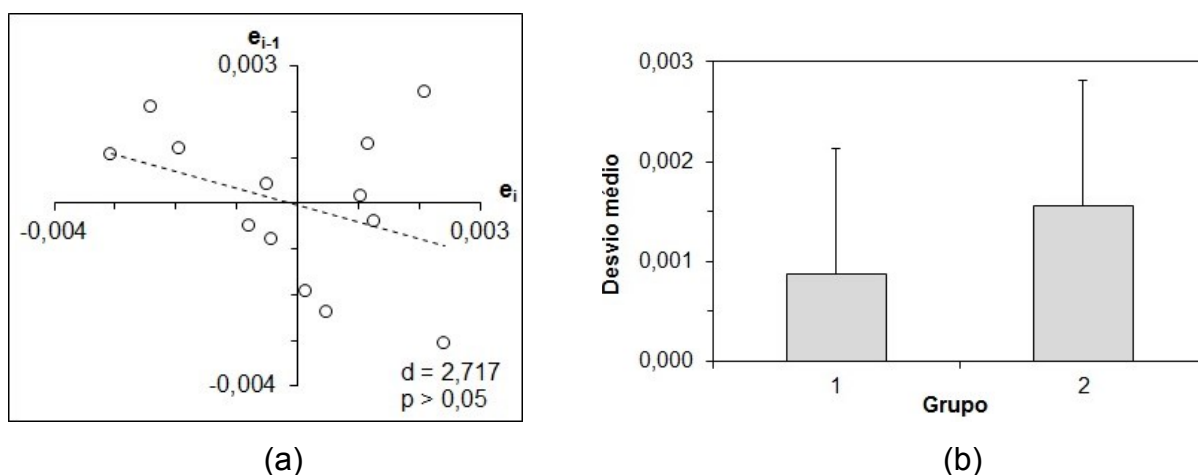


Figura 3-11: Gráficos representando (a) a independência dos resíduos e (b) a homoscedasticidade das variâncias dos resíduos nos grupos 1 e 2 para o método de quantificação de Sb^{III} .

Onde: e_i = resíduo da regressão; d = estatística de Durbin-Watson; p = significância; Grupo 1 = 0,2; 0,9 e 1,6 $\mu g L^{-1}$; Grupo 2 = 2,3; 3,0 e 3,7 $\mu g L^{-1}$.

A Figura 3-12 mostra a curva analítica com sua equação e coeficiente de determinação. Tabela 3-17 apresenta os dados estatísticos de avaliação da linearidade, como a alta significância apresentada ($p < 0,001$) com desvio de linearidade não significativo ($p > 0,05$).

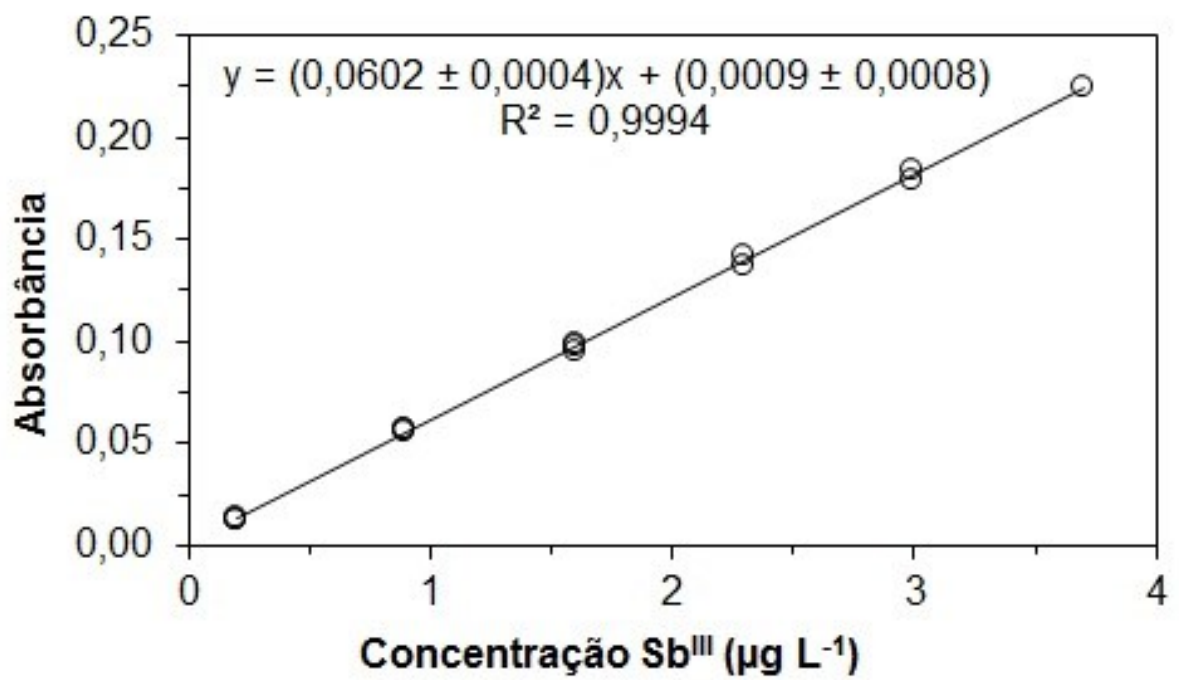


Figura 3-12: Curva analítica para o método de quantificação de Sb^{III} por HG-AAS.

Tabela 3-17: Dados estatísticos obtidos na avaliação dos requisitos de normalidade, independência, homoscedasticidade, ANOVA da regressão e desvio de linearidade para a curva analítica do método de quantificação de Sb^{III} por HG-AAS

Estadística	Curva Sb ^{III} por HG-AAS
Número de observações	
n	14
Normalidade	
R	0,9952
R _{crítico}	0,9481
p	p > 0,10
Independência	
d	2,717
Não há autocorrelação	1,252 < d < 2,748
p	p > 0,05
Homoscedasticidade	
t _L	1,185
p	0,259
Regressão	
R ²	0,9994
F	20746
p	8,42 x 10 ⁻²¹
Desvio da linearidade	
F	0,141
p	0,962

Onde: n = número de observações; R = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner; p = significância; d = estatística de Durbin-Watson; t_L = estatística t de Levene; R^2 = coeficiente de determinação; F = razão entre variâncias.

3.2.2.2. Seletividade e Efeito de Matriz

A seletividade do método foi avaliada preparando-se triplicatas independentes de amostras de soluções aquosas de ácido cítrico diluído na mesma concentração do método otimizado, enriquecidas com $1,60 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb^{III} , e também triplicatas independentes de amostras idênticas com acréscimo de $20,0 \mu\text{g L}^{-1}$ dos interferentes Ni^{II} , Pb^{II} , Cu^{II} ou As^{III} , ou com acréscimo de $400,0 \mu\text{g L}^{-1}$ do interferente Sb^{V} . Comparou-se os sinais analíticos obtidos na ausência e dos interferentes com os sinais analíticos obtidos na presença de cada um dos interferentes por meio dos testes F e t . Como pode ser visto na Tabela 3-18, os testes não foram significativos ($p > 0,05$) para nenhum dos interferentes analisados, demonstrando a seletividade do método.

Tabela 3-18: Avaliação da seletividade do método de quantificação de Sb^{III} na ausência de interferentes e na presença de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ dos interferentes Ni^{II} , Pb^{II} , Cu^{II} ou As^{III} , ou na presença de $400,0 \mu\text{g L}^{-1}$ do interferente Sb^{V}

Estatística	Ni^{II}	Pb^{II}	Cu^{II}	As^{III}	Sb^{V}
Teste F (Snedecor) de homogeneidade das variâncias					
F	154,6	87,73	67,79	4,99	105,4
p	0,051	0,067	0,077	0,268	0,062
Teste t (Student) de comparação das médias					
t	0,31	3,95	0,57	2,14	2,38
p	0,788	0,058	0,628	0,166	0,140

A seletividade também foi avaliada pelo efeito da matriz no método. Dois grupos de triplicatas independentes de curvas analíticas do método otimizado foram preparados, um sem a presença da matriz e o outro com acréscimo de meglumina diluída para uma concentração final de $1,50 \text{mg L}^{-1}$. Os sinais analíticos dos ensaios para as concentrações nos pontos das curvas analíticas foram obtidos com padrões externos corrigidos da solução em branco. As seis curvas, três com matriz e três sem matriz, foram avaliadas quanto à linearidade e todas as premissas relativas ao MQM foram confirmadas. A homogeneidade das variâncias das interseções e das inclinações das curvas com e sem matriz foi confirmada pelo teste F ($p > 0,05$). O teste t com variâncias combinadas foi adotado para comparar os parâmetros

interseção e inclinação e avaliar o efeito de matriz após a confirmação das premissas de linearidade e de homogeneidade. A Tabela 3-19 apresenta os valores destes testes que não indicaram diferenças significativas entre as interseções e entre as inclinações das curvas com ou sem matriz ($p > 0,05$), confirmando a não existência de efeito de matriz.

Tabela 3-19: Comparações entre as interseções e inclinações das curvas com e sem matriz para o método de quantificação de Sb^{III} por HG-AAS

Estatística	Comparação da interseção	Comparação da inclinação
Teste F (Snedecor) de homogeneidade das variâncias		
F	11,28	10,64
p	0,184	0,189
Teste t (Student) de comparação das médias		
t	0,183	0,083
p	0,872	0,941

Onde: t = estatística t de Student; p = significância.

3.2.2.3. Limite de detecção, limite de quantificação

O LD e o LQ foram estimados a partir da curva analítica pelo método simplificado (Capítulo 2, item 6.3). O valor de desvio padrão foi obtido pela leitura de sete brancos independentes, e o valor de coeficiente angular foi dado pela média de três curvas independentes após avaliação de linearidade. A faixa linear de trabalho deste método, considerando o LQ e o último nível de concentração da curva analítica, é de 0,17 a 3,70 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os parâmetros são reportados na Tabela 3-20.

Tabela 3-20: Faixa dinâmica linear, faixa linear de trabalho, Limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) para o método de quantificação de Sb^{III} empregando HG-AAS

Parâmetro	Valor ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Faixa dinâmica linear	0,17 – 6,00
Faixa linear de trabalho	0,17 – 3,70
LD	0,05
LQ	0,17

3.2.2.4. Tendência e precisão

Ensaio de recuperação foram utilizados para estimar a tendência do método, enquanto a precisão do método foi medida por meio da repetibilidade, sendo expressa pelo DPR. A tendência e a repetibilidade foram avaliadas em três níveis de concentração, baixo, médio e alto. Para cada concentração foram preparadas 7 replicatas independentes. Os valores obtidos que estão de acordo com os valores aceitáveis pela AOAC dentro da faixa de concentração analisada (Tabela 3-21).

Tabela 3-21: Valores de repetibilidade e tendência obtidos na validação do método de determinação de Sb^{III} por HG-AAS (n = 7)

[Sb ^{III}], $\mu\text{g L}^{-1}$	Tendência, %	Critério de aceitação*, %	Repetibilidade, DPR%	Critério de aceitação*, DPR%
0,2	108,1	40 – 120	20,1	30
1,6	88,1	60 – 115	9,1	21
3,7	86,7	60 – 115	9,1	21

* Fonte: AOAC, 2012.

3.3. Quantificação de Sb total e Sb^{III} em amostras comerciais

Sb total, Sb^{III}, e Sb^V, por diferença, foram quantificados em amostras de Glucantime[®] de diferentes lotes (L78259; L205105; L246882) usando condições otimizadas (Tabela 3-22). A concentração de Sb total determinada nas três amostras

variou de 80,1 a 101,1 mg mL⁻¹ (valor nominal de 81 mg mL⁻¹). Na determinação do Sb^{III}, os resultados variaram de 0,08 a 0,17 mg mL⁻¹, o que corresponde a percentuais de 0,08 a 0,21% em relação ao Sb total. Esses resultados são equivalentes a outros encontrados na literatura relatando concentrações de Sb^{III} menores que 0,3 mg mL⁻¹ (SANTOS et al., 2009; LUKASZCZYK e ZYRNICKI, 2010; SEBY et al., 2012). Em publicações anteriores, foram relatados níveis de Sb^{III} em AM comercial variando de 1,7 a 15,5 mg mL⁻¹, (FLORES et al., 2002; 2003; FRANCO et al., 1995; RATH et al., 1997; GONZÁLEZ et al., 2005; 2006; 2007; RENEDO e MARTINEZ, 2007) sugerindo uma adaptação no processo de fabricação do Glucantime[®] para controlar a redução do antimônio pentavalente.

