



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

# **TESE DE DOUTORADO**

**Desenvolvimento de metodologias analíticas baseadas  
em HPLC-DAD, espectroscopia no infravermelho e  
quimiometria para o controle de qualidade de  
repelentes de insetos**

**WELMA THAÍSE SILVA VILAR**

**João Pessoa – PB – Brasil**

**Setembro/2018**

# **TESE DE DOUTORADO**

**Desenvolvimento de metodologias analíticas baseadas em  
HPLC-DAD, espectroscopia no infravermelho e quimiometria  
para o controle de qualidade de repelentes de insetos**

**WELMA THAÍSE SILVA VILAR\***

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Química, área de concentração Química Analítica.

**Orientador: Prof. Dr. Márcio José Coelho de Pontes**

**\*Bolsista CNPq**

**João Pessoa – PB – Brasil**

**Setembro/2018**

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

V697d Vilar, Welma Thaise Silva.  
DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS BASEADAS EM  
HPLC-DAD, ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO E  
QUIMIOMETRIA PARA O CONTROLE DE QUALIDADE DE REPELENTE  
DE INSETOS / Welma Thaise Silva Vilar. - João Pessoa,  
2018.  
184 f. : il.

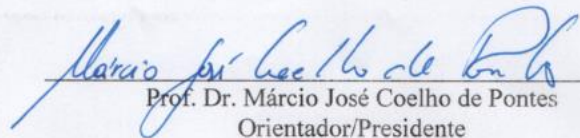
Tese (Doutorado) - UFPB/CCEN/PPGQ.

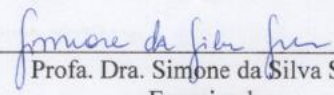
1. DEET. 2. Icaridina. 3. IR 3535. 4. Cromatografia em  
fase líquida. 5. Espectrometria no infravermelho. 6.  
Análise multivariada. I. Título

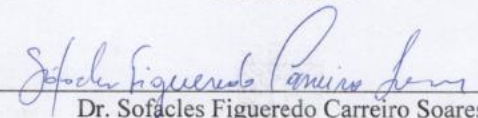
UFPB/CCEN

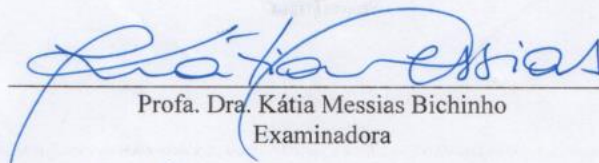
**Desenvolvimento de metodologias analíticas baseadas em HPLC-DAD, espectroscopia no infravermelho e quimiometria para o controle de qualidade de repelentes de insetos.**

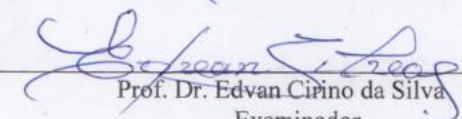
Tese de Doutorado apresentada pela aluna Welma Thaíse Silva Vilar e aprovada pela banca examinadora em 28 de setembro de 2018.

  
Prof. Dr. Márcio José Coelho de Pontes  
Orientador/Presidente

  
Profa. Dra. Simone da Silva Simões  
Examinadora

  
Dr. Sofácles Figueredo Carreiro Soares  
Examinador

  
Profa. Dra. Kátia Messias Bichinho  
Examinadora

  
Prof. Dr. Edvan Cirino da Silva  
Examinador

*"Ninguém escapa ao sonho de voar, de ultrapassar os limites do espaço onde nasceu de ver novos lugares e novas gentes. Mas saber ver em cada coisa, em cada pessoa, aquele algo que a define como especial, um objeto singular, um amigo, - é fundamental. Navegar é preciso, reconhecer o valor das coisas e das pessoas, é mais preciso ainda." (Antoine de Saint-Exupéry)*

Aos meus pais, **Rejane e Neto**, por todo apoio, carinho e dedicação.

DEDICO.

## AGRADECIMENTOS

Foram muitos os que me ajudaram a chegar até aqui e principalmente a concluir este trabalho. Agradeço a todos que participaram direta ou indiretamente desses anos acadêmicos.

➤ À Deus e a minha Mãe Maria, fontes inesgotáveis de amor, por me mostrar a força e fé que nem eu mesmo conhecia. Por me acalantar em todos os momentos;

➤ Aos meus pais, Neto e Rejane, que são as minhas maiores inspirações de vida, que se doa com todo amor para que eu possa realizar meus sonhos. Eu só cheguei até aqui graças ao amor de vocês. Muito obrigada.

➤ Aos meus irmãos, Weberth, Diego e Diogo, maiores incentivadores para o meu crescimento, pela amizade, carinho, companheirismo, amor e por segurarem a minha mão e caminharem juntos comigo em todos os momentos da minha vida.

➤ As três pessoas que ainda nem sabem, mas conseguem extrair o melhor de mim e me trazer paz em meio a tanta correria e estresse. Titia ama vocês, Pedro, Clara e Júlia.

➤ A Albéris Aragão, a minha pessoa, pela paciência, por toda dedicação, amor, pela amizade de todos os dias.

➤ A toda minha família pelo apoio e toda torcida.

➤ Ao Prof. Márcio Coelho, pela orientação, dedicação, confiança, conselhos e compreensão.

➤ Ao Dr. Everaldo Paulo de Medeiros, que foi a porta de entrada para minha vida acadêmica, a quem sou grata por tudo.

➤ A Luzia, por toda amizade, por ser minha família de João Pessoa, a irmã que eu não tive, quem está comigo diariamente dividindo os estresses, choros, gargalhadas, orações, enfim sou grata a Deus por ter um ser tão iluminado diariamente comigo. Muito, muito, muito OBRIGADA.

- Aos meus amigos que o mestrado e doutorado me deram a honra de conhecer: Adenilton, Adriano, Amanda, Anabel, David, Daniela, Edilene, Flaviana, Flaviano, Emanuella, Kevla, Mayara, Neto, Paulo, Socorro, Thiago. Vocês tornaram o doutorado leve e divertido, muito obrigada por todos os momentos.
- Aos demais membros do LAQA pela amizade.
- Em especial, aos anjos que Deus colocou em meu caminho, Emanuella, Mayara e Neto. Obrigada por toda ajuda no decorrer desse trabalho, pela amizade e carinho de vocês.
- A Anninha e Karla, as amigas as quais levarei por toda a vida, obrigada por todos os momentos que compartilhamos nesse doutorado, seja perto ou longe.
- As amigas, Bruna, Edjane, Emilly, Ivanda, Kallenya e Laisy, por toda amizade, carinho e pela torcida em todos os momentos da vida.
- Aos Profs. Edvan Cirino e Kátia Bichinho, pelas excelentes sugestões e contribuições no exame de qualificação.
- A Profa. Simone Simões e o Dr. Sófacles Figueredo pelas contribuições.
- Ao Prof. Mário Ugulino pela amizade e ensinamentos.
- Ao Laboratório de Combustíveis (LAC) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), em especial ao Neirivaldo, pelas medidas no NIR.
- Ao Laboratório de Combustíveis da UFPB, em especial a Alex Meireles, pelas medidas no MIR.
- A Marcos Pequeno pela amizade durante a pós-graduação.
- Ao CNPq pela bolsa concedida.
- A Merck pela doação do padrão de IR 3535.
- A Universidade Federal da Paraíba.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1</b> – Estrutura molecular do DEET.....	26
<b>Figura 2.2</b> - Estrutura molecular da Icaridina.....	27
<b>Figura 2.3</b> – Estrutura molecular IR 3535.....	28
<b>Figura 2.4</b> - Curvas de energia potencial de uma molécula diatômica: modelo do oscilador harmônico.....	38
<b>Figura 2.5</b> - Curvas de energia potencial de uma molécula diatômica: modelo do oscilador anarmônico.....	39
<b>Figura 2.6</b> - Primeira e segunda PCs obtidas a partir da combinação linear das variáveis originais. (a) As linhas pontilhadas na cor preta correspondem às projeções de uma amostra nas PCs (escores), enquanto as linhas tracejadas na cor vermelha representam as projeções nas variáveis originais. (b) O cosseno dos ângulos $\theta_1$ e $\theta_2$ representa os loadings.....	44
<b>Figura 2.7</b> - Representação do modelo PLS-DA utilizando o algoritmo PLS 1 para duas classes de objetos.....	45
<b>Figura 2.9</b> - Sequência de projeções realizadas pelo SPA com $Kc = 3$ e $j = 5$ . Resultado da primeira (a) e segunda (b) iteração. Neste exemplo, o subconjunto de variáveis selecionadas inicia com $x_1$ e deverá ser $\{x_1, x_2, x_5\}$ .....	50
<b>Figura 3.1</b> - Cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC).....	65
<b>Figura 3.2</b> - (a) Cromatogramas médios de amostras de mistura padrão de calibração. DEET em azul e IR 3535 em vermelho, (b) DEET e (c) espectro IR 3535 para o padrão de calibração de maior concentração. Os pontos azuis e vermelhos representam o comprimento de onda usado para calibração e quantificações de amostras.....	67
<b>Figura 3.3</b> - Curvas analíticas obtidas para a) DEET e b) IR 3535.....	68
<b>Figura 4.1</b> – a) Espectrômetro frontier FT-NIR da PerkinElmer b) FTIR Shimadzu IR Prestige-21.....	81
<b>Figura 4.2</b> - FTIR Analyzer (AIT, Analect Diamond 20).....	85
<b>Figura 4.3</b> - Espectros registrados no NIR a) antes b) após o pré-processamento para o DEET (azul), Icaridina (verde) e IR 3535 (vermelho).....	87
<b>Figura 4.4</b> - Gráfico dos escores obtidos pela PCA aplicada aos espectros pré-processados. a) PC1 x PC2 e b) PC1 x PC3 (●: DEET, ■: Icaridina e ▲: IR 3535).....	88

<b>Figura 4.5</b> - Gráfico dos pesos para as três primeiras PC's.....	89
<b>Figura 4.6</b> - Espectros médios do conjunto de dados com indicação das variáveis selecionadas pelo SPA (●), SW (●) e GA (●) em modelos de classificação LDA.....	91
<b>Figura 4.7</b> - Gráfico de escores obtido por LDA usando algoritmos de seleção de variáveis a) SPA, b) SW e c) GA. ●:DEET, ●: Icaridina, ●: IR 3535. ●: Amostras de treinamento; ■: Amostras de teste.....	92
<b>Figura 4.8</b> - Taxa de erro de validação cruzada <i>versus</i> o número de variáveis latentes. A seta identifica o número de variáveis latentes selecionadas.....	93
<b>Figura 4.9</b> – Valores de classe estimados pelo PLS-DA <i>versus</i> o gráfico de amostras de treinamento e teste.a) DEET, b) Icaridina e c) IR 3535. ●:DEET, ●: Icaridina, ●: IR 3535. ●: Amostras de treinamento; ■: Amostras de teste. Valores de limiar: a) 0,15; b) 0,16; c) 0,06.....	94
<b>Figura 4.10</b> - Espectros originais a) DEET b) IR 3535.....	97
<b>Figura 4.11</b> - Espectros das amostras a) DEET (azul) b) IR 3535 (vermelho) e dos padrões (cinza) dos respectivos princípios ativos.....	98
<b>Figura 4.12</b> - Intervalos de variáveis selecionadas pelo iPLS a) DEET e b) IR 3535.....	102
<b>Figura 4.13</b> - Espectros NIR médios do conjunto de dados com indicação das variáveis selecionadas pelos algoritmos SPA (●), SW (▲) e GA (■), para DEET (a, b e c) e IR 3535 (d, e e f).....	103
<b>Figura 4.14-</b> Elipse de confiança para o a) DEET e b) IR 3535 obtidas para os modelos PLS (linha vermelha), iPLS (linha azul), MLR/SPA (linha verde), MLR/SW (linha preta) e MLR/GA (linha laranja).....	109
<b>Figura 4.15</b> - Gráfico dos valores preditos <i>versus</i> os valores de referências obtidos pelos modelos PLS (a e f), iPLS (b), MLR/SPA (c), MLR/SW (d) e MLR/GA (e) Para DEET Amostras de calibração (●) e amostra de predição (●) e IR 3535 Amostras de calibração (▲) e amostra de predição (▲).....	110
<b>Figura 4.16</b> - Espectros originais no infravermelho médio para a) DEET b) IR 3535.....	111
<b>Figura 4.17-</b> Espectros das amostras a) DEET (azul) b) IR 3535 (vermelho) e dos padrões (cinza) dos respectivos princípios ativos.....	114
<b>Figura 4.18</b> - Intervalos de variáveis selecionadas pelo iPLS a) DEET e b) IR 3535.....	115
<b>Figura 4.19-</b> Espectros MIR médios do conjunto de dados com indicação das variáveis selecionadas pelos algoritmos SPA (●), SW (▲) e GA (■), para DEET (a, b e c) e IR 3535 (d, e e f).....	116

<b>Figura 4.20</b> - Elipse de confiança para o a) DEET e b) IR 3535 obtidas para os modelos PLS (linha vermelha), iPLS (linha azul), MLR/SPA (linha verde), MLR/SW (linha preta) e MLR/GA (linha laranja).....	120
<b>Figura 4.21</b> - Gráfico dos valores preditos <i>versus</i> os valores de referências obtidos pelos modelos PLS (a e f), iPLS (b), MLR/SPA (c), MLR/SW (d) e MLR/GA (e) Para DEET Amostras de calibração (●) e amostra de predição (○) e IR 3535 Amostras de calibração (▲) e amostra de predição (△).....	121
<b>Figura 4.22</b> - Espectros completos para os equipamentos primário e secundário a e c) DEET e b e d) IR 3535.....	123
<b>Figura 4.23</b> - RMSEP em função do número de amostras de transferência após padronização com as técnicas DS e RS, para o parâmetro DEET.....	128
<b>Figura 4.24</b> - RMSEP em função do número de amostras de transferência após padronização com as técnicas DS e RS, para o parâmetro IR 3535.....	129
<b>Figura 4.25</b> -Representação das variáveis selecionadas pelo algoritmo SPA para os princípios ativos a) DEET e b) IR 3535 para as técnicas DS (●) e RS (■).....	131
<b>Figura 4.26</b> - Espectros médios NIR das amostras de DEET (azul) e IR 3535 (vermelho) obtidos utilizando os instrumentos primários e secundários antes e depois da padronização pelos métodos a e b) DS e c e d) RS.....	132
<b>Figura 4.27</b> - Gráfico dos valores preditos <i>versus</i> referência dos subconjuntos de predição dos modelos pelos métodos DS e RS, para o DEET. a) PLS – DS, b) PLS–RS, c) MLR/SPA– DS e d) MLR/SPA – RS.....	133
<b>Figura 4.28</b> - Gráfico dos valores preditos <i>versus</i> referência dos subconjuntos de predição dos modelos pelos métodos DS e RS, para o IR 3535. a) PLS – DS, b) PLS–RS, c) MLR/SPA– DS e d) MLR/SPA – RS.....	134

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1</b> - Tabela de análise da variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados, de um modelo linear nos parâmetros.....	31
<b>Tabela 2.2</b> - Regiões espectrais no infravermelho.....	37
<b>Tabela 3.1</b> - Parâmetros analíticos para a curva de calibração de DEET e IR 3535.....	69
<b>Tabela 3.2</b> - Resultados da ANOVA para DEET e IR 3535. Entre parêntesis, estão os graus de liberdade.....	70
<b>Tabela 3.3</b> - Teste de precisão univariada intra e inter dia para quantificação de repelentes de insetos.....	71
<b>Tabela 3.4</b> - Estudos de recuperação para a determinação de DEET e IR 3535.....	72
<b>Tabela 3.5</b> -Valores descritos no rótulo e encontrados através do método HPLC-DAD.....	74
<b>Tabela 4.1</b> - Número de amostras de treinamento e teste para NIR.....	81
<b>Tabela 4.2</b> - Número de amostras de calibração e predição usadas na determinação do DEET e IR 3535.....	83
<b>Tabela 4.3</b> - Taxa de classificação correta (TCC) obtidos com os modelos LDA/SPA, LDA/SW, LDA/GA e PLS-DA.....	90
<b>Tabela 4.4</b> - Resultados da classificação para o conjunto de teste obtidos com modelos LDA/SPA, LDA/SW, LDA/GA e PLS-DA, para o NIR. A taxa de classificação correta obtida por cada modelo é indicada em parêntesis. N é o número de amostras preditas empregadas neste estudo.....	95
<b>Tabela 4.5</b> - Parâmetros de desempenho dos resultados dos modelos LDA/SPA, LDA/SW, LDA/GA e PLS-DA para o conjunto de teste das amostras de DEET (1), Icaridina (2) e IR3535 (3).....	96
<b>Tabela 4.6</b> - Resultados obtidos para os modelos PLS, <i>i</i> PLS, MLR/SPA, MLR/SW e MLR/GA para o DEET. Os valores entre parêntesis correspondem aos números de fatores ou variáveis empregadas nos modelos. A faixa de calibração do parâmetro é apresentada entre colchetes, cv (validação cruzada).....	99
<b>Tabela 4.7</b> - Resultados obtidos para os modelos PLS, <i>i</i> PLS, MLR/SPA, MLR/SW e MLR/GA para o IR 3535. Os valores entre parêntesis correspondem aos números de fatores ou variáveis empregadas nos modelos. A faixa de calibração do parâmetro é apresentada entre colchetes, cv (validação cruzada).....	101

<b>Tabela 4.8-</b> Resultados obtidos pelos modelos PLS, iPLS, MLR/SPA, MLR/SW e MLR/GA para o conjunto de predição (em termos de RMSEP, valores de correlação e de determinação, LOD e LOQ. N é o número de amostras de predição.....	105
<b>Tabela 4.9-</b> Resultados para o teste F (nível de confiança de 95%) obtidos na comparação dos valores dos modelos PLS, iPLS, MLR-SPA, MLR/SW e MLR/GA.....	107
<b>Tabela 4.10-</b> Resultados para o teste <i>t</i> -pareado (95%de confiança) obtidos na comparação dos valores de referências e valores previstos pelos modelos.....	108
<b>Tabela 4.11-</b> Resultados obtidos para os modelos PLS, iPLS, MLR/SPA, MLR/SW e MLR/GA para o DEET. Os valores entre parênteses correspondem aos números de fatores ou variáveis empregadas nos modelos. A faixa de calibração do parâmetro é apresentada entre colchetes, cv (validação cruzada).....	112
<b>Tabela 4.12-</b> Resultados obtidos para os modelos PLS, iPLS, MLR/SPA, MLR/SW e MLR/GA para o IR 3535. Os valores entre parênteses correspondem aos números de fatores ou variáveis empregadas nos modelos. A faixa de calibração do parâmetro é apresentada entre colchetes, cv (validação cruzada).....	113
<b>Tabela 4.13-</b> Resultados obtidos pelos modelos PLS, iPLS, MLR/SPA, MLR/SW e MLR/GA para o conjunto de predição (em termos de RMSEP, valores de correlação e de determinação. N é o número de amostras de predição.....	118
<b>Tabela 4.14-</b> Resultados para o teste <i>F</i> (nível de confiança de 95%) obtidos na comparação dos valores de referências e valores previstos pelos modelos PLS, iPLS, MLR-SPA, MLR/SW e MLR/GA.....	119
<b>Tabela 4.15-</b> Resultados para o teste <i>t</i> (nível de confiança de 95%) obtidos na comparação dos valores dos modelos PLS, iPLS, MLR-SPA, MLR/SW e MLR/GA.....	120
<b>Tabela 4.15-</b> Valores $r^2$ e RMSEP das amostras de DEET e IR 3535 a partir de diferentes pré-processamentos na matriz de dados NIR primário. As variáveis selecionadas e latentes encontram-se entre parênteses. A faixa de calibração do parâmetro é apresentada entre colchetes.....	125
<b>Tabela 4.16-</b> Valores $r^2$ e RMSEP das amostras de DEET e IR 3535 a partir de diferentes pré-processamentos na matriz de dados NIR secundário. As variáveis selecionadas e latentes encontram-se entre parênteses. A faixa de calibração do parâmetro é apresentada entre colchetes.....	126
<b>Tabela 4.17-</b> Valores de RMSEP obtidos com os modelos PLS espectro completo e MLR/SPA antes e depois das técnicas de padronização DS, RS e PDS para determinação de DEET e IR 353. ....	130

## LISTA DE SIGLAS

**ANVISA:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
**DAD-** Detector de Arranjo de Diodo  
**DS:** Padronização Direta  
**FD** Função Discriminante  
**FN:** Falso-Negativos  
**FP:** Falso Positivos  
**GA:** Algoritmo Genético  
**HPLC:** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
**INMETRO-** Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade e Tecnologia  
**KS:** Kennard-Stone  
**LDA:** Análise Discriminante Linear  
**LOD:** Limite de Detecção  
**LOQ** Limite de Quantificação  
**MIR:** Infravermelho médio  
**MLR:** Regressão linear múltipla  
**NIR:** Infravermelho Próximo  
**PC:** Componente principal  
**PCA:** Análise de componente principal  
**PDS:** Padronização direta por partes  
**PLS:** Partial Least Squares  
**PLS-DA:** Partial Least Squares Discriminant  
**REP:** Erro Relativo de Predição  
**RMSEP** Raiz do Erro Quadrático Médio de Predição  
**RS** Padronização Reversa  
**RSD-** Desvio padrão relativo  
**SG:** Savitzky-Golay  
**SPA:** Algoritmo das projeções sucessivas  
**SW** Stepwise  
**TCC:** Taxa de Classificação Correta  
**TN:** Verdadeiro-Negativos

## RESUMO

Os mosquitos *Aedes aegypti* são vetores de doenças como a dengue, *chikungunya*, *zika* e febre amarela. Com o aumento da incidência dessas enfermidades a população tem recorrido ao uso de repelentes para tentar se proteger do ataque desses mosquitos. O mercado brasileiro disponibiliza uma variedade grande de produtos que possuem princípios ativos diferentes (com vários níveis de concentração), tempo de ação e preços distintos. Destacam-se os repelentes a base de DEET (N,N-dietil-3-metilbenzamida), do IR3535 (etil-butil-acetilaminopropionato) e icaridina (hidroxietil isobutil-piperidina carboxilato) para uso em adultos e em crianças. O tempo de ação desses repelentes depende, entre outros fatores, da concentração desses ingredientes ativos. Este trabalho propõe metodologias para classificação e determinação de princípios ativos em repelentes de insetos, tendo em vista que não existe um método de referência para realizar o controle de qualidade desses produtos. Na primeira etapa foi realizado o desenvolvimento e validação de um método baseado na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD). O método validado de acordo com a EURACHEM apresentou boa linearidade (0,25 a 22 mg L<sup>-1</sup> para o DEET,  $r^2 = 0,9986$  e 0,5 a 40 mg L<sup>-1</sup>,  $r^2 = 0,9976$  para o IR 3535), com a precisão intra e interdia calculada usando uma razão de Horwitz menor que 2 e recuperações de 89,2 a 111,6% e 94,7 a 109,2% para DEET e IR3535, respectivamente. Foram utilizadas as espectroscopias no infravermelho e técnicas quimiométricas para classificação, calibração e transferência de calibração dos repelentes comerciais. Na parte de classificação multivariada foi utilizada a espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) obteve-se o melhor resultado com a análise discriminante pelos mínimos quadrados parciais (PLS-DA) e MLR com seleção de variáveis stepwise (MLR/SW), alcançando uma Taxa de Classificação Correta (TCC) de 100% para os três princípios ativos estudada (DEET, IR 3535 e icaridina). Em relação à calibração multivariada, foram utilizadas as espectroscopias NIR e no infravermelho médio (MIR) para determinar DEET e IR 3535 em repelentes. Para o DEET empregando os dados NIR, foram encontrados resultados satisfatórios utilizando a regressão pelos mínimos quadrados parciais por intervalos (iPLS) e regressão linear múltipla com seleção de variáveis pelo algoritmo das projeções sucessivas (MLR/SPA) atingindo um RMSEP de 0,70% e 0,74% (m m<sup>-1</sup>), respectivamente. As amostras de IR 3535 medidas no NIR apresentaram melhores resultados com PLS e MLR/SW alcançando RMSEP de 0,64% e 1,03% (m m<sup>-1</sup>), respectivamente. Os melhores resultados utilizando MIR foram alcançados com o modelo PLS, com RMSEP de 1,38% e 1,69% (m m<sup>-1</sup>), para DEET e IR 3535, respectivamente. Por fim, foi realizado um estudo de transferência de calibração empregando dois equipamentos de espectroscopia NIR. Para este propósito, técnicas de padronização direta (DS), reversa (RS) e direta por partes (PDS) foram utilizadas. Para DEET, o melhor resultado foi obtido com PLS aplicados à técnica RS onde o RMSEP diminuiu de 7,95% para 1,21%. Para o IR 3535, o menor valor foi alcançado com MLR/SPA, em que o RMSEP diminuiu de 25,18% para 1,58% (DS). As metodologias alternativas propostas baseadas na espectroscopia NIR e MIR apresentaram vantagens por serem rápidas, não destrutivas, baixo custo e não utilizam reagentes. E são promissoras na classificação e calibração para o controle de qualidade de princípios ativos em amostras de repelentes de insetos.

