



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA INDUSTRIAL**

VITOR DANTAS ALVES

**QUANTIFICAÇÃO DE IVERMECTINA EM MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS
POR ESPECTROFLUORIMETRIA ASSOCIADA A QUIMIOMETRIA**

CAMPINA GRANDE - PB

2019

VITOR DANTAS ALVES

**QUANTIFICAÇÃO DE IVERMECTINA EM MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS
POR ESPECTROFLUORIMETRIA ASSOCIADA A QUIMIOMETRIA**

Trabalho de Conclusão de Curso em Química Industrial da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Química Industrial.

Orientador: Prof. Dr. José Germano Vêras Neto

CAMPINA GRANDE - PB

2019

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

A474q Alves, Vitor Dantas.
Quantificação de ivermectina em medicamentos veterinários por espectrofluorimetria associada a quimiometria [manuscrito] / Vitor Dantas Alves. - 2019.
38 p. : il. colorido.
Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Industrial) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências e Tecnologia, 2019.
"Orientação : Prof. Dr. José Germano Vêras Neto, Departamento de Química - CCT."
1. Ivermectina oral. 2. Espectrofluorimetria. 3. Quimiometria. 4. Medicamentos veterinários. I. Título
21. ed. CDD 660

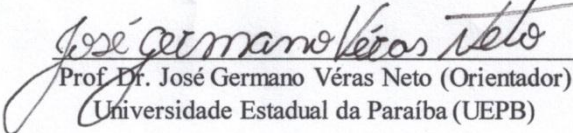
VITOR DANTAS ALVES

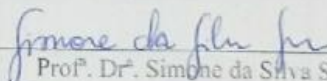
QUANTIFICAÇÃO DE IVERMECTINA EM MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS POR
ESPECTROFLUORIMETRIA ASSOCIADA A QUIMIOMETRIA

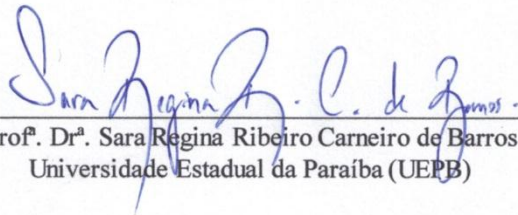
Trabalho de Conclusão de Curso em Química Industrial da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Química Industrial.

Aprovada em: 28/11/2019.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. José Germano Vêras Neto (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)


Prof. Dr. Simone da Silva Simões
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)


Prof. Dr. Sara Regina Ribeiro Carneiro de Barros
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

À minha avó Anália (in memoriam),
por todo amor e ensinamentos os quais
mantereí por toda minha vida, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me conceder discernimento durante todo meu percurso. Por ter colocado pessoas maravilhosas na minha vida, com as quais aprendi muito.

À minha mãe por todo o empenho e investimento durante todos esses anos que culminaram na concretização de mais um objetivo. Por nos momentos os quais me questionava, me recordava meu propósito. Por ser meu exemplo e minha base, juntamente com meu padrasto. Por todas as felicidades que conseguimos nos proporcionar em todos esses anos. Nunca desistindo de mim ou me permitindo desistir.

Às minhas avós Gercina e Anália (*in memoriam*), as quais dedico toda minha jornada, por toda instrução e ajuda na minha construção. Sendo maestras fundamentais no meu desenvolvimento, fontes de ensinamentos e princípios os quais nunca abrirei mão. Por terem me acolhido e feito quem eu sou.

Às minhas irmãs, Laura e Lívia, por me lembrarem constantemente dos meus potenciais e reconhece-los. Apesar de nossas diferenças conseguimos compartilhar experiências, conhecimentos, momentos, frustrações, conquistas e amor. Me permitindo ser, além de um irmão melhor, um amigo.

À Keitson, por toda motivação e em meio aos meus piores momentos consegue enxergar o melhor de mim. Por todo companheirismo que construímos. Por toda compreensão e paciência nos momentos difíceis. Pelos sorrisos e abraços que me fazem ter um porto seguro ao meu lado.

À Letícia e Thamires, por todas as experiências compartilhadas, sendo além de primas, irmãs. Obrigado por serem minhas incentivadoras a seguir com meus sonhos, principalmente o acadêmico. Por todos os puxões de orelha e todos os momentos que vivemos juntos desde que éramos pequenos

Aos meus amigos, Isabelly, Carol, Bruno, Manuella, Ayslana, Carlos e Matheus, por terem compartilhado momentos especiais comigo através de todos esse anos. Aos amigos que graduação me proporcionou, por todo o encorajamento, risadas, compartilhamento de conhecimentos.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Germano Vêras Neto e a Prof^a. Dr^a. Ana Cláudia Dantas de Medeiros por me receberem de braços abertos, pelo incentivo, apoio, confiança e por serem profissionais exemplares e inspiradores. Assim como, a toda equipe do LABDEM e LQAQ pelo esforço ao me ajudar durante o desenvolvimento desse trabalho.

A todos os funcionários da UEPB pela disposição.

A todos que contribuíram de forma direta e indireta na concretização desse sonho.
Agradeço.

*“Por mais que o vento sopra, uma montanha
nunca irá se ajoelhar diante dele.”*

(Mulan)

RESUMO

A ivermectina é um antihelmíntico, do grupo das avermectinas, utilizado mundialmente em animais. Diferentemente dos medicamentos para uso humano, os medicamentos veterinários não dispõem de normas específicas para o controle de qualidade. A falta deste controle pode comprometer a saúde e o tratamento veterinário. Segundo órgãos regulamentadores, como a Farmacopéia Brasileira e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), recomendam métodos cromatográficos para quantificação de fármacos. Entretanto, essas metodologias são destrutivas, de custo elevado e experiência no manuseio do equipamento. Tendo em vista que a espectrofluorimetria é de baixo custo, não degrada as amostras e proporciona análises rápidas. O objetivo deste trabalho foi a construção de um modelo de quantificação de IVM em medicamentos veterinários sob a forma de comprimidos mastigáveis, utilizando espectrofluorimetria como técnica analítica em conjunto a quimiometria. Amostras de IVM, padrão e comerciais, foram analisadas por espectrofluorimetria em uma faixa de 260 a 300 nm de excitação e 300 a 380 nm de emissão, selecionando a região de maior intensidade de sinal, com comprimentos de onda de excitação de 281 a 286 nm e de emissão de 310 a 360 nm. Utilizando calibração multivariada de primeira ordem como Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS) e Regressão pelo método de Componentes Principais (PCR), além de tratamentos prévios, Variação Normal Padrão (SNV) e Savitzky-Golay (SG), para redução de ruídos instrumentais e interferentes. Comparando os modelos criados perante cada pré-tratamento, obtivemos o modelo de PCR, a 284 nm de excitação tratado por derivação de Savitzky-Golay, adequado diante as considerações feitas nos valores de RMSEC (0,492815), RMSECV (1,225903), R^2 (0,999029) e R^2_{cv} (0,993909). Levando em consideração a predição do método mostrou-se eficaz diante as amostras reais, com desvio de 0,5% da concentração de IVM nas amostras comerciais.

Palavras-chave: Ivermectina oral, espectrofluorimetria, validação analítica, quimiometria.

ABSTRACT

Ivermectin is an anthelmintic, avermectin's group, worldwide used in animals. Besides human medicines, pet medications does not have specifically regulations to quality control. The lack of this control can cause health damages and disrupt treatment. According to regulatory agencies, such as Brazilian Pharmacopoeia and Agencia Nacional de Vigilancia Sanitária (ANVISA), recommend medicines quantification by chromatography methods. Although, these methods are destructive, expensive, also, needs operation experience. Spectrofluorimetry is a fast, lower price method and sample conservative. So, the objective was to develop a quantification model of chewable IVM medicines, applying spectrofluorimetry as analytical technique with chemometrics association. Utilizing first-order multivariate calibration, Partial Least Squares (PLS) and Principal Components Regression (PCR). Additionally previous treatment, Standard Normal Variation (SNV) and Savitzky-Golay (SG), to noise reduce and interference. Starting with fluorescence spectral data treatment of a matrix composed of the medicine signal intensity provides by emission (310 to 450 nm) and excitation ranges (200 to 300 nm), the obtained results was satisfying. The model created is considered useful by statistical parameters, RMSEC (0,492815) e RMSECV (1,225903). Considering prediction, the model is efficient to detect real samples, with 0,5% of deviation of IVM's commercial samples.