Tabela 3-22: Concentração de Sb total e Sb^{III} determinadas em amostras de Glucantime[®] usando o procedimento proposto. Resultados expressos como média ± desvio padrão (n = 3); os valores entre parênteses são as porcentagens de Sb^{III} em relação a Sb total

Amostras	[Sb total], mg mL ⁻¹	[Sb ^{III}], mg mL ⁻¹ (%)
L78259	83,4 ± 1,9	0,14 ± 0,01 (0,17)
L205105	80,1 ± 1,3	0,17 ± 0,01 (0,21)
L246882	101,1 ± 2,9	0,08 ± 0,04 (0,08)

4. Conclusões

Um procedimento de especificação de antimônio inorgânico em amostras de antimoniato de meglumina utilizadas no tratamento da leishmaniose foi desenvolvido e avaliado. No desenvolvimento do método analítico, o uso de DOE nos permitiu atingir a condição de maior intensidade do sinal analítico com um número reduzido de ensaios, além de fornecer informações sobre a interação entre as variáveis avaliadas, o que no desenvolvimento do método de determinação Sb^{III} foi crucial para encontrar a condição ideal de análise com o uso de uma concentração de ácido cítrico mais baixa. O uso de ácido cítrico em concentrações mais baixas eliminou problemas relatados em algumas publicações, como a necessidade de limpeza periódica das células de quartzo para manter a sensibilidade (FLORES et al., 2002; 2003) e a

necessidade de medir uma solução analítica em branco após cada determinação de Sb para corrigir efeitos de memória (FLORES et al., 2002). Assim, não houve perda na frequência analítica de uma amostra por minuto (45 s de retardo e 15 s de leitura em triplicata), preservando-se também a robustez do método. Mesmo em concentrações mais baixas, o ácido cítrico manteve a capacidade de suprimir os sinais de Sb^V presentes em concentrações aproximadamente 2.000 vezes maiores do que o Sb^{III}. Os métodos foram capazes de quantificar Sb total e Sb^{III} em amostras comerciais e sintéticas de antimoniato de meglumina, e podem ser utilizados no controle de qualidade dessas formulações.

Capítulo 4 – Antimoniato de Meglumina: Otimização dos Métodos de Síntese, Caracterização e Estudo de Estabilidade

1. Introdução

O AM é obtido sinteticamente a partir da reação da meglumina (N-metil-D-glucamina) com o ácido antimônico, sendo este adquirido a partir da diluição de Sb^V em água. O composto é obtido como um pó branco solúvel em água e pouco solúvel em solventes orgânicos (RATH et al., 2003), recomendando-se não exposição à luz para melhor armazenamento (MARSDEN, 1985).

O ácido antimônico não pode ser isolado como uma fase pura, é um ácido relativamente forte ($pK_a = 2,55$) que se condensa para formar polímeros à medida que o pH aumenta (JANDER e OSTMANN, 1962). Ele geralmente é representado como $H[Sb(OH)_6]$ ou $HSbO_3$, em solução. Em condições muito ácidas a espécie predominante é SbO_2^+ e em condições levemente ácida, neutra ou alcalina a principal espécie presente é $Sb(OH)_6^-$ (ou SbO_3^-) (FILELLA et al., 2002).

O processo proposto pela patente Rhône Poulenc (JOAN e CONCEPCIO, 1994) para a síntese de AM parte da reação de Sb_2O_3 com H_2O_2 para produzir pentóxido de antimônio (Sb_2O_5) e, em seguida, hidrolisá-lo para obter o ácido antimônico. Outros métodos sintéticos foram descritos para a preparação de AM utilizando como fonte de Sb^V o $SbCl_5$ (DEMICHELI, 1999; DE MORAIS-TEIXEIRA et al., 2008) e o $KSb(OH)_6$ (DEMICHELI e FRÉZARD, 2001). O AM obtido a partir de $KSb(OH)_6$ (AM- $KSb(OH)_6$) continha uma quantidade 10 vezes menor de Sb^{III} residual do que aquelas encontradas nos compostos preparados a partir de $SbCl_5$ (AM- $SbCl_5$) e em diferentes lotes comerciais (DEMICHELI e FRÉZARD, 2001). Além disso, o AM- $KSb(OH)_6$ levou a um nível mais baixo de apoptose no fígado após a administração parenteral em camundongos com LV, quando comparado ao Glucantime® (KATO et al., 2014). Foi então proposto que a menor toxicidade do AM- $KSb(OH)_6$ pode ser devido à menor quantidade de resíduo Sb^{III} (DZAMITIKA et al., 2006; KATO et al., 2014). Testes comparativos mostraram que formulações sintéticas (AM- $KSb(OH)_6$ ou AM- $SbCl_5$) administradas por via oral (300 mg de Sb/kg de peso corporal/12 h durante 30 dias) em um modelo murino de LV (KATO et al., 2018), e administradas por via

tópica durante 30 dias para o modelo murino de LC (DE OLIVEIRA, 2019), foram tão eficazes no tratamento quanto o Glucantime® usado por via parenteral durante 30 dias.

Neste estudo, foram desenvolvidas as condições experimentais para a síntese do antimoniato de meglumina, utilizando planejamento de experimentos, com o objetivo de se obter um fármaco com menores teores de Sb^{III} para um tratamento mais seguro e eficaz da leishmaniose. Este estudo também teve como foco o desenvolvimento de formulações candidatas para administração oral e tópica, estabelecendo parâmetros mínimos de qualidade para medicamentos usados globalmente na terapia da leishmaniose. Foi avaliado não só a concentração de Sb^{III} gerada, mas também a estabilidade do produto.

2. Materiais e métodos

2.1. Reagentes e materiais

Os seguintes reagentes foram utilizados na síntese do AM: N-Metil-D-glucamina (NMG ou meglumina), cloreto de antimônio(V) (SbCl₅) e ácido clorídrico (HCl), da Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, EUA), hexahidróxido antimoniato de potássio [KSb(OH)₆], da Fluka Chemie GmbH (Buchs, Suíça) e hidróxido de potássio (KOH), da Química Moderna (Barueri, Brasil). Acetona da Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha) foi usada na precipitação do AM.

Na preparação de formulações de AM para uso tópico, o agente gelificante hidroxietilcelulose (HEC), ou Natrosol®, foi obtido da Merck KGaA, (Darmstadt, Alemanha) e o propilenoglicol foi obtido da Vetec Química Fina (Duque de Caxias, Brasil).

Reagentes de alta pureza foram utilizados em todos os experimentos e, no preparo das soluções aquosas, foi utilizada água ultrapura, obtida no sistema Direct-Q 3 (Millipore, Burlington, EUA) com resistividade de 18,2 MΩ cm.

2.2. Equipamentos

A temperatura da reação de síntese do AM foi controlada com bomba aquecedora de imersão recirculante em banho-maria Polyscience (71 - Niles, EUA) e

a solução foi misturada com agitação magnética em aparelho Fisatom (752a - São Paulo, Brasil). As medidas de pH foram realizadas com equipamento Hanna (HI 2221 - Woonsocket, EUA). O SbCl_5 hidratado foi centrifugado por 7 minutos a 4.600 x g em equipamento Eppendorf (5430 R - Hauppauge, EUA) para precipitação do Sb_2O_5 . Um evaporador rotativo Büchi Labortechnik AG (R-114 - Flawil, Suíça), equipado com um banho-maria B-480, foi usado para concentrar as formulações de AM. Uma câmara climática Eletrolab (EL 101/1 - São Paulo, Brasil) foi usada nos testes acelerados de estabilidade. Para medições de massa, foi utilizada uma balança AUX220 Shimadzu (Tóquio, Japão) com precisão de $\pm 0,0001$ g.

As quantificações de Sb total e Sb^{III} nas amostras de AM sintetizadas foram realizadas por HG-AAS com o equipamento e condições operacionais descritos no item 2.2 do capítulo anterior.

2.3. Síntese do antimoniato de meglumina

O AM foi sintetizado a partir de uma mistura equimolar de meglumina e Sb^{V} em água (DEMICHELI et al., 2003). Duas rotas sintéticas diferentes foram avaliadas em função da fonte de Sb^{V} :

(I) SbCl_5 : a hidratação de SbCl_5 foi realizada com água ultrapura em uma reação exotérmica, produzindo ácido clorídrico e pentóxido de antimônio. A mistura foi centrifugada durante 7 minutos a 4.600 força g para precipitar o Sb_2O_5 formado. O sobrenadante foi descartado e o precipitado transferido para um frasco de fundo redondo imerso em banho-maria sob agitação magnética. Depois que a solução atingiu a temperatura do banho, a meglumina foi adicionada.

(II) $\text{KSb}(\text{OH})_6$: o $\text{KSb}(\text{OH})_6$ foi dissolvido em água ultra pura em um frasco de fundo redondo imerso em banho-maria sob agitação magnética a 80 °C, temperatura necessária para a completa dissolução do reagente, já que os sais de hidroxiantimonato de metais alcalinos são moderadamente solúveis em água. Após a dissolução completa, a solução foi resfriada até a temperatura específica da síntese, e a meglumina foi então adicionada.

Em ambas as rotas sintéticas, a solução adquiriu uma cor esbranquiçada após a adição de meglumina. A reação inicia imediatamente com diminuição repentina do pH. Uma vez que o pH da solução pode se tornar básico devido à solubilização da

meglumina, HCl 1,0 mol L⁻¹ foi adicionado por gotejamento até que o pH atingisse o valor próximo a 7. Nessa condição, a reação iniciou imediatamente. O pH foi elevado com a adição de KOH 1,0 mol L⁻¹, mantendo o valor recomendado para a síntese ao longo da reação. O pH foi controlado até a solução clarear e o pH estabilizar. Após o final da reação, o aquecimento e a agitação foram desligados e a solução foi deixada para esfriar. Acetona foi adicionada na quantidade de 3 vezes o volume da solução resultante. Após a precipitação do AM, o sobrenadante era descartado e o precipitado foi seco à temperatura ambiente.

2.4. Caracterização dos AMs sintetizados

Os percentuais dos elementos C, H e N foram determinados nos compostos sintetizados usando um analisador CHN/S Perkin Elmer modelo 2400 (Departamento de Química, UFMG).

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em um equipamento Perkin Elmer FT-IR RX-83303 (Departamento de Química, UFMG), na região de 4500-370 cm⁻¹ e resolução de 2,0 cm⁻¹. As amostras foram preparadas em pastilhas de KBr.

A análise térmica (TG) foi realizada em um equipamento Shimadzu TGA-50. (Departamento de Química, UFMG). Os estudos foram feitos entre 25 e 700 °C, com uma razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹ e com uma vazão média de 50 mL min⁻¹ de nitrogênio.

2.5. Planejamento de experimentos da síntese de AM

A otimização da síntese objetivou a obtenção de compostos AM com baixos teores de Sb^{III}. Como várias variáveis podem influenciar o resultado, um experimento de triagem foi realizado de acordo com um planejamento fatorial fracionário 2⁴⁻¹ (Tabela 4-1) para determinar as variáveis experimentais e as interações que influenciam significativamente o resultado. A significância dos efeitos foi estimada pela ANOVA e pelo teste-*t* por meio do valor de *p* (*p* = 0,05).