**Palavras-Chave:** DEET; icaridina; IR 3535; cromatografia em fase líquida; espectrometria no infravermelho; análise multivariada.

## ABSTRACT

The *Aedes aegypti* mosquitoes are vectors of diseases such as dengue, chikungunya, zika and yellow fever. With the increase in the incidence of these diseases, the population has resorted to the use of repellents to try to protect themselves from the attack of these mosquitoes. The Brazilian market offers a wide variety of products which have different active ingredients (with varying levels of concentration), protection time and different prices. The most important repellents are the base on DEET (N, N-diethyl-3-methylbenzamide), IR3535 (ethyl butyl acetylaminopropionate) and icaridin (hydroxyethyl isobutyl piperidine carboxylate) for use in adults and children. The action time of these repellents depends, among other factors, on the concentration of these active ingredients. This work proposes methodologies for classification and determination of active ingredients in insect repellents, considering that there is no reference method to perform the quality control of these products. In the first stage the development and validation of a method based on high performance liquid chromatography (HPLC-DAD) was carried out. The validated method according to EURACHEM showed good linearity (0.25 to 22 mg L<sup>-1</sup> for DEET,  $r^2 = 0.9986$  and 0.5 to 40 mg L<sup>-1</sup>,  $r^2 = 0.9976$  for IR 3535 ), with intra- and inter-day precision calculated using a Horwitz ratio of less than 2 and recoveries of 89.2 - 111.6% and 94.7 - 109.2% for DEET and IR3535, respectively. Infrared spectroscopy and chemometric techniques for classification, calibration and calibration transfer of commercial repellents were used. In the multivariate classification part, the near infrared spectroscopy (NIR) was obtained the best result with the discriminant analysis by the partial least squares (PLS/DA) and MLR with selection of stepwise variables (MLR/SW), reaching a rate Correct Classification (TCC) of 100% for the three active ingredients studied (DEET, IR 3535 and icaridin). Regarding the multivariate calibration, NIR and medium infrared (MIR) spectroscopies were used to determine DEET and IR 3535 in repellents. For DEET, using the NIR data, satisfactory results were obtained using the interval partial least squares regression (iPLS) and multiple linear regression with variable selection by the successive projection algorithm (MLR/SPA), reaching a RMSEP of 0.70% and 0.74% (m m<sup>-1</sup>), respectively. The IR 3535 samples measured in the NIR showed better results with PLS and MLR/SW reaching RMSEP of 0.64% and 1.03% (m m<sup>-1</sup>), respectively. The best results using MIR were obtained with the PLS model, with RMSEP of 1.38% and 1.69% (m m<sup>-1</sup>), for DEET and IR 3535, respectively. Finally, a calibration transfer study was carried out using two NIR spectroscopy equipment. For this purpose, Direct Standardization (DS), Reverse Standardization (RS) and Piecewise Direct Standardization (PDS) techniques were used. For DEET, the best result was obtained with PLS applied to the RS technique, in which RMSEP decreased from 7.95% to 1.21%. For IR 3535, the lowest value was reached with MLR/SPA, in which RMSEP decreased from 25.18% to 1.58% (DS). The proposed alternative methodologies based on NIR and MIR spectroscopy presented advantages because they are fast, non destructive, low cost and do not use reagents. And they are promising in the classification and calibration for quality control of active ingredients in insect repellent samples.

Keywords: DEET; icaridin; IR 3535; liquid phase chromatography; infrared spectrometry; multivariate analysis.

## Sumário

<b>Capítulo 1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>1 Aspectos Gerais.....</b>	<b>18</b>
<b>1.2 Objetivos.....</b>	<b>21</b>
<b>1.2.1 Objetivo geral.....</b>	<b>21</b>
<b>1.2.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>21</b>
<b>Capítulo 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>23</b>
<b>2.1 Repelentes.....</b>	<b>24</b>
<b>2.1.1 N,N-dietil-meta-toluamida (DEET) .....</b>	<b>25</b>
<b>2.1.2 1-piperidina carboxilato 2-(2-hidroxietil)-1- metilpropilester.....</b>	<b>27</b>
<b>2.1.3 Etil-butil-acetilaminopropionato (IR 3535).....</b>	<b>28</b>
<b>2.2 Cromatografia.....</b>	<b>28</b>
2.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	29
<b>2.3 Calibração univariada.....</b>	<b>30</b>
2.3.1 Parâmetros de desempenho analítico.....	32
2.3.1.1 Seletividade.....	32
2.3.1.2 Linearidade.....	33
2.3.1.4 Limite de quantificação (LOQ) .....	33
2.3.1.5 Exatidão e precisão .....	34
2.3.1.5.1 Repetibilidade.....	35
2.3.1.5.2 Precisão intermediária .....	35
2.3.1.5.3 Efeito de matriz .....	35
<b>2.4 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho.....</b>	<b>37</b>
<b>2.4.1 Espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) .....</b>	<b>40</b>
<b>2.4.2 Espectroscopia no infravermelho médio (MIR) .....</b>	<b>40</b>
<b>2.5 Quimiometria .....</b>	<b>41</b>
<b>2.5.1 Pré-Processamentos.....</b>	<b>42</b>
<b>2.5.2 Técnicas de Reconhecimento de Padrões .....</b>	<b>42</b>
2.5.2.1 Análise por componentes principais (PCA) .....	43
2.5.2.2 Análise discriminante pelos mínimos quadrados parciais (PLS-DA) .....	44
2.5.2.3 Análise discriminante linear (LDA) .....	45

<b>2.6 Calibração multivariada.....</b>	<b>46</b>
<b>2.6.1 Regressão dos mínimos quadrados parciais (PLS).....</b>	<b>48</b>
<b>2.6.2 Regressão linear múltipla (MLR) .....</b>	<b>49</b>
2.6.2.1 Seleção de variáveis.....	49
2.6.2.1.1 Algoritmo das projeções sucessivas (SPA) .....	50
2.6.2.2 Stepwise (SW) .....	52
2.6.2.3 Algoritmo genético (GA).....	53
2.6.2.4 Algoritmo iPLS.....	54
<b>2.6.3 Seleção de amostras .....</b>	<b>54</b>
<b>2.6.4 Transferência de calibração .....</b>	<b>55</b>
2.6.4.1 Padronização direta – DS .....	56
2.6.4.2 Padronização direta em etapas – PDS .....	57
2.6.4.3 Padronização reversa .....	58
<b>2.6.5 Seleção das amostras de transferência.....</b>	<b>58</b>
 <b>Capítulo 3 Desenvolvimento e validação de um método HPLC para determinação de DEET e IR 3535 em amostras de repelentes .....</b>	 <b>60</b>
<b>3.1 Revisão da literatura.....</b>	<b>61</b>
<b>3.2 Metodologia .....</b>	<b>64</b>
3.2.1 Reagentes e soluções .....	64
3.2.2 Análise cromatográfica .....	64
3.2.3 Calibração, validação e quantificação de DEET e IR 3535 .....	65
<b>3.3 Resultados e Discussão.....</b>	<b>67</b>
3.3.1 Conjunto de amostras de calibração.....	67
3.3.2 Seletividade, LOQ e LOD .....	70
3.3.3 Exatidão e Precisão.....	71
3.3.4 Quantificação de DEET e IR 3535 em amostras repelentes .....	73
<b>3.4 Conclusão .....</b>	<b>75</b>
 <b>Capítulo 4 Desenvolvimento de métodos analíticos baseados na espectroscopia NIR e MIR para identificação e determinação de princípios ativos em amostras de repelentes.....</b>	 <b>76</b>
<b>4.1 Revisão da literatura .....</b>	<b>77</b>
<b>4.2 Metodologia .....</b>	<b>80</b>
4.2.1 Espectrometria NIR e MIR .....	80

4.2.1.1 Amostras .....	80
4.2.1.2 Aquisição dos espectros no infravermelho NIR e MIR.....	80
<b>4.2.2 Procedimentos quimiométricos e softwares .....</b>	<b>81</b>
<b>4.2.2.1 Classificação (NIR) .....</b>	<b>81</b>
4.2.2.2 Calibração multivariada.....	83
<b>4.2.3 Transferência de calibração (NIR) .....</b>	<b>85</b>
4.2.3.1 Amostras .....	85
4.2.3.2 Aquisição dos espectros.....	85
4.2.3.3 Procedimento quimiométrico .....	86
<b>4.3 Resultados e Discussão.....</b>	<b>87</b>
<b>4.3.1 Estudos de classificação (NIR).....</b>	<b>87</b>
4.3.1.1 Avaliação dos espectros NIR.....	87
4.3.1.2 Análise das Componentes Principais (PCA) .....	88
<b>4.3.2 Métodos de Reconhecimento de Padrões Supervisionados.....</b>	<b>89</b>
4.3.2.1 Modelo LDA.....	90
4.3.2.2 Modelos PLS-DA .....	93
<b>4.3.3 Comparação das metodologias de classificação.....</b>	<b>95</b>
<b>4.4 Estudos de calibração (NIR) .....</b>	<b>97</b>
4.4.1.1 Espectros.....	97
<b>4.4.2 Modelos de calibração multivariada .....</b>	<b>98</b>
4.4.2.1 Avaliação dos modelos de calibração desenvolvido .....	102
4.4.2.2 iPLS.....	102
4.4.2.2 Seleções de variáveis .....	103
<b>4.4.3 Análises dos modelos de calibração .....</b>	<b>104</b>
<b>4.5 Estudo de Calibração (MIR).....</b>	<b>111</b>
<b>4.5.1. Espectros.....</b>	<b>111</b>
<b>4.5.2 Avaliação dos modelos desenvolvidos .....</b>	<b>114</b>
4.5.2.1 iPLS.....	114
4.5.2.2 Seleções de Variáveis .....	115
<b>4.5.3 Análises dos modelos de calibração .....</b>	<b>118</b>
<b>4.6 Estudos de transferência de calibração.....</b>	<b>123</b>
<b>4.6.2 Espectros.....</b>	<b>123</b>
<b>4.6.3 Transferência de Calibração .....</b>	<b>127</b>
<b>4.7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>135</b>

<b>Capítulo 5 CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>.139</b>
<b>5.1 Propostas futuras.....</b>	<b>139</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>141</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>158</b>

# 1

## INTRODUÇÃO

## 1 Aspectos Gerais

As doenças transmissíveis por insetos acometem milhões de pessoas em todo o mundo, causando milhares de mortes. Os mosquitos que são vetores de doenças para cerca de 700 milhões de habitantes ao ano, sobretudo em países tropicais e subtropicais [1-3].

A dengue é uma doença viral bem conhecida pela população brasileira, transmitida pelo mosquito *Aedes aegypti*, foi identificada pela primeira vez no Brasil em 1986. Estima-se que 50 milhões de infecções por dengue ocorram anualmente no mundo [2]. Além da dengue, a febre *chikungunya* e o vírus da *zika*, também transmitidas pelo *Aedes aegypti*, vêm ocorrendo no Brasil, em maior número na região Nordeste.

Nos boletins epidemiológicos divulgados pela ANVISA, até a semana 11 de 2018 (31/12/2017 a 17/03/2018) foram registrados 58.986 casos prováveis de dengue no país, com uma incidência de 28,4 casos/100 mil habitantes, com 15 casos de óbitos apenas no primeiro trimestre de 2018. Para *chikungunya* foram registrados 16.434 casos no país, sendo que 13 casos foram a óbito. E para o *zika* vírus em 2016 foi o ápice de incidência, no qual foram registrados 216.207 casos, porém houve uma queda neste número e em 2018 foram registrados 1.486 casos até o boletim 11. Este último está associado à ocorrência de crianças com microcefalia ou más formações, em que algumas acabaram falecendo por consequência desta doença [4].

Sem sombra de dúvidas, uma maior atenção tem sido dada ao vírus da *zika*, sobretudo para as gestantes. De fato, no final do ano de 2015, houve um aumento do número de casos de crianças nascidas com microcefalia e fez com que o Ministério da Saúde confirmasse sua relação com o vírus da *zika* [4]. Em pouco tempo, o vírus se tornou fonte de preocupação mundial, levando a Organização Mundial de Saúde (OMS), declarar, naquele momento, a microcefalia causada pelo *zika* vírus como um caso de emergência mundial [2].

A maior incidência do *zika* vírus no Brasil está no Nordeste, porém 73 países (Bolívia, Trinidad Tobago, Vietnã, entre outros) também relataram casos de *zika* vírus com 26 casos de microcefalia e outras más formações [4].

Diante deste cenário, a população brasileira, em especial as gestantes, tem recorrido ao uso de repelentes como forma de prevenção aos mosquitos, já que até o presente momento não existe vacina contra o vírus da *zika* e *chikungunya*.

Os repelentes são classificados como cosméticos e os princípios ativos mais utilizados são: N,N-dietil-3-metilbenzamida (DEET), o hidroxietil isobutil-piperidina carboxilato de etilo (Icaridina) e o etil-butil-acetilaminopropionato (IR3535 ou EBAAP). Existem ainda produtos registrados contendo como substância ativa o extrato vegetal ou o óleo de plantas do gênero *Cymbopogon* (citronela) [5].

Os repelentes que empregam o DEET como princípio ativo podem ser encontrados no mercado brasileiro, em sua grande maioria, numa faixa de concentração de 5 a 30% ( $\text{m m}^{-1}$ ), com tempo de ação médio em torno de 4 – 6 horas. Para o icaridina e o IR3535, é possível encontrar a mesma faixa de concentração, porém de acordo com as informações apresentadas pelo fabricante, o tempo de ação do icaridina é superior àqueles que contêm o DEET e IR 3535 [6].

Além dos fatores associados ao tempo de ação, o consumidor deve ficar atento à possibilidade de alergias, sobretudo em crianças que são, em geral, mais sensíveis. Desse modo, a escolha do tipo de repelente e da concentração do princípio ativo deve ser avaliada com cuidado para evitar problemas de saúde aos consumidores [7].

De acordo com a Resolução RDC nº 19/2013 da ANVISA [8], repelentes a base de DEET não devem ser utilizados em crianças menores de 2 (dois) anos. O uso é permitido para crianças de 2 (dois) a 12 (doze) anos de idade, desde que a concentração de DEET não seja superior a 10% ( $\text{m m}^{-1}$ ). Ainda, são permitidas as formulações contendo DEET, em concentrações superiores a 30% ( $\text{m m}^{-1}$ ) para pessoas com idade superior a 12 anos, desde que sejam realizados estudos de avaliação de risco para humanos. No Brasil não são encontrados repelentes com concentração superior a 30%, porém em outros países essa concentração pode chegar a 99% [9].

De acordo com alguns pesquisadores da área de saúde [10], repelentes à base de icaridina têm sido reportados como aqueles favoritos para gestantes devido ao tempo maior de atuação e, por consequência, um número menor de aplicações durante o dia. De fato, as concentrações desse princípio ativo nos repelentes são comumente encontradas nas faixas de 20-25% ( $\text{m m}^{-1}$ ) e os valores cobrados por esses produtos costumam ser bem maiores, quando comparados com os repelentes que utilizam o DEET ou o IR3535.

Os repelentes a base de IR3535 são indicados para crianças devido ao menor risco de alergias e intoxicações. No mercado brasileiro, são encontrados com concentrações em torno de 15% ( $\text{m m}^{-1}$ ).

Uma pesquisa foi realizada pela ANVISA e de acordo com os resultados, os produtos avaliados apresentaram, de maneira geral, proteção aos mosquitos, porém com tempo de ação inferior ao declarado pelos fabricantes. No que diz respeito às alergias, a grande maioria das marcas avaliadas apresentaram reações adversas nas primeiras 24 horas [1]. Diante desse contexto, surge a necessidade de um controle de qualidade desses repelentes, uma vez que baixas concentrações não vão repelir o suficiente e altas concentrações podem ser prejudiciais à saúde.

As Cromatografias Gasosa (GC) e a Líquida de Alta Eficiência (HPLC) são métodos recomendados para a determinação dos principais princípios ativos utilizados nos repelentes em diferentes matrizes [11]. Apesar de eficientes, esses métodos podem ser demorados e apresentam custos elevados de análise e manutenção. Em muitos casos, também, podem gerar resíduos tóxicos ao meio ambiente.

A OMS (Organização Mundial de Saúde), que faz uso da Farmacopeia Americana, recomenda o uso da análise univariada na região do infravermelho médio para a determinação de DEET [12]. Todavia, tal método é mais susceptível à presença de interferentes e, ainda, utiliza reagentes tóxicos, como o dissulfeto de carbono.

É importante mencionar que a maioria dos trabalhos encontrados na literatura está voltada à determinação dos princípios ativos DEET, IR 3535 e icaridina em amostras ambientais [13-14] e biológicas [15-16].

Em face do exposto, torna-se de extrema importância o desenvolvimento de metodologias analíticas alternativas rápidas, seguras, com pouco ou nenhum uso de reagentes e que possam auxiliar no controle de qualidade dos repelentes de insetos comercializadas no Brasil.

A literatura tem reportado um número elevado de trabalhos envolvendo o uso da espectrometria no infravermelho (IR) combinados com métodos de análise multivariada no desenvolvimento de novas metodologias analíticas que auxiliam o controle de qualidade de diferentes matrizes, incluindo amostras de alimentos [17-18], ambientais [19-20], farmacêuticas [21-22], cosméticos [23], entre outras [24-26].

Até o presente momento, não foram encontrados trabalhos que usam métodos multivariados aplicados a dados provenientes da espectrometria NIR e MIR para análise qualitativa e quantitativa de repelentes de insetos.

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 *Objetivo geral*

Desenvolver metodologias analíticas para avaliar a qualidade de repelentes comercializados no Brasil utilizando HPLC-DAD, espectrometria no infravermelho e técnicas quimiométricas.

### 1.2.2 *Objetivos específicos*

## Capítulo 3 - Desenvolvimento e validação de um método HPLC-DAD para determinação de DEET e IR 3535 em amostras de repelentes

- ✓ Validar os modelos de calibração elaborados de acordo com a EURACHEM;
- ✓ Avaliar o desempenho do método na predição de DEET e IR 3535 em amostras de repelentes comerciais.

## Capítulo 4 - Desenvolvimento de métodos analíticos baseados na espectrometria NIR e MIR para a identificação e determinação de princípios ativos em amostras de repelentes

### Parte 1 – *Espectrometria NIR para classificação de repelentes*

- ✓ Realizar um estudo exploratório dos dados através da análise de componentes principais (PCA) aos espectros NIR;
- ✓ Aplicar métodos de reconhecimento de padrões supervisionados (LDA/SPA, LDA/SW, LDA/GA e PLS-DA) aos espectros NIR para classificação de repelentes de insetos quanto ao tipo;
- ✓ Comparar o desempenho dos modelos desenvolvidos utilizando diferentes pré-processamentos em função da taxa de classificação correta (TCC), sensibilidade e especificidade obtida para um conjunto externo (teste) de amostras.