Keywords: Oral ivermectin, spectrofluorimetry, analytical validation, chemometrics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fórmulas moleculares da IVM.....	15
Figura 2 – Diagrama de níveis de energia comparativo.....	16
Figura 3 – Representação gráfica das Componentes Principais e <i>outliers</i> dos dados.....	18
Figura 4 – Representação das dimensões de respostas instrumentais na calibração analítica.....	19
Figura 5 – Espectro 3D aproximado de IVM.....	25
Figura 6 – Pré-processamento dos espectros.....	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultado dos PLS de acordo com cada pré-tratamento.....	27
Tabela 2 – Resultados dos PCR perante os pré-tratamentos aplicados.....	28
Tabela 3 – Comparação de modelos PLS e PCR.....	29
Tabela 4 – Valores preditos pelo modelo PCR em relação aos reais.....	30

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo Geral	13
2.2 Objetivos Especificos	13
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
3.1 Ivermectina	14
3.2 Espectrofluorimetria	15
3.3 Quimiometria	17
3.3.1 Calibração multivariada	18
3.3.2 Pré-Tratamento de Dados	21
4 METODOLOGIA	22
4.1 Local de realização dos experimentos	22
4.2 Instrumentação	22
4.3 Obtenção dos insumos	22
4.4 Preparo para análises espectrofluorimétricas	22
4.5 Tratamento quimiométrico	23
5 RESULTADOS	24
6 CONCLUSÕES	31
REFERENCIAS	32

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores consumidores de medicamentos de uso veterinário no mundo, com um comércio no ano de 2017 estimado em 20,3 bilhões de reais, correspondendo a 7,7% do faturamento total do mercado de produtos destinados a animais domésticos, de acordo com a Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (ABINPET, 2018). Este volume de mercado representa um crescimento de aproximadamente 7% entre os anos de 2016 a 2017. Neste sentido, os órgãos reguladores das atividades de produção e comercialização de medicamentos veterinários, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) associada ao Ministério da Saúde e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, são instados a fiscalizar número maior de estabelecimentos, tais como indústrias e farmácias de manipulação de medicamentos veterinários.

Dentre os medicamentos veterinários, a Ivermectina (IVM) surge como fármaco de interesse, pois é um potente anti-helmíntico de largo espectro, podendo ser utilizada em diversos animais e seres humanos no controle de doenças parasitárias (SILVA et al, 2017; IEZZI et al, 2017; IDIKA et al, 2017; ANDRADE et al, 2017), além de estudos preliminares como anticancerígeno (JUAREZ et al, 2018). É uma substância do grupo das lactonas macrolíticas, com grupos hidroxila, metoxilas, anéis tetrahidropirano e tetrahidrofurano e ésteres.

Técnicas de análise de produtos farmacêuticos devem ser rápidas, econômicas e que possam ser conduzidas ou em campo ou com mínimo de condições de contorno para manutenção adequada das amostras até chegada aos laboratórios de análise. Neste viés, os estabelecimentos também carecem de procedimentos que atendam aos mesmos requisitos indicados anteriormente e que permitam acompanhar a produção em termos de sua qualidade.

Perante os procedimentos adotados para avaliação da qualidade dos produtos está a quantificação dos princípios ativos dos medicamentos e neste sentido as técnicas comumente utilizadas são as cromatografias, notadamente cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês “High Performance Liquid Chromatography”) e a cromatografia gasosa (GC, do inglês “Gas Chromatography”), associadas a diversos tipos de detectores. Entretanto, estas técnicas analíticas requerem reagentes e manutenção de equipamentos caros, além de pessoal qualificado para executar as análises (ANVISA, 2019).

Neste sentido, o desenvolvimento de métodos que utilizem técnicas analíticas não invasivas e não destrutivas de amostras, sem uso de reagentes, de baixo custo e com velocidade analítica elevada é extremamente importante para os órgãos fiscalizatórios e as próprias indústrias que poderão acompanhar os processos e produtos sem afetar

significativamente os seus custos e poderem responder rapidamente a um desvio da qualidade dos produtos. Dentre as possíveis técnicas que atendam a alguns requisitos citados está a Espectroscopia atômica ou molecular.

Diante disso, a espectrofluorimetria molecular destaca-se pela rapidez, atenuação no uso de reagentes, baixo custo e facilidade no preparo da amostra, reduzindo erros experimentais, comparado com a cromatografia. A associação desta técnica espectrométrica a tratamentos de dados quimiométricos, possibilita a distinção de seus constituintes, geralmente, analito e interferentes.

Pretende-se neste trabalho o desenvolvimento de um método espectrofluorimétrico combinado a calibração multivariada de primeira ordem para quantificar ivermectina em medicamentos veterinários.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um método para quantificação de IVM em medicamentos veterinários mastigáveis por espectrofluorimetria e quimiometria.

2.2 Objetivos Especificos

- Escolher a região espectral adequada para detecção fluorescente de IVM;
- Validar um método analítico para quantificação do fármaco;
- Selecionar e comparar os métodos quimiométricos para quantificação.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Ivermectina

De acordo com a ABINPET - Associação Brasileira de Indústria de Produtos para Animais de Estimação (2019), o mercado veterinário doméstico faturou aproximadamente 20,3 bilhões de reais no ano de 2018, com 17,7% do faturamento total direcionado a medicamentos veterinários. Destes, destacam-se os vermífugos (RIBEIRO et al, 2008) por sua ampla aplicabilidade em animais de todos os portes e destes o princípio ativo de maior uso é a ivermectina.

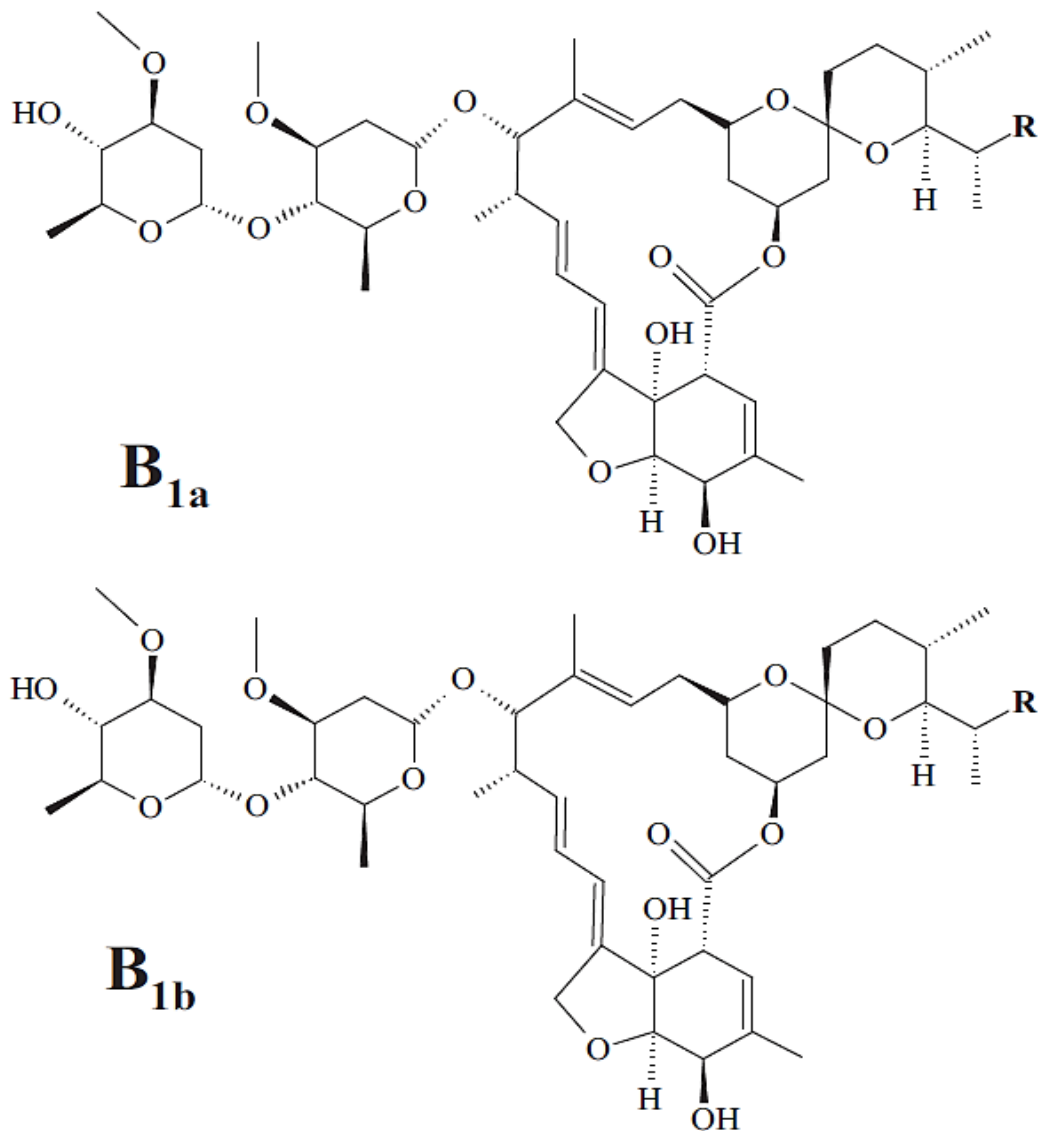
A Ivermectina (IVM) surge como fármaco de interesse por ser potente anti-helmíntico de largo espectro, podendo ser utilizada em diversos animais e seres humanos no controle de doenças parasitárias e de ação anticancerígena. (SILVA et al, 2017; IEZZI et al, 2017; IDIKA et al, 2017; ANDRADE et al, 2017; JUAREZ et al, 2018). É uma substância semissintética, lipossolúvel, de fácil distribuição e com liberação lenta do tecido adiposo (IEZZI et al, 2017).