Tabela 4-1: Fatores e níveis estudados no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} para a otimização da síntese de AM

Variáveis	Nível baixo (-1)	Nível alto (+1)
Fonte de Sb^{V}	SbCl_5	KSb(OH)_6
Temperatura, °C	55	70
Volume, mL	25	40
pH	6	7

Após os experimentos de triagem, CCD foi aplicado para determinar a condição ótima da síntese do AM, usando duas fontes diferentes de Sb^{V} [SbCl_5 e KSb(OH)_6]. A variável que não teve efeito significativo na resposta foi fixada e as variáveis que afetaram a resposta foram otimizadas simultaneamente empregando-se o CCD. A adequação e significância do modelo quadrático foram avaliadas por ANOVA com nível de confiabilidade de 95%.

Os experimentos de cada planejamento experimental foram realizados aleatoriamente. O software Statistica Versão 10 (2010) foi usado para modelar o planejamento experimental.

2.6. Formulações de AM para tratamento oral e tópico

Após a otimização das condições experimentais da síntese do AM para obtenção de baixos teores de Sb^{III} residual, foram elaboradas formulações para tratamento oral e tópico, escolhendo processos simples e escalonáveis. Os compostos de AM foram sintetizados de acordo com o procedimento descrito no item 2.3 deste capítulo, excluindo-se a etapa de precipitação do AM com acetona. O ajuste da concentração de Sb nos valores de 300 e 850 mg mL^{-1} para as formulações orais e tópicos, respectivamente, foi realizada com o uso de equipamento evaporador rotativo. Para preparar as formulações tópicos, uma mistura 1:1 (v/v) de propilenoglicol e água contendo 2% (m/v) de HEC, foi adicionada à solução de AM (850 mg mL^{-1} de Sb) na proporção de 1:1 (v/v), e a mistura foi mantida sob agitação a 60°C por 30 minutos.

2.7. Determinação do teor de Sb^{III} por HG-AAS

A porcentagem de Sb^{III} em relação à quantidade de Sb total presente nos compostos de AM foi usada como resposta durante a otimização da síntese. Os compostos de AM sintetizados durante a otimização da síntese, conforme item 2.3, foram pesados para preparar soluções estoque de Sb 1,0 g L⁻¹, considerando-se 29,0 % (m/m) como valor teórico da porcentagem de Sb nos compostos. Além disso, a estabilidade de formulações orais e tópicas de AM, preparadas de acordo com o item 2.6, foi avaliada por meio da determinação do teor de Sb^{III}.

Foram preparados padrões intermediários diluindo-se as amostras em água ultrapura. Alíquotas destes padrões intermediários foram adicionadas às soluções de trabalho preparadas de acordo com os métodos otimizados. A diluição foi calculada de forma a garantir que as concentrações finais de Sb fossem próximas de 4,0 µg L⁻¹ e abaixo de 400,0 µg L⁻¹, para os métodos de quantificação de Sb total e Sb^{III}, respectivamente. Os fatores de diluição utilizados foram de 250.000 para Sb total e 3.200 para Sb^{III}, em relação à solução estoque dos compostos de AM preparados durante a otimização, de 21.750.000 para Sb total e 300.000 para Sb^{III}, em relação às formulações orais, e de 30.810.000 para Sb total e 400.000 para Sb^{III}, em relação às formulações tópicas.

As quantificações de Sb total e Sb^{III} foram realizadas em condições otimizadas.

2.8. Estudo de estabilidade das formulações orais e tópicas

Para avaliar a estabilidade em termos de formação de subprodutos tóxicos (derivados de Sb^{III}) e propriedades físico-químicas, como pH, clareza de soluções e osmolaridade (apenas para formulações orais), diferentes formulações foram preparadas e monitoradas por um período de 45 e 90 dias com câmara climatizada mantida a 40 °C, após análise inicial. Testes de comparação múltipla usando ANOVA foram realizados empregando o software Statistica 10 (2010).

3. Resultados e discussão

3.1. Planejamento de experimentos da síntese do antimoniato de meglumina (AM)

A otimização da síntese de AM com o objetivo de minimizar a resposta em termos de teor de Sb^{III}, usou como base o estudo desenvolvido por Demicheli et al. (2003). Compostos de Sb^V [SbCl₅ ou KSb(OH)₆] e meglumina foram utilizados na quantidade de 0,004 mol. Quatro variáveis experimentais e suas interações foram investigadas na formação do Sb^{III}: fonte de Sb^V; temperatura; volume de água; e pH. Nesse sentido, um planejamento fatorial fracionário 2⁴⁻¹ foi feito e cada ensaio foi executado em duplicata (2⁴⁻¹ = 8 ensaios x duplicata = 16 experimentos). A matriz do planejamento experimental desenvolvida e os resultados obtidos em porcentagem de Sb^{III} em relação à quantidade de Sb total presente nos compostos de AM sintetizados em cada experimento são apresentados na Tabela 4-2. Os compostos de AM obtidos nesses experimentos apresentaram teores médios de Sb^{III}, variando de 0,141 a 0,895%.

Tabela 4-2: Matriz do planejamento fatorial fracionário 2⁴⁻¹ da otimização da síntese de AM e teores de Sb^{III} (% em relação ao Sb total) obtidos para os complexos de cada ensaio (n = 2)

Ensaio	Fonte de Sb ^V	Temperatura, °C	Volume, mL	pH	Teor de Sb ^{III} , % (mSb ^{III} /mSb total)	
1	SbCl ₅ (-1)	55(-1)	25(-1)	6(-1)	0,499	0,540
2	KSb(OH) ₆ (+1)	55(-1)	25(-1)	7(+1)	0,128	0,155
3	SbCl ₅ (-1)	70(+1)	25(-1)	7(+1)	0,580	0,789
4	KSb(OH) ₆ (+1)	70(+1)	25(-1)	6(-1)	0,180	0,153
5	SbCl ₅ (-1)	55(-1)	40(+1)	7(+1)	0,762	0,746
6	KSb(OH) ₆ (+1)	55(-1)	40(+1)	6(-1)	0,193	0,199
7	SbCl ₅ (-1)	70(+1)	40(+1)	6(-1)	0,893	0,898
8	KSb(OH) ₆ (+1)	70(+1)	40(+1)	7(+1)	0,189	0,179

A significância dos efeitos foi verificada por meio do gráfico de Pareto (Figura 4-1), que mostra os efeitos representados por barras e o limite de significância (0,05). De acordo com o gráfico de Pareto, apenas a variável pH e sua interação com a fonte de Sb^V não foram significativas, dentro dos níveis estudados, para a resposta com 95% de confiança. O teor de Sb^{III} foi maior quando $SbCl_5$, o nível mais baixo (-), foi usado como fonte de Sb^V . A etapa que mais contribuiu para o alto teor de Sb^{III} nos compostos de AM preparados com $SbCl_5$ foi provavelmente a hidratação desse reagente, no qual $SbCl_5$ foi adicionado a um volume de água ultrapura em uma reação exotermicamente. Além disso, os níveis mais elevados (+) das variáveis volume e temperatura contribuíram para o aumento do teor de Sb^{III} .

O controle de pH foi realizado de forma manual com gotejamento de soluções de KOH e HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. No início das reações (até 3 minutos aproximadamente) o pH se alterava de forma muito abrupta indicando que a reação ocorria vigorosamente. Depois o pH já se alterava de forma mais lenta.

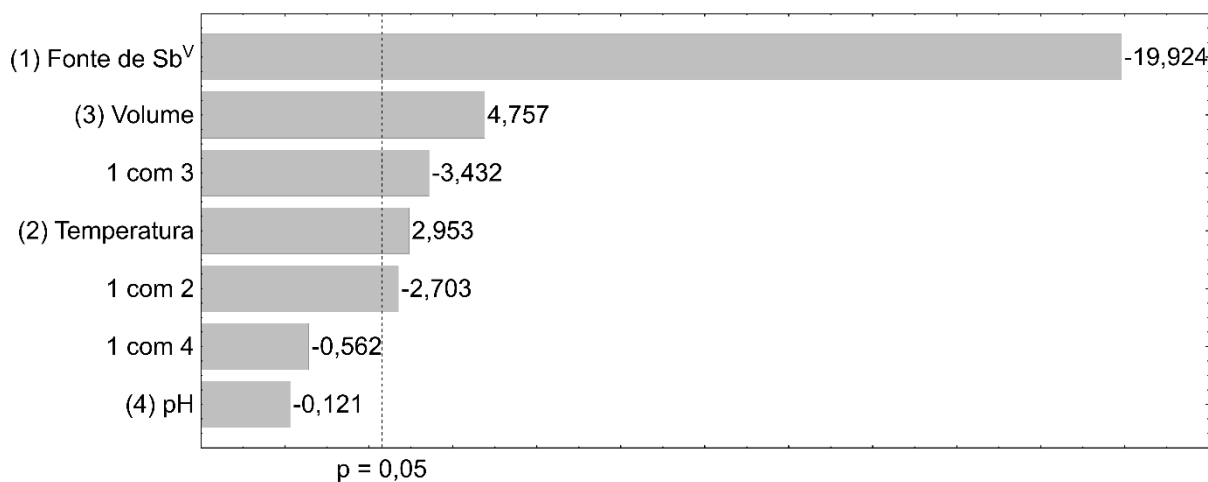


Figura 4-1: Gráfico de Pareto gerado pelo planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} da otimização da síntese de AM

As interações que apresentaram, dentro dos níveis estudados, efeito significativo na resposta foram fonte de Sb^V com temperatura e fonte de Sb^V com volume de água, ambas com sinais negativos. Pode-se concluir que uma maior quantidade de Sb^{III} residual foi obtida utilizando $SbCl_5$ como fonte de Sb^V , e empregando os maiores níveis (+) das variáveis temperatura e volume de água, como pode ser visto nas Figuras 4-2.a e 4-2.b, respectivamente. A mesma tendência pode

ser observada quando se trabalha com $\text{KSb}(\text{OH})_6$, embora não tenha havido mudança significativa na resposta, a 95% de confiança, para afirmar que mais Sb^{III} foi produzido.

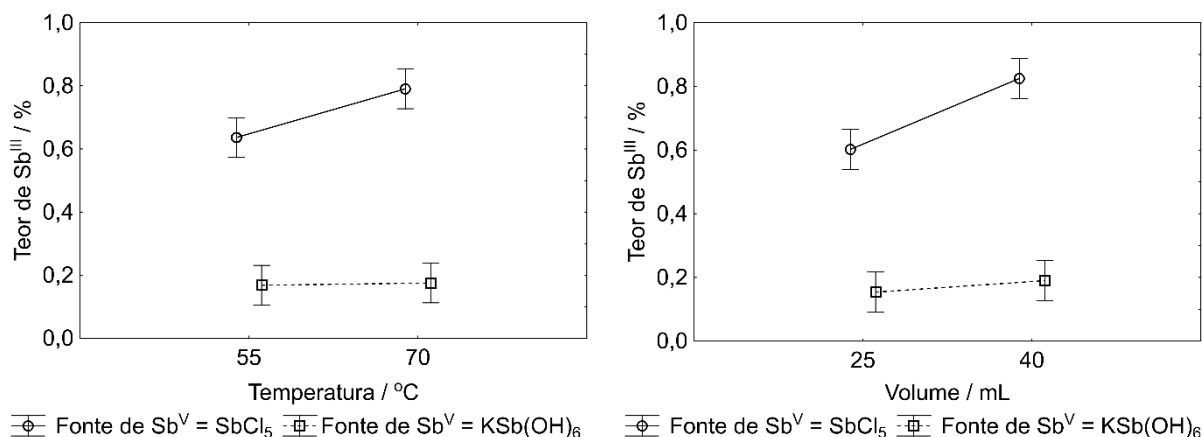


Figura 4-2: Gráfico de médias marginais dos efeitos de interação da fonte de Sb com temperatura (a) e com volume de água (b) para o teor de Sb^{III} . As barras verticais representam intervalos de 95% de confiança.