**Parte 2 – Espectrometria NIR e MIR para determinação de DEET e IR 3535**

- ✓ Desenvolver modelos PLS e MLR, utilizando diferentes técnicas de seleções de variáveis utilizando a espectrometria NIR e MIR para determinar DEET e IR 3535 em amostras comerciais de repelentes de insetos;
- ✓ Comparar os modelos de calibração multivariada nas regiões NIR e MIR separadamente.

**Parte 3 – Transferência de calibração em espectrometria NIR**

- ✓ Comparar o desempenho dos modelos desenvolvidos em dois equipamentos NIR diferentes;
- ✓ Avaliar diferentes estratégias de transferência de calibração utilizando os modelos PLS e MLR/SPA entre dois instrumentos NIR de bancada diferentes para determinar DEET e IR 3535 em amostras de repelentes de insetos.

# 2

## Fundamentação Teórica

## 2.1 Repelentes

Repelentes são substâncias obtidas por processos naturais ou sintéticos, utilizados para manter insetos afastados evitando seus ataques. Comumente são comercializados produtos com extrato de andiroba ou citronela, piretroides ou os que apresentam princípios ativos contendo DEET, icaridina ou IR 3535. Essas substâncias usadas têm odor discreto e são apresentadas como cremes, loções, soluções, geis, óleos, entre outros [27].

Um repelente considerado de uso ideal é aquele que não apresenta toxicidade, não é irritante, nem tampouco resseca a pele e, principalmente, ofereça um tempo de proteção mais prolongado possível.

Após algumas horas de uso, a eficiência dos repelentes pode ser diminuída devido ao suor, evaporação ou absorção, porém poucos estudos foram apresentados sobre a eficácia dos produtos utilizados durante um longo período de tempo. No entanto, sabe-se que alguns princípios ativos podem apresentar alta toxicidade, principalmente em crianças, o que torna de grande importância a avaliação dos repelentes de insetos antes que cheguem ao consumidor [28-29].

Scott et al. (2014) [30] avaliaram o tempo de duração de repelentes de três diferentes princípios ativos: DEET (15%), icaridina (5%) e um repelente natural à base de citronela (10%). O teste foi realizado com seis pessoas do sexo masculino e feminino, nos quais foram aplicados em seus antebraços um tipo de repelente. Após 30 minutos o braço de cada participante foi inserido em uma caixa contendo mosquitos criados em laboratórios em um intervalo de 1 minuto e, após 6h e 48 min, não foi observada mais eficiência desses produtos. O resultado mostrou que o DEET (15%) tem um tempo maior de duração na pele comparado ao icaridina (5%) que durou em torno de 3h e 46 min e citronela 2h. Com isso é observado que quanto maior a concentração maior o tempo de duração do repelente na pele.

A Associação Brasileira de Defesa do Consumidor (PROTESTE) avaliou a eficácia de 10 produtos de fabricantes de repelentes comercializados no Brasil, cinco destinadas ao uso de adultos e cinco voltados para o público infantil [31]. De acordo com os resultados, os produtos avaliados apresentaram, de maneira geral, proteção aos mosquitos, porém com tempo de ação inferior ao declarado pelos fabricantes. No que diz respeito às alergias, a grande maioria das marcas avaliadas apresentou reações adversas nas primeiras 24 horas [32].

Wiles et al. (2014) [33] relataram um caso de um homem de 37 anos que ingeriu um repelente contendo 40% de DEET (748 mg kg<sup>-1</sup>). Dentro de minutos, o paciente apresentou um quadro de convulsão, seguido de parada cardíaca, entre outros fatores que levaram à morte. Os autores confirmaram que o DEET em doses elevadas é letal para a saúde de um humano.

Diante desses estudos, é importante que a escolha do tipo de repelente e a concentração do princípio ativo sejam avaliadas para evitar problemas de saúde aos consumidores [31].

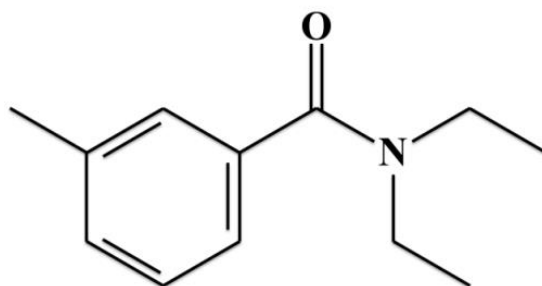
### 2.1.1 *N,N*-dietil-meta-toluamida (DEET)

O DEET é uma carbamuramida aromática N-N dissubstituída derivada da benzamida onde estão presentes os isômeros N,N- dietil-meta-toluamida orto e para, esses dois últimos em baixas concentrações. É conhecido mundialmente por sua vasta aplicação como repelente contra mosquitos [34]. Tipicamente formulado com solventes como etanol, isopropanol ou água para uso em produtos comerciais.

Uma gama de concentrações desse tipo de repelente está disponível para os consumidores e varia amplamente de 4 a 99%. Somente nos Estados Unidos, mais de 1,8 milhão de kg de DEET foram relatados como sendo usados anualmente [35].

Sua utilização é relatada desde meados de 1940 pelo Exército Militar dos Estados Unidos como pesticida [36]. Existem informações sobre sua toxicidade no ambiente, bem como no organismo humano, porém ainda com limitações, mesmo sendo o princípio ativo de repelentes mais utilizados [37].

O DEET (**Figura 2.1**) é conhecido por sua capacidade de mascarar a percepção sensorial do ácido láctico na pele [38], e a ação dos mosquitos é através deste ácido, pois este é essencial para o inseto pousar no hospedeiro.



**Figura 2.1** – Estrutura molecular do DEET [33].

Mundialmente, o DEET tem sido o princípio ativo mais utilizado pelos consumidores. Diante disso, surgiram dúvidas com respeito ao seu perfil toxicológico e seus riscos para a saúde humana.

De acordo com a ANVISA foram realizados estudos em fêmeas de ratos e coelhos grávidas, injetando concentrações baixas e elevadas de DEET em diferentes partes do corpo. No entanto, não foi afetado o desenvolvimento pré-natal após os testes [1].

Barr et al. (2010) [39] analisaram os níveis de pesticidas e DEET no sangue materno e no cordão umbilical em algumas mulheres grávidas em New Jersey, US. O estudo foi realizado com 150 mulheres que foram submetidas à cirurgia cesariana, e apontou que o DEET foi um dos compostos mais frequentes detectados nas amostras de sangue. Observou-se ainda, um aumento na circunferência abdominal dos fetos relacionado às crescentes concentrações de DEET e pesticidas. Segundo os autores do artigo, essas informações sugerem que alguns pesticidas e repelentes podem resultar em problemas de saúde no feto.

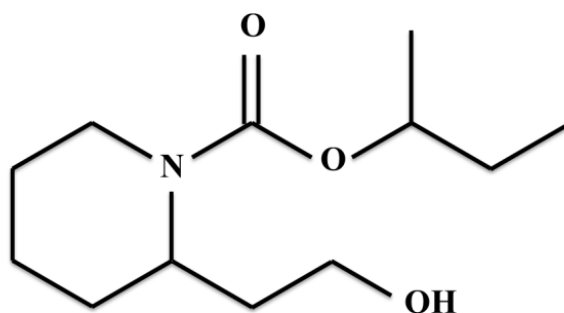
Em um estudo posterior, Wickerham et al. (2012) [40] identificaram a presença do DEET no sangue do cordão umbilical de alguns recém-nascidos com 37 semanas. Em 73% dos casos analisados foi detectada uma maior presença do DEET no cordão umbilical. Além disso, casos de crianças com nascimento abaixo do peso normal foram relatados. Contudo, de acordo com o estudo, não foi possível correlacionar tais acontecimentos com a concentração de DEET no sangue dos pacientes.

Há também o relato na literatura de hipersensibilidade ao DEET em uma criança com mais de oito anos de idade [41], com aparecimento de erupções nas áreas em que o repelente foi aplicado em alta quantidade, e episódios de convulsões.

Estudos reportados na literatura apontam, ainda, que o DEET pode ser absorvido pelo corpo e excretado pela urina, o que pode causar contaminações em rios [42], lagos [43], piscinas [44], entre outros compartimentos ambientais.

### 2.1.2 1-piperidina carboxilato 2-(2-hidroxi-1-metilpropil)éster

A Icaridina (**Figura 2.2**) é um repelente que foi desenvolvido pela empresa Bayer e registrado inicialmente em 2001, nos Estados Unidos.



**Figura 2.2** - Estrutura molecular da icaridina [6].

Este composto tem a grande vantagem de ser inodoro, não pegajoso ou oleoso e não apresentar nenhuma reação tóxica adversa. Segundo Katz et. al (2008) [36], foram realizados ensaios para verificar a toxicidade crônica em ratos e estes estudos sugerem que a icaridina não apresenta nenhuma toxicidade para a saúde humana.

De acordo com Lupi et al. [6], a icaridina apresentou uma proteção de 1- 6h contra o mosquito *Aedes aegypti*, e contra o *Culex* (muriçoca) apresentou proteção de 8h.

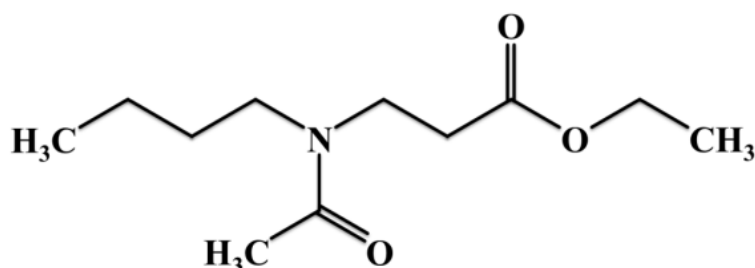
De acordo com alguns pesquisadores da área da saúde [3], repelentes à base de icaridina, têm sido reportados como favoritos para gestantes devido ao tempo maior de atuação, atingindo um tempo de duração de 7h e repelência de 95% [45] e, por consequência, um número menor de aplicações durante o dia.

### 2.1.3 Etil-butil-acetilaminopropionato (IR 3535)

O princípio ativo IR 3535 foi desenvolvido pela empresa alemã Merck; é um derivado do aminoácido natural  $\beta$ -alanina. Este tipo de repelente é ativo contra mosquitos *Aedes aegypti*, *Culex*, entre outros. De acordo com os fabricantes, os repelentes contendo tal princípio ativo podem ser eficazes por até 8 h [5].

Estudos de toxicidade foram realizados em ratos, cachorros e coelhos. Como resultados, uma taxa de penetração dérmica de 30% foi observada, porém estes estudos não revelaram efeitos adversos importantes [46].

Os repelentes a base de IR3535 (**Figura 2.3**) são muito utilizados em crianças devido ao menor risco de alergias e intoxicações quando comparados ao DEET. No mercado brasileiro, são encontrados nas faixas de concentração em torno de 15% ( $\text{m}^{-1}$ ) e apresentam eficácia com tempo médio variado.



**Figura 2.3** – Estrutura molecular IR 3535 [5].

## 2.2 Cromatografia

A cromatografia é um método físico-químico de separação de constituintes presentes em uma mistura, que ocorre através da interação desses constituintes entre duas fases: estacionária e móvel. Diferentes mecanismos promovem esta separação, sendo eles baseados em processos físicos, químicos ou mecânicos. Os principais tipos de interação dos analitos com as fases são por adsorção, partição, troca iônica, exclusão e bioafinidade [47].

### 2.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

Dentre os tipos de cromatografia líquida, a mais usada possui uma fase estacionária quimicamente ligada e são preenchidas com partículas de sílica de baixo diâmetro, o que eleva a pressão exercida sobre o sistema, que faz com que seja denominada cromatografia líquida de alta eficiência [47-48]. A fase estacionária mais utilizada é a reversa, onde são empregadas cadeias alquilas mais longas como octilsilano (C8) e octadecilsilano (C18), que estão quimicamente ligadas à sílica, fazendo com que uma melhor afinidade com compostos apolares ocorra [49].

Para obter uma maior resolução de sinal, as tecnologias em colunas foram sendo desenvolvidas e aprimoradas, aumentando a superfície de contato, devido ao número de pratos teóricos, e a proporção e reprodutibilidade das partículas quimicamente modificadas [47,49].

Na detecção a cromatografia utiliza dispositivos que respondem à presença de componentes e emitem um sinal elétrico, medindo as propriedades físicas e químicas da amostra ou soluções. Em geral em cromatografia tem-se a concentração do constituinte de interesse em função do tempo [47-48]. Para que se obtenha um resultado satisfatório é necessário que o detector possua sensibilidade, boa estabilidade, reprodutibilidade, seletividade, boa resposta linear [47-48].

Os detectores mais utilizados em HPLC são os espectrofotométricos com arranjo diodo (DAD), massa (MS) e fluorescência. O detector DAD permite analisar espécies em diferentes comprimentos de onda, uma vez que toda a luz da fonte passa pelo analito. A luz que surge é dispersa por uma grade holográfica e todos os comprimentos existentes são focalizados sobre uma fila de fotodiodos [47,49].

Além de todos esses processos físicos e químicos, oriundos da separação dos compostos ou detecção dos sinais dos analitos, é preciso que seja possível correlacionar e obter uma correta interpretabilidade química do que foi obtido por esses instrumentos. Diante disso, as utilizações de ferramentas matemáticas, através das etapas de calibração e estudos dos parâmetros de desempenhos analíticos são cruciais para garantir confiabilidade à metodologia desenvolvida.

### 2.3 Calibração univariada

Na calibração univariada um único valor para cada amostra é relacionado com a concentração do analito a ser estudado. Este procedimento pode ser realizado em duas etapas: descritiva e preditiva. Na etapa descritiva a construção do modelo acontece quando é possível relacionar linearmente o valor da resposta instrumental com uma concentração padrão conhecida do analito é usualmente denominado de curva analítica. Na etapa preditiva emprega-se o modelo construído na predição de amostras desconhecidas, na qual poderá ser realizada de maneira direta ou inversa com os coeficientes obtidos [50-51].

Após construir uma curva analítica é possível compreender se o modelo é preciso, exato e aplicável. A maneira mais comum para se conseguir um ajuste da curva analítica é através da estimativa dos coeficientes de regressão pelo método dos mínimos quadrados que minimiza o resíduo na **equação 2.1**.

$$y = b_0 + b_1X + \epsilon \quad (2.1)$$

Na **equação 2.1** observa-se um modelo linear, onde uma variável dependente (y) e uma variável independente (x) são relacionadas. Em que,  $b_0$  e  $b_1$  são os coeficientes linear e angular ajustados por mínimos quadrados e o  $\epsilon$  o erro associado à determinação de y [51].

Na **Tabela 2.1** estão apresentadas as equações utilizadas para calcular a ANOVA nos modelos lineares obtidos pelo método dos mínimos quadrados [50-51].

**Tabela 2.1** - Tabela de análise da variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados, de um modelo linear nos parâmetros.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática
Regressão	$SQ_R = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$p - 1$	$MQ_{reg} = \frac{SQ_{reg}}{(p - 1)}$
Residual	$SQ_r = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$	$n - p$	$MQ_{re} = \frac{SQ_r}{(n - p)}$
Falta de ajuste	$SQ_{faj} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$	$m - p$	$MQ_{faj} = \frac{SQ_{faj}}{(m - p)}$
Erro puro	$SQ_{ep} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$n - m$	$MQ_{ep} = \frac{SQ_{ep}}{(n - m)}$
Total	$SQ_T = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$	$n - 1$	
% de variação explicada	$\frac{SQ_R}{SQ_T}$		
% máxima de variação explicável	$\frac{SQ_T - SQ_{ep}}{SQ_T}$		

$n_i$ = números de repetições no nível  $i$ ;  $m$ = número de níveis distintos da variável independente;  $n = \sum n_i$  = número total de observações;  $p$  = número de parâmetros do modelo. Adaptado de Barros Neto, 2007 [52].

Na avaliação da ANOVA é recomendado observar primeiro as médias quadráticas da regressão ( $MQ_{reg}$ ) e do resíduo ( $MQ_r$ ), quanto maior a razão dessas médias ( $MQ_{reg}/MQ_r$ ) melhor o modelo. Quando o valor desta razão é comparado com um teste F apropriado ( $F_{vreg, vr}$ ), o valor da razão deve ser muito maior que o valor do F crítico, demonstrando assim que o modelo é significativo para regressão [50-52].

Para avaliar se o modelo está bem ajustado, compara-se o valor da razão das médias quadráticas da falta de ajuste ( $MQ_{faj}$ ) e do erro puro ( $MQ_{ep}$ ) com o valor F adequado ( $F_{vfaj, vep}$ ), o resultado da razão deverá ser menor que o F crítico, apresentando assim que o modelo está bem ajustado [50-51].

Para uma avaliação do modelo proposto, é necessário analisar se a metodologia desenvolvida apresenta parâmetro de desempenho satisfatório para identificar e quantificar o analito de interesse. Para estes estudos existem órgãos reguladores que normalizam essa prática.

### 2.3.1 Parâmetros de desempenho analítico

A validação de um modelo construído qualifica um método proposto e garante que o mesmo produza informações confiáveis a partir de dados experimentais.

Alguns órgãos no Brasil são responsáveis por este procedimento como o Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade e Tecnologia (INMETRO), a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Outros órgãos internacionais como o *International Standard Organization* (ISSO), *American Society for Testing and Materials* (ASTM), *Analytical Chemistry in Europe* (EURACHEM/CITAC), também asseguram e indicam que os métodos desenvolvidos possuam desempenhos que atendam aos requisitos adequados [53].

Alguns tipos de parâmetros de desempenho como precisão, linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), exatidão, seletividade e sensibilidade serão estudados neste trabalho. Estes apresentam informações necessárias sobre o comportamento dos fatores que influenciam na incerteza dos dados [53-55].

#### 2.3.1.1 Seletividade

A seletividade é a capacidade de um método analítico de determinar uma espécie de interesse mesmo na presença de substâncias interferentes [49,53]. Em termos gerais, a verificação da seletividade é realizada através da comparação entre a resposta instrumental do analito de interesse presentes em solução.

No caso da cromatografia, devem-se considerar os fatores que podem influenciar na seletividade como pureza do pico, uma resolução satisfatória e garantir que interferentes presentes não estejam coeluídos com o analito [54-55].

### 2.3.1.2 Linearidade

É a capacidade de que o método analítico tem para fornecer resultados diretamente ou inversamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de uma faixa de trabalho. A faixa de trabalho deve contemplar a concentração que se espera para a amostra de ensaio. É importante que o valor esperado para a amostra esteja em torno do centro da curva de calibração.

Cada órgão regulamentador recomenda certo número de níveis de concentrações a serem analisados, obtendo, assim, o coeficiente de correlação linear (R). A ANVISA recomenda, no mínimo, cinco níveis de concentrações diferentes com uma correlação de  $R=0,99$  [56]. Para EURACHEM [53], a faixa linear precisa variar de seis a quinze níveis de concentração, e analisar se existem valores incomuns que prejudiquem a correlação da curva. Para isto, devem-se avaliar os resíduos de concentração que deve estar distribuídos de maneira aleatória ao longo da linha de regressão [51].

### 2.3.1.3 Limite de detecção (LOD)

O LOD é a menor quantidade em que o analito presente em uma amostra pode ser detectado pelo método a um nível especificado de confiança e pode ser calculado de acordo com a **equação 2.2**.

$$LOD = 3 X \frac{s}{S} \quad (2.2)$$

onde  $s$  é calculado pelo desvio padrão das medidas do branco ou menor concentração aceitável do analito, e  $S$  é o coeficiente angular estimado pela curva analítica. A EURACHEM, órgão seguido neste trabalho, recomenda que sejam realizadas 10 repetições do branco, nos dados de cromatografia utiliza-se a menor concentração do conjunto de calibração [53,57].

### 2.3.1.4 Limite de quantificação (LOQ)

Define-se por LOQ o nível mais baixo de concentração em que o analito possui relação sinal/ruído considerável para que seja possível sua detecção no detector, garantindo exatidão e precisão para o analito. A **equação 2.3** apresenta como pode ser calculado o LOQ [53].

$$LOQ = 10 X \frac{s}{S} \quad (2.3)$$

### 2.3.1.5 Exatidão e precisão

A exatidão de um método é estimada através do grau de concordância entre o valor medido ou determinado e o valor de referência. Para avaliar a exatidão de um método são utilizados materiais de referência certificados, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição de padrão [54].

A precisão apresenta o grau de confiança entre os resultados de um número de medidas realizadas em uma mesma amostra e mesmo nível de concentração preparadas em condições determinadas. A precisão é estimada pelo desvio padrão absoluto (s) que está apresentado na **equação 2.4**.

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2.4)$$

onde  $x_i$  é o valor individual de uma medição e  $\bar{x}$  é a média aritmética de um pequeno número de determinações.

O RSD ou coeficiente de variação (CV) também é uma maneira para estimar a precisão, sendo representada pela **equação 2.5** [53].

$$RSD \% \text{ ou } CV \% = \frac{s}{\bar{x}} 100 \quad (2.5)$$

S é o desvio padrão.

Neste trabalho, a precisão foi expressa em termos da razão de Hortwirtz [58] calculada usando **as equações 2.6 e 2.7**.

$$RSD_{Hor} = C^{-0,15} \quad (2.6)$$

$$Razão Hor = \frac{RSD (encontrado)}{RSD_{Hor} (calculado)} \quad (2.7)$$

Em que C é a fração de massa expressa como exponencial de 10 (por exemplo, 1 mg g<sup>-1</sup> = 10<sup>-3</sup>).

A razão de Hortwitz (HorRat) é utilizada para gerar os valores aceitáveis para repetibilidade. O HorRat compara a repetibilidade medida e a precisão calculada pela **equação 2.7** para os níveis de concentração estudada. Os valores que são aceitáveis para esta razão variam de 0,5 a 2 [58].