A IVM faz parte do grupo das lactonas macrolíticas (avermectinas), com grupos hidroxila, metoxilas, anéis tetrahidropirano e tetrahidrofurano e ésteres, matando os parasitas por ativação dos canais de cloreto ligados a glutamato e outros receptores (CHEN; KUBO, 2018). Consiste em uma mistura de dois precursores: 22,23- dihidroavermectina B1a e 22,23- dihidroavermectina B1b. Estes dois se diferenciam pelo grupo orgânico constituinte no carbono 25, sendo, um grupo terc-butila na IVM B1a e um grupo isopropila na IVM B1b, representados na **Figura 1**.

Em termos da quantificação, nos últimos anos a IVM tem sido determinada por meio de técnicas cromatográficas. Silva et al (2017) determinaram o fármaco, com outros resíduos de drogas veterinárias, por UHPL-CMS, coluna 50 mm x 2,1 mm x 1,7 um com temperatura de 35 °C. Fase móvel A de 5 mmol/L de formiato de amônio em água com 0,1% de ácido fórmico e para a fase móvel B foi usado acetonitrila em água (95:5% v/v) com ácido fórmico a velocidade de fluxo de 0,4 mL/min.

Iezzi et al (2017) analisaram IVM em músculo e gordura por HPLC com detecção por fluorescência. A coluna cromatográfica foi de C18 fase reversa e detector de fluorescência com excitação em 365 nm e emissão em 475 nm. A fase móvel consistiu de ácido acético (0,2% em água, v/v), metanol e acetonitrila (5:40:55, v/v/v), bombeado com velocidade de 1,5 mL/min.

Figura 1 – Fórmulas moleculares da IVM.



Fonte: LOURENÇÃO et al, 2016.

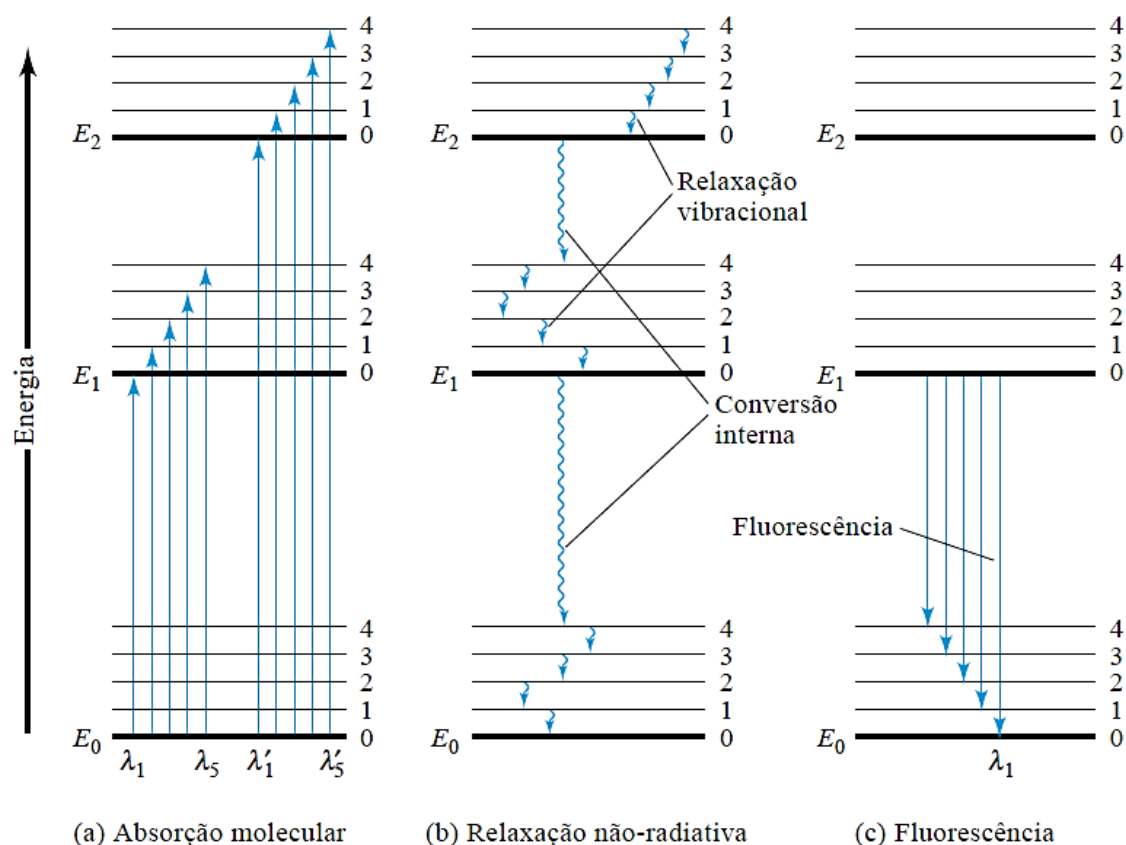
3.2 Espectrofluorimetria

A espectrometria de fluorescência, também conhecida como espectrofluorimetria, é uma ferramenta bastante utilizada pela rapidez, sensibilidade, seletividade e facilidade de manuseio. Essa técnica analítica consiste na exposição da amostra a uma fonte de radiação seguida pela emissão de radiação em comprimentos de onda maiores do que absorvidos, normalmente na região do ultravioleta e do visível.

Por basear-se na excitação de moléculas as quais apresentem o fenômeno de fluorescência. A espectrofluorimetria molecular, geralmente, é aplicada espécies químicas que contenham sistemas sigma ($\Delta\lambda$) conjugados e/ou aromáticos. Assim, excitando-as com comprimento de onda apropriado (λ_{ex}) e medindo sua intensidade da radiação emitida (λ_{em}) (EL-KIMARY, RAGAB, 2018; ANDRADE-EIROA et al, 2010).

A Espectrofluorimetria Total ou Fluorescência de Matriz Excitação-Emissão escaneia emissão enquanto a amostra sofre excitação em comprimento de onda fixo, sendo isto repetido para diversos comprimentos de excitação (MONYEM et al.,2001; TANAJURA, 2016).

Figura 2 – Diagrama de níveis de energia comparativo.



Fonte: SKOOG (2005)

Considera-se que a luminescência molecular ocorre quando o elétron de valência, anteriormente excitado por meio da absorção de energia, volta ao seu estado fundamental pela emissão de um fóton de luz, depois de ser excitado para um nível de energia mais elevado. Portanto, o comprimento de onda da radiação emitida é sempre maior (menos energia) que o comprimento de onda incidente.

Diferentemente da absorção molecular e da relaxação não-radiativa, como observado na **Figura 2**, a fluorescência é perceptível a passagem do estado excitado eletrônico mais baixa energia (E_1) para o estado fundamental (E_0), representando, assim, a emissão de energia após a excitação da molécula.

O uso de fluorescência possibilita discernir tipos de compostos, tendo em vista que a associação dos processos de excitação e emissão de luz caracteriza a identidade das espécies químicas na forma molecular. (LIU et al, 2009). Devido ao grande volume de dados e a relativa complexidade da informação espectral, destaca-se a necessidade de associação desta técnica analítica com a quimiometria.

3.3 Quimiometria

A quimiometria é definida como ramo da química que aplica ferramentas estatísticas e matemáticas para modelagem e tratamento de dados multivariados. (SIMEONOV et al, 2003; OTTO, 2016; SHAFII et al, 2019). É possível utilizar um grande número de algoritmos que permitem atender a demanda de interpretação adequada do conjunto dos dados em termos de explicação de fenômenos nas amostras, mas a primeira ferramenta utilizada deve ser a visualização do grau de proximidade das amostras, das variáveis, o que pode ser feito por meio da Análise de Componentes Principais (PCA) (FERREIRA, 2015).