Embora o experimento de triagem indique que o uso de $\text{KSb}(\text{OH})_6$ como fonte de Sb^{V} foi o fator mais significativo para a obtenção de compostos AM com níveis mais baixos de Sb^{III} residual, duas considerações foram relevantes para manter a rota sintética usando SbCl_5 . A primeira está relacionada com evidências de que os compostos de AM obtidos com SbCl_5 apresentaram melhores resultados nos testes de tratamento da leishmaniose para o modelo murino de LV por via oral (KATO et al., 2018). A outra se deve ao fato de mudança de cor das soluções aquosas dos compostos de AM- $\text{KSb}(\text{OH})_6$ após algumas semanas, indicando uma possível degradação. Para diminuir a contribuição para a formação de Sb^{III} durante a etapa de hidratação do SbCl_5 , o procedimento foi alterado para o gotejamento de água ultrapura em um volume de SbCl_5 , gerando uma quantidade menor de calor.

Modelos CCD foram desenvolvidos para cada rota sintética, considerando apenas os fatores e interações significativos obtidos no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} . O parâmetro pH não foi significativo na resposta dentro dos níveis estudados, por isso foi mantido entre 6 e 7 durante todos os experimentos.

A matriz do planejamento experimental e os resultados obtidos como teor de Sb^{III} relacionado à quantidade de Sb total presente nos compostos de AM sintetizados

em cada experimento das rotas sintéticas via KSb(OH)_6 e via SbCl_5 são mostrados na Tabela 4-3.

Tabela 4-3: Matriz CCD da otimização da síntese de AM e teor de Sb^{III} obtido para os compostos de AM em cada experimento. Os valores entre parênteses são os valores codificados

Ensaio	Volume / mL	Temperatura / °C	Teor de Sb^{III} ^a / %	Teor de Sb^{III} ^b / %
k1	9,6 (-1)	50 (-1)	0,146	0,187
2	22,4 (+1)	50 (-1)	0,196	0,237
3	9,6 (-1)	60 (+1)	0,177	0,207
4	22,4 (+1)	60 (+1)	0,296	0,332
5	7,0 ($-\alpha^c$)	55 (0)	0,296	0,294
6	25,0 ($+\alpha$)	55 (0)	0,135	0,346
7	16,0 (0)	48 ($-\alpha$)	0,165	0,201
8	16,0 (0)	62 ($+\alpha$)	0,174	0,248
PC ^d	16,0 (0)	55 (0)	0,086	0,196
PC	16,0 (0)	55 (0)	0,127	0,172
PC	16,0 (0)	55 (0)	0,124	0,182

^aRota sintética via KSb(OH)_6 ; ^bRota sintética via SbCl_5 ; ^c $\alpha = 1,414$; ^dPC = ponto central.

A ANOVA mostrou que a regressão não foi significativa para o modelo obtido na rota sintética via KSb(OH)_6 , o que pode ser explicado pela baixa dispersão dos resultados nos níveis analisados. Dessa forma, foi selecionado o ponto central como condição ótima para esta síntese, uma vez que um menor teor de Sb^{III} foi obtido nessa condição.

Os parâmetros de qualidade dos modelos podem ser observados na Tabela 4-4. Podemos observar que o modelo CCD do método de síntese de AM via SbCl_5 apresentou regressão significativa e falta de ajuste não significativo, dentro dos níveis estudados, com 95% de confiabilidade.

Tabela 4-4: Parâmetros estatísticos obtidos a partir da ANOVA para o estudo de otimização da síntese de AM utilizando os planejamentos fatorial fracionário 2^{4-1} e composto central ($p = 0,05$)

Planejamento	R^2	$R^2_{\text{máx}}$	Falta de ajuste (valor de p)	Regressão (valor de p)
Fatorial fracionário 2^{4-1}	0,98	0,98	NA*	NA
Composto Central via KSb(OH)_6	0,50	0,98	0,068	0,504
Composto Central via SbCl_5	0,90	0,99	0,108	0,017

*NA = Não se aplica

A Figura 4-3 mostra a superfície de resposta do modelo obtido para a propriedade teor de Sb^{III} nos compostos de AM pela rota sintética via SbCl_5 . A derivada da função que descreve o modelo indica que o teor de Sb^{III} nos compostos de AM atingiu um valor mínimo igual a 0,172% na coordenada de 15,2 mL de volume e 50,9 °C de temperatura, condição selecionada para a o método otimizado.

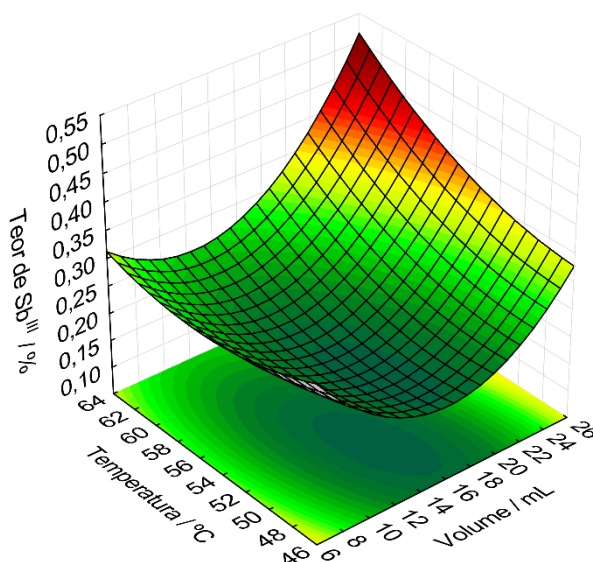


Figura 4-3: Superfície de resposta para a propriedade teor de Sb^{III} em relação a Sb total em compostos sintéticos de AM obtidos via SbCl_5 .

3.2. Caracterização físico-química do antimoniato de meglumina (AM)

3.2.1. Análise Termogravimétrica (TG)

Os complexos AM-KSb(OH)₆ e AM-SbCl₅ foram submetidos à TG (Figuras 4-4.a e 4-4.b, respectivamente). Para ambos resultados é observado uma primeira etapa até aproximadamente 200 °C, correspondente à perda de três moléculas de água de hidratação (valor teórico = 12,87%). A segunda etapa está relacionada com o primeiro estágio da decomposição do composto, ocorrendo próximo a 460 °C. A amostra de AM-KSb(OH)₆ sofreu uma etapa de decomposição próximo a 460 °C, enquanto a amostra de AM-SbCl₅ passa por mais duas etapas de decomposição, próximo a 650 °C e 700 °C. Não ocorreu decomposição completa de ambas amostras até 700 °C, obtendo-se um resíduo de óxidos de antimônio com massa de 40,0% e 32,6% em relação a massa inicial da amostra, para as amostras de AM-KSb(OH)₆ e AM-SbCl₅ respectivamente.

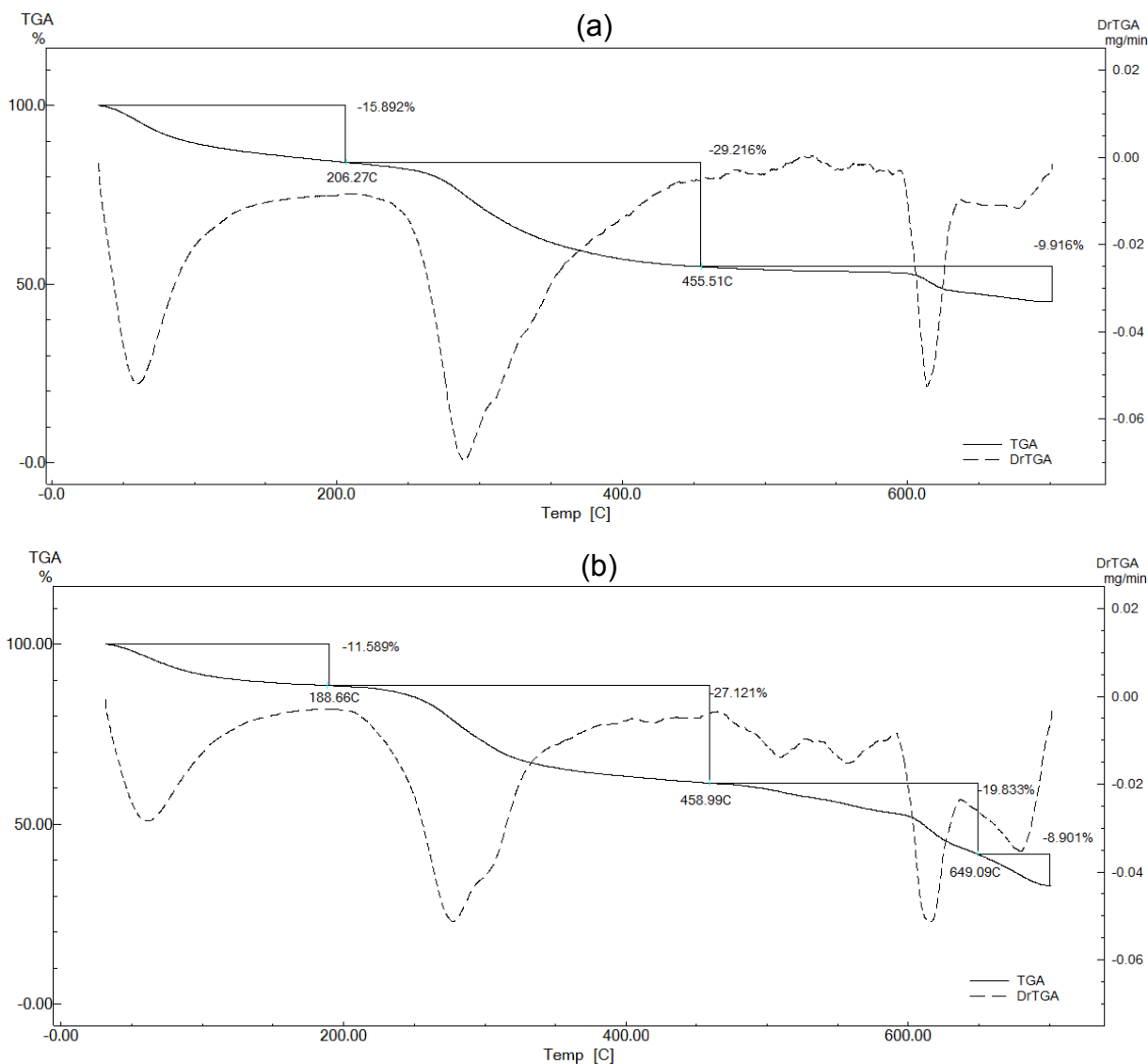


Figura 4-4: Curvas TG e DTG das amostras de (a) AM-KSb(OH)₆ e de (b) AM-SbCl₅.

3.2.2. Microanálises

Como já demonstrado por Demicheli et al (2003), os complexos de AM obtidos nas reações em água possuem relação molar melgumina/Sb^V 1:1. Considerando a presença das moléculas de água indicadas pela análise termogravimétrica, esses dados sugerem a formação de um composto com a fórmula mínima C₇H₁₈O₈NSb.3H₂O. A tabela 4-5 mostra os resultados de percentuais de elementos encontrados na microanálise para os complexos de AM.

Tabela 4-5: Percentuais médios dos elementos C, H, N e Sb encontrados para os complexos de AM, e desvio padrão correspondentes (n = 2)

Complexos	C, %	H, %	N, %	Sb, %
AM-KSb(OH) ₆	20,93 ± 0,07	5,46 ± 0,17	3,49 ± 0,01	32,52 ± 0,12
AM-SbCl ₅	21,66 ± 0,74	5,90 ± 0,43	3,38 ± 0,15	29,45 ± 0,56
Valores Teóricos	20,07	5,70	3,58	29,00

Os resultados da tabela 4-5 mostram que os complexos obtidos apresentam percentuais de elementos muito próximo do valor teórico esperado. Os teores de hidrogênio foram recalculados por um fator de correção após constatar que o equipamento estava informando resultados de teor de hidrogênio cerca de 77% do valor real para reagentes com fórmula mínima conhecida.