Em termos gerais, a precisão é obtida nos níveis de repetibilidade (utilizam-se as mesmas condições em um pequeno intervalo de tempo), precisão intermediária (medidas dentro de um mesmo dia e em dias diferentes pelo mesmo analista e equipamento) e também por reprodutibilidade (medidas em diferentes equipamentos e/ou laboratórios). A reprodutibilidade não foi avaliada neste trabalho [59].

#### 2.3.1.5.1 *Repetibilidade*

A repetibilidade avalia a variabilidade de uma medida, sendo que esta deve ter a variação sendo realizada por um único analista, em um mesmo equipamento, e em curto espaço de tempo [53].

De acordo com a EURACHEM, as medidas devem ser realizadas de seis a quinze replicatas para cada nível de concentração [53].

#### 2.3.1.5.2 *Precisão intermediária*

A precisão intermediária mostra se existem variações das medidas realizadas no mesmo laboratório a condições diferentes como dias, analistas ou equipamentos [53].

É o resultado mais representativo da variabilidade dos resultados em um único laboratório, por isso é a mais utilizada para expressar resultados de precisão. Tem como objetivo confirmar que em um mesmo laboratório o método apresenta o mesmo resultado. A EURACHEM [53] recomenda que sejam realizadas medidas em dois dias diferentes de seis a quinze repetições sendo que esta precisão pode ser expressa pelo RSD.

#### 2.3.1.5.3 *Efeito de matriz*

Quando as medidas das amostras apresentam resultados estatisticamente diferentes para a mesma quantidade e nível de concentração do analito presente em uma

determinada amostra, esta diferença é chamada de efeito matriz. Este efeito pode prejudicar a exatidão de um método utilizado como rotina.

O efeito matriz pode ser avaliado realizando-se medidas com os padrões analíticos com certo grau de pureza conhecido preparados em solvente e comparados com padrões extraídos em diferentes níveis de fortificação.

Testes estatísticos são realizados e utilizados para calcular o efeito de matriz, como por exemplo, o teste  $F$  (Fisher Snedecor) que estuda a homogeneidade das variâncias, avaliando se as matrizes que foram fortificadas são estatisticamente iguais, a um nível de 95% de confiança, em cada ponto curva analítica, de acordo com a **equação 2.8** [53,54].

$$F_{cal} = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (2.8)$$

onde  $s_1^2$  e  $s_2^2$ , são as variâncias dos padrões externos e os pontos extraídos com fortificação, respectivamente. Se o valor de  $F_{calculado}$  for menor que o  $F_{crítico}$  (tabelado), pode-se concluir que não há diferenças estatisticamente significativas, considerando os mesmos graus de liberdade e nível de confiança.

Um teste  $t$  é realizado para comparar os métodos a um nível de confiança (geralmente 95%) [60], que é baseado na **equação 2.9**.

$$t_{cal} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{s^2 \left( \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} \quad (2.9)$$

Onde  $s^2$ ,  $\bar{x}_1$  e  $\bar{x}_2$  são as médias das matrizes com os padrões fortificados e sem fortificação,  $n_1$  e  $n_2$  são os tamanhos das amostras.

De acordo com Moreno-Gonzalez et al. (2016) [61], o efeito matriz (EM) pode ainda ser calculado de acordo com a **equação 2.10**. O valor de EM não pode ser maior que  $\pm 20\%$  [61].

$$EM (\%) = \left( \left( \frac{\text{inclinação da curva de calibração fortificada}}{\text{inclinação da curva de calibração externa}} \right) - 1 \right) \times 100 \quad (2.10)$$

## 2.4 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

A região espectral do infravermelho corresponde a uma faixa que varia de 750 a 100.000 nm. Dentro dessa extensa faixa, o infravermelho pode ser dividido em três regiões diferentes: infravermelho próximo (NIR – Near Infrared), médio (MIR – Middle Infrared) e distante (FIR - FAR Infrared). Na **Tabela 2.2** são apresentados os limites de cada região [62].

**Tabela 2.2** - Regiões espectrais no infravermelho [63]

Região	Intervalo de número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Região de comprimento de onda (nm)	Região de frequência (Hz)
<b>Próximo (NIR)</b>	12800 – 4000	780 – 2500	3,8 x 10 <sup>14</sup> – 1,2 x 10 <sup>14</sup>
<b>Médio (MIR)</b>	4000 – 200	2500 – 50000	1,2 x 10 <sup>14</sup> – 6,0 x 10 <sup>14</sup>
<b>Distante (FIR)</b>	200 – 10	5000 – 100.000	6,0 x 10 <sup>14</sup> – 3,0 x 10 <sup>11</sup>

Os espectros no infravermelho são originados por transições na energia ocasionada por mudanças das moléculas de um estado vibracional/rotacional para o outro [63]. O oscilador harmônico apresenta de maneira simplificada uma similaridade com as vibrações das moléculas diatômicas, através da mecânica quântica, os níveis de energia vibracional quantizados podem ser representados de acordo com a **Equação 2.10**.

$$E_{vib} = hv \left( n + \frac{1}{2} \right) \quad (2.10)$$

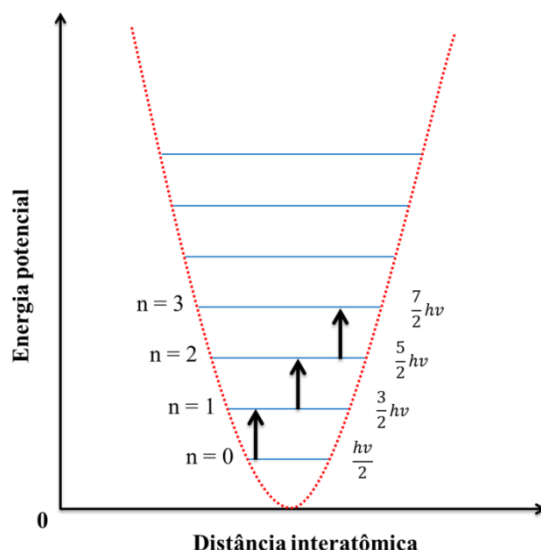
Em que:

**E<sub>vib</sub>**: energia vibracional;

**h**: constante de Plank;

**n**: número quântico vibracional

O modelo do oscilador harmônico é apresentado na **Figura 2.4**.



**Figura 2.4** - Curvas de energia potencial de uma molécula diatômica: modelo do oscilador harmônico.

Adaptado de SKOOG, 2002 [63].

Na **Figura 2.4** pode-se observar que para  $n=0$  o valor da energia é igual a  $h\nu/2$ , conhecido como energia do estado fundamental. Na transição de energia para o nível 1, para o nível 2 ou do nível 2 para o nível 3, deveria assumir um valor de energia de transição do estado fundamental para o nível 1. De acordo com a teoria quântica, existe uma restrição para seleção do oscilador harmônico que são os níveis de energia equiespaçados, de que apenas transições fundamentais, a qual é denominada regra de seleção ( $\Delta n = \pm 1$ ), são permitidas. Visto que os níveis vibracionais são igualmente espaçados, um único pico de absorção é observado para cada vibração molecular [63-64].

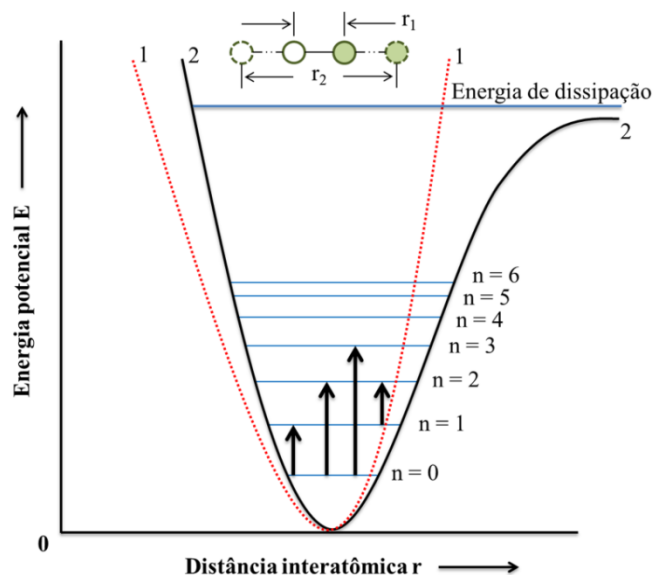
Diante desse contexto, a vibração molecular diatômica pode ser comparada com oscilador anarmônico, o qual apresenta níveis de energia vibracional de acordo com a **Equação 2.11**.

$$E_{\text{vib}} = h\nu \left( n + \frac{1}{2} \right) - h\nu w \left( n + \frac{1}{2} \right)^2 \quad (2.11)$$

Em que  $E_{\text{vib}}$  é a energia vibracional,  $h$  é a constante de plank,  $\nu$  é a frequência vibracional clássica,  $n$  é o número quântico e  $w$  é a constante de anarmonicidade [63-67].

Na **Figura 2.5** é representado o modelo do oscilador anarmônico, a regra de seleção, neste caso, muda para  $\Delta n = \pm 1, \pm 2, \pm 3 \dots$ . É importante ressaltar que, de

acordo com o aumento do número quântico vibracional  $n$ , a energia dos níveis diminui. Ainda é possível constatar que existe uma energia de dissociação, o que não ocorre no oscilador harmônico [68].



**Figura 2.5** - Curvas de energia potencial de uma molécula diatômica: modelo do oscilador anarmônico. Adaptado de Skoog, 2002 [63].

A rotação de moléculas diatômicas em torno dos seus centros de massa provoca uma variação no momento de dipolo fazendo com que ocorra a radiação no infravermelho, o mesmo fenômeno não ocorre às moléculas homonucleares ( $O_2$ ,  $N_2$  ou  $Cl_2$ ) e como consequência para substâncias desse tipo não ocorre absorção no infravermelho [63,67].

Os números prováveis para vibrações de uma molécula linear é  $3N - 5$ , e para uma molécula não linear é  $3N - 6$ , onde  $N$  é o número de átomos na molécula. Os espectros do infravermelho apresentam um grande número de bandas de absorção, o que pode ocorrer à presença de sobretons e bandas de combinações [66-67,69].

A espectrometria no infravermelho é uma técnica analítica amplamente utilizada para diversos fins, pois é uma técnica não destrutiva, rápida, relativamente de baixo custo e capaz de analisar amostras com pouco ou sem nenhum pré-tratamento.

### 2.4.1 *Espectroscopia no infravermelho próximo (NIR)*

Ao decompor a luz por meio de um prisma de vidro e movendo um termômetro através das cores para sua identificação no espectro, o alemão Frederick William-Herschel, no ano de 1800, observou a radiação do infravermelho próximo incidente na amostra. Ele percebeu que existia uma pequena variação na temperatura depois do vermelho, ou seja, uma radiação além do visível. Porém, esta descoberta só foi considerada com o desenvolvimento dos instrumentos modernos capazes de registrar espectros [70]. O uso da espectroscopi NIR na área da química analítica iniciou em 1960 por Karl Norris, nos EUA [71].

Como mencionado na seção anterior, a região do NIR abrange uma faixa de 780 – 2.500 nm do espectro eletromagnético, suas bandas são provenientes de sobretons de transições vibracionais e bandas de combinações de transições fundamentais.

Normalmente, os espectros NIR apresentam bandas de moléculas ou átomos de C, O, N ou S ligados ao átomo de hidrogênio. Esta técnica tem uma vasta aplicação nos estudos de compostos orgânicos, tem presente em suas estruturas moléculas ligações C-H, N-H, O-H, S-H [71-72].

Apesar de conseguir um sinal proveniente desses compostos, as informações adquiridas com o NIR apresentam bandas amplamente sobrepostas, de difícil interpretação e atribuição, fazendo com que o seu uso dependa de recursos matemáticos e/ou estatísticos para contornar esses problemas e obter dados confiáveis para realizar as análises.

### 2.4.2 *Espectroscopia no infravermelho médio (MIR)*

A região do MIR compreende a faixa de 2.500 – 5.000 nm, no qual ocorrem as vibrações fundamentais onde as variações nos níveis vibracionais ( $\Delta n$ ) são iguais a  $\pm 1$ . Geralmente, essas variações são mais intensas no MIR, com bandas mais definidas e coeficiente de absorção que permite uma melhor análise da estrutura da molécula [69].

O MIR é bastante utilizado para caracterização de um material, uma vez que funciona como uma “impressão digital” do composto, pois pequenas mudanças na constituição das moléculas apresentam em diferenças em seu perfil espectral e distribuição dos picos [69].

Na literatura, o MIR foi bastante utilizado para caracterizar [73], identificar [74] e quantificar [75]. Esta técnica é extremamente robusta e segura para estudos quantitativos envolvendo diferentes matrizes.

A região MIR apresenta bandas provenientes de grupos funcionais presentes na molécula que são comparadas a compostos que apresentem o mesmo grupo funcional em sua molécula para tornar possível a identificação de compostos desconhecidos [68,75]. Ressalta-se que a intensidade das bandas é diretamente proporcional com as concentrações dos respectivos grupos funcionais.

Quando aplicados à química analítica, a espectrometria MIR também apresenta sobreposição em seus espectros, requerendo, assim, técnicas de análise multivariadas para auxiliar na extração e interpretação dos dados [77].

## 2.5 Quimiometria

A quimiometria pode ser entendida como a aplicação da matemática e estatística a dados químicos [70,78]. Neste sentido, a quimiometria é utilizada para planejar experimentos, extrair o maior número de informação de dados de difíceis interpretações, sendo eles químicos e de natureza multivariada [79].

Desde o seu surgimento no final dos anos 60 até hoje têm sido desenvolvidos muitos métodos que facilitam a interpretabilidade dos dados que antes seriam impossíveis de serem analisados. Como exemplo, os dados de infravermelho para análise quantitativa de compostos, antes sem a utilização de modelos de calibração multivariada não apresentavam alternativa para estas determinações, principalmente quando ocorre a presença de interferentes [62].

Neste trabalho, são empregadas técnicas de reconhecimentos de padrões e calibração multivariada. Antes da aplicação dos métodos quimiométricos é importante avaliar diferentes tipos de pré-processamentos dos dados. A ausência desta etapa poderá comprometer o desempenho dos modelos construídos.

### 2.5.1 *Pré-Processamentos*

O pré-processamento dos dados tem a função de contornar problemas nas medidas instrumentais causados por instabilidade instrumental, medidas em dias diferentes, ruídos instrumentais e espalhamentos provocados pela radiação durante a análise [80].

A centralização na média, escalonamento e autoescalonamento dos dados são pré-tratamentos aplicados com frequência. Centrar os dados na média significa subtrair os elementos de cada linha ou coluna pela sua média. Escalonar um determinado conjunto de dados consiste em dividir os elementos da coluna pelo desvio padrão da mesma coluna. Por fim, autoescalonamento equivale em realizar os dois pré-processamentos citados anteriormente com o objetivo de atribuir o mesmo peso às variáveis em consideração [70].

Outros tipos de pré-processamentos também podem ser utilizados, como a normalização, ponderação, correção de linha de base e suavização [70,81]. A normalização e ponderação contornam variações sistemáticas provenientes das amostras dividindo ou multiplicando cada variável do vetor amostra por uma constante [81-82].

Problemas associados a espalhamento de radiação ou variação da linha de base também podem ser contornados pela primeira derivada, que promove uma melhor visualização dos picos existentes nos sinais originais [81]. O aumento da relação sinal/ruído bem como o ruído aleatório pode ser obtido através da suavização dos dados. A segunda derivada, por sua vez, elimina uma variação linear de linha de base que estão associadas aos espalhamentos [70,82].

A técnica mais utilizada para derivar e suavizar os dados é o método de Savitzky-Golay [83], que faz um ajuste de polinômio de baixa ordem aos pontos de janela por mínimos quadrados.

A escolha do pré-processamento adequado é necessário para que as técnicas quimiométricas sejam aplicadas.

### 2.5.2 *Técnicas de Reconhecimento de Padrões*

As técnicas de reconhecimento de padrões (RP) têm por objetivo avaliar se existem similaridades entre os grupos de amostras que estão submetidas a algum tipo de análise [84-85]. Podem ser classificadas em dois tipos: não supervisionadas ou supervisionadas.

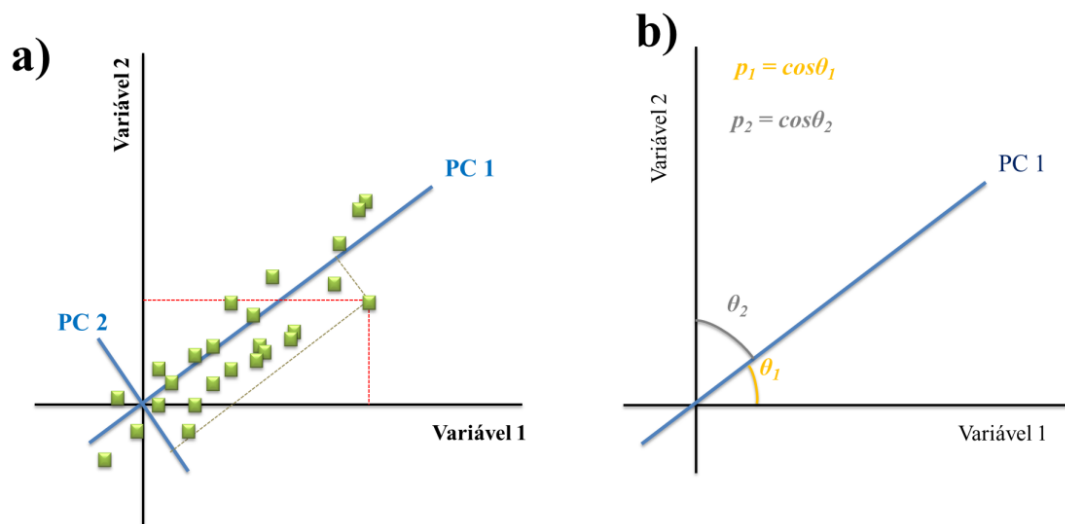
1. Não supervisionadas: realizadas para analisar os agrupamentos naturais utilizando apenas as informações fornecidas pelas variáveis, sem considerar rótulos ou qualquer informação sobre as classes [81]. A técnica de RP não supervisionada mais conhecida e utilizada é a análise de componentes principais (PCA) [70,86-88].
2. Supervisionadas: objetiva-se na construção de modelos de um conjunto de amostras conhecidas, denominadas conjunto de treinamento [70, 81]. O modelo construído é utilizado posteriormente para identificar amostras de classes desconhecidas. Na literatura, as técnicas de RP supervisionadas estão bem difundidas e com um elevado número de aplicações que são: a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) e análise discriminante linear (LDA) [89-94].

#### 2.5.2.1 *Análise por componentes principais (PCA)*

A PCA é uma das técnicas RP não supervisionado mais utilizadas para diminuir a dimensionalidade dos dados, identificar agrupamentos naturais e amostras anômalas presentes no conjunto de dados. Com esta finalidade, um cálculo matemático é realizado sob uma matriz de dados  $\mathbf{X}$  ( $n \times m$ ), as linhas correspondem às amostras ( $n$ ) e nas colunas as variáveis ( $m$ ); no caso dos dados espectrais, as variáveis são os valores de absorvância correspondente a cada comprimento de onda.

Na PCA, toda variação do conjunto de dados é determinada em um espaço multidimensional reduzido, mantendo a máxima informação possível [85]. Este espaço resulta da decomposição da matriz de dados em um agrupamento formado por eixos ortogonais entre si, que são denominados fatores ou componentes principais (PCs), e são obtidos por uma combinação linear das variáveis originais em que são dispostas ordem decrescente de variância [70, 86-87]. A variância e as PCs são diretamente proporcionais: à medida que a variância diminui, acontece o mesmo com a informação em porcentagem contida nas PCs. Como consequência, menos PCs serão necessárias para representar o conjunto de dados, reduzindo sua dimensionalidade [70].

A **Figura 2.6** apresentam duas variáveis em um plano bidimensional com duas PCs, os escores são as novas coordenadas das amostras no novo espaço [87].



**Figura 2.6** - Primeira e segunda PCs obtidas a partir da combinação linear das variáveis originais. (a) As linhas pontilhadas na cor vermelha correspondem às projeções de uma amostra nas PCs (scores), enquanto as linhas tracejadas na cor vermelha representam as projeções nas variáveis originais. (b) O cosseno dos ângulos  $\theta_1$  e  $\theta_2$  representa os loadings.

Fonte: adaptada de Beebe 1998 [81].

As PCs são obtidas a partir da combinação linear das variáveis originais e os coeficientes da combinação representam os pesos de cada variável original na construção do modelo [87]. Esses pesos também são chamados de *loadings*, que são apresentados na **Figura 2.7b** calculados através do cosseno dos ângulos formados entre a PC e cada variável.

### 2.5.2.2 Análise discriminante pelos mínimos quadrados parciais (PLS-DA)

O PLS-DA utiliza a regressão PLS para construir modelos de classificação que relacionam as informações instrumentais com as propriedades de interesse, utilizando as informações das classes (rótulos) armazenadas em um vetor [92, 95-98].

Assim como no PLS, o PLS-DA também apresenta variáveis latentes (VL), que são resultados da combinação linear das variáveis e têm como objetivo obter uma melhor discriminação das classes de amostras baseado na covariância máxima entre  $\mathbf{X}$  (matriz instrumental) e uma matriz  $\mathbf{Y}$ . No PLS-DA, a matriz  $\mathbf{Y}$  codificada por meio de valores binários, geralmente são utilizados 0 ou 1 [99].

O limiar pode ser calculado através do teorema de byes ou pelo limite de confiança para cada classe estudada, comumente são utilizados valor de 0,5, sendo assim, quando um valor próximo a zero ou abaixo da fronteira é obtido para uma

amostra, a mesma é classificada como sendo da classe que representa o valor 0. Na **Figura 2.7** está apresentado um esquema de como o PLS-DA se comporta.