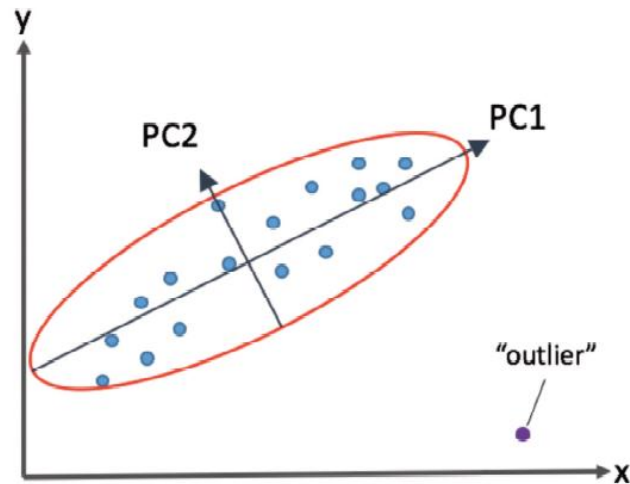
A Análise de Componentes Principais (PCA) contribui para visualização da estrutura de dados, indicando similaridades ou dissimilaridades (*outliers*) entre as amostras e minimiza a dimensão do conjunto de dados, projetando os dados em um sistema de eixos, chamados de Componentes Principais (PC), como mostra a **Figura 3** (SENA et al, 1999; FERREIRA, 2015).

As PCs permitem a interpretação da variação dos dados. De modo que a primeira PC, ou PC1, descreve a máxima variância entre os dados originais e a segunda PC, ou PC2, direciona a máxima variância dos dados em um espaço ortogonal a PC1. Essas duas componentes principais entram no arranjo matemático da PCA representadas na matriz pesos (P), que em produto com a matriz escores (T) determina a matriz de dados (X), associada também a matriz erros (E), na Equação 1 (FERREIRA; 2015;).

$$X = TP^T + E \quad (1)$$

Os escores (T), da Equação (1), referem-se a coordenadas das amostras nos sistemas de eixos formados pelas PC's, como demonstrado na **Figura 3**. Sendo os pesos (P) cossenos dos ângulos entre variáveis originais e as PC.

Figura 3 – Representação gráfica das Componentes Principais e *outliers* dos dados.



Fonte: OLIVEIRA (2018).

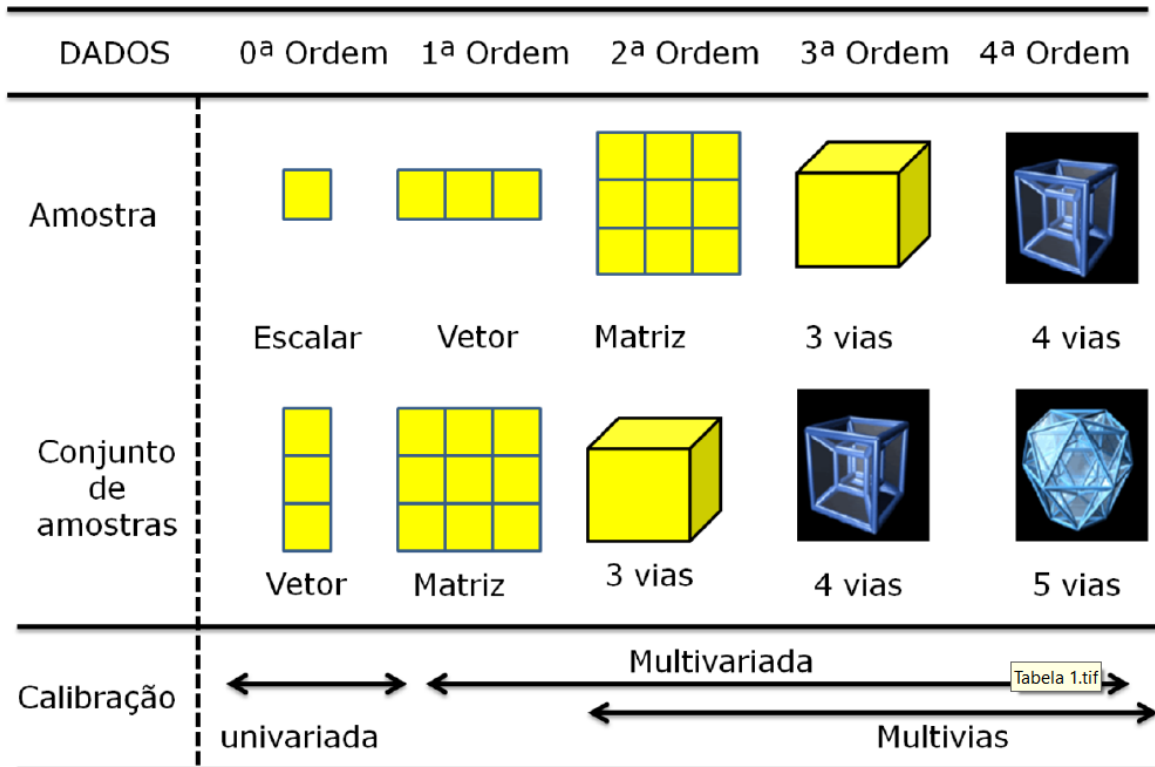
A PCA é utilizada como parâmetro para construção de modelos multivariados de calibração por facilitar a visualização das interações de amostras, entre si, e com interferentes de acordo com cada variável. Em seguida, e de acordo com a perspectiva de obtenção das informações sobre as amostras e/ou variáveis é possível fazer o reconhecimento de padrões por meio de técnicas supervisionadas ou prever propriedades físicas, químicas e/ou físico-químicas e/ou quantificar analitos, utilizando método de calibração multivariada.

3.3.1 Calibração multivariada

A calibração multivariada proporciona a criação de modelos que podem estimar a forma que a detecção do analito se relaciona com outras espécies químicas e/ou variáveis físico-químicas, além de corrigir os efeitos interferentes. Em outras palavras, a calibração multivariada relaciona múltiplas respostas instrumentais com propriedades intrínsecas às amostras. (GEMPERLINE, 2006; BEEBE, 1998).

A calibração analítica é classificada, como mostra a **Figura 4**, de acordo com informação química. Sendo, a calibração univariada, ou de ordem zero, relaciona a resposta instrumental em apenas um meio com as concentrações analisadas. A calibração multivariada apresenta outros meios de relacionar o sinal instrumental e a concentração do analito, essa relação pode aumentar suas vias a medida que são agregadas variáveis. No caso da 1ª ordem, por exemplo, comprimentos de onda são adicionados para a leitura espectral do analito, então a relação entre o espectro e as concentrações da amostra resulta em uma matriz, diferindo da univariada (GOMES, 2015).

Figura 4 – Representação das dimensões de respostas instrumentais na calibração analítica.



Fonte: GOMES (2015).

A calibração multivariada de primeira ordem apresenta técnicas para associação a dados de ordem superior por meio de regressão linear. Sendo algumas dessas, a Regressão Linear Múltipla (MLR, do inglês “Multiple Linear Regression”), Regressão pelo método das Componentes Principais (PCR, do inglês “Principal Component Regression”) e o mais popular, a Regressão por Quadrados Mínimos Parciais (PLSR, do inglês “Partial Least Square Regression”).

O método de MLR, também conhecido como Método Indireto, é considerado o mais simples para calibração multivariada. Combinando linearmente as variáveis presentes na matriz X criada pela PCA, Equação 1, conseguimos obter a variável de interesse Y , na Equação 5 (SENA et al, 1999).

$$X = TP^T + E \quad (1)$$

$$Y = XB + E \quad (5)$$

Em que B representa a matriz com os coeficientes de regressão, E é a matriz de erros nas concentrações, Y sendo a matriz da variável de interesse e X refere-se a matriz das variáveis independentes. Para construção do modelo, o MLR utiliza-se toda informação

contida na matriz \mathbf{X} e isso pode ser uma limitação, caso seja inserida uma quantidade significativa de informações irrelevantes (SENA et al, 1999; FERREIRA, 2015).

A PCR utiliza escores obtidos pela PCA. De modo que, os dados são decompostos da matriz \mathbf{X} . A PCR além de definir o espaço de dimensão reduzida, minimiza ruídos que possam prejudicar o modelo final (FERREIRA, 2015).

$$\mathbf{X} = \mathbf{T}_A \mathbf{L}_A^T + \mathbf{E} \quad (3)$$

$$y = \mathbf{T}_A \mathbf{q} + e \quad (4)$$

Nas Equações 3 e 4, a matriz de pesos \mathbf{L}_A direciona-se ortonormalmente a o espaço-linha e a matriz de escores \mathbf{T}_A é ortogonal ao espaço-coluna de \mathbf{X} . A matriz de resíduos representada por \mathbf{E} . Sendo o vetor \mathbf{q} de regressão estimado pelo método de quadrados mínimos.