3.2.3. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

Os espectros de absorção no infravermelho dos complexos AM-KSb(OH)₆ (Figura 4-5.a) e AM-SbCl₅ (Figura 4-5.b) seguiram os mesmos padrões de outros trabalhos encontrados na literatura (DEMICHELI et al., 1999). A forte absorção entre 3600 e 3100 cm⁻¹, pode estar relacionada à vibração O-H da molécula de água coordenada ao Sb (> 3400 cm⁻¹), e às vibrações de estiramento dos grupos O-H e N-H (< 3400 cm⁻¹). Também se verificou o alargamento das bandas de deformação angular dos grupos O-H, entre 1460 e 1228 cm⁻¹, e C-O, em 1050 cm⁻¹. Outra banda importante na confirmação da complexação do ligante com o Sb aparece em 785 cm⁻¹, que pode ser atribuída à vibração de estiramento assimétrico Sb-O.

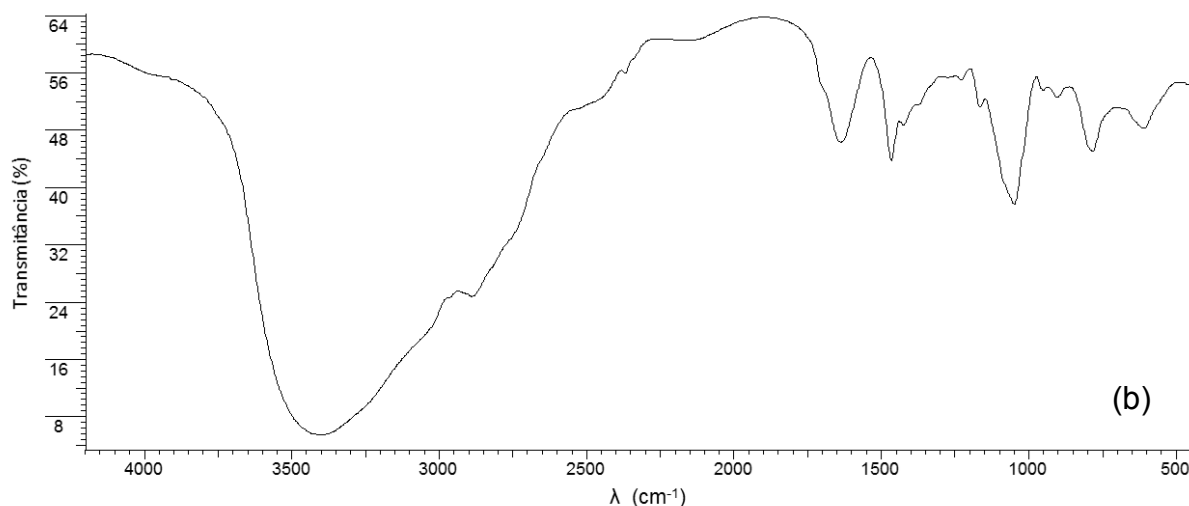
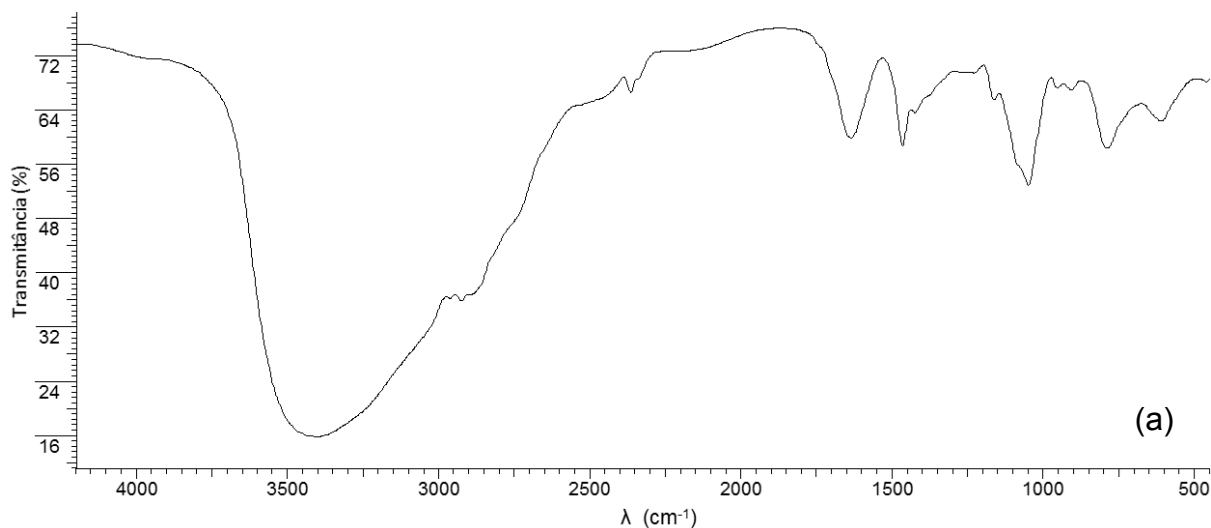


Figura 4-5: Espectros no infravermelho dos complexos AM-KSb(OH)₆ (a) e AM-SbCl₅ (b) obtidos na otimização da síntese.

3.3. Estudo de estabilidade das formulações orais e tópicas

Durante a otimização da síntese do AM, observou-se que as soluções aquosas dos compostos de AM-KSb(OH)₆ apresentaram mudança de cor em poucas semanas. Diante desse fato, decidimos realizar o estudo de estabilidade apenas com os compostos AM-SbCl₅ preparados de acordo com as condições otimizadas em formulações para administração oral (FO1-FO4) e tópica (FT1-FT4). Foram preparadas quatro replicatas de cada formulação, as quais foram divididas em 3 alíquotas para serem analisadas em momentos diferentes a partir da data de fabricação (0, 45 e 90 dias). As formulações e a avaliação dos valores de pH, teor de

Sb^{III} e osmolaridade são apresentadas nas Figuras 4-6 e 4-7. O valor médio para teor de Sb^{III} foi de 0,174% ± 0,056%, o que está muito próximo do teórico (0,172%) previsto na condição ideal. O valor do teor de Sb^{III} obtido na condição otimizada da síntese de AM demonstra o efeito da otimização multivariada na redução dos níveis de Sb^{III}. Em outro estudo, Cabral et al (2008) descreveram o desenvolvimento de uma formulação injetável de AM e obtiveram porcentagens de Sb^{III} em relação a Sb total variando de 1,16 a 4,57%. Em relação ao Glucantime®, as porcentagens relatadas de Sb^{III} em relação a Sb total, variam em grandes ordens de magnitude, de valores entre 0,09 e 0,30% (SANTOS et al., 2009; LUKASZCZYK e ZYRNICKI, 2010; SEBY et al., 2012), a valores superiores a 30%. (SALAÜN e FRÉZARD, 2013).

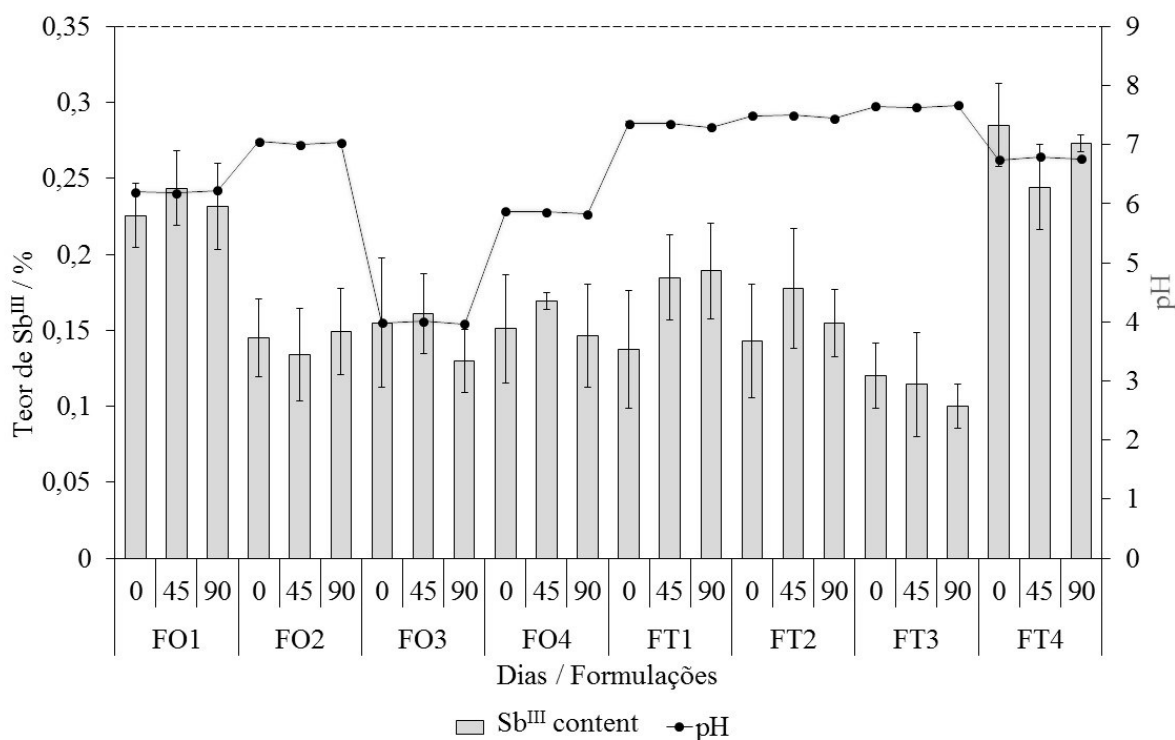


Figura 4-6: Resultados das medidas do teor de Sb^{III} e valores de pH para formulações orais (FO1-FO4) e tópicas (FT1-FT4) de AM durante 90 dias de estudos de estabilidade. As barras verticais representam o desvio padrão.

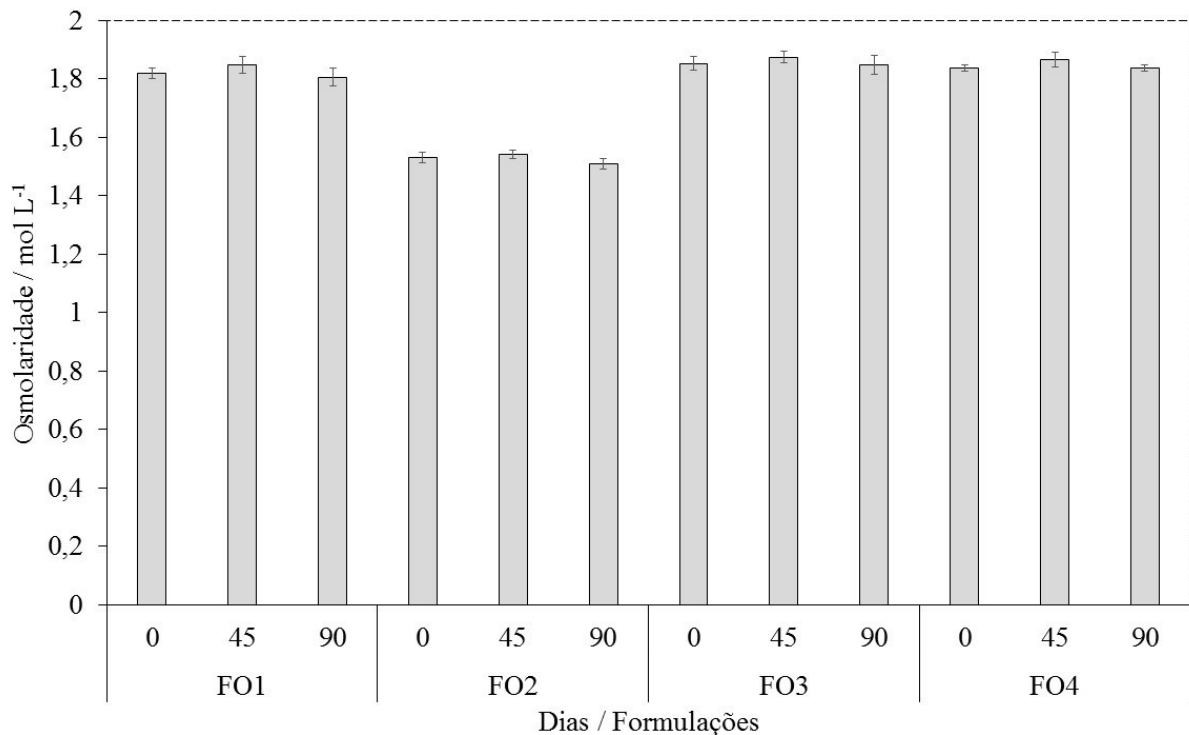


Figura 4-7: Resultados das medidas dos valores de osmolaridade para formulações orais (OF1-OF4) de AM durante 90 dias de estudos de estabilidade. As barras verticais representam o desvio padrão.