		Vetor $y$	Matriz $X$			
Classe A	✕	0	$x_{1,1}$	$x_{1,2}$	...	$x_{1,n}$
	✕	0	$x_{2,1}$	$x_{2,2}$	...	$x_{2,n}$
	✕	0	$x_{3,1}$	$x_{3,2}$	...	$x_{3,n}$
Classe B	■	1	$x_{4,1}$	$x_{4,2}$	...	$x_{4,n}$
	■	1	$x_{5,1}$	$x_{5,2}$	...	$x_{5,n}$
	■	1	$x_{6,1}$	$x_{6,2}$	...	$x_{6,n}$

**Figura 2.7-** Representação do modelo PLS-DA utilizando o algoritmo PLS 1 para duas classes de objetos.

### 2.5.2.3 Análise discriminante linear (LDA)

A LDA baseia-se no cálculo de funções discriminantes (FDs) que maximiza a distância entre as classes e minimizam a variância entre as amostras de uma mesma classe [70]. Para que isto ocorra, as FDs são obtidas partindo de combinações lineares das variáveis originais que discriminam melhor as classes ou grupos de objetos [70].

Quando se determinam os centros das classes dos objetos a serem classificados, obtém-se uma fronteira denominada função discriminante linear, equidistante e perpendicular à linha que une os centros. A função discriminante determina as regiões correspondentes de cada classe, assim, se um objeto estiver presente na região em torno de  $R_1$ , este é classificado como pertencente à classe A, se não, pertencerá à classe B [100]. Na LDA, as amostras sempre serão classificadas como membros de uma ou outra classe. As FDs serão um plano quando estiver relacionada a um espaço tridimensional e um hiperplano  $m-1$  para quatro ou mais dimensões,  $m$  é o número de variáveis presentes [100].

A eficiência de modelos LDA é comprometida quando a dimensão dos dados é muito grande, isso pode ocasionar problemas de colinearidade. Para casos com muitas

variáveis, recomenda-se reduzir a dimensionalidade dos dados ou o uso de seleções de variáveis, principalmente quando aplicados a dados espectrais [101].

Na área de seleções de variáveis em modelos LDA, destacam-se alguns métodos que vêm sendo bastante utilizados na literatura, como o Algoritmo das Projeções Sucessivas (SPA) [54, 102-103], Stepwise (SW) [104] e Algoritmo Genético (GA) [79].

## 2.6 Calibração multivariada

A função da calibração multivariada é construir um modelo matemático a partir de dados multivariados, prevendo, com rapidez, propriedades de interesse da amostra, sejam elas químicas ou físicas [81, 87, 105].

Este processo é composto por três fases: calibração, validação e predição. Na primeira fase – de calibração, modelos matemáticos são construídos, em que as matrizes instrumentais ( $\mathbf{X}$ ) são relacionadas com um vetor que possui os valores de referência ( $\mathbf{Y}$ ) [87].

Na validação, realiza-se uma avaliação dos modelos verificando se são satisfatórios para determinar a propriedade de interesse. Existem duas técnicas para validar um modelo, a validação por série de teste que utiliza subconjuntos separados de calibração e validação e a validação cruzada que usa unicamente o conjunto de calibração, sendo essa última empregada neste trabalho.

Para avaliar a validação de um modelo, é calculada a raiz quadrada do erro médio quadrático de validação (RMSEV) ou validação cruzada (RMSECV) [78,81]. Neste trabalho foi utilizada a validação cruzada é calculado pela a **equação 2.12**.

$$\text{RMSECV} = \sqrt{\frac{1}{K_c} \sum_{i=1}^{K_c} (y_c^i - \hat{y}_c^i)^2} \quad (2.12)$$

onde  $K_c$  é o número de amostras do conjunto de calibração,  $y_c^i$  e  $\hat{y}_c^i$  são respectivamente valores medidos e previstos para o parâmetro de interesse na *i-ésima* amostra de calibração.

A etapa de predição é utilizada para avaliar a habilidade dos modelos de calibração utilizando as amostras externas, ou seja, as que não participam do processo de construção do modelo. Neste caso, utiliza-se o valor de raiz quadrada do erro médio

quadrático de predição (RMSEP) apresentado na **equação 2.13**, que segue com os mesmos parâmetros acima, mas para as amostras de predição.

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{1}{K_p} \sum_{i=1}^{K_p} (y_p^i - \hat{y}_p^i)^2} \quad (2.13)$$

Ainda, como avaliação para o conjunto de predição, pode-se realizar um teste estatístico através da região elíptica de confiança conjunta (EJCR), em que o objetivo é analisar a presença de erros sistemáticos no método desenvolvido, realizando uma comparação entre os valores preditos pelo método de referência e pelo modelo desenvolvido, no qual são comparadas as inclinações e interceptos das regressões lineares para ambos os métodos. O cálculo deste teste é apresentado na **equação 2.14** [106].

$$N_{\text{am}}(a - \hat{a})^2 + 2(\sum C_{\text{real}})(a - \hat{a})(b - \hat{b}) + (\sum C_{\text{real}})^2(b - \hat{b})^2 = 2s^2 F_{\alpha(2, N_{\text{am}}-2)} \quad (2.14)$$

Em que:

$a$  e  $\hat{a}$  são interceptos real e estimado, respectivamente.

$b$  e  $\hat{b}$  são inclinações real e estimada, respectivamente.

$C_{\text{real}}$  é a concentração real das amostras

$s^2$  é a variância do valor médio das concentrações reais das amostras.

$N_{\text{am}}$  é o número de amostras do conjunto de predição.

$F_{\alpha(2, N_{\text{am}}-2)}$  é o valor do ponto de distribuição F com 2 e  $N_{\text{am}} - 2$  graus de liberdade

$\alpha$  é o nível de confiança (usualmente 95%).

Se o ponto crítico ( $a=0$  e  $b=1$ ) que corresponde a inclinação e intercepto estiver contido dentro da elipse EJCR, significa que a hipótese nula é aceita, concluindo que não há diferenças estatisticamente significativas entre os valores de concentração preditos pelos modelos desenvolvidos e os valores de concentração real [106].

O erro relativo de predição (REP) também é um parâmetro importante para avaliar a qualidade do modelo desenvolvido. Seu cálculo é realizado através da **equação 2.15** [107].

$$\text{REP} (\%) = 100 \sqrt{\sum_{i=1}^{i_v} \frac{(y_i - \hat{y}_i)^2}{I_v y_i^2}} \quad (2.15)$$

Em que  $y_i$  é o valor da referência da concentração para as amostras do conjunto de predição,  $\hat{y}_i$  é o valor predito pelo modelo e  $I_v$  é o número de amostras utilizadas na etapa de validação.

Os métodos de calibração multivariada mais comumente encontrados na literatura são a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) e a regressão linear múltipla (MLR) [108].

### 2.6.1 Regressão dos mínimos quadrados parciais (PLS)

Nesta regressão a variável química ou física ( $y$ ) é determinada como uma função de fatores, que são realizados a partir da combinação linear das variáveis instrumentais ( $X$ ), que maximizam a covariância entre  $X$  e  $y$  [108,109]. Para isto, utilizam-se as equações 2.16 e 2.17.

$$X = TP^T + E \quad (2.16)$$

$$y = Tq^T + e \quad (2.17)$$

Em que a matriz  $E$  e o vetor  $e$  são os resíduos de  $X$  e  $y$ , respectivamente.  $T$  são os escores para ambos  $X$  e  $y$  e  $P$  e  $q$  representam os pesos da matriz  $X$  e do vetor  $y$ , respectivamente.

As equações 2.18 e 2.19 relacionam linearmente os escores da matriz  $X$  ( $T$ ) com os escores da matriz  $y$  ( $U$ ) [105].

$$U = BT^t + G \quad (2.18)$$

$$Y = BTQ^t + H \quad (2.19)$$

Em que  $B$ ,  $G$  e  $H$  são as matrizes dos coeficientes de regressão, resíduos dos escores e resíduos de concentração, respectivamente.

A otimização do número de variáveis latentes (VL) é determinado por validação cruzada e o número ótimo de VL é utilizado no modelo PLS [81].

### 2.6.2 Regressão linear múltipla (MLR)

O MLR é um dos métodos de calibração mais simples em que as respostas instrumentais ( $\mathbf{X}$ ) são correlacionadas com os parâmetros ( $\mathbf{y}$ ), estabelecendo uma relação linear entre cada variável dependente do vetor  $\mathbf{y}$  com as variáveis independentes da matriz  $\mathbf{X}$ , como apresentado na **equação 2.20** [78-79,105].

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\mathbf{b} + \mathbf{e} \quad (2.20)$$

Em que  $\mathbf{y}$  é o parâmetro que se pretende determinar;  $\mathbf{X}$  é a matriz contendo a resposta instrumental;  $\mathbf{b}$  o vetor dos coeficientes lineares de regressão e  $\mathbf{e}$  o vetor dos resíduos (não é modelado em  $\mathbf{y}$ ) [78].

Os coeficientes  $\mathbf{b}$  são determinados de acordo com o critério dos “mínimos quadrados” na etapa de calibração, pela **equação 2.21**.

$$\mathbf{b} = (\mathbf{X}^T\mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^T\mathbf{y} \quad (2.21)$$

Para resolver esta equação acima, é necessária a matriz inversa  $\mathbf{X}^T\mathbf{X}$ . No entanto, para que isso seja possível, a quantidade de variáveis deve ser igual ou menor ao número de amostras [78, 105].

Contudo, em dados de origem espectrais é bastante comum a quantidade de variáveis ser maior que a quantidade de amostras empregadas, ou ainda, podem existir alta multicolinearidade na matriz  $\mathbf{X}$ . Para contornar estes problemas e fazer o uso do MLR sem restrições, métodos de seleções de variáveis são requeridos nesse contexto [81].

#### 2.6.2.1 Seleção de variáveis

Como abordado nas **seções 2.5.2.3 e 2.6.2** existem algumas limitações no uso de alguns métodos de classificação e de calibração multivariada. Para contornar tais problemas, a seleção de variáveis tem sido empregada a fim de remover variáveis não informativas e/ou redundantes, deixando apenas as que contribuem para melhorar o desempenho dos modelos resultantes. Muitos trabalhos empregando seleção de variáveis são encontrados na literatura. Destes, destacam-se o algoritmo das projeções

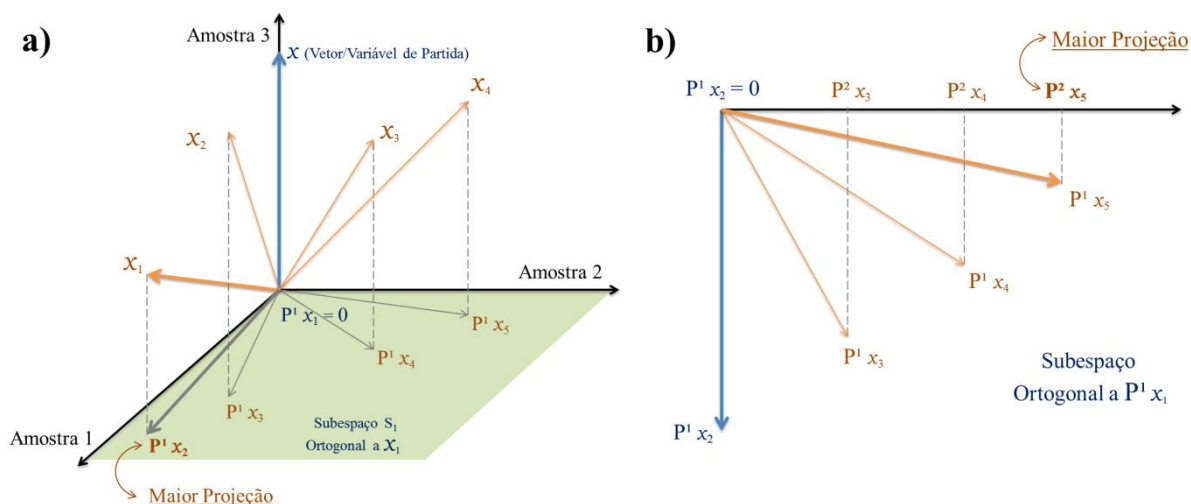
sucessivas (SPA) [102,109-112], algoritmo genético (GA) [113], stepwise (SW) [78,103], regressão por mínimos quadrados parciais por intervalo (iPLS) [114-115], entre outros.

### 2.6.2.1.1 Algoritmo das projeções sucessivas (SPA)

O SPA inicialmente foi proposto por Araújo et.al. (2001) [110] com o propósito de selecionar variáveis em dados espectroscópicos para utilizar o MLR. A finalidade do SPA é buscar subconjuntos representativos de variáveis com menor colinearidade [110]. O melhor subconjunto é escolhido através da modelagem do MLR de acordo com o menor RMSEV ou RMSECV [112], calculado com a equação 2.12.

Fundamentalmente, o SPA realiza as projeções envolvendo colunas de uma determinada matriz  $\mathbf{X}$  ( $K_c \times j$ ) provenientes da resposta instrumental, em que  $k_c$  são as observações e  $j$  são as variáveis instrumentais, gerando subconjuntos com variáveis minimamente correlacionada [110].

A **Figura 2.8** exhibe o procedimento de projeções sucessivas das variáveis até a escolha do melhor conjunto.



**Figura 2.8** - Sequência de projeções realizadas pelo SPA com  $K_c = 3$  e  $j = 5$ . Resultado da primeira (a) e segunda (b) iteração. Neste exemplo, o subconjunto de variáveis selecionadas inicia com  $x_1$  e deverá ser  $\{x_1, x_2, x_3\}$ .

Adaptada de Pontes (2009) [70].

Na **Figura 2.8** o vetor  $x_1$  (vetor correspondente à variável inicial de seleção) é projetado no subespaço  $S_1$  ortogonal a  $x_1$ . Os vetores ou variáveis que sobram, são

projetados no subespaço  $S_1$  e o SPA seleciona a variável que possui maior projeção. O vetor das variáveis, chamado de  $\mathbf{x}_2$ , é o vetor que apresenta a maior quantidade de informação não contida no vetor de partida.

O próximo passo é restrito ao subespaço ortogonal à projeção do vetor de  $\mathbf{x}_2$ , chamado de  $\mathbf{P}_{1 \times 2}$ , sendo essa a projeção referência. A cada passo repetido uma nova variável é selecionada para integrar o conjunto que contém o número de variáveis que foi estabelecido pelo analista. Cada passo de projeção é seguido sucessivamente até que uma cadeia de variáveis seja obtida. O SPA possibilita que no máximo  $k_c$  variáveis sejam selecionadas, uma vez que a cada operação de projeção, um grau de liberdade é retirado da matriz  $\mathbf{X}$  [82].

Pontes et al. (2005) [103] adaptaram o SPA para ser usado nos modelos de classificação, principalmente para os modelos com LDA. Neste contexto, a função de custo utilizada para orientar a escolha das variáveis foi o risco médio  $G$  de uma classificação incorreta pela LDA, que é calculada baseada no conjunto de calibração (Equação 2.22) [103].

$$\mathbf{G} = \frac{1}{k_v} \sum_{i=1}^{k_v} \mathbf{g}_k \quad (2.22)$$

onde  $\mathbf{g}_k$  (risco de uma classificação incorreta do objeto  $\mathbf{x}_k$  da  $k$ -ésima amostra de validação) definido como (Equação 2.23):

$$\mathbf{g}_k = \frac{r^2(\mathbf{X}_k, \mu_{IK})}{\min_{I_j \neq IK} r^2(\mathbf{X}_k, \mu_{IK})} \quad (2.23)$$

Em que:

- ✓  $r^2(\mathbf{X}_k, \mu_{IK})$  corresponde ao quadrado da distância de Mahalanobis entre o objeto  $\mathbf{x}_k$  (com índice de classe  $Ik$ ) e a média de sua classe ( $\mu_{IK}$ ).
- ✓  $\min_{I_j \neq IK} r^2(\mathbf{X}_k, \mu_{IK})$  corresponde ao quadrado da distância de Mahalanobis entre o objeto  $\mathbf{x}_k$  e o centro da classe errada mais próxima.

O valor de  $\mathbf{g}_k$  deve ser tão pequeno quanto possível, ou seja, o  $\mathbf{x}_k$  deve estar perto do centro da sua classe verdadeira e distante dos outros centros (classes).

Soares et al.(2014) [116] propuseram um critério para o SPA-LDA baseado na validação interna. O cálculo do custo é realizado não mais com o conjunto de validação,

e, sim, com o conjunto de treinamento, levando em consideração o número de graus de liberdade. Esse critério é apresentado pela **equação 2.24**.

$$J_{cost} = \frac{1}{N_{train} - L - C} \sum_{n=1}^{N_{train}} g_n \quad (2.24)$$

onde,  $N_{train}$  representa o número de amostra de treinamento,  $L$  é o número de variáveis do subconjunto que está sendo avaliado e  $C$  representa o número de classes de objeto investigadas. Com este critério, apenas o conjunto de treinamento e teste são utilizados.

### 2.6.2.2 Stepwise (SW)

O Stepwise verifica a importância das variáveis, adicionando-as (*forward*) ou excluindo-as (*backward*) do modelo, de acordo com o fator de discriminação individual ( $D_i$ ) de cada uma, considerando as medidas de dispersão dentro e entre as classes (**equação 2.25**) [70,79].

$$D_i = \frac{SB_i}{SW_i} \quad (2.25)$$

Em que  $SB_i$  a dispersão entre as classes e o  $SW_i$  a dispersão dentro da classe.

A variável  $n_j$  que apresenta o maior fator de discriminação é selecionada e realiza-se um procedimento de validação cruzada (*leave – one- out*), de maneira a obter o número de erros. Esta etapa é repetida com todas as outras variáveis existentes, até que o grupo de variáveis que apresentar o menor erro seja escolhido [70,79].

Nesse contexto, podem-se testar diferentes valores de limiar (*threshold*) variando de 0,1 a 0,9, que são comparados de acordo com o número de erros do conjunto de validação [69].

Na calibração, o método *forward* é iterativo que começa com uma variável ( $\mathbf{X}$ ) e, gradualmente, adiciona mais variáveis ao modelo de regressão até que atinja um critério satisfatório. A primeira variável deve apresentar uma máxima correlação com a variável de resposta ( $\mathbf{Y}$ ). A cada passo, um novo modelo é construído e o efeito da variável incluída é avaliado por um teste  $F$ . A variável que obtiver um valor de  $F$  maior que um

F-crítico é incluída no modelo. O backward, método que elimina uma variável, começa com a construção de um modelo de regressão com todas as variáveis disponíveis, em seguida, as variáveis são excluídas, e o que essa exclusão causa no modelo, é avaliado, da mesma maneira que a etapa *forward*, porém a variável com um valor de F menor que a do F crítico é excluída do modelo.

Forina et al. (2007) [117] modificaram este método e utilizaram a ortogonalidade para eliminar o problema de multicolinearidade entre as variáveis selecionadas.

### 2.6.2.3 Algoritmo genético (GA)

O algoritmo genético foi proposto por John H. Holland na década de 60. Esta é uma técnica de otimização e busca, de maneira aleatória, tomando como base o princípio da biologia de evolução e genética natural das espécies de Charles R. Darwin [118]. A semelhança com o processo evolutivo natural permite que as variáveis do sistema estudado sejam codificadas de forma binária, tornando-se semelhante aos dos cromossomos biológicos. Através de um gerador aleatório, uma população de cromossomos é formada aleatoriamente, evitando, assim, influências tendenciosas externas. O passo seguinte é testar a aptidão do indivíduo, investigando estatisticamente qual a melhor resposta para o sistema [68].

No âmbito de classificação multivariada, a aptidão utilizada foi considerada como o inverso do risco G, representada na **equação 2.22**, apresentada na seção anterior. Onde é calculado usando as variáveis codificadas no cromossomo. Os indivíduos que gerarem os melhores resultados terão seus parâmetros cruzados para geração de novas combinações (descendentes). Alguns indivíduos podem receber características diferentes de seus pais e sofrerem mutações. Tanto as mutações quanto as gerações ocorrem até que a condição de avaliação seja alcançada [119].

Para calibração multivariada, praticamente avalia-se através da construção de modelos MLR baseados nos comprimentos de onda indicados nos cromossomos. Após isso, esses modelos são utilizados para medir o parâmetro de interesse no conjunto de validação, o valor de aptidão é calculado como o inverso do RMSEP obtido, o subconjunto de variáveis que tiver o menor RMSEP, ou seja, uma maior aptidão será o resultado do GA [120].

#### 2.6.2.4 Algoritmo *iPLS*

O *iPLS* foi desenvolvido por Nørgaard e colaboradores [115], este algoritmo é uma ampliação interativa desenvolvida para o PLS. Como o PLS, o *iPLS* utiliza a regressão realizada por mínimos quadrados parciais em cada subintervalo equidistante, definido anteriormente no decorrer de toda faixa espectral, e é capaz de identificar e selecionar a faixa de variável que expressa uma informação mais relevante que possua o menor valor de RMSECV (**equação 2.23**). Após isso, constrói-se o modelo na faixa que foi selecionada e faz-se uma comparação utilizando toda faixa espectral [114,121].

#### 2.6.3 Seleção de amostras

O algoritmo Kennard-Stone (KS) [122] é o mais utilizado para selecionar amostras em quimiometria. Segundo Galvão et al. (2005) [123], o KS seleciona um subconjunto representativo de um conjunto contendo N amostras, maximizando as distâncias euclidianas entre os vetores das respostas instrumentais ( $\mathbf{x}$ ) das amostras selecionadas. Essa distância pode ser descrita como  $d_x(p,q)$  entre o  $x$  vetores de cada par (p,q) das amostras selecionadas, e pode ser calculada de acordo com a **equação 2.26**.

$$d_x(\mathbf{p}, \mathbf{q}) = \sqrt{\sum_{j=1}^J [\mathbf{x}_p(j) - \mathbf{x}_q(j)]^2}; \quad (2.26)$$

onde  $x_p(j)$  e  $x_q(j)$  são as respostas do instrumento na  $j$ -ésima variável, para as amostras “p” e “q”, respectivamente. J representa o número de variáveis no conjunto de dados.