A PLSR, proposta por Herman Wold e colaboradores em 1975, é uma técnica de análise de dados multivariados que relaciona uma matriz de variáveis independentes (matriz \mathbf{X}) e outra matriz de variáveis resposta (matriz \mathbf{Y}) incorporando informações de interesse da variável de interesse no cálculo dos fatores. Diferentemente do PCR, ocorre apenas uma etapa, a qual as informações da matriz \mathbf{X} e das variáveis de interesse são levadas em consideração. Aplicando o MLR da PCA da matriz \mathbf{X} e da PCA da matriz \mathbf{Y} , simultaneamente. (SIMÕES, 2008; OLIVEIRA, 2006; BEEB, 1998).

A PLSR possibilita discernir fatores que modelam apropriadamente as variáveis dependentes à \mathbf{Y} . Ainda, assim, proporciona eficiência ao tratamento de conjuntos de dados os quais apresentem variáveis relacionadas e com ruído aleatório interferente. A determinação da variável é feita como uma função de fatores realizados de acordo com a combinação linear de variáveis instrumentais (\mathbf{X}), otimizando a concordância entre \mathbf{X} e \mathbf{Y} , como feito no MLR. Utilizando as Equações 1 e 6.

$$\mathbf{X} = \mathbf{T} \mathbf{P}^T + \mathbf{E} \quad (1)$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{T} \mathbf{Q}^T + \mathbf{F} \quad (6)$$

Compostas pela matriz \mathbf{E} , na equação \mathbf{X} , e o vetor \mathbf{F} , na equação 1, como resíduos dos independentes e das respostas, respectivamente. Os termos \mathbf{P} e \mathbf{Q} são os pesos respectivos da matriz \mathbf{X} e do vetor \mathbf{Y} . Os \mathbf{T} servem como matrizes dos escores para \mathbf{X} e \mathbf{Y} . Decompondo em

escores (T) e pesos (P e Q) é possível a aplicação de diversos tipos de algoritmos, porém apresentam resultados semelhantes.

Concluindo que PLSR realiza associação linear entre os escores da matriz X com os escores da matriz Y, respectivamente apresentados nas Equações 7 e 8, abaixo.

$$U = BT + G \quad (7)$$

$$Y = BTQ^T + H \quad (8)$$

Nas quais os termos B referem-se a matriz de coeficientes de regressão, G à matriz de resíduos dos escores e H a matriz de resíduos de concentração.

3.3.2 Pré-Tratamento de Dados

Os pré-tratamentos dos dados são empregados com o intuito de corrigir problemas em medidas instrumentais provocados por instabilidades durante o uso dos instrumentos, análises realizadas em dias distintos, ruídos instrumentais e espalhamento de radiação. Estes pré-processamentos podem ser executados no conjunto das amostras ou no de variáveis. Vale ressaltar que a seleção do método de pré-tratamento mais adequado para o conjunto de dados tem influência das características da amostra e pelos processos químicos e físicos durante a análise instrumental. Os mais utilizados em termos das variáveis são centralização na média, escalonamento e auto-escalonamento dos dados, normalização e ponderação. Em termos de amostras são frequentemente utilizados como pré-processamentos suavização, correção da linha de base, derivação, dentre outros (BEEBE, 1998).

A suavização e correção da linha de base utiliza a primeira derivada visando otimização dos picos existentes referentes aos sinais originais ou brutos. De modo que a segunda derivada é aplicada para suprimir os efeitos do espalhamento na variação linear da linha de base (do inglês *baseline*). A técnica de Variação Normal Padrão (SNV, do inglês, “Standart Normal Variate”) é utilizada para corrigir efeitos de espalhamento aditivos e interferências provocadas por tamanhos de partículas diversos (FERREIRA, 2015).

Em termos de derivação a mais aplicada como pré-processamento é baseado no algoritmo de Savitzky-Golay (SG). Aplica o parâmetro de janela para calcular o ponto central e efetua, na sequência, um polinômio de grau. Dessa forma, ajusta o valor encontrado anteriormente utilizando média ponderada das variáveis. Repetindo-se em todo o espectro a fim de realizar o alisamento por completo. Deve ser usado cuidadosamente devido a possível introdução de ruídos às informações espectrais (FERREIRA, 2015; BEEBE, 1998).

4 METODOLOGIA

4.1 Local de realização dos experimentos

Os experimentos desse trabalho foram realizados no Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos (LABDEM) e no Laboratório de Química Analítica e Quimiometria (LQAQ). Localizados no prédio das Três Marias (subsolo) do campus I, situado na cidade de Campina Grande, da Universidade Estadual da Paraíba.

4.2 Instrumentação

Durante a realização do trabalho foram utilizados pipetas graduadas calibradas, balança analítica WEBLABOR modelo M214Ai, agitadores magnéticos SOLAR SL – 92, banho ultrassônico USC – 1800 da marca UNIQUE, cubeta de quartzo de quatro faces polidas com capacidade para 3,5 mL do fabricante KASVI, espectrofluorímetro modelo FP-8200 da JASCO.

4.3 Obtenção dos insumos

O preparo das soluções foi executado com uso do padrão farmacêutico de IVM doado por pesquisador parceiro da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Além do solvente etanol P.A. e amostras sólidas de um lote do medicamento veterinário mastigáveis de 12 mg do fármaco.

4.4 Preparo para análises espectrofluorimétricas

As soluções foram obtidas de acordo com o solvente recomendado para IVM pela Farmacopeia Brasileira, o Etanol. Foram preparadas soluções padrão entre as concentrações de 30 e 80 µg/mL, a partir de diluições de uma solução padrão estoque de 100 µg/mL em 6 pontos equidistantes no intervalo citado, em balões de 10 mL.

Soluções de seis amostras comerciais do medicamento foram preparadas diluindo o medicamento em etanol obtendo um volume final de 10 mL e uma concentração de 55 µg/mL. Para auxiliar a dissolução completa do comprimido, as soluções passaram por agitação magnética e banho ultrassônico.

As alíquotas das soluções padrão e das amostras comerciais, em triplicata e com mesmo solvente, foram submetidas a análise no espectrofluorímetro para varreduras de sinais de emissão entre 310 e 380 nm e de excitação 260 e 300 nm.

4.5 Tratamento quimiométrico

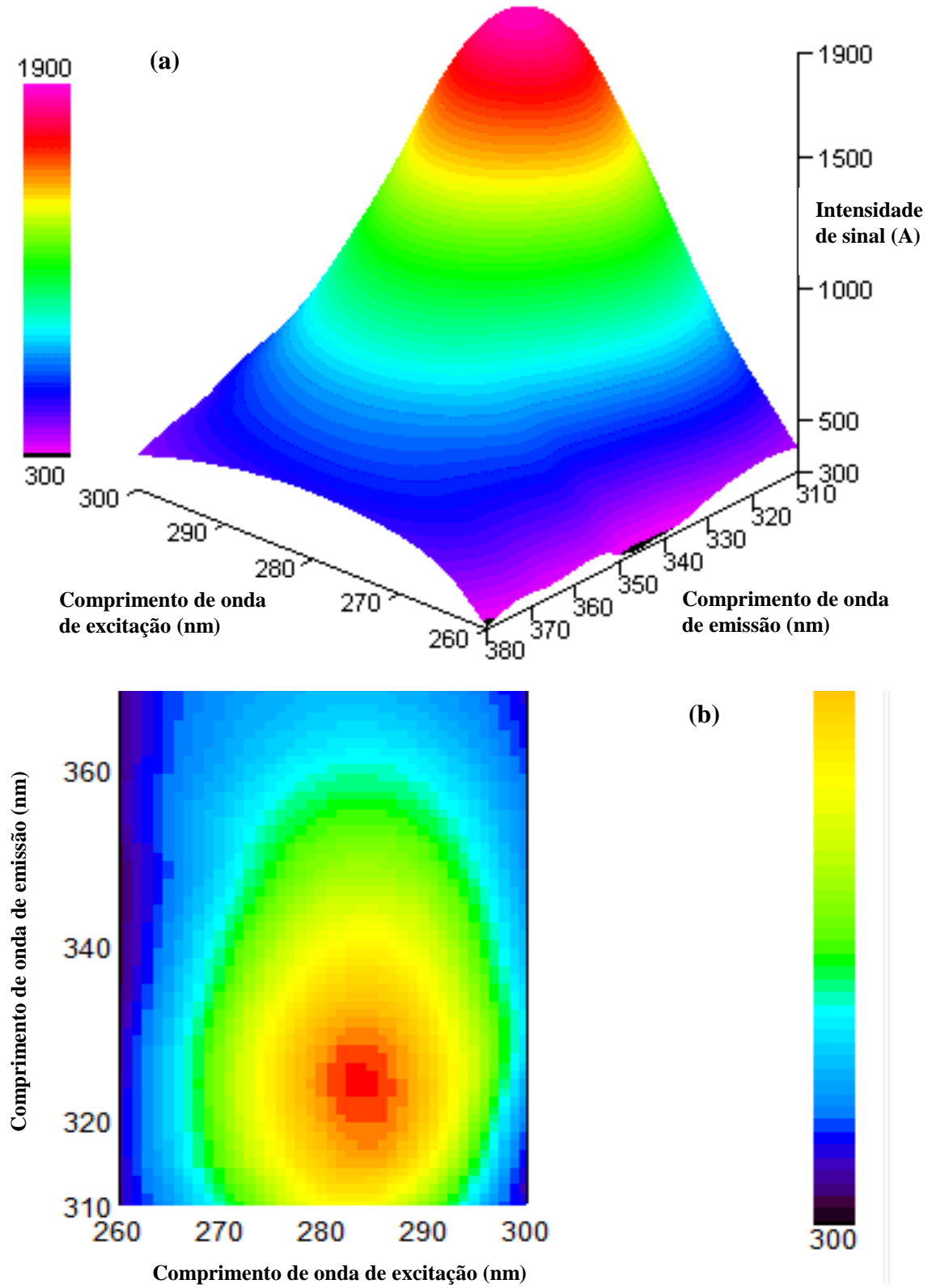
O tratamento das informações químicas provenientes da espectrofluorimetria foram feitas por meio de técnicas quimiométricas de pré-processamento de dados e calibração multivariada de primeira ordem para construção de modelos, utilizando o software Unscrambler® versão 9.7 da CAMO S/A.