Testes de comparação múltipla utilizando ANOVA foram realizados para cada formulação de AM e para cada parâmetro (teor de Sb^{III}, pH e osmolaridade), considerando os dados analisados em 0, 45 e 90 dias. A homogeneidade e a normalidade dos dados foram confirmadas pelos testes de Levene e Shapiro-Wilk, respectivamente. Os valores de *p* para comparações múltiplas, utilizando ANOVA, mostraram que não houve variações significativas de cada parâmetro para as formulações durante os 90 dias com 95% de confiança, confirmando a estabilidade das formulações de AM.

4. Conclusões

Este estudo demonstra a aplicabilidade do DOE na síntese do antimoniato de meglumina para obtenção de um composto com menores níveis de Sb^{III} residual para um tratamento mais eficiente e seguro da leishmaniose. O procedimento de triagem por meio do planejamento fatorial fracionário 2⁴⁻¹ indicou que, entre variáveis

avaliadas, a fonte de Sb^{V} apresentou impacto significativo e negativo dentro dos níveis estudados, enquanto o volume de água e a temperatura apresentaram impacto significativo e positivo na formação de Sb^{III} , dentro dos níveis estudados com 95% de confiabilidade. A otimização da síntese visando a redução do teor de Sb^{III} foi realizada por meio do CCD para ambas rotas sintéticas. O modelo CCD da síntese via $\text{KSb}(\text{OH})_6$ não apresentou regressão significativa devido à baixa variabilidade na resposta para os níveis estudados. O ponto central, nível que apresentou menores teores de Sb^{III} nos compostos de AM ($0,112 \pm 0,023\%$), foi selecionado como condição ótima para esta rota sintética. Já o modelo CCD via SbCl_5 apresentou regressão significativa e falta de ajuste não significativo. A condição ótima para obtenção de menores teores de Sb^{III} foi atingida utilizando volume de 15,2 mL e temperatura de 50,9 °C.

As formulações candidatas para uso oral e tópico foram obtidas e avaliadas quanto à estabilidade acelerada. Testes de comparação múltipla utilizando ANOVA para cada parâmetro estudado (teor de Sb^{III} , pH e osmolaridade) mostraram que não houve mudanças significativas nas formulações durante 90 dias, confirmando a estabilidade das formulações de AM monitoradas a uma temperatura de 40 °C.

Considerações Finais

Neste trabalho propomos realizar o aprimoramento da síntese do antimoniato de meglumina, de forma a obter um fármaco com teores controlados de Sb^{III} residual para utilização no tratamento seguro e eficaz da leishmaniose.

O primeiro passo foi desenvolver métodos analíticos que fossem simples, seletivos, sensíveis, confiáveis e de baixo custo para determinação quantitativa de Sb total e Sb^{III} em fármacos de AM utilizados no tratamento da leishmaniose. Optou-se por fazer uso da técnica HG-AAS por contemplar todas estas características.

Com os métodos otimizados e validados foi possível passar para a etapa de otimização da síntese do AM avaliando a propriedade teor de Sb^{III} em relação à quantidade de Sb total. Duas rotas sintéticas que utilizam fontes diferentes de Sb^{V} foram otimizadas, via $\text{KSb}(\text{OH})_6$ e via SbCl_5 , e para ambas foi possível obter AM com níveis baixos e controlados de Sb^{III} . Apesar dos complexos de AM- $\text{KSb}(\text{OH})_6$ apresentarem menores teores de Sb^{III} residual do que AM- SbCl_5 , este último se mostrou mais estável em solução aquosa, o que ficou demonstrado pelo estudo de estabilidade acelerado.

O emprego de DOE permitiu melhorar o desempenho dos métodos analíticos e da síntese de AM estabelecendo a relevância e a significância estatística dos efeitos das variáveis analisadas, e avaliando os efeitos de interação entre as mesmas. Além disso, possibilitou grande economia de experimentos e, conseqüentemente, de tempo, esforços e custos, ao contrário da otimização univariada.

Os procedimentos otimizados para preparar as formulações de AM são simples e eficientes para viabilizar a produção em larga escala com bom rendimento, níveis controlados de Sb^{III} e baixo custo. Os métodos analíticos desenvolvidos e validados para quantificação de Sb total e Sb^{III} em AM são rápidos, simples, confiáveis, sensíveis e de baixo custo, podendo ser utilizados no controle de qualidade dessas formulações.

Para trabalhos desenvolvidos a partir deste podemos sugerir um estudo *in vivo* para avaliar as atividades antileishmania e citotóxica de formulações tópicas de AM com diferentes teores de Sb^{III} residual, um projeto piloto visando a produção em grande escala, estudos clínicos das formulações orais de AM e estudos de estabilidade de longa duração em câmara climática com controle de umidade, temperatura e radiação luminosa.

Referências Bibliográficas

AGTERDENBOS, J.; BUSSINK, R. W.; BAX, D. A study on the generation of hydrogen selenite and decomposition of tetrahydroborate in HGAAS. **Anal. Chim. Acta.**, 188: 127-135, 1986a.

AGTERDENBOS, J.; VAN NOORT, J. P. M.; PETERS, F. F.; BAX, D. The determination of selenium with hydride generation AAS—III: The role of oxygen and of the cuvette wall. **Spectrochim. Acta B**, v. 41, p. 283-290, 1986b.

ALEGRIA, B.; BARBERA, R.; FARRE, R. Evaluation of antimony, cadmium and lead levels in vegetables, drinking and raw water from different agricultural areas. **Int. J. Environ. Anal. Chem.**, v. 38, p. 65-73, 1990.

ALVAR, J.; CROFT, S.; OLIARO, P. Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. **Adv. Parasitol.**, v. 61, p. 223–274, 2006.

ANDREAE, M. O.; ASMODE, J. F.; FOSTER, P.; VAN'T DACK, L. Determination of antimony(III), antimony(V), and methylantimony species in natural waters by atomic absorption spectrometry with hydride generation. **Anal. Chem.**, v. 53, n. 12, p. 1766–1771, 1981.

ANDREAE, M. O.; FROELICH, P. N. Arsenic, antimony and germanium biogeochemistry in the Baltic Sea. **Tellus B Chem. Phys. Meteorol.**, v. 36, n. 2, p. 101-117, 1984.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). **Official methods of analysis. Appendix D: Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis.** 2002.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). **Official methods of analysis. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements.** 2012

ARIZA, G. J. L.; MORALES, E.; SÁNCHEZ-RODAS, D.; GIRÁLDEZ, L. Stability of chemical species in environmental matrices. **Trends Anal. Chem.**, v. 19, n. 2-3, p. 200-209, 2000.

BALANÍA-FOUCE, R.; REGUERA, R. M.; CUBRIA, J. C.; ORDÓÑEZ, D. The pharmacology of leishmaniasis. **Gen. Pharmacol.: Vasc. S.**, v. 30, n. 4, p. 435-443, 1998.

BAX, D.; VAN ELTEREN, J. T.; AGTERDENDOS, J. The determination of arsenic with hydride generation AAS. A study of the factors influencing the reactions in the absorption cuvette. **Spectrochim. Acta B**, v. 41, n. 9, p. 1007-1013, 1986.

BERMAN, J. D. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. **Rev. Infect. Dis.**, v. 10, n. 3, p. 560-586, 1988.

BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clin. Infect. Dis.**, v. 24, n. 4, p. 684-703, 1997.

BERMAN, J. D.; GROGL, M. Leishmania mexicana: chemistry and biochemistry of sodium stibogluconate (Pentostam). **Exp. Parasitol.**, v. 67, n. 1, p. 96-103. 1988.

BLUM, J.; DESJEUX, P.; SCHWARTZ, E., BECK, B.; HATZ, C. Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 53, n. 2, p. 158-166, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017. Guia para validação de métodos analíticos. **Diário Oficial da União**. Brasília, 25 de julho de 2017, seção 1, pag. 87. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/do1-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412. Acesso em: 14 set. 2020.

BRASIL; Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Ministério da Saúde. **Portaria interministerial nº 1.426, de 11 de julho de 2008**. Brasília, Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=1485867168>. Acesso em: 14 set. 2020.

BRASIL; Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose visceral: Recomendações clínicas para redução da letalidade. **Editora MS**, 2ª ed., 78 p., Brasília, 2009.

CABRAL, L. M.; JULIANO, V. N. M.; DIAS, L. R. S.; DORNELAS, C. B.; RODRIGUES, C. R.; VILLARDI, M.; CASTRO, H. C.; SANTOS, T. C. Speciation of antimony (III) and antimony (V) using hydride generation for meglumine antimoniate pharmaceutical formulations quality control. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 2, p. 130-137, 2008.

CARTER, K. C.; SUNDAR, S.; SPICKETT, C.; PEREIRA, O. C.; MULEN, A. B. The *in vivo* susceptibility of *Leishmania donovani* to sodium stibogluconate is drug specific and can be reversed by inhibiting glutathione biosynthesis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 47, n. 5, p. 1529-1535, 2003

CHRISTENSEN, R.; **Analysis of variance, design and regression – applied statistical methods**, 1 ed., Chapman and Hall/CRC, Nova York, 1996.

CHULAY, J. D., FLECKENSTEIN, L.; SMITH, D. H. Pharmacokinetics of antimony during treatment of visceral leishmaniasis with sodium stibogluconate or meglumine antimoniate. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 82, n. 1, p. 69-72. 1988.

COMANDOLLI-WYREPKOWSKI, C. D.; GRAFOVA, I.; NAIFF, M. D. F.; AVELLA, M.; GENTILE, G.; GRAFOV, A.; FRANCO, A. M. R. Topical treatment of experimental cutaneous leishmaniasis in golden hamster (*Mesocricetus auratus*) with formulations containing pentamidine. **Acta Amazonica**, v. 47, n. 1, p. 39-46, 2017.

CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H. Trypanothione reductase from *Leishmania donovani*. Purification, characterisation and inhibition by trivalent antimonials. **Eur. J. Biochem.**, v. 230, n. 2, p. 460-468. 1995.

DAVIDSON, R. N. Visceral leishmaniasis in clinical practice. **Journal of Infections.**, v. 39, n. 2, p. 112-116, 1999.

DAVIDSON, R. N.; DEN BOER, M.; RITMEIJER, K. Paromomycin. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v. 103, n. 7, p. 653-660, 2009.

DE ALMEIDA, M. C.; VILHENA, V.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Leishmanial Infection: Analysis of its First Steps. A Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 7, p. 861-870, 2003.

DEDINA, J.; TSALEV, D. **Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry**. 1 ed., John Willey & Sons, Nova York, 1995.

DE LIMA, E.B.; PORTO, C.; DA MOTTA, J.O.C.; SAMPAIO, R.N.R. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. **An. Bras. Dermatol.**, v. 82, n. 2, p. 111-124, 2007.

DEMICHELI, C. Processo para preparação de antimoniato de meglumina e de antimoniato gluconato de potássio utilizados no tratamento de protozooses. Titular: Universidade Federal de Minas Gerais. **BR n. PI9907575-0**. Depósito: 9 dez. 1999.

DEMICHELI, C.; DE FIGUEIREDO, T. L.; CARVALHO, S.; SINESTERRA, R. D.; LOPES, J. C. D.; FRÉZARD, F. Physico-chemical characterization of meglumine antimoniate. **Biometals**, v. 12, n. 1, p.63-66, 1999.