O algoritmo KS é bastante utilizado para dados de classificação. Para selecionar amostras no conjunto de calibração multivariada, Galvão et al. (2005) [123] realizaram uma adaptação no algoritmo KS e chamaram esta adaptação de SPXY (Partição de amostras baseado na distância de  $\mathbf{X}$ - $\mathbf{y}$ ) que engloba no cálculo das distâncias interamostras as diferenças de  $\mathbf{X}$  e de  $\mathbf{y}$ . A distância  $d_y(p,q)$  pode ser calculada para cada par de amostras “p” e “q”, como apresentado na **equação 2.27**.

$$d_y(\mathbf{p}, \mathbf{q}) = \sqrt{(\mathbf{y}_p - \mathbf{y}_q)^2} = |\mathbf{y}_p - \mathbf{y}_q|; \quad \mathbf{p}, \mathbf{q} \in [1, N] \quad (2.27)$$

#### 2.6.4 *Transferência de calibração*

As etapas existentes em um modelo de calibração multivariada incluem planejamento do experimento, avaliação dos dados, pré-processamento, construir o modelo (validar) e, por fim, realizar a predição das amostras [124].

Quando os modelos de calibração estão prontos para serem aplicados na determinação de um parâmetro, é esperado que estes sejam capazes de realizar previsões confiáveis por um longo período de tempo. Contudo, alguns imprevistos podem ocorrer com a instrumentação utilizada na modelagem dos dados, como instabilidade, desgaste da fonte, ou até substituição do equipamento. Outros fatores que variam e impedem uma modelagem satisfatória, são mudanças na constituição química e física das amostras devido a variações de temperatura ou umidade do ambiente. Infelizmente, todas essas condições provocam deslocamento dos sinais, desvios não lineares na intensidade, impedindo uma predição confiável das amostras futuras [125-126].

E, mais ainda, seria de grande vantagem poder aplicar o modelo construído para instrumentos diferentes daquele que foi utilizado na etapa de modelagem. Para contornar tais problemas, torna-se necessário realizar uma recalibração completa do modelo, isto é, é preciso coletar novamente inúmeras amostras, analisá-las através do método de referência e desenvolver todo o modelo novamente. Todavia, este procedimento nem sempre é o mais apropriado, visto que exige tempo e um custo envolvido [125-126].

A transferência de calibração é uma grande aliada para esses fatores aqui citados, pois tem por objetivo o desenvolvimento de tratamento de dados e modelagem para resolver esses problemas [125-126].

Nos métodos de padronização, a função de resposta do equipamento secundário, é matematicamente modificada para se tornar parecida com a função de resposta do equipamento primário onde o modelo foi desenvolvido (primário) [124].

Um procedimento simples de padronização consiste em compensar diferenças de intensidade entre os espectros do equipamento secundário e os do primário, multiplicando cada variável (comprimentos de onda) do secundário por um fator de correção [125]. Tal fator é obtido por regressão linear com base em sinais analíticos (espectros) registrados nos dois instrumentos para um mesmo subconjunto representativo de amostras, chamadas amostras de transferência. Contudo, esse procedimento univariado, ou seja, baseado na relação entre variáveis instrumentais

individuais, não é eficaz em caso de deslocamentos espectrais ou alargamento de bandas [126], o que motivou o desenvolvimento de métodos multivariados.

Os métodos de padronização multivariada mais utilizados são os de Padronização Direta (DS), Padronização Reversa (RS) e Padronização Direta por Partes (PDS) [127]. Tais métodos têm por objetivo construir uma transformação linear que modifique a resposta instrumental obtida no instrumento secundário, de modo a torná-la mais semelhante a do primário.

#### 2.6.4.1 Padronização direta – DS

No método proposto por Wang et al. (1991) [128], são relacionadas matrizes das respostas instrumentais  $X_p$  ( $n_{trans} \times q$ ) e  $X_s$  ( $n_{trans} \times p$ ) através de uma matriz de transformação  $F$ , conforme apresentado na **equação 2.28**. Se o equipamento primário e o secundário forem iguais, a matriz de transformação  $F$  será quadrada e sua coluna representa, para os respectivos comprimentos de onda, as correlações entre as absorvâncias dos espectros primários e secundários [124]. Caso  $X_s$  seja invertível, a matriz  $F$  poderá ser calculada por:

$$F = (X_s)^{-1} \cdot X_p \quad (2.28)$$

Normalmente, as matrizes  $X_s$  são retangulares. Em tal caso,  $F$  pode ser calculado por métodos multivariados como a regressão por componentes principais (PCR) ou mínimos quadrados parciais (PLS) [125]. A padronização do espectro da nova amostra é obtida a partir da matriz  $F$  de acordo com a **equação 2.29**.

$$X^a = X_s F \quad (2.29)$$

onde o vetor resposta de uma amostra desconhecida, medida no equipamento secundário,  $X_s$ , é padronizado para o vetor resposta esperado no equipamento primário,  $X^a$ .

A fim de certificar que  $\mathbf{F}$  represente apenas as variações instrumentais e não alterações na composição química ou físicas das amostras, este método propõe que as amostras sejam analisadas nos dois equipamentos nas mesmas condições. Além do que, o método DS é geralmente afetado por sobreajuste (*overfitting*) na estimativa de  $\mathbf{F}$ , uma vez que o número de amostras de transferência é muito menor que o número de constantes utilizadas no ajuste do espectro inteiro [125].

#### 2.6.4.2 Padronização direta em etapas – PDS

A padronização direta em etapas normalmente é aplicada nos casos em que as correlações espectrais estão limitadas a pequenas regiões. Contrário ao DS, na qual cada comprimento de onda do espectro primário é relacionado a todos os comprimentos de onda do espectro secundário, no PDS cada comprimento de onda do espectro primário é relacionado com uma janela correspondente a uma pequena região do espectro secundário [125].

No PDS, as matrizes das respostas instrumentais  $X_p$  e  $X_s$  também se relacionam como apresentado na **Equação 2.30**, porém para cada janela é calculado um vetor de regressão  $\mathbf{f}$ . Esses vetores são dispostos em uma matriz diagonal  $\mathbf{F}$ , cujas estruturas é expressa por:

$$\mathbf{F} = \text{diag}(\mathbf{f}_1^T, \mathbf{f}_2^T, \dots, \mathbf{f}_j^T, \dots, \mathbf{f}_k^T) \quad (2.30)$$

Onde  $k$  é o número de comprimentos de onda. Dessa forma, uma nova amostra pode ser padronizada pela **Equação 2.30**. Em razão de que o PDS funciona com uma janela móvel, alguns inconvenientes podem atrapalhar o sucesso desta padronização, como os efeitos de borda que podem ocorrer quando não há dados suficientes para formar uma janela completa. Para contornar este problema, o final do espectro é removido ou estimado por extrapolação [131].

Essa janela será simétrica ou assimétrica ao redor de cada variável. Quando existem problemas com comprimentos de onda, ou desvios espectrais, a janela

assimétrica melhora a transferência, já a janela simétrica é eficaz quando ocorrem mudanças no comprimento de onda insignificantes [125,131].

O bom desempenho da padronização PDS se dá pela capacidade de corrigir de forma simultânea diferenças de intensidade, deslocamentos de comprimentos de onda e alteração na largura das bandas [124].

#### 2.6.4.3 Padronização reversa

O DS e o PDS podem ser utilizados de maneira “reversa”, neste tipo de padronização, é realizado um ajuste no conjunto de calibração do equipamento primário. Estas amostras são padronizadas e utilizadas para desenvolver um modelo que poderá ser aplicado aos espectros do equipamento secundário [132].

Os métodos de padronização reversa são mais ajustáveis, por permitirem o uso de ferramentas quimiométricas para análise exploratória dos dados e selecionar do melhor subconjunto de amostras que será modelado [132].

#### 2.6.5 Seleção das amostras de transferência

Escolher as amostras que irão participar da transferência é de suma importância. Essas amostras são medidas nos equipamentos primário e secundário e devem representar as diferenças físicas ou químicas [135]. Se isso não acontece, os parâmetros de transferência calculados poderão resultar em padronizações não confiáveis.

Normalmente, esta seleção é realizada pelo algoritmo que busca as amostras com maior *leverage* ou influência, a qual é retirada do conjunto de dados e ortogonalizada contra as demais. Uma repetição desse procedimento é realizada até que o número de amostras estabelecido pelo analista seja encontrado. Há uma desvantagem nesse método, é um método muito sensível à heterogeneidade na distribuição dos dados [131].

Alternativamente, o algoritmo clássico Kennard-Stone tem sido utilizado. O KS permite selecionar amostras de todas as partes do espaço de dados para distribuições não homogêneas [131].

Dantas Filho et al. (2011) [134] propuseram uma adaptação do algoritmo SPA, normalmente utilizado para seleção de variáveis, para ser aplicado à seleção de amostras de calibração, também podendo ser empregado para amostras de transferência. No SPA, a matriz das respostas instrumentais é transposta de maneira que as amostras de calibração se tornam as colunas, e o SPA seleciona um subconjunto de amostras que exibe mínima colinearidade.

O número de amostras que devem ser selecionadas também é um fator, esse número é determinado após avaliar os resultados de validação, de maneira que o número ideal de amostras é aquele que tem o menor erro de predição [125]. Dois fatores devem ser considerados na escolha do número ideal de amostras: a magnitude das diferenças instrumentais e o tipo de padronização utilizado [135-136].

# 3

Desenvolvimento e validação de um método HPLC para determinação de DEET e IR 3535 em amostras de repelentes

### 3.1 Revisão da literatura

Os princípios ativos utilizados em repelentes foram estudados em diferentes matrizes: (a) água [137] como contaminantes emergentes, (b) fluidos biológicos (sangue e urina) [138-139], (c) estudos em vivos [17,140] que avaliaram a toxicidade e a duração de ação desses repelentes na pele e (d) a cinética de degradação [141-142] (neste caso, apenas DEET). Em particular, no caso do repelente IR3535, apenas um único trabalho [143] foi relatado na literatura envolvendo a determinação de sua concentração em amostras de repelentes.

O controle de qualidade eficiente dos repelentes é importante, já que altas concentrações podem causar danos à saúde e concentrações inferiores às indicadas no rótulo não garantem eficiência. Para este propósito, no presente capítulo, o uso de uma cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) é proposto para a quantificação de DEET e IR 3535 em repelentes de insetos comercializados no Brasil. O método proposto será validado seguindo os critérios da EURACHEM [53] com seletividade, LOQ, LOD, faixa linear, exatidão, precisão intradia e interdia [59,144-146]. Na próxima seção, será apresentada uma revisão da literatura referente às estratégias adotadas para a determinação de DEET e IR3535 em diferentes matrizes.

É importante ressaltar que a maioria dos trabalhos encontrados na literatura está associada ao DEET em matrizes biológicas e de águas. Apenas um único trabalho [143] foi reportado em aplicações em amostras de repelente.

Abu-Qare e Abou-Donia (2001) [15] analisaram a presença de malation, permetrina, DEET e seus metabólitos em sangue e urina de ratos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detector de absorvância de comprimento de onda duplo. Os autores concluíram que o método proposto é confiável, rápido, simples, com alta sensibilidade e seletividade, indicando que o mesmo pode ser aplicado rotineiramente em amostras de sangue e urina de humanos.

Marselos e Archontaki (2002) [143] analisaram a quantidade de IR 3535 em amostras de repelentes em gel utilizando HPLC com detector UV. O artigo apresentou uma metodologia precisa, com alta sensibilidade e seletividade para determinação do princípio ativo IR 3535 em repelentes. No entanto, apenas seis amostras e estavam em fase semissólida. Além disso, apenas amostras em uma concentração de 8% m m<sup>-1</sup> foram avaliadas.

Kuklenik et al. (2013) [144] desenvolveram e validaram um método HPLC-MS-MS para medir concentrações de DEET em urina de humanos. Os autores encontraram resultados satisfatórios com um LOD variando de 0,1 – 1 ng mL<sup>-1</sup>. Em 51% das amostras foram encontradas o princípio ativo DEET.

Costa (2005) [145] propôs uma formulação de lipossomos a fim de prolongar o tempo de fixação do repelente, avaliando assim diferentes metodologias, utilizando cromatografia e espectrometria no infravermelho médio. De acordo com o autor, bons resultados foram encontrados pelas metodologias. Todavia a metodologia com infravermelho médio tem a desvantagem por usar o CS<sub>2</sub>, extremamente tóxico e, ainda, por ser mais susceptível à presença de interferentes, quando comparada com a cromatografia.

Kasichayanula et al. (2005) [16] utilizaram o HPLC acoplado com detector UV, para avaliar a quantidade de DEET em amostras de sangue e urina oriundos de repelentes de insetos e protetor solar. Os autores concluíram que o método foi bastante eficiente na análise de DEET e outros compostos oriundos do uso de repelentes e protetores solares, em amostras de sangue, urina e pele, com uma corrida relativamente rápida (14 min). A aplicação do método evidenciou a detecção de medidas com precisão, especificidade e alta seletividade.

Pietrogrande e Basaglia (2007) [148] utilizaram a cromatografia em fase gasosa combinada com espectrometria de massa para detectar princípios ativos utilizados em produtos de cuidados pessoais oriundos de contaminações em rios. Como resultado, foi verificado que o GC-MS é uma alternativa promissora na análise em matrizes de água, pois esta metodologia pode avaliar o quanto tóxico está e, também, fornece sensibilidade e seletividade necessária para identificar e quantificar princípios ativos em produtos de cuidados pessoais.

Broschard et al. (2013) [149] avaliaram a absorção e excreção do repelente IR 3535 na pele de humanos utilizando HPLC-MS. Os resultados mostraram que foi possível detectar o IR 3535 em sangue e urina. Os resultados demonstraram que o IR 3535 foi rapidamente absorvido com uma taxa de penetração de 13,3%, considerado um valor preocupante para absorção da pele.

Yiin et al. (2015) [150] realizaram estudos sobre a absorção dérmica de repelentes de insetos contendo DEET através de amostras de urina, utilizando HPLC-MS. Os autores concluíram que a metodologia empregada no trabalho apresentou

sensibilidade e precisão satisfatórias e uma grande vantagem foi a pequena quantidade de amostra utilizada.

## 3.2 Metodologia

### 3.2.1 Reagentes e soluções

Os padrões de alta pureza de N, N-dietil-3-metilbenzamida (DEET) foram adquiridos de Sigma Aldrich e etil-3- (N-n-butil-N-acetil) aminopropionato (IR 3535) foi doado por Merck (Darmstadt, Alemanha). Os solventes acetonitrila (J,T Baker) e água obtida de um sistema de purificação de água Mili-Q (Milipore) foram utilizados em todo procedimento.

Um total de 86 e 19 amostras de repelentes a base de DEET e IR3535, respectivamente, foram adquiridos de diferentes lotes, fabricantes e faixas de concentração do princípio ativo em diversos estados brasileiros. A diferença da quantidade de amostras desses dois tipos de repelentes é devido à existência de um número maior de fabricantes que utilizam o DEET como ingrediente ativo. Os níveis de concentração para os dois analitos variaram de 5 a 30 % ( $\text{m m}^{-1}$ ). É importante mencionar que as amostras de repelente possuem excipientes como perfume, álcool, água, conservantes, entre outros.

Para análise por HPLC-DAD, as amostras passaram por uma etapa de diluição simples com acetonitrila e água (10:90, v v<sup>-1</sup>), na proporção de 20.000 e 10.000 vezes para DEET e IR 3535, respectivamente.

### 3.2.2 Análise cromatográfica

Os estudos cromatográficos foram realizados em um equipamento HPLC-DAD da Dionex da série ultimate (**Figura 3.1**) 3000 (Dionex Technologies) equipado com uma bomba quaternária, um injetor manual com loop fixo de 20  $\mu\text{L}$  e um detector de arranjos diodos UV-Visível. Uma coluna Acclaim™ 120 C18 de 50 mm  $\times$  2,1 mm, 3  $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula e 300 Å de tamanho de poro.



**Figura 3.1** - Cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC).

A eluição foi realizada em gradiente com água Mili-Q purificada (solvente A) e acetonitrila (solvente B) nas seguintes condições: 0 – 5 min: 20 – 80% de gradiente linear B e 80 a 20% a 5 – 7 min o solvente B retorna a proporção inicial. A temperatura foi fixada em 30 °C e a vazão em 0,3 mL min<sup>-1</sup>. Os dados foram coletados através do software Chromeleon, versão 6.80 com frequência de aquisição de espectros de 10 Hz.

### 3.2.3 *Calibração, validação e quantificação de DEET e IR 3535*

As soluções estoques de DEET (194 mg L<sup>-1</sup>) e IR 3535 (200 mg L<sup>-1</sup>) (estoque 1) foram preparadas em acetonitrila em um balão volumétrico de 100 mL.

As soluções padrões de 20 e 40 mg L<sup>-1</sup> (estoque 2) foram preparadas e armazenadas a 4 °C até o uso. O conjunto de calibração foi preparado diluindo alíquotas apropriadas dos estoques 1 e 2 com uma solução acetonitrila e água (10:90, v v<sup>-1</sup>) e armazenada a 4 °C até o uso. O conjunto de calibração é formado por onze misturas de DEET e IR 3535, com níveis de concentração variando de 0,25 a 22 mg L<sup>-1</sup> para DEET e 0,50 a 40 mg L<sup>-1</sup> para IR 3535, preparadas e eluídas em triplicata.

O estudo de precisão foi realizado de acordo com os critérios do guia de validação da Eurachem [53]. Foram preparados quatro níveis de concentrações igualmente espaçados variando de 2 a 8 mg L<sup>-1</sup> (DEET) e 8 a 32 mg L<sup>-1</sup> (IR 3535). Cada mistura foi medida sete vezes ao longo de quatro semanas. Com isso foi aplicado o teste *t* e calculado o desvio padrão relativo (RSD) para avaliar a precisão interdia e intradia. Os intervalos de valores adequados de RSD dependem do nível de concentração e foram

normalizados usando os critérios de razão de Horwitz, calculados pelas Equações 6 e 7 [144].

Um teste de recuperação foi realizado a fim de identificar a presença de efeito matriz [61]. Quatro níveis de fortificação foram preparados com concentrações igualmente espaçadas variando de 2 a 8 e de 8 a 32 mg L<sup>-1</sup>, para DEET e IR 3535, respectivamente. O efeito matriz foi calculado de acordo com Moreno-Gonzales et al. (2007) [61].

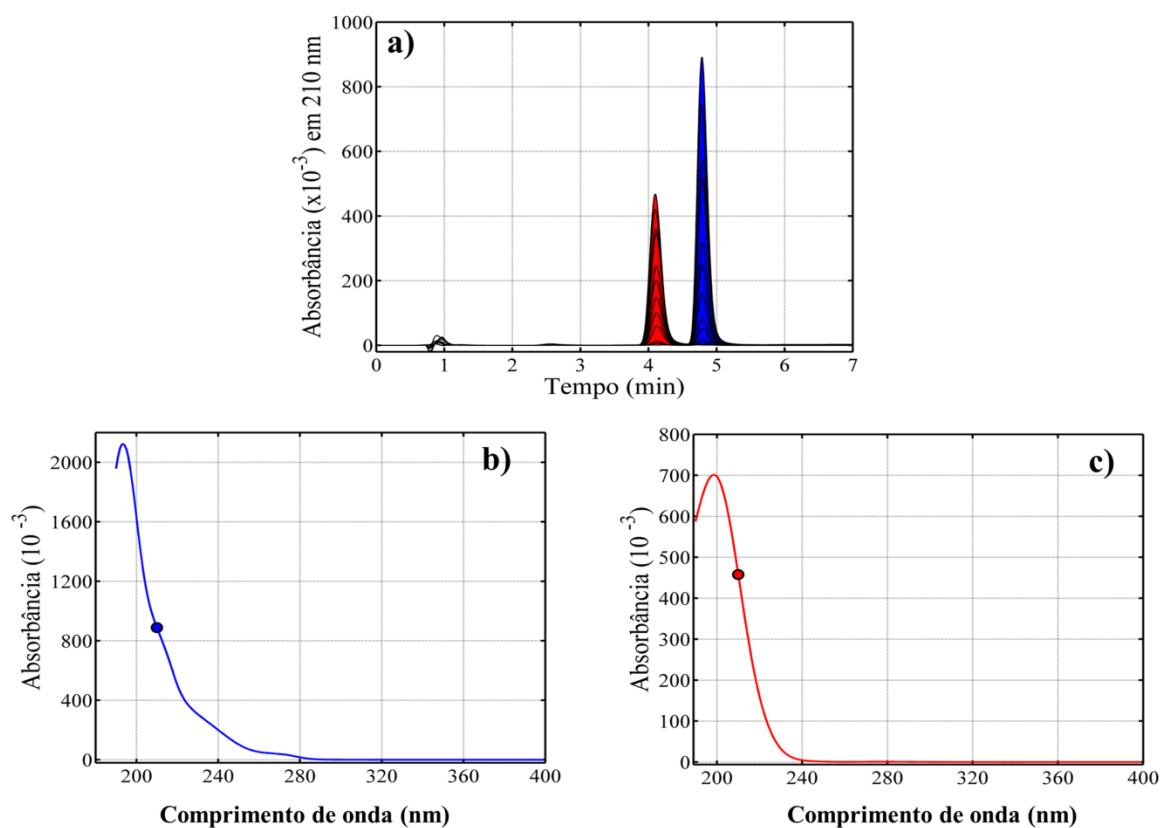
As amostras da curva analítica foram medidas em triplicatas autênticas em que foi possível realizar uma ANOVA para identificar a inclinação, o intercepto, a significância da regressão e a falta de ajuste do modelo.

As inclinações das curvas analíticas preparadas para DEET e IR 3535, constituíram a sensibilidade do modelo e foram utilizados para calcular o limite de quantificação (LOQ) e limite de detecção (LOD), conforme descrito na **Equação 2.2 e 2.3** Para isto, os pontos da curva analítica com menores concentrações de DEET (0,25 mg L<sup>-1</sup>) e IR 3535 (0,50 mg L<sup>-1</sup>) foram medidos trinta vezes.