A partir dos dados espectrais na faixa de trabalho definida, tratamentos prévios dos dados foram executados, tais como suavização de linha de base, minimização de ruídos e interferências instrumentais. Para isso foram usados SNV e derivação por SG, com 5 janelas e polinômio de 2º grau, nessa etapa. Em seguida, foram construídos os modelos quimiométricos de regressão multivariada de primeira ordem com as técnicas PLS e PCR nos dados brutos e tratados previamente.

5 RESULTADOS

As análises instrumentais realizadas no espectrofluorímetro de concentração distintas, entre 30 e 80 $\mu\text{g/mL}$, de Ivermectina proporcionaram a varredura de espectros de emissão e excitação em relação a intensidade de sinal analítico. Assim, foi possível plotar o gráfico 3D relacionando comprimento de onda de emissão, de 310 a 450 nm, excitação, 200 a 300 nm, e intensidade de sinal (nm) da IVM. Mostrado na **Figura 5a**. Pode-se notar que o sinal o aumento de sinal espectral na forma de intensidade, da coloração roxa até a vermelha e rosa no pico representativo de Ivermectina, à aproximadamente 1900 nm. Assim, foi selecionada essa região de maior intensidade, reduzindo a área trabalhada.

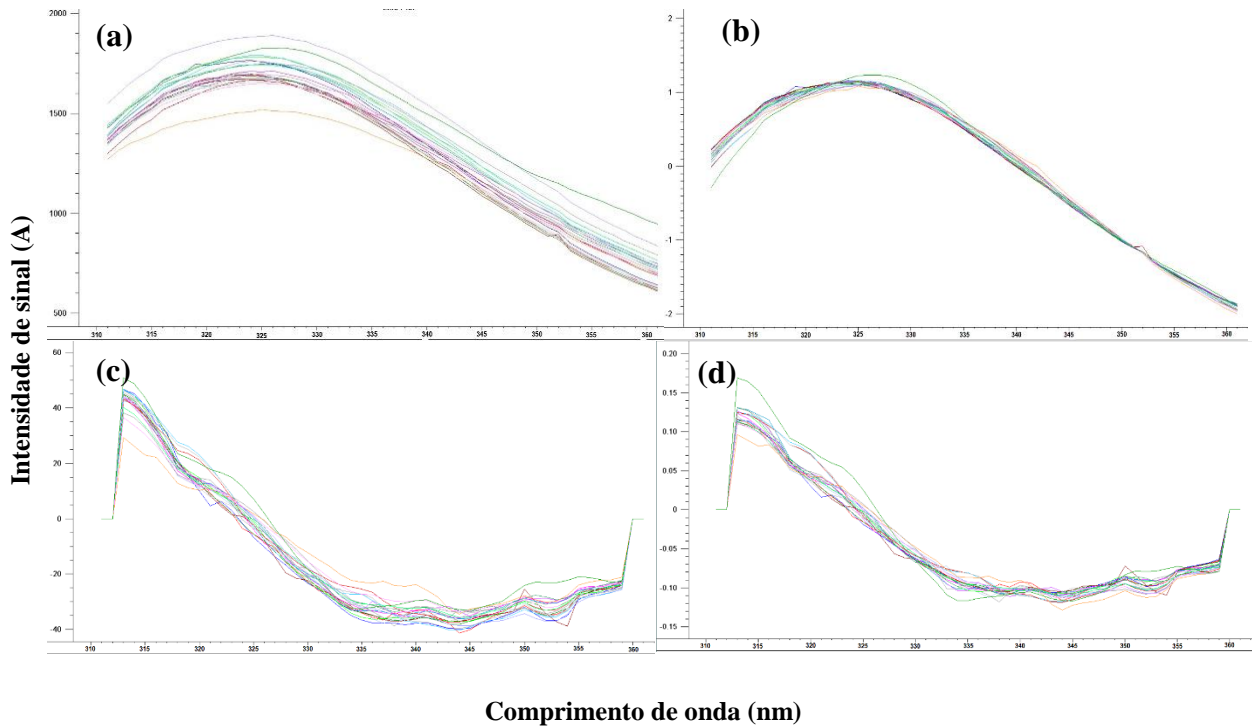
Figura 5. Espectro 3D aproximado de IVM.



Fonte: Dados da pesquisa (2019)

Na **Figura 5b** pode-se perceber a região de maior intensidade entre 281 e 286 nm de excitação e de emissão entre 310 e 360 nm, o qual gerou uma resposta de intensidade mais elevada, sendo o pico máximo na Figura 6a. Para calibração das amostras, foram selecionadas quatro concentrações diferentes, com leituras de sinais realizadas triplicata.

Figura 6 – Pré-processamento dos espectros.



Legenda: **(a)** Dados brutos; **(b)** SVN; **(c)** 1 derivação por SG com 5 janelas e polinômio de 2º grau; **(d)** SNV+SG.

Fonte: Dados da pesquisa (2019).

Posteriormente aos tratamentos dos dados para calibração multivariada dos comprimentos de onda de excitação de 281 a 286 nm e de emissão entre 310 e 360 nm. Com a finalidade de minimizar informações não desejadas e não relacionadas ao objeto de estudo foi utilizada SNV e derivação por SG, separada e conjuntamente, para posterior construção do modelo PLSR.

Os resultados estão indicados na Tabela 1, com as figuras de mérito: Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Calibração (RMSEC, do inglês “Root Mean Square Error of Calibration”) e de Validação Interna (RMSECV, do inglês “Root Mean Square Error of Cross-Validation”), R^2 de calibração e de validação cruzada. É possível observar que apenas os resultados com pré-processamento por derivação Savitzky-Golay obtiveram resultados satisfatórios nos comprimentos de onda de excitação 281, 283 a 286 nm. Para 282 nm de

excitação a junção de pré-tratamentos SNV e S. Golay mostrou-se mais eficazes para a construção de um modelo PLSR, destacado em negrito.

Tabela 1 – Resultado dos PLS de acordo com cada pré-tratamento.

Excitação (nm)	Pré-processamento	Parâmetros				
		VL	RMSEC	R ² Cal	RMSECV	R ² cv
281	BRUTO	3	2,569533	0,973591	3,430529	0,960446
	SNV	2	2,401831	0,976925	3,477136	0,959364
	SG	3	1,329340	0,992932	2,726286	0,975019
	SNV + SG	2	1,487056	0,991155	2,815500	0,973357
282	BRUTO	3	2,603299	0,972892	3,483325	0,959219
	SNV	2	2,411245	0,976744	3,550068	0,957641
	SG	3	1,329340	0,992932	2,726286	0,975019
	SNV + SG	2	0,889514	0,996835	2,986820	0,970016
283	BRUTO	3	2,662304	0,971649	2,554028	0,955470
	SNV	2	2,428018	0,976420	3,594446	0,956475
	SG	2	1,234549	0,993904	2,801110	0,973629
	SNV + SG	2	2,365093	0,977626	3,697390	0,954063
284	BRUTO	3	2,720763	0,970391	3,620898	0,955934
	SNV	2	2,472161	0,97554	3,650630	0,955207
	SG	3	1,241809	0,993832	2,923204	0,971280
	SNV + SG	2	2,499805	0,975005	3,926683	0,948177
285	BRUTO	3	2,787841	0,968913	3,702139	0,953934
	SNV	2	2,502131	0,974958	3,635787	0,955571
	SG	3	1,401399	0,992145	3,145184	0,966752
	SNV + SG	2	2,611741	0,972716	4,047218	0,944947
286	BRUTO	3	2,855669	0,967381	3,786801	0,951803
	SNV	2	2,520036	0,974598	3,587000	0,956755
	SG	3	1,613518	0,989586	3,313548	0,963097
	SNV + SG	2	2,658535	0,971430	4,026463	0,945510

Fonte: Dados da pesquisa (2019).