DEMICHELI, C.; FRÉZARD, F. Novo processo para preparação de derivados de antimônio. Titular: Universidade Federal de Minas Gerais. **BR n. PI0106305-7**. Depósito: 10 abr. 2001.

DEMICHELI, C.; FRÉZARD, F.; LECOUEY, M.; GARNIER-SUILLEROT, A. Antimony(V) complex formation with adenine nucleosides in aqueous solution. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1570, n. 3, p. 192-198, 2002.

DEMICHELI, C.; OCHOA R.; LULA, I.S.; GOZZO, F.C; EBERLIN, M.N.; FRÉZARD, F. Pentavalent organoantimonial derivatives: two simple and efficient synthetic methods for meglumine antimonate. **Appl. Organomet. Chem.**, v. 17, n. 4, p. 226-231, 2003.

DEMICHELI, C.; SANTOS, L. S.; FERREIRA, C. S.; BOUCHEMAL, N.; HANTZ, E.; EBERLIN, M. N.; FRÉZARD, F. Synthesis and characterization of Sb(V)–adenosine and Sb(V)–guanosine complexes in aqueous solution. **Inorg. Chim. Acta**, v. 359, n. 1, p. 159-167. 2006

DE MORAIS-TEIXEIRA, E.; DE CARVALHO, A. S.; DA COSTA, J. C. S.; DUARTE, S. L.; MENDONÇA, J. S.; BOECHAT, N.; RABELLO, A. *In vitro* and *in vivo* activity of meglumine antimoniate produced at Farmanguinhos-Fiocruz, Brazil, against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L (L.) chagasi* and *L (Viannia) braziliensis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 4, p. 358-362, 2008

DENTON, H.; MCGREGOR, J.C.; COOMBS, G.H.. Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. **Biochem. J.**, v. 381, n. 2, p. 405-412, 2004.

DE OLIVEIRA, A. C. B. **Desenvolvimento de uma formulação tópica do antimoniato de meglumina para o tratamento da leishmaniose cutânea** Dissertação, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

DRITTRICH, K.; MANDRY, R. Investigations into the improvement of the analytical application of the hydride technique in atomic absorption spectrometry by matrix modification and graphite furnace atomisation. Part I. Analytical results. **Analyst**, v. 111, n. 3, p. 269-275, 1986a

DRITTRICH, K.; MANDRY, R. Investigations into the improvement of the analytical application of the hydride technique in atomic absorption spectrometry by matrix modification and graphite furnace atomisation. Part II. Matrix interferences in the gaseous phase of hydride atomic absorption spectrometry. **Analyst**, v. 111, n. 3, p. 277-280, 1986a.

D'ULIVO, A. Chemical vapor generation by tetrahydroborate(III) and other borane complexes in aqueous media - A critical discussion of fundamental processes and mechanisms involved in reagent decomposition and hydride formation. **Spectrochim. Acta B**, v. 59, n. 6, p. 793-825, 2004.

DZAMITIKA, S. A.; FLACÃO, C. A.; DE OLIVEIRA, F. B.; MARBEUF, C. GARNIER-SUILLEROT, A.; DEMICHELI, C.; ROSSI-BERGMANN, B.; FREZARD, F. Role of residual Sb(III) in meglumine antimoniate cytotoxicity and MRP1-mediated resistance. **Chem. Biol. Int.**, v. 160, n. 3, p. 217-224, 2006.

ELLIS, M.; BERNSEN, R.; AALI-ZADEH, H.; KRISTENSEN, J.; HEDSTRÖM, U.; PUGHIAS, L.; BRESNIK, M.; AL-ESSA, A.; STEVENS, D. A. A safety and feasibility study comparing an intermittent high dose with a daily standard dose of liposomal amphotericin B for persistent neutropenic fever. **J. Med. Microbiol.**, v. 58, n. 11, p.1474-1485, 2009.

EMSLEY, J.; **The elements of murder: A history of poison (Hardcover)**. 1 ed., Oxford University Press, Nova York, 2005.

FAIRLAMB, A. H.; CERAMI, A. Metabolism and functions of trypano thione in the Kinetoplastida. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 46, p. 695-729, 1992.

FERREIRA, S. L. C.; DOS SANTOS, W. N. L.; DOS SANTOS, I. F.; JUNIOR, M. M. S. Strategies of sample preparation for speciation analysis of inorganic antimony using hydride generation atomic spectrometry. **Microchem. J.**, v. 114, p. 22–31, 2014.

FERREIRA, C. D. S.; PIMENTA, A. M. C.; DEMICHELI, C.; FRÉZARD, F. Characterization of reactions of antimoniate and meglumine antimoniate with a guanine ribonucleoside at different pH. **Biometals**, v.19, n. 5, p. 573-581, 2006.

FILELLA, M.; BELZILEB, N.; CHEN, Y-W. Antimony in the environment: a review focused on natural waters II. Relevant solution chemistry. **Earth Sci. Rev.**, v. 59, n. 1-4, p. 265-285, 2002.

FOWLER, B. A.; GOERING, P. L. Antimony. In: MERIAN, E., ed. **Metals and their compounds in the environment: occurrence, analysis, and biological relevance**. 1 ed., Wiley VCH, p. 743-750, Weinheim, 1991.

FLORES, E. M. M., DOS SANTOS, E. P.; BARIN, J. S., ZANELLA, R., DRESSLERA, V. L., BITTENCOURT, C. F. Determination of antimony(III) and total antimony by hydride generation atomic absorption spectrometry in samples of injectable drugs used for leishmaniasis treatment. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 17, n. 8, p. 819-823, 2002.

FLORES, E. M. M., PAULA, F. R.; DA SILVA, F. E. B.; DE MORAES, D .P., PANIZA, J. N. G.; DOS SANTOS, E. P.; DRESSLERA, V. L., BITTENCOURT, C. F. Selective Determination of Sb(III) in Drugs by Flow Injection Hydride Generation AAS. **At. Spectrosc.**, v. 24, n. 1, p. 15-21, 2003.

FRANCO, M. A.; BARBOSA, A. C.; RATH, S.; DOREA, J. G. Antimony Oxidation States in Antileishmanial Drugs. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 52, n. 5, p. 435-437, 1995.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; KATO, K. C.; REIS, P. G.; LIZARAZO-JAIMES, E. H. Chemistry of antimony-based drugs in biological systems and studies of their mechanism of action. **Rev. Inorg. Chem.**, v. 33, n. 1, p. 1-12, 2013.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R. R. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2317-2336, 2009.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.;. New delivery strategies for the old pentavalent antimonial drugs. **Expert Opin. Drug Deliv.**, v. 7, n. 12, p. 1343-1358, 2010.

FRÉZARD, F.; MARTINS, P. S.; BARBOSA, M. C.; PIMENTA, A. M.; FERREIRA, W. A.; DE MELHO, J. E.; MANGRUM, J. B.; DEMICHELI, C.. New insights into the chemical structure and composition of the pentavalent antimonial drugs, meglumine antimonate and sodium stibogluconate. **J. Inorg. Biochem.**, v.102, n. 4, p. 656-665, 2008.

FUENTES, E.; PINOCHET, H.; DE GREGORI, I.; POTIN-GAUTIER, M. Redox Speciation Analysis of Antimony Extracts by Hydride Generation Atomic Fluorescence Spectrometry. **Spec. Acta B**, v. 58, n. 7, p. 1279-1289, 2003.

GAINEY, D.; SHORT, S.; MCCOY, K. L. Intracellular location of cysteine transport activity correlates with productive processing of antigen disulfide. **J. Cell Physiol.**, v. 168, n. 2, p. 248-254, 1996.

GONZÁLEZ, M. J.; RENEDO, O. D.; MARTINEZ, M. J. Simultaneous determination of antimony(III) and antimony(V) by UV-vis spectroscopy and partial least squares method (PLS). **Talanta**, v. 68, n. 1, p. 67-71, 2005.

GONZÁLEZ, M. J.; RENEDO, O. D.; MARTINEZ, M. J.; Speciation of Antimony by Adsorptive Stripping Voltammetry Using Pyrogallol Red. **Electroanal.**, v. 18, n. 12, p. 1159-1166, 2006.

GONZÁLEZ, M. J.; RENEDO, O. D.; MARTINEZ, M. J. Speciation of antimony by adsorptive stripping voltammetry using pyrogallol. **Talanta**, v. 71, n. 2, p. 691-698, 2007.

GOURBAL, B.; SONUC, N.; BHATTACHARJEE, H.; LEGARE, D.; SUNDAR, S.; OUELLETTE, M.; ROSEN, B. P.; MUKHOPADHYAY, R. Drug uptake and modulation of drug resistance in Leishmania by an aquaglyceroporin. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 30, p. 31010-31017, 2004.

GUY, A.; JONES, P.; HILL, S. J. Identification and chromatographic separation of antimony species with α -hydroxy acids. **Analyst**, v. 123, n. 7, p. 1513-1518, 1998.

HAILU, W.; WELDEGEBREAL, T.; HURISSA, Z.; TAFES, H.; OMOLLO, R.; YIFRU, S.; BALASEGARAM, M.; HAILU, A. Safety and effectiveness of meglumine antimoniate in the treatment of Ethiopian visceral leishmaniasis patients with and without HIV co-infection. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 104, n. 11, p. 706-712, 2010.

HANSEN, H. R.; PERGANTIS, S. A. Identification of Sb(V)-complexes in biological and food matrices and their stibine formation efficiency during hydride generation with ICP-MS detection. **Anal. Chem.**, v. 79, n. 14, p. 5304-5311, 2007.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). DOQ-CGCRE-008: **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. INMETRO, rev. 9, 2020.

JANDER, G., OSTMANN, H. J., Über die Sauerstoffsäuren des Antimon(V). I. Messungen der Lichtabsorption und des Diffusionsvermögens von Antimonat(V)-lösungen bei verschiedenen Wasserstoffionen-Konzentrationen. **Z. Anorg. Allg. Chem.**, v. 315, n. 5-6, p. 241-249, 1962.

JOAN, F. B.; CONCEPCIO, M. C. New procedure for the preparation of antimononic acid derivatives applicable in the treatment of canine leishmaniasis. **ES Patent 2.050.614**, 1994.

KATO, K. C., MORAIS-TEIXEIRA, E., ISLAM, A., LEITE, M. F., DEMICHELI, C., DE CASTRO, W. V., FRÉZARD, F. Efficacy of meglumine antimoniate in a low polymerization state orally administered in a murine model of visceral leishmaniasis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 62, n. 8, e00539-18, 2018. Disponível em: <https://aac.asm.org/content/aac/62/8/e00539-18.full.pdf>. Acesso em: 14 set. 2020.

KATO, K. C.; MORAIS-TEIXEIRA, E.; REIS, P. G.; SILVA-BARCELLOS, N. M.; SALAÛM, P.; CAMPOS, P. P.; CORRÊA-JUNIOR, J. D.; RABELLO, A.; DEMICHELI, C.; FRÉZARD, F. Hepatotoxicity of Pentavalent Antimonial Drug: Possible Role of Residual Sb(III) and Protective Effect of Ascorbic Acid; **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 58, n. 1, p. 481-488, 2014.

KOTHARI, H.; KUMAR, P.; SUNDAR, S.; SINGH, N. Possibility of membrane modification as a mechanism of antimony resistance in *Leishmania donovani*. **Parasitol. Int.**, v.56, n. 1, p. 77-80, 2007.

LAWN, S. D.; ARMSTRONG, M.; WHITTY, C. J. Electrocardiographic and biochemical adverse effects of sodium stibogluconate during treatment of cutaneous and mucosal leishmaniasis among returned travellers. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 100, n. 3, p. 264-269, 2006.

LÉGARÉ, D.; RICHARD, D.; MUKHOPADHAY, R.; STIERHOF, Y. D.; ROSEN, B. P.; HAIMEUR, A.; PAPADOPOULOU, B.; OUELLETTE, M. The *Leishmania* ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metalthiol transporter ATPase. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 8, p. 26301-26307, 2001.