### 3.3 Resultados e Discussão

#### 3.3.1 Conjunto de amostras de calibração

Todas as amostras foram injetadas no sistema cromatográfico sob as condições descritas na seção 3.2.2. A Figura 3.2 apresenta os cromatogramas médios para cada nível dos padrões de calibração, assim como os espectros DEET e IR3535 registrados em 210 nm.



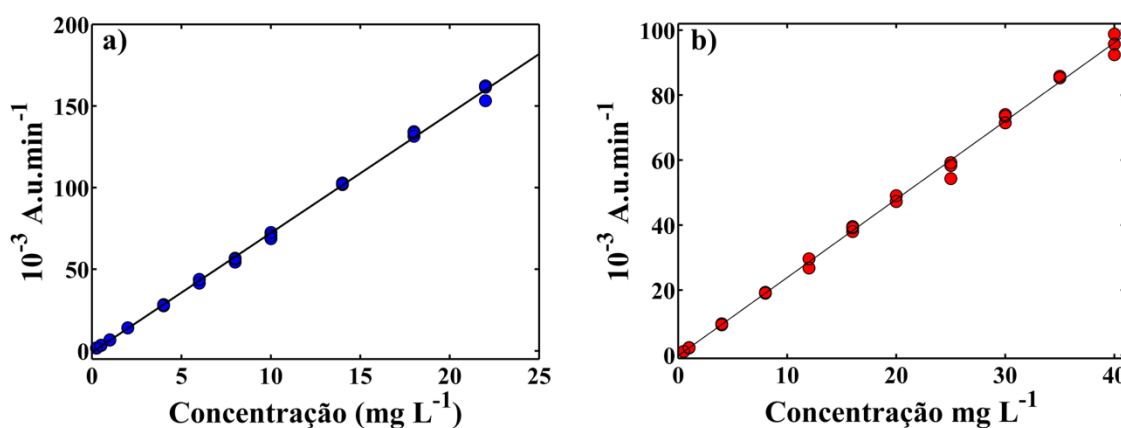
**Figura 3.2** - (a) Cromatogramas médios de amostras de mistura padrão de calibração. DEET em azul e IR 3535 em vermelho, (b) DEET e (c) espectro IR 3535 para o padrão de calibração de maior concentração. Os pontos azuis e vermelhos representam o comprimento de onda usado para calibração e quantificações de amostras.

Os cromatogramas foram registrados a 210 nm com uma frequência de 10 espectros por segundo, pois o comprimento de onda que corresponde ao pico máximo (200nm) ainda existe resposta do solvente. Como pode ser visto na Fig. 3.2a, tanto o DEET quanto o IR 3535 foram completamente eluídos em aproximadamente 5 minutos, resultando em um curto gradiente de corrida que aumentou a frequência analítica. As

**Fig. 3.2b e 3.2c** mostram os espectros registrados para DEET a 4,11 min de tempo de retenção e para IR3535 a 4,78 min, respectivamente.

Não há alterações de formato de pico ou desalinhamentos, e as larguras de pico são inferiores a 0,3 min para ambos os analitos, mesmo com uma baixa taxa de fluxo de 0,3 mL min<sup>-1</sup>. Os parâmetros de resolução foram adequados para uma análise quantitativa com assimetria de aproximadamente 1 e resolução superior a 2,030 [47] mesmo na maior concentração de ambos os analitos.

A linearidade foi avaliada de acordo com a relação entre concentrações estudadas e a área dos picos cromatográficos. As curvas analíticas para o DEET e IR 3535 são representadas na **Figura 3.3**.



**Figura 3.3** - Curvas analíticas obtidas para a) DEET e b) IR 3535

Os parâmetros de regressão para ambos os analitos são mostrados na **Tabela 3.1**. Assim como, os valores de inclinação, que estão associados à sensibilidade do modelo e ao coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foram maiores que 0,99 tanto para o DEET quanto para IR 3535.

**Tabela 3.1** - Parâmetros analíticos para a curva de calibração de DEET e IR 3535

Analito	Faixa linear de trabalho (mg L <sup>-1</sup> )	Equação de Regressão		
		Intercepto (a)	Inclinação (b) <sup>a</sup>	R <sup>2</sup> <sup>b</sup>
DEET	0,25 – 22,00	-0,8229	7,2506	0,9986
IR 3535	0,50– 40,00	-0,1903	2,4009	0,9976

<sup>a</sup>Análise de regressão linear usando a equação  $y = a + bx$ , onde  $x$  é a concentração em mg L<sup>-1</sup>. <sup>b</sup>R<sup>2</sup> é o coeficiente de determinação.

A **Tabela 3.2** apresenta os valores obtidos para as médias quadráticas, significância da regressão e falta de ajuste com a análise de variância (ANOVA) de acordo com as equações apresentadas na **Tabela 2.1** (descrita na **Seção 3.1.2**). Na ANOVA para os modelos DEET e IR 3535, o valor de  $F$  calculado é maior que o valor tabelado (4,15), indicando significância estatística para a regressão.

**Tabela 3.2** - Resultados da ANOVA para DEET e IR 3535. Entre parêntesis, estão os graus de liberdade.

Analito	Fonte de variação	Soma quadrática	Média quadrática	Fcal regressão	Fcal falta de ajuste
DEET	Regressão (1)	89224,0	89224,0		
	Resíduo (31)	113,87	3,67		
	Falta de ajuste (9)	43,3091	4,81	24290,45	1,50
	Erro puro (22)	70,5605	3,21		
IR 3535	Regressão (1)	33002,7	33002,7		
	Resíduo (31)	79,3614	2,56		
	Falta de ajuste (9)	32,7166	3,64	12891,43	1,71
	Erro puro (22)	44,6448	2,12		

### 3.3.2 Seletividade, LOQ e LOD

Na **Fig. 3.2a**, também é possível observar que o método tem um procedimento de eluição rápido, no qual ambos os analitos estão bem separados com uma resolução de 2,35 entre os picos. Como dez espectros por segundo foram adquiridos na região UV (190 - 400 nm), foi possível realizar um teste de pureza máxima comparando os espectros ao longo do pico do analito com o registrado no tempo de retenção. Para ambos os analitos, estes espectros combinaram 100% em pureza conforme esperado para o padrão analítico. Ressalta-se que este é um teste crucial para as amostras, pois os interferentes podem impedir uma quantificação univariada. Das 105 amostras analisadas, os espectros correspondem a valores superiores a 98% para os picos de DEET e IR 3535, que indicam seletividade satisfatória de ambos os modelos. Portanto, nenhum dos excipientes interferiu na determinação de DEET e IR 3535 nas condições experimentais utilizadas.

Para o LOD os valores foram 0,033 mg L<sup>-1</sup> para o DEET e 0,020 mg L<sup>-1</sup> para o IR 3535. Os valores de LOQ foram 0,099 mg L<sup>-1</sup> e 0,061 mg L<sup>-1</sup> para DEET e IR 3535,

respectivamente. Como a concentração das amostras desses ingredientes ativos foram maiores do que o LOQ pode-se concluir que os resultados foram satisfatórios.

### 3.3.3 Exatidão e Precisão

Na **Tabela 3.3** são apresentados os resultados da razão de Horwitz e do valor  $t$  calculado para o primeiro dia (intradia) e entre os valores médios das medidas de quatro dias (interdia). Os valores da razão de Horwitz foram menores que 2 para o teste de precisão intra e interdias e os valores de  $t_{cal}$  foram menores que os valores tabelados, indicando que não há diferenças estatisticamente significativas e apresentando resultados satisfatórios para implementar um método quantitativo.

**Tabela 3.3** - Teste de precisão univariada intra e interdia para quantificação de repelentes de insetos

Ingredientes ativos	Razão Horwitz								$t_{cal}^a$							
	Interdia				Intradia				Interdia (3,182)				Intradia (2,447)			
	L1	L2	L3	L4	L1	L2	L3	L4	L1	L2	L3	L4	L1	L2	L3	L4
<b>DEET</b>	1,17	1,24	1,15	0,25	0,76	1,76	0,54	1,2	0,55	1,07	1,36	0,39	0,27	1,17	0,50	1,44
<b>IR3535</b>	0,25	0,36	0,69	0,37	0,29	0,79	0,31	0,32	0,34	1,00	2,48	1,79	0,31	1,70	0,88	1,25

<sup>a</sup>Valores  $t$  calculados, Os valores tabulados são mostrados entre parênteses para intradia (2,447) e interdia (3,182), que são 6 e 3 graus de liberdade, respectivamente. L1 - L4 representam os dias 1 a 4. As concentrações foram de 2 a 8 mg L<sup>-1</sup> para DEET e 8 a 32 mg L<sup>-1</sup> para IR 3535.

Os resultados de recuperação são apresentados na **Tabela 3.4**, no qual pode ser visto que os valores de recuperação (REC) variaram de 89,2% a 111,6% e 94,7% a 109,2% para todas as amostras e níveis de fortificação para DEET e IR3535, respectivamente. Não foi identificado efeito matriz, pois os valores calculados não foram superiores a  $\pm 20\%$  [61,152].

Tabela 3.4 - Estudos de recuperação para a determinação de DEET e IR 3535

		Níveis de concentração (mg L <sup>-1</sup> )					Efeito de matriz (EM)
DEET		0	2	4	6	8	
<b>Amostra 1</b>	<b>Encontrado</b>	4,45	7,67	10,93	14,16	16,87	
(5%) <sup>a</sup>	REC (%) <sup>b</sup>	-	96,5	97,2	97,1	93,1	-7,59
<b>Amostra 2</b>	<b>Encontrado</b>	4,42	7,61	10,73	13,89	17,43	
(5%) <sup>a</sup>	REC (%) <sup>b</sup>	-	95,6	94,6	94,7	97,6	-4,72
<b>Amostra 3</b>	<b>Encontrado</b>	9,23	12,21	15,65	18,51	21,38	
(10%) <sup>a</sup>	REC (%) <sup>b</sup>	-	89,2	96,3	92,8	91,1	-9,72
<b>Amostra 4</b>	<b>Encontrado</b>	11,29	14,66	17,91	20,71	24,35	
(15%) <sup>a</sup>	REC (%) <sup>b</sup>	-	101,1	99,3	94,1	97,9	-5,15
<b>Amostra 5</b>	<b>Encontrado</b>	5,07	8,12	11,31	14,31	17,45	
(5%) <sup>a</sup>	REC (%) <sup>b</sup>	-	95,7	97,9	96,6	97,1	-4,53
<b>Amostra 6</b>	<b>Encontrado</b>	10,35	13,42	17,47	20,18	23,53	
(10%) <sup>a</sup>	REC (%) <sup>b</sup>	-	96,1	111,6	102,7	103,3	2,12
		Níveis de concentração (mg L <sup>-1</sup> )					Efeito de matriz <sup>c</sup> (EM)
IR3535		0	8	16	24	32	
<b>Amostra 7</b>	<b>Encontrado</b>	16,42	29,85	43,46	59,03	72,16	
(12,6%) <sup>a</sup>	REC (%) <sup>b</sup>	-	100,8	101,4	106,5	104,5	-0,41
<b>Amostra 8</b>	<b>Encontrado</b>	12,35	24,98	40,39	54,94	69,70	
(12,6%) <sup>a</sup>	REC (%) <sup>b</sup>	-	94,7	105,1	106,5	107,5	2,40
<b>Amostra 9</b>	<b>Encontrado</b>	6,79	20,45	34,97	49,22	62,73	
(10%) <sup>a</sup>	REC (%) <sup>b</sup>	-	102,4	105,7	106,1	104,9	-0,44
<b>Amostra 10</b>	<b>Encontrado</b>	7,38	21,94	35,46	50,44	64,41	
(10%) <sup>a</sup>	REC (%) <sup>b</sup>	-	109,2	105,3	107,6	106,9	0,92

<sup>a</sup>Concentrações descritas no rótulo para cada amostra repelente são mostradas entre parênteses.

<sup>b</sup>Recuperação calculada. <sup>c</sup>EM [61,152-153].

### 3.3.4 *Quantificação de DEET e IR 3535 em amostras repelentes*

Como apresentado na **Tabela 3.5**, os valores de concentração dos princípios ativos em 87 amostras foram inferiores aos indicados no rótulo.

De fato, o monitoramento de repelentes é importante porque, quando o valor da concentração é inferior ao indicado no rótulo do produto, o tempo de ação destes repelentes pode ser reduzido e, conseqüentemente, a eficácia do produto pode ser diminuída.

**Tabela 3.5** - Valores descritos no rótulo e encontrados através do método HPLC-DAD. As concentrações em parêntesis em % m m<sup>-1</sup>.

Amostras	Encontrados (%)	Amostras	Encontrados (%)	Amostras	Encontrados (%)	Amostras	Encontrados (%)	Amostras	Encontrados (%)
1 (14,55) <sup>a</sup>	10,62	22 (6,79) <sup>a</sup>	5,78	43 (15) <sup>a</sup>	17,44	64 (5) <sup>a</sup>	4,99	85 (12,5) <sup>b</sup>	12,49
2 (14,55) <sup>a</sup>	14,80	23 (6,79) <sup>a</sup>	5,98	44 (15) <sup>a</sup>	12,76	65 (5) <sup>a</sup>	5,28	86 (12,5) <sup>b</sup>	13,76
3 (14,55) <sup>a</sup>	9,51	24 (6,79) <sup>a</sup>	4,65	45 (15) <sup>a</sup>	12,79	66 (6,65) <sup>a</sup>	4,59	87 (12,5) <sup>b</sup>	10,85
4 (14,55) <sup>a</sup>	9,16	25 (6,79) <sup>a</sup>	5,31	46 (15) <sup>a</sup>	15,30	67 (6,65) <sup>a</sup>	4,43	88 (12,5) <sup>b</sup>	9,94
5 (14,55) <sup>a</sup>	8,45	26 (6,79) <sup>a</sup>	4,69	47 (15) <sup>a</sup>	11,45	68 (6,65) <sup>a</sup>	4,36	89 (12,5) <sup>b</sup>	10,85
6 (14,55) <sup>a</sup>	9,41	27 (6,79) <sup>a</sup>	4,13	48 (15) <sup>a</sup>	16,20	69 (6,65) <sup>a</sup>	4,09	90 (12,5) <sup>b</sup>	11,27
7 (14,55) <sup>a</sup>	10,83	28 (6,79) <sup>a</sup>	5,18	49 (15) <sup>a</sup>	11,57	70 (6,65) <sup>a</sup>	6,68	91 (12,5) <sup>b</sup>	10,25
8 (14,55) <sup>a</sup>	11,01	29 (6,79) <sup>a</sup>	4,19	50 (15) <sup>a</sup>	12,03	71 (6,65) <sup>a</sup>	4,62	92 (12,5) <sup>b</sup>	11,44
9 (10) <sup>a</sup>	7,16	30 (6,79) <sup>a</sup>	5,16	51 (15) <sup>a</sup>	13,80	72 (6,65) <sup>a</sup>	5,22	93 (12,5) <sup>b</sup>	11,68
10 (10) <sup>a</sup>	8,24	31 (6,79) <sup>a</sup>	5,54	52 (15) <sup>a</sup>	11,29	73 (6,65) <sup>a</sup>	4,93	94 (12,5) <sup>b</sup>	11,97
11 (10) <sup>a</sup>	8,16	32 (6,79) <sup>a</sup>	4,67	53 (15) <sup>a</sup>	11,83	74 (6,65) <sup>a</sup>	5,28	95 (10) <sup>b</sup>	6,70
12 (10) <sup>a</sup>	9,34	33 (6,79) <sup>a</sup>	5,19	54 (15) <sup>a</sup>	12,66	75 (6,65) <sup>a</sup>	4,93	96 (10) <sup>b</sup>	6,92
13 (10) <sup>a</sup>	8,00	34 (30) <sup>a</sup>	22,25	55 (15) <sup>a</sup>	12,70	76 (16) <sup>a</sup>	11,96	97 (12,5) <sup>b</sup>	11,63
14 (7) <sup>a</sup>	4,60	35 (6,79) <sup>a</sup>	5,56	56 (5) <sup>a</sup>	5,98	77 (16) <sup>a</sup>	11,27	98 (12,5) <sup>b</sup>	9,36
15 (7) <sup>a</sup>	5,35	36 (6,79) <sup>a</sup>	4,70	57 (5) <sup>a</sup>	4,94	78 (7,6) <sup>a</sup>	5,23	99(12) <sup>b</sup>	6,29
16 (7) <sup>a</sup>	4,33	37 (6,79) <sup>a</sup>	5,89	58 (5) <sup>a</sup>	5,34	79(7,6) <sup>a</sup>	5,41	100 (12) <sup>b</sup>	6,56
17 (7) <sup>a</sup>	4,78	38 (6,79) <sup>a</sup>	4,29	59(5) <sup>a</sup>	5,06	80 (10) <sup>a</sup>	11,36	101 (12) <sup>b</sup>	6,56
18 (7) <sup>a</sup>	5,62	39(6,79) <sup>a</sup>	4,26	60 (5) <sup>a</sup>	6,10	81 (10) <sup>a</sup>	12,17	102 (10) <sup>b</sup>	8,86
19(7) <sup>a</sup>	6,76	40 (6,79) <sup>a</sup>	4,94	61 (5) <sup>a</sup>	3,95	82 (10) <sup>a</sup>	8,23	103 (10) <sup>b</sup>	10,56
20 (6,79) <sup>a</sup>	4,58	41 (6,79) <sup>a</sup>	4,45	62 (5) <sup>a</sup>	4,80	83 (10) <sup>a</sup>	7,91	104 (10) <sup>b</sup>	9,30
21 (6,79) <sup>a</sup>	5,58	42 (6,79) <sup>a</sup>	4,20	63 (5) <sup>a</sup>	5,22	84 (5) <sup>a</sup>	4,25	105 (30) <sup>b</sup>	27,05

<sup>a</sup>Valor da concentração no rótulo DEET e b) IR 3535.

### 3.4 Conclusão

Neste capítulo, o método por HPLC-DAD foi desenvolvido, validado e aplicado para a quantificação de DEET e IR 3535 em amostras comerciais de repelentes de insetos comerciais.

O método proposto apresentou linearidade, LOD, LOQ, recuperação, precisão intradia e interdia com valores satisfatórios.

A aplicação da metodologia em amostras comerciais permitiu a quantificação de DEET e IR 3535 com concentrações rotuladas de 5 a 30% ( $\text{m m}^{-1}$ ) e concentrações encontradas com essa metodologia variaram de 4,0 a 27,0 % ( $\text{m m}^{-1}$ ).

O efeito de matriz da metodologia desenvolvida não foi significativo e esta metodologia utiliza uma simples diluição da amostra, com uma corrida de 7 minutos de eluição com acetonitrila/água sem aditivo ou modificador. Além disso, foram utilizados apenas 870  $\mu\text{L}$  de acetonitrila por corrida, de acordo com os princípios da química analítica verde de baixo consumo de solvente. O método proposto permite o monitoramento de concentrações de DEET e IR3535 em repelentes de insetos, que é de vital importância, pois altas concentrações podem ser prejudiciais para a saúde da população e uma concentração abaixo do descrito no rótulo compromete a ação desses produtos para proteger a população de doenças transmitidas por mosquitos *Aedes aegypti*.

# 4

**Desenvolvimento de métodos analíticos baseados  
na espectroscopia NIR e MIR para identificação  
e determinação de princípios ativos em amostras  
de repelentes**

#### 4.1 Revisão da literatura

A utilização da espectrometria no infravermelho (NIR e MIR) e análise multivariada tem permitido contornar grandes problemas encontrados nos setores industriais, principalmente no que diz respeito a fármacos e cosméticos [157 – 167].

Deconinck et al. (2014) [157] classificaram cosméticos (cremes, loções, sabonetes) contendo agentes branqueadores ilegais, utilizando o ATR-IR combinado com quimiometria. De acordo com os resultados apresentados pelos autores, o k-NN (vizinho mais próximo) apresentou o melhor resultado quando comparado ao PLS-DA.

Santana et al (2016) [158] utilizaram o MIR para detectar fraudes em óleo de rosa mosqueta (autêntica e adulterada com outros óleos) através do PLS-DA. A metodologia foi considerada adequada e seletiva para este tipo de classificação, com todas as amostras classificadas corretamente.

Lafhal et al. (2016) [159] determinaram linalol acetato, linalol, eucaliptol e cânfora em óleos essenciais utilizando o NIR e o PLS. O estudo foi realizado com amostras dos três anos de safra (2012 a 2014) levando em conta as variáveis sazonais. Como resultados, o modelo apresentou uma correlação de 0,97 e um Erro Relativo de Predição (REP) próximo a 2,5%.

Guillemain et al. (2017) [160] utilizaram a espectrometria NIR para classificar comprimidos falsificados. A classificação foi realizada entre dois métodos: LDA e SVM (Support Vector Machine). Os autores concluíram que ambos os modelos podem ser utilizados nessa classificação uma vez que não existia diferença estatística entre eles.

Sanches et al. (2012) [161] determinaram dipirona em formulações injetáveis sem violar as ampolas. O método proposto utilizou o infravermelho próximo e calibração multivariada (PLS e MLR/SPA). Para o PLS, foram utilizadas quatro variáveis latentes e cinco variáveis foram selecionadas com o SPA. Como resultados o valor satisfatório de RMSEP, de 0,39 e 0,35% ( $\text{m v}^{-1}$ ) para o PLS e MLR/SPA, respectivamente. Em termos de coeficiente de correlação de 0,9970 para o PLS e 0,9975 para o MLR/SPA para uma calibração na faixa de 40 – 60 % ( $\text{m v}^{-1}$ ).

Silva et al. (2015) [162] avaliaram a viabilidade de utilizar a espectrometria NIR para quantificar três polimorfos do mebendazol (MBZ) em matérias-primas farmacêuticas. Os espectros de refletância NIR foram usados para desenvolver modelos PLS e PLS/JK (algoritmo Jack-Knife). Os polimorfos de MBZ foram quantificados com

valores de RMSEP de 2,37%  $m\ m^{-1}$ , 1,23%  $m\ m^{-1}$  e 1,48%  $m\ m^{-1}$  para os polimorfos A, B e C, respectivamente. Os autores concluíram que este é um método fácil, rápido e viável para monitorar a qualidade de materiais farmacêuticos brutos de MBZ de acordo com a pureza polimorfa.