Tabela 2 – Resultados dos PCR perante os pré-tratamentos aplicados.

Excitação (nm)	Pré-processamento	Parâmetros				
		VL	RMSEC	R ² Cal	RMSECV	R ² cv
281	BRUTO	3	2,764709	0,969426	3,508544	0,958626
	SNV	2	2,768028	0,969353	3,500776	0,958809
	SG	3	2,744766	0,969866	3,553882	0,957550
	SNV + SG	2	3,172645	0,959738	3,817100	0,951029
282	BRUTO	3	2,764709	0,969426	3,508544	0,958626
	SNV	2	2,821618	0,970372	3,446252	0,960082
	SG	3	2,761007	0,969507	3,582942	0,956852
	SNV + SG	2	3,172645	0,959738	3,817100	0,951029
283	BRUTO	3	2,820933	0,968170	3,585412	0,956793
	SNV	2	2,779787	0,969092	3,524086	0,958259
	SG	3	2,874807	0,966943	3,776542	0,952064
	SNV + SG	2	3,235974	0,958115	4,005145	0,946084
284	BRUTO	3	2,865157	0,967164	3,649501	0,955235
	SNV	2	2,770487	0,969298	33,539361	0,957896
	SG	3	0,492815	0,999029	1,225903	0,993909
	SNV + SG	2	3,219484	0,958538	4,115541	0,943072
285	BRUTO	3	2,925232	0,965773	3,732826	0,953168
	SNV	2	2,748522	0,969783	3,519653	0,958364
	SG	2	0,273958	0,999700	2,675790	0,975936
	SNV + SG	2	3,241279	0,957978	4,223539	0,940045
286	BRUTO	3	2,981523	0,964443	3,811749	0,951166
	SNV	2	2,706402	0,970702	3,462224	0,959711
	SG	3	2,909627	0,966137	4,021639	0,945640
	SNV + SG	2	3,132700	0,960746	4,120900	0,942924

Fonte: Dados da pesquisa (2019).

Em seguida, levando em consideração os mesmos tratamentos de dados, construímos um modelo utilizando calibração multivariada de primeira ordem, PCR. Com o intuito de comparar os modelos construídos usando as técnicas quimiométricas assim como feito com PLSR, selecionando o mais coerente.

Destacados em cinza estão representados os melhores resultados dos pré-processamentos seguidos pelo método PCR de cada comprimento de onda referente a excitação. Constatamos que em 284 nm, com suavização de S. Golay, os parâmetros estatísticos foram satisfatórios.

Segundo Dias (2011), usando o RMSEC e RMSECV, podemos escolher o melhor modelo de acordo com as predições para as amostras do conjunto de calibração e de validação, respectivamente. Necessitando que esses parâmetros estatísticos estejam em uma margem aceitável, tendo em vista o decréscimo nesses valores comparados aos resultados de outros pré-processamentos.

O modelo desenvolvido por Marson (2015) usando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectroscopia de Massas Sequencial (CLAE-EM/EM) e PLSR para quantificação de fármacos antimaláricos, como a IVM, apresentou valores de parâmetros estatísticos mostrados na Tabela 3.

Comparando com o modelo cromatográfico de PLS criado por MARSON (2015), podemos perceber que ambos os modelos considerados mais adequados, desenvolvidos a partir da fluorimetria. Os modelos de PLS 282 (SNV+SG) e PCR 284 (SG) apresentam valores duas e três vezes, respectivamente, inferiores de RMSEC, porém, apenas o modelo de PCR mostra-se com RMSECV inferior ao PLS de MARSON (2015).

Tabela 3 – Comparação de modelos PLS e PCR.

Modelos	Parâmetros			
	RMSEC	R ² Cal	RMSECV	R ² cv
PLS 282 (SNV+SG)	0,889514	0,996835	2,986820	0,970016
PCR 284 (SG)	0,492815	0,999029	1,225903	0,993909
MARSON (2015)	1,59	0,92	2,1	0,92

Fonte: Dados da pesquisa (2019).

Comparando os dois melhores modelos, de PLS referente a 282 nm com pré-tratamentos de SNV associado a derivação de SG e de PCR em 284 nm tratado por SG. Podemos observar que o modelo de PCR apresenta valores superiores de R² em 0,25% e R²cv em 2%, e menores valores em 55,4% de RMSEC e 41% de RMSECV diferenciando do PLS. Indicando assim, melhor ajuste de modelo e maior correlação entre valores reais e preditos, na Tabela 4.

Tabela 4 – Valores preditos pelo modelo PCR em relação aos reais.

Modelo	Valores reais	Valores preditos
PCR 284 SG	55	49,985
	55	44,123
	55	91,784
	55	43,638
	55	52,121
	55	50,941
Média	55	55,432
Desvio		0,5%

Fonte: Dados da pesquisa (2019).

Ao avaliar os valores preditos, podemos perceber que há concentrações bem distintas nas amostras comerciais de IVM em relação ao valor real, segundo a predição do modelo. Segundo a Farmacopéia Brasileira (2019), em medicamentos humanos o desvio é considerado aceitável em até 10% da concentração predita do fármaco. Porém, pela falta um parâmetro presente na regulamentação específica para medicamentos veterinários, não pode-se julgar a aceitabilidade das amostras comerciais.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas construções de modelos quimiométricos de calibração multivariada de primeira ordem, utilizando PLSR e PCR, para predizer concentrações de IVM em fármacos veterinários mastigáveis indicaram o modelo PCR de calibração mais adequado. Após pré-tratamentos visando suavizações como SNV e Savitzky Golay.

O modelo criado usando PCR, considerando os parâmetros estatísticos RMSEC, RMSECV, R^2_{Cal} e R^2_{cv} apresentou resultados superiores aos do modelo criado utilizando PLS.

Além de se mostrar um modelo coerente à ao método clássico proposto por Marson (2013), o qual apresenta mais que o triplo de valor em RMSEC e o dobro de RMSECV. Em relação a predição média vemos um desvio de aproximadamente 0,5% apenas dos valores reais.

Com uso da espectrofluorimetria associada a técnicas quimiométricas de calibração analítica de primeira ordem obteve-se a criação de um modelo coerente em seus parâmetros estatísticos para quantificação de IVM em medicamentos veterinários. Tendo em vista a redução de gastos relacionados a técnicas recomendadas pelos órgãos reguladores, como separações cromatográficas, destrutivas e demoradas.

De modo que o método analítico proposto por este trabalho apresentou resultados satisfatórios. Possibilitando o uso do modelo para quantificação de mais lotes amostras comerciais, usando também outro equipamento analítico, para testar a confiabilidade do mesmo criado durante este trabalho.

REFERENCIAS

- ABINPET – Associação Brasileira de Produtos para Animais de Estimação. **Faturamento – Mercado Pet Brasileiro**. 2019. Disponível em: <<http://abinpet.org.br/mercado/>>. Acesso em: 01 de nov. de 2019.
- ALCANTARA-DURAN, J. et al. Matrix-effect free multi-residue analysis of veterinary drugs in food samples of animal origin by nanoflow liquid chromatography high resolution mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 245, p. 29-38, 2018.
- ANDRADE, G.M. et al. **Eficácia da ivermectina comprimido no tratamento da sarnasarcóptica em cães naturalmente infestados**. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 37, n. 4, 245, p. 385-388, 2017.
- ANDRADE-EIROA, A. et al. Critical approach to synchronous spectrofluorimetry. I. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 8, 2010.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para tratamento estatístico da validação analítica**, 2017. Publicado dia 12/09/2017. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/%281%29Guia+10+v1+Tratamento+e+statistico+validacao+analitica.pdf/85b0e965-d72f-4b7c-bd2e-17de13af1976>>. Acesso em 13 jul. 2019.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia Brasileira**, de 24 de julho de 2017. Publicada dia 15 de agosto de 2019. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/farmacopeia-brasileira>>. Acesso em 03 dez. 2019.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da diretoria colegiada – RDC nº 166**, de 24 de julho de 2017. Publicada dia 25 de julho de 2017. Disponível em: <<https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf>>. Acesso em 14 jul. 2019.
- ANZANELLO, M. J. et al. PLS-DA wavenumber selection for the categorization of medicine samples based on multiple criteria. **Forensic Science International**, v. 242, p. 111–116, 2014.
- ARANTES, J. F. M. **Desenvolvimento e validação de métodos para quantificação de ivermectina em medicamentos veterinários**. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas. Campinas. São Paulo. 2011.

BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B. **Chemometrics: a practical guide**. 1 ed. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1998.

CHABALA, J. C. et al. Ivermectin, a New Broad-Spectrum Antiparasitic Agent. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 10, p. 1134–1136, 1980.

CHEN, I.S.; KUBO, Y. Ivermectin and its target molecules: shared and unique modulation mechanisms of ion channels and receptors by ivermectin. **Journal of Physiology**, v. 596, n. 10, p. 1833-1845, 2018.

DEGROODT, J. M.; WYHOWSKI DE BUKANSKI, B.; SREBRNIK, S. Determination of Ivermectin residues in meat and liver by HPLC and Fluorometric Detection. **Jornal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 17, n. 6, p. 1419-1426, 2006.

DIAS, Y. G. **Espectroscopia NIR e Calibração Multivariada Aplicadas ao Controle de Qualidade de Gases Combustíveis Naturais e Derivados do Petróleo**. 2011. 125f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Estadual de Campinas, 2011.

EL-KIMARY, E. I.; RAGAB, M. A. A. Derivative synchronous spectrofluorimetry: Application to the analysis of two binary mixtures containing codeine in dosage forms. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 204, p. 677–684, 2018.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria: Conceitos, Métodos e Aplicações**. 1 ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2015.

GELADI, P.; KOWASLSKI, B. R. Partial Least-Squares Regression: A Tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 185, p. 1-17, 1986.

GEMPERLINE, P. **Practical guide to chemometrics**. 2 ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2006.

GENISHEVA, Z. et al. New PLS analysis approach to wine volatile compounds characterization by near infrared spectroscopy (NIR). **Food Chemistry**, v. 246, n. November 2017, p. 172–178, 2018.

GHOSH, A. et al. Fluorescence lifetime correlation spectroscopy: Basics and applications. **Methods**, v. 140–141, p. 32–39, 2018.

- GOMES, A. A. **Algoritmo das projeções sucessivas para seleção de variáveis em métodos de calibração de ordem superior**. 2015. 127f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.
- HASSOUN, A. et al. Fluorescence spectroscopy as a rapid and non-destructive method for monitoring quality and authenticity of fish and meat products: Impact of different preservation conditions. **LWT – Food Science and Technology**, v. 103, p. 279-292, 2019.
- IDIKA, I. K. et al. Efficacy of ivermectin against gastrointestinal nematodes of pig in Nsukka area of Enugu State, Nigeria. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 10, p. 39-42, 2017.
- IEZZI, S. et al. Relationship between ivermectin concentrations at the injection site, muscle and fat of steers treated with traditional and long-acting preparations. **Food and Chemistry Toxicology**, v. 105, p. 319-321, 2017.
- JUAREZ, M.; SCHCOLNIK-CABRERA, A.; DUEÑAS-GONZALEZ, A. The multitargeted drug ivermectin: from an antiparasitic agent to a repositioned cancer drug. **American Journal of Cancer Research**, v. 8, n. 2, p. 317-331, 2018.
- KARTHIKEYAN, S. S. et al. Pharmacokinetics of ivermectin (ivermic super®) following single dose subcutaneous administration in cattle calves. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v. 11, n. 1, p. 16-23, 2017.
- LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3 ed. Singapore: Springer, 2006.
- LENHARDT, L. et al. Fluorescence spectroscopy coupled with PARAFAC and PLS DA for characterization and classification of honey. **Food Chemistry**, v. 175, p. 284–291, 2015.
- LIU, C. et al. Fluorescence turn-on chemosensor for Hg⁺² based on a rhodamine derivative and its application in bioimaging. **Science in China Series B: Chemistry**, v. 52, n. 9, p. 760-764, 2009.
- LOURENCAO, B. C. et al. Flow-injection determination of the anthelmintic drugs ivermectin and levamisole using electrochemically pretreated boron-doped diamond electrodes. **Sensors and Actuators B**, v. 222, p. 181-189, 2016.

MARSON, B. M. **Desenvolvimento e validação de métodos para quantificação de fármacos antimaláricos utilizando IVM-PLS e CLAE-EM/EM**. 2015. 129f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, 2015.

MONYEM, A.; VAN GERPEN, J. H. The effect of biodiesel oxidation on engine performance and emissions. **Biomass&Bioenergy**, v. 20, p. 317, 2001.

NEVES, B. J.; ANDRADE, Carolina H.; CRAVO, Pedro V.L. Natural products as leads in schistosome drug discovery. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 1872–1903, 2015.

OLIVEIRA, S. C. **Espectroscopia no infravermelho associada a quimiometria para a determinação de parâmetros de qualidade e de indicação geográfica de cachaças**. 2018. 97f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual da Paraíba. 2018.

ORTIZ, A. J. et al. Isolation and determination of ivermectin in post-mortem and in vivo tissues of dung beetles using a continuous solid phase extraction method followed by LC-ESI+-MS/MS. **Plos One**, v. 12, n. 3, p. e0172202, 2017.

OTTO, M. **Chemometrics: Statistics and Computes Application in Analytical Chemistry**. 3 ed. John Willey & Sons, 2016.

RIBEIRO, R. M. R. et al. Espectrofluorimetria comparada à cromatografia líquida de alta eficiência na detecção de ocratoxina A em café. **Semana: Ciências Agrárias**, v. 29, n.2, p.331-338, 2008.

RINGLE, C. M. et al. PLS path modeling and evolutionary segmentation. **Jornal of Business Research**, v. 66, p. 1318-1324, 2013.

RODRIGUES, J. M. et al. a Espectroscopia De Fluorescência Sincronizada Aplicada Na Análise Qualitativa E Quantitativa De Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Em Amostras D'Água. **Ciência e Natura**, v. 36, n. 2, p. 782–788, 2014.

SANTANA, V. R. **Validação de metodologia para detecção e quantificação de ivermectina em leite de vaca com uso de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier com reflectância total atenuada (FTIR-ATR)**. 2016. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2016.

SENA, M. M. et al. Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 547-554. 1999.

SHAFII, N. Z. et al. Application of chemometrics techniques to solve environmental issues in Malaysia. **Heliyon**, v. 5, n. 10, p. e02534, 2019.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**, trad. Norte-americana. Cengage Learning. 2014.

SILVA, G. R. et al. Multiresidue method for identification and quantification of avermectins, benzimidazoles and nitroimidazoles residues in bovine muscle tissue by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) using a quechers approach. **Talanta**, v. 171, p. 307-320, 2017.

SILVA, W. T. Desenvolvimento de metodologias analíticas baseadas em HPLC-DAD, espectroscopia no infravermelho e quimiometria para o controle de qualidade de repelente de insetos. **Coletânea de Atividades em Pesquisa Científica e Inovação Tecnológica**, p. 103–121, 2019.

SIMEONOV, V. et al. Assessment of the surface water quality in Northern Greece, **J. Water Res**, v. 37, p. 4119-4124, 2003.

SIMÕES, S. S. **Desenvolvimento de métodos validados para a determinação de captopril usando espectrometria NIR e calibração multivariada**. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal da Paraíba, 2008.

SOTOMAYOR, M. D. P. T. et al. Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1755–1774, 2008.

TANAJURA, A. dos S. **Aplicação da espectrofluorimetria e análise multivariada na determinação da viscosidade, estabilidade oxidativa e massa específica de combustíveis, biocombustíveis e óleos**. 2016. 86f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal da Bahia, 2016.

TOBIAS, R. D. et al. **Chemometrics: A Practical Guide. Technometrics**. [S.l.: s.n.].1999.

VALDERRAMA, P; BRAGA, J.W.B; POPPI, R.J. Estudo da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Química Nova**, v.32, n.5, p. 1278-1287, jun, 2009.

VLASCICI, D. et al. Thiocyanate and fluoride electrochemical sensors based on nanostructured metalloporphyrin systems. **Journal of Optoelectronics and Advanced Materials**, v. 10, n. 9, p. 2303–2306, 2008.

ZABOTTI, C. **Desenvolvimento de Método Analítico por Espectroscopia de Fluorescência para Determinação de Bisfenol A**. 2018. 90f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual do Oeste Do Paraná, 2018.

ZHANG, H. X. et al. Rapid and sensitive detection of avermectin residues in edible oils by magnetic solid-phase extraction combined with ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 10, p. 3201-3208, 2017.

ZIMMER, J; ANZANELLO, M. J. Um novo método para seleção de variáveis preditas com base em índices de importância. **Production**, v. 24, n. 1, p. 84-93, 2014.