LIMA; E. B. D.; PORTO, C.; DA MOTTA, J. O. C.; SAMPAIO, R. N. R. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. **An. Bras. Dermatol.**, v. 82, n. 2, p. 111-124, 2007.

LUKASZCZYK, L.; ZYRNICKI, W. Speciation analysis of Sb(III) and Sb(V) in antileishmaniotic drug using Dowex 1 x 4 resin from hydrochloric acid solution. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 52, n. 5, p. 747-751, 2010.

MARSDEN, P. D. Pentavalent antimonials: old drugs for new diseases. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 18, n. 3, p. 187-198, 1985.

MARSDEN, P. D. Personal experience with diagnostic and therapeutic aspects of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Tres Bracos. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 89, n. 3, p. 485-487, 1994.

MASSART, D. L.; VANDEGINSTE, B. G. M.; BUYDENS, L. M. C.; JONG, S.; LEWI, P. J.; SMEYERS-BERBEKE, J. **Handbook of chemometrics and qualimetrics: Part A**. 20 ed., Elsevier Science B. V., Amsterdam, 1998.

MIEKELEY, N.; MORTARI, S. R.; SCHUBACH, A. O. Monitoring of total antimony and its species by ICP-MS and on-line ion chromatography in biological samples from patients treated for leishmaniasis. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 372, n. 3, p. 495-502, 2002.

MITROPOULOS, P., KONIDAS, P., DURKIN-KONIDAS, M. New World cutaneous leishmaniasis: Updated review of current and future diagnosis and treatment. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 63, n. 2, p. 309-322, 2010.

MOHAMMAD, B.; URE, A. M.; REGLINSKI, J.; LITTLEJOHN, D. Speciation of antimony in natural waters : the determination of Sb(III) and Sb(V) by continuous flow hydride generation-atomic absorption spectrometry. **Chem. Spec. Bioavailab.**, v. 2, n. 3, p. 117-122, 1990.

MOON, S.; JAMBERT, E.; CHILDS, M.; VON SCHAEOEN-ANGERER, T. A win-win solution?: A critical analysis of tiered pricing to improve access to medicines in developing countries. **Global. Health**, v. 7, n. 39, 2011. Disponível em: <https://globalizationandhealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/1744-8603-7-39>. Acesso em: 14 set. 2020.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C.; ANDERSON-COOK, C. M. **Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments**. 4 ed., John Wiley & Sons, Inc., Nova Jersey, 2002.

NARSITO, A. J.; AGTERDENBOS, J. A study of arsenic(III) and arsenic(V) reduction and of arsine decomposition in hydride-generation atomic absorption spectrometry. **Anal. Chim. Acta**, v. 197, n. C, p. 315-321, 1987.

NARSITO, A. J.; AGTERDENBOS, J.; SANTOSA, S. J. Study of processes in the hydride generation atomic absorption spectrometry of antimony, arsenic and selenium. **Anal. Chim. Acta**, v. 237, n. C, p.189-199, 1990.

NETO, B. B.; SCARMINIO, E. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 3 ed., Editora da Unicamp, Campinas, 2003.

OMS (Organização Mundial de Saúde). **Control of Leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Committee**. WHO technical report series, nº 949, Geneva, 2010.

OMS (Organização Mundial de Saúde). Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 14 set. 2020.

OLLIARO, P. L., GUERIN, P. J., GERSTL, S., HAASKJOLD, A. A., ROTTINGEN, J. A., SUNDAR, S. Treatment options for visceral leishmaniasis: a systematic review of clinical studies done in India, 1980–2004. **Lancet**, v. 5, n. 12, p. 763-774, 2005.

OPAS (Organização Pan-Americana da Saúde): Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas: Washington: Organização Pan-Americana da Saúde; 2018. Disponível em: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/34857/LeishReport6_por.pdf?sequence=5&isAllowed=y. Acesso em: 14 set. 2020.

OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resist. Updat.**, v. 7, n. 4-5, p. 257-266, 2004.

PERGANTIS, S. A.; WINNIK, W.; HEITHMAR, E. M.; CULLEN, W. R. Investigation of arsine-generating reactions using deuterium-labeled reagents and mass spectrometry, **Talanta**, v. 44, n. 11, p. 1941-1947, 1997.

PONTE-SUCRE, A.; GAMARRO, F.; DUJARDIN, J-C.; BARRETT, D. M.; LOPEZ-VELEZ, R.; GARCIA-HERNÁNDEZ, R.; POUNTAIN, A. W.; MWENECHANYA, R.; PAPADOPOULOU, B. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 11, n. 12, e0006052, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006052>. Acesso em : 14 set. 2020.

POTIN-GAUTIER, M.; PANNIER, F.; QUIROZ, W.; PINOCHET, H.; GREGORI, I. D. Antimony speciation analysis in sediment reference materials using high-performance liquid chromatography coupled to hydride generation atomic fluorescence spectrometry. **Anal. Chim. Acta**, 553, n. 1-2, p. 214-222, 2005.

RATH, S.; JARDIM, W. F; DOREA, J. G. A simple spectrophotometric procedure for the determination of antimony (III) and (V) in antileishmanial drugs. **Fresen. J. Anal. Chem.**, v. 358, n. 548-550, 1997.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A. IMBRUMITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; DE JESUS, M. N.; MARZAAL, P. C.; DE ANDRADE JUNIOR, H. F.; TEMPONEL, A. G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Quím. Nova**, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

RENEDO, O. D.; MARTINEZ, M. J. A novel method for the anodic stripping voltammetry determination of Sb(III) using silver nanoparticle-modified screen-printed electrodes. **Electrochem. Commun.**, v. 9, n. 4, p. 820-826, 2007.

RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: Uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Quim. Nova**, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.

ROBBINS, W. B., CARUSO, J. A. Development of hydride generation methods for atomic spectroscopic analysis. **Anal. Chem.**, v. 51, n. 8, p. 889-899, 1979.

ROMERO, G. A.; LESSA, H. A.; ORGE, M. G.; MACEDO, V. O.; MARSDEN, P. D. Treatment of mucosal leishmaniasis with aminosidine sulfate: results of two year follow-up. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 31, n. 6, p. 511-516, 1998.

RONDÓN, C.; BURGUERA, J. L.; BURGUERA, M.; BRUNETTO, M. R.; GALLIGNANI, M.; PETIT DE PEFFIA, Y. Selective determination of antimony(III) and antimony(V) in liver tissue by microwave-assisted mineralization and hydride generation atomic absorption spectrometry. **Fre. J. Anal. Chem.**, v. 353, p. 133-136, 1995.

SALAÜN, P.; FRÉZARD, F. Unexpectedly high levels of antimony (III) in the pentavalent antimonial drug Glucantime: insights from a new voltammetric approach. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 405, n. 15, p. 5201-5214, 2013.

SANTOS, V. S.; SANTOS, W. D. R.; KUBOTA, L. T.; TARLEY, C. R. T. Speciation of Sb(III) and Sb(V) in meglumine antimoniate pharmaceutical formulations by PSA using carbon nanotube electrode. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 50, n. 2, p. 151-157, 2009.

SAVOIA, D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 9, n. 6, p. 588-596, 2015.

SEBY, F.; GLEYSE, C.; GROSSO, O.; PLAU, B.; DONARD, O. F. X. Speciation of antimony in injectable drugs used for leishmaniasis treatment (Glucantime®) by HPLC-ICP-MS and DPP. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 404, n. 10, p. 2939-2948, 2012.

SERENO, D.; HOLZMULLER, P.; MANGOT, I; CUNY, G.; OUAISSI, A.; LEMESRE, J. L. Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, n. 7, p. 2064-2069, 2001.

SMITH, A. E. Interferences in the Determination of Elements that Form Volatile Hydrides with Sodium Borohydride Using Atomic-Absorption Spectrophotometry and the Argon-Hydrogen Flame. **Analyst**, v. 100, n. 1190, p. 300-306, 1975.

SOUZA, S. V. C. **Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos**. Tese, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Anal. Chim. Acta**, v. 552, n. 1-2, p. 25-35, 2005.

STATISTICA. **Versão 10**, StatSoft, Inc., USA, 2010.

STURGEON, R. E.; MESTER, Z. Analytical applications of volatile metal derivatives. **Appl. Spectrosc.**, v. 56, n. 8, p. 202-213, 2002.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J.; AGARWAL, D.; RAI, M.; MURRAY, H. W. Single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in India. **N. Engl. J. Med.**, v. 362, n. 6, p. 504-512, 2010.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Paromomycin in the treatment of leishmaniasis. **Expert. Opin. Investig. Drugs**, v. 17, n. 5, p. 787-794, 2008.

SUNDAR, S.; MONDAL, D.; RIJAL, S.; BHATTACHARYA, S.; GHALIB, H.; KROEGER, A.; BOELAERT, M.; DESJEUX, P.; RICHTER-AIRIJOKI, H.; HARMS, G. Implementation research to support the initiative on the elimination of kala azar from Bangladesh, India and Nepal--the challenges for diagnosis and treatment. **Trop Med Int Health**, v. 13, n. 1, p. 25, 2008.

SUNDAR, S.; SINGH, A.; RAI, M.; PRAJAPATI, V. K.; SINGH, A. K.; OSTYN, B., BOELAERT, M.; DUJARDIN, J-C.; CHAKRAVARTY, J. Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. **Clin. Infect. Dis.**, v. 55, n. 4, p. 543-550, 2012.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. **Expert Opin. Pharmacother.**, v. 14, n. 1, p. 53-63, 2013.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. An Update on Pharmacotherapy for Leishmaniasis. **Expert. Opin. Pharmacother.**, v. 16, n. 2, p. 237-252, 2015.

TAKASE, I.; PEREIRA, H. B.; LUNA, A. S.; GRINBERG, P.; CAMPOS, R. C. A Geração Química de Vapor em Espectrometria Atômica. **Quim. Nova**, v. 25, n. 6B, p. 1132-1144, 2002.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas Eletrônicas para Cálculos de Planejamentos Experimentais, um Tutorial, **Quim. Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.

TIMERSTEIN, M. A.; PLEWS, P. I.; WALKER, C. V.; WOOLERY, M. D.; WEY, H. E.; TORAASON, M. A. Antimony induces oxidative-stress and toxicity in cultured cardiac myocytes. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 130, n. 1, p. 41-47, 1995.

URICH, N.; SCHAKED, P.; ZIBERSTEIN, D. Speciation of antimony(III) and antimony(V) in cell extracts by anion chromatography/ inductively coupled plasma mass spectrometry. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 368, n. 1, p. 62-66, 2000.

VERLINDEN, M.; DULSTRA, H. Study of the effects of elements that form volatile hydrides on the determination of selenium by hydride generation atomic absorption spectrometry. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 296, p. 253-258, 1979.

VOGEL, A. I.; MENDHAM, J.; DENNEY, R. C.; BARNES, J. D.; THOMAS, M. J. K. **Análise Química Quantitativa**. 6 ed., LTC, Rio de Janeiro, 2002.

WALKER, J.; SARAVIA, N. G. Inhibition of *Leishmania donovani* promastigote DNA topoisomerase I and human monocyte DNA topoisomerases I and II by antimonial drugs and classical antitopoisomerase agents. **J. Parasitol.**, v. 90, n. 5, p. 1155-1162, 2004.

WYLLIE, S.; CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmaniadonovani*. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 38, p. 39925-39932, 2004.

WYLLIE, S.; FAIRLAMB, A. H. Differential toxicity of antimonial compounds and their effects on glutathione homeostasis in a human leukaemia monocyte. **Biochem. Pharmacol.**, v. 71, n. 3, p. 257-267, 2006.

ZILIJLSTRA, E. E.; MUSA, A. M.; KHALIL, E. A.; EL-HASSAN, I. M.; EL-HASSAN, A. M. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Lancet Infect. Dis.**, v. 3, n. 2, p. 87-98, 2003.

ZHENG, J.; IJIMA, A.; FURUTA, N. Complexation effect of antimony compounds with citric acid and its application to the speciation of antimony (III) and antimony (V) using HPLC-ICP-MS. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 16, n. 8, p. 812-818, 2001.