Tankeu et al. (2014) [163] propuseram uma nova metodologia baseada nas espectrometrias NIR e MIR associadas a técnicas quimiométricas para determinação de lavandas. Foram utilizadas 60 amostras distribuídas em seis compostos, onde foram quantificados empregando a cromatografia gasosa (CG-MS-FID), utilizados como dados de referência. Os modelos de calibração (PLS) construídos revelaram um desempenho estatístico satisfatório com um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) variando de 0,92 – 0,99 (MIR) e 0,90 – 0,98 (NIR). Assim como, baixos valores de RMSEP's foram obtidos ( $\leq 1,6$ ). Como relatado, o conjunto de dados externo foi previsto com precisão, de acordo como evidenciado pela comparação com os dados de referência.

Cascant et al. (2011) [164] determinaram frutose, glicose e maltose em cera depilatória utilizando HPLC (dados de referência) e MIR. Segundo os autores, os modelos PLS revelaram capacidade de predição com um RMSEP variando de 7,04 a 12,55  $mg\ g^{-1}$  de açúcar por amostra, com um REP variando de 2,6 – 5,2 %. A metodologia proposta mostrou-se como alternativa para os métodos que utilizam cromatografia, uma vez que é rápida, não destrutiva, não utiliza reagentes e não gera resíduos tóxicos.

Bergman et al. (2006) [165] avaliaram o desempenho de dois equipamentos NIR para formulações farmacêuticas sólidas utilizando três modelos de transferência de calibração PDS, correção de inclinação e centralização local. Como resultado, os três modelos de transferência apresentaram bons resultados, mostrando que é possível fazer uma transferência de calibração com instrumentos com configuração diferente. Para o PDS funcionar com sucesso, é preciso uma otimização no número de amostras de transferência. Segundo os autores, a centralização local é o modelo de transferência que apresenta um melhor desempenho e de simples execução, sem a necessidade de nenhuma otimização.

Pereira et al. (2016) [166] propuseram uma transferência de calibração entre os espectros obtidos em um espectrofotômetro NIR para as mesmas amostras de nevirapina em diferentes formas físicas. Utilizaram o algoritmo PLS e o modelo de transferência DWPDS (janela dupla por meio de padronização direta). Bons resultados foram

conseguidos com esses modelos com um número pequeno de amostras de transferência (apenas sete), que foram validados na faixa de trabalho de 83 – 113,9%. A utilização do DWPDS permitiu diminuir significativamente o RMSEP de 4,8% para 2,6%. Os autores concluíram que o uso de modelos de transferência em diferentes etapas apresentaram vantagens e economizaram tempo e mão de obra.

Boiret et al. (2011) [167] avaliaram o uso da espectrometria NIR para quantificar Tianeptina em Stablom®. Os valores de referência foram obtidos através do HPLC e modelos de calibração PLS foram construídos. Em função disto, este modelo foi utilizado para um segundo equipamento utilizando o método de transferência PDS. Após avaliar o PDS o valor do RMSEP baixou de 4,0 % para 2,4%. Segundo os autores esse método apresentou resultados satisfatórios e é possível que operadores de produção utilizem esta abordagem.

## 4.2 Metodologia

### 4.2.1 Espectrometria NIR e MIR

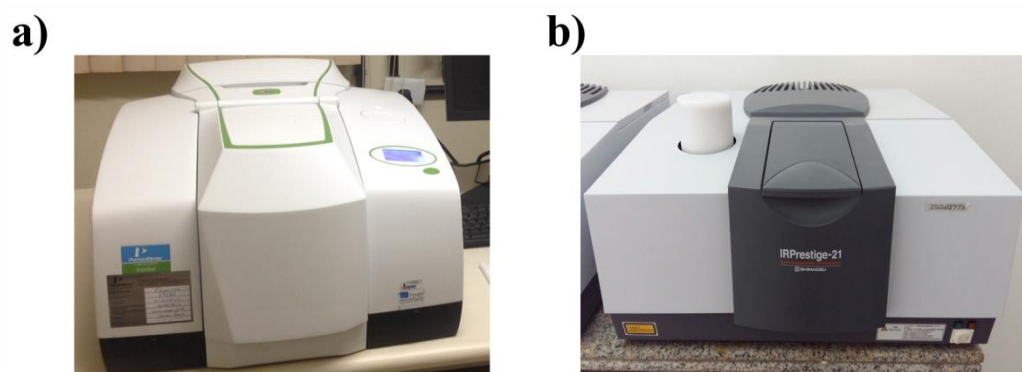
#### 4.2.1.1 Amostras

Foram adquiridos repelentes de insetos em vários estados brasileiros contendo diferentes princípios ativos (DEET, icaridina e IR 3535). Com o intuito de agregar variabilidade e representatividade aos modelos, lotes e fabricantes diferentes níveis de concentração variando de 5% a 30% foram escolhidos. Todas as amostras foram armazenadas em recipiente comercial original, conforme indicado no rótulo.

Para o estudo de calibração apenas os repelentes DEET e IR 3535 foram utilizados. As amostras de DEET e IR 3535, uma de cada fabricante, foram fortificadas com os seus respectivos padrões em diferentes níveis de concentração. Este procedimento foi realizado com o intuito de adicionar variabilidade da composição dos princípios ativos nas amostras.

#### 4.2.1.2 Aquisição dos espectros no infravermelho NIR e MIR

Um espectrômetro frontier FT-NIR da PerkinElmer (**Figura 4.1a**) equipado com uma célula de quartzo de 0,1 mm foi utilizado para obter os espectros NIR (750 a 2500 nm). Um espectrômetro FTIR Shimadzu IR Prestige-21 (**Figura 4.1b**) equipado com um acessório de amostragem ATR foi utilizado para obter os espectros no MIR. Todos os espectros foram registrados com 16 e 32 varreduras e resolução espectral de 0,1 nm. O registro do branco ocorreu através da cubeta vazia e com acessório ATR, para a região do NIR e MIR, respectivamente. A temperatura foi controlada em torno de  $24 \pm 1$  °C durante o processo de aquisição espectral.



**Figura 4.1** – a) Espectrômetro frontier FT-NIR da PerkinElmer b) FTIR Shimadzu IR Prestige-21

## 4.2.2 Procedimentos quimiométricos e softwares

### 4.2.2.1 Classificação (NIR)

É importante ressaltar que a classificação foi avaliada de acordo com o tipo de princípio ativo para a espectrometria NIR, este estudo de caso foi aplicado aos três tipos de repelentes encontrados no Brasil: DEET, IR 3535 e icaridina.

Com a finalidade de garantir a melhor representatividade dos modelos de classificação, as amostras foram divididas em dois subconjuntos de acordo com algoritmo Kenard-Stones (KS) [122]. Este algoritmo foi aplicado para cada classe de acordo com Pontes et al. (2005) [103], conforme apresentado na **Tabela 4.1**.

**Tabela 4.1** - Número de amostras de treinamento e teste para NIR.

NIR			
Repelentes	Número de amostras	Subconjuntos	
		Treinamento	Teste
DEET	75	40	35
Icaridina	66	40	26
IR 3535	62	40	22

As amostras de treinamento foram utilizadas para treinar e validar os modelos [118], bem como para escolha das variáveis na LDA e variáveis latentes para PLS-DA.

O subconjunto de teste foi utilizado para avaliar o desempenho dos modelos de classificação em função da taxa de classificação correta (TCC) (**Equação 4.1**).

$$\text{TCC (\%)} = \frac{(\text{Número de acertos de classificação})}{(\text{Número total de amostras do subconjunto de teste})} \times 100 \quad (4.1)$$

Os modelos também foram avaliados de acordo com os parâmetros de desempenho de exatidão (**equação 4.2**) especificidade (**equação 4.3**) e sensibilidade (**equação 4.4**) [136].

$$\text{Exatidão} = \frac{VP+VN}{VP+VN+FP+FN} \quad (4.2)$$

$$\text{Especificidade} = \frac{VN}{VN+FP} \quad (4.3)$$

$$\text{Sensibilidade} = \frac{VP}{VP+FN} \quad (4.4)$$

Em que:

VP (verdadeiros positivos) = número de amostras pertencentes a uma classe e corretamente classificadas nela;

VN (verdadeiros negativos) = número de amostras que não pertencem à classe e não foram classificadas nela;

FP (falsos positivos) = números de amostras que não pertencem à classe e foram incorretamente classificadas nela;

FN (falsos negativos) = número de amostras que pertencem à classe e foram incorretamente classificadas como não pertencentes a ela.

A especificidade mede a habilidade do modelo para rejeitar amostras de outra classe. A sensibilidade mede a habilidade do modelo para reconhecer amostras pertencentes as suas classes.

Os modelos construídos foram: LDA/SPA, LDA/SW e LDA/GA e o PLS-DA foi empregado utilizando o espectro completo.

Uma análise exploratória dos dados utilizando a PCA foi realizada. A construção dos modelos LDA/SPA seguiu a formulação proposta por Soares et al. (2014) [120].

Para o PLS-DA, foi empregada a validação cruzada *leave one out*, tendo a escolha do número de fatores baseada no menor número de erros de classificação no conjunto de validação. O limiar adotado para a definição das classes foi baseado no cálculo do teorema de Bayes [99,168], selecionando o ponto no qual o número de falsos positivos e falsos negativos são minimizados.

#### 4.2.2.2 Calibração multivariada

Para determinar os princípios ativos (DEET e IR 3535) em amostras comerciais de repelentes, foram construídos modelos de calibração multivariada a partir dos espectros (NIR e MIR) e os valores obtidos pelo método HPLC-DAD a como apresentado na sessão 3.1.2. Para isto, foram avaliados os modelos PLS aplicados ao espectro completo, *i*PLS e MLR com seleções de variáveis SPA, SW e GA. Antes da construção dos modelos, os dados foram divididos em calibração e predição aplicando o algoritmo SPXY [111] e os modelos desenvolvidos foram comparados posteriormente.

A **Tabela 4.2** apresenta o número de amostras para determinação de DEET e IR 3535 no infravermelho (NIR e MIR).

**Tabela 4.2.** Número de amostras de calibração e predição usadas na determinação do DEET e IR 3535.

NIR			
Repelentes	Número de amostras	Subconjuntos	
		Calibração	Predição
DEET	123	73	50
IR 3535	55	30	25
MIR			
Repelentes	Número de Amostras	Subconjuntos	
		Calibração	Predição
DEET	104	64	40
IR 3535	45	25	20

Para construção dos modelos foi empregada a validação cruzada *leave one out*, enquanto que o conjunto de predição foi utilizado para avaliar a capacidade preditiva dos modelos desenvolvidos.

O algoritmo *i*PLS foi aplicado dividindo os espectros NIR e MIR das amostras contendo DEET e IR 3535 em 10 intervalos de tamanhos iguais. O melhor intervalo foi selecionado com base no menor valor de RMSECV.

A regressão MLR com seleções de variáveis foi realizada de acordo com Galvão et al. (2007) [111].

A capacidade preditiva do modelo final foi expressa de acordo com os valores de RMSEP, EPCR, REP, coeficiente de correlação ( $r$ ) e determinação ( $r^2$ ), LOQ e LOD, sendo os dois últimos aplicados apenas para os dados NIR.

Um teste  $F$ , com nível de confiança de 95%, foi realizado para avaliar as diferenças de significância estatística entre os valores do RMSEP obtidos pelos modelos PLS, *i*PLS e MLR com seleções de variáveis de acordo com a **equação 4.5**. Essa relação foi comparada com o valor crítico  $F(n, n, 0,95)$  [169-170].

$$F = \frac{RMSEP_1^2}{RMSEP_2^2} \quad (4.5)$$

Em que:

$RMSEP_1$  e  $RMSEP_2$  são as raízes dos erros quadrados médios superiores e inferiores, respectivamente.

Um teste  $t$  pareado, com nível de confiança de 95%, foi realizado para avaliar a existência de diferenças significativas entre os valores preditos pelos modelos e valores de referência. Os valores de  $t$ -calculado (**Equação 4.6**) foram comparados com os valores de  $t$ -crítico (0,95;  $n - 1$ ) tabelado [169-170].

$$t = \frac{\bar{d}}{sd/\sqrt{N}} \quad (4.6)$$

onde  $\bar{d}$  é a diferença média entre os valores de referência e os estimados pelo modelo,  $Sd$  é o desvio padrão da diferença e  $N$  o número de amostras utilizadas para a predição.

Os espectros de infravermelho (NIR e MIR) foram avaliados sem pré-processamentos e com diferentes pré-processamentos: correção de linha de base *offset*,

primeira derivada de Savitzky-Golay (variando o número de janelas 11 e 21 pontos) e segunda derivada de Savitzky-Golay com janela de 21 pontos com polinômio de segunda ordem.

O pré-processamento dos dados, os algoritmos de reconhecimento de padrões e calibração multivariada foram executados utilizando o Matlab R2010 b.

### 4.2.3 Transferência de calibração (NIR)

#### 4.2.3.1 Amostras

Um total de 134 amostras de DEET e 50 de IR 3535 foram utilizadas nesse estudo de caso. Todas as amostras foram adquiridas em comércio de diferentes estados brasileiros. A análise de referência foi descrita no capítulo 3.

#### 4.2.3.2 Aquisição dos espectros

Um espectrômetro FTIR Analyzer (AIT, Analect Diamond 20), escolhido como equipamento secundário (**Figura 4.2**), foi utilizado na obtenção dos espectros NIR na faixa de 833,33 – 2500 nm com resolução espectral de 0,2 nm e 32 varreduras.



**Figura 4.2** - FTIR Analyzer (AIT, Analect Diamond 20).

O instrumento intitulado como primário foi o descrito na **seção 4.3.1.2**.

Para o instrumento secundário, as amostras passaram por uma etapa de diluição em tetracloreto de carbono ( $\text{CCl}_4$ ) na proporção 1:1, visto que na região de ocorrência

das bandas de combinação os espectros das amostras puras apresentaram saturação de sinal.

O instrumento primário está localizado no Laboratório de Combustíveis (LAC) na Universidade Federal do Pernambuco e o secundário está localizado no Laboratório de Automação e Instrumentação em Química Analítica e Quimiometria (LAQA) na Universidade Federal da Paraíba.

#### 4.2.3.3 Procedimento quimiométrico

Estratégias de pré-processamentos dos dados foram avaliadas como a correção de linha de base *offset*, primeira derivada de Savitzky-Golay com polinômio de segunda ordem (com janelas de 7, 11 e 21 pontos).

O conjunto de amostras foi dividido em subconjuntos de calibração (DEET: 85; IR 3535: 30) e predição (DEET: 49; IR 3535: 20) aplicando o algoritmo SPXY (partição do conjunto de amostras com base nas distâncias da junção x-y) [123].

Todo o procedimento de modelagem foi realizado utilizando as amostras de calibração com MLR utilizando seleção de variáveis (SPA) e PLS aplicados ao espectro completo com determinação de fatores (variáveis latentes). A comparação dos modelos foi realizada para avaliação final empregando as amostras de predição.

O desempenho dos modelos de calibração foi avaliado de acordo com os valores de RMSEP de acordo com a **equação 2.13**.

Foram utilizados diferentes números de amostras de transferência para DEET e IR 3535 (8, 11, 14, 17 e 20) empregando o algoritmo Kennard – Stone (KS) [122].

Um teste *F* com 95% de confiança foi realizado a fim de avaliar a existência de diferença estatisticamente significativa entre os valores de RMSEP, de acordo com a **equação 4.5**.

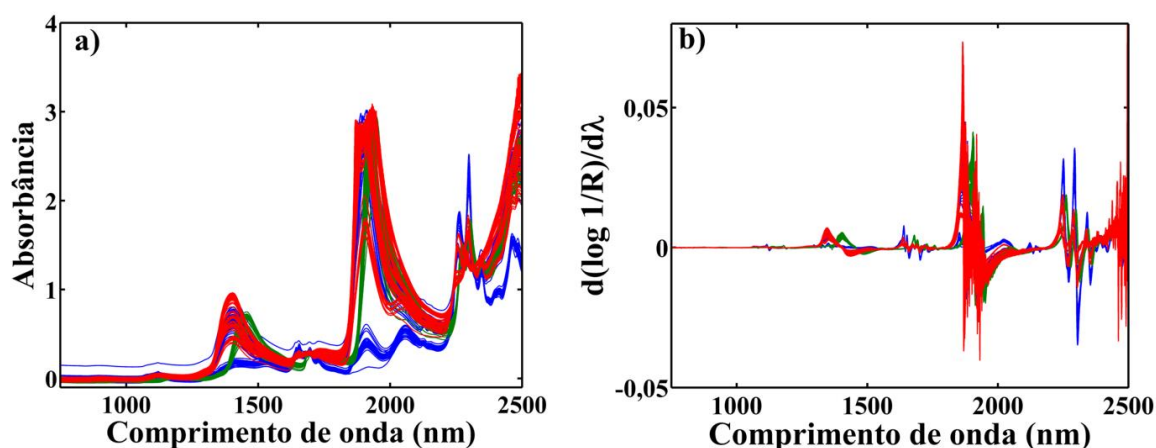
Os procedimentos de pré-processamento foram realizados utilizando o Unscrambler® X.1 (CAMO S,A, Noruega). Os algoritmos SPXY, KS PLS e MLR/SPA foram realizados em Matlab R2010 b (Mathworks, EUA).

### 4.3 Resultados e Discussão

#### 4.3.1 Estudos de classificação (NIR)

##### 4.3.1.1 Avaliação dos espectros NIR

Os espectros de absorção dos repelentes foram registrados no NIR (750 – 2500 nm) são apresentados na **Figura 4.3**.



**Figura 4.3** - Espectros registrados no NIR a) antes b) após o pré-processamento para o DEET (azul), Icaridina (verde) e IR 3535 (vermelho).

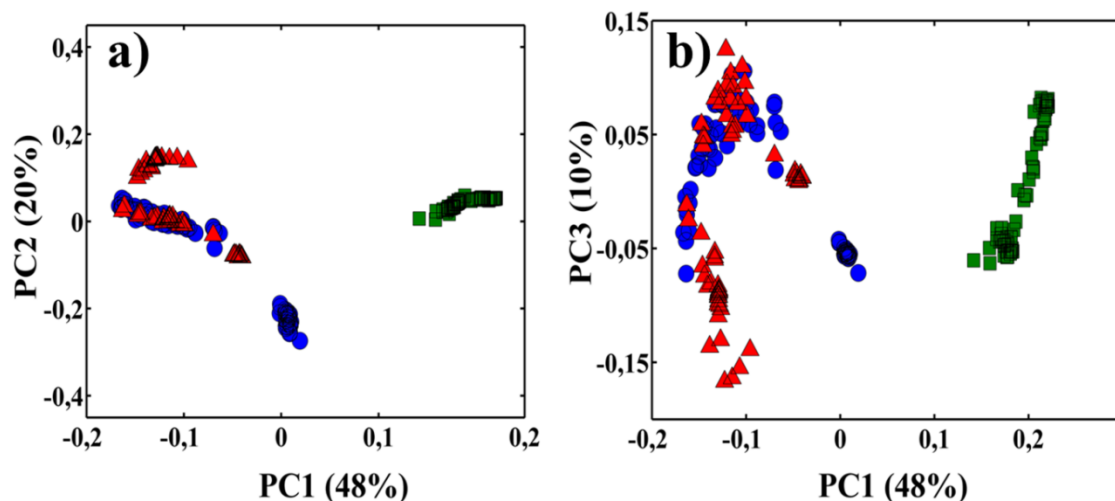
Na **Figura 4.3a** é possível observar uma substancial semelhança nos espectros principalmente do DEET e IR 3535, bem como uma variação de linha de base entre os espectros dos três princípios ativos. Especificamente para amostras de DEET uma maior dispersão das amostras quando comparados com a icaridina e o IR 3535. Isto pode ter ocorrido devido a uma maior variabilidade de marcas desse repelente. Essa dispersão é facilmente contornada quando aplicados diferentes pré-processamentos de dados. A **Figura 4.3b** apresenta os espectros pré-processados com a primeira derivada de Savitzky –Golay com janela de 11 pontos.

Os picos que possuem uma maior intensidade estão entre as regiões de 1.800 – 2.200 nm e na região de combinação de 2.200 – 2.500 nm, região esta que corresponde aos sobretons de CH e OH. Além disso, observa-se uma grande variação no sinal na

região entre 1.900 – 2.100 nm que corresponde às bandas de estiramento da ligação O - H na água [171-172].

#### 4.3.1.2 Análise das Componentes Principais (PCA)

Uma PCA foi realizada no conjunto dos espectros NIR pré-processados (**Figura 4.3b**) e o resultado é apresentado na **Figura 4.4**.



**Figura 4.4** - Gráfico dos escores obtidos pela PCA aplicada aos espectros pré-processados. a) PC1 x PC2 e b) PC1 x PC3 (●: DEET, ■: Icaridina e ▲: IR 3535).

A PCA mostrou uma tendência de separação entre as amostras de icaridina das demais classes de repelentes. Na **Figura 4.4a** Ao longo dos escores negativos de PC1 as amostras de DEET e IR 3535 apresentaram uma considerável sobreposição. Nos escores positivos de PC1 encontram-se as amostras de icaridina. Nos escores de PC2 nota-se que as amostras de DEET formaram dois agrupamentos diferentes, isso pode ter ocorrido porque as amostras de DEET são de diferentes fabricantes e possuem excipientes diferentes, isso também é refletido nos espectros. Em PC3 (**Figura 4.4b**) a separação ocorreu em diferentes faixas de concentração de DEET, IR 3535 e icaridina, onde os maiores valores estão nos escores negativos de PC3 e nos escores positivos estão as concentrações mais baixas.

Na **Figura 4.5** é apresentado o gráfico dos pesos para PCA, a fim de avaliar a contribuição de cada variável auxiliando na compreensão do comportamento do gráfico dos scores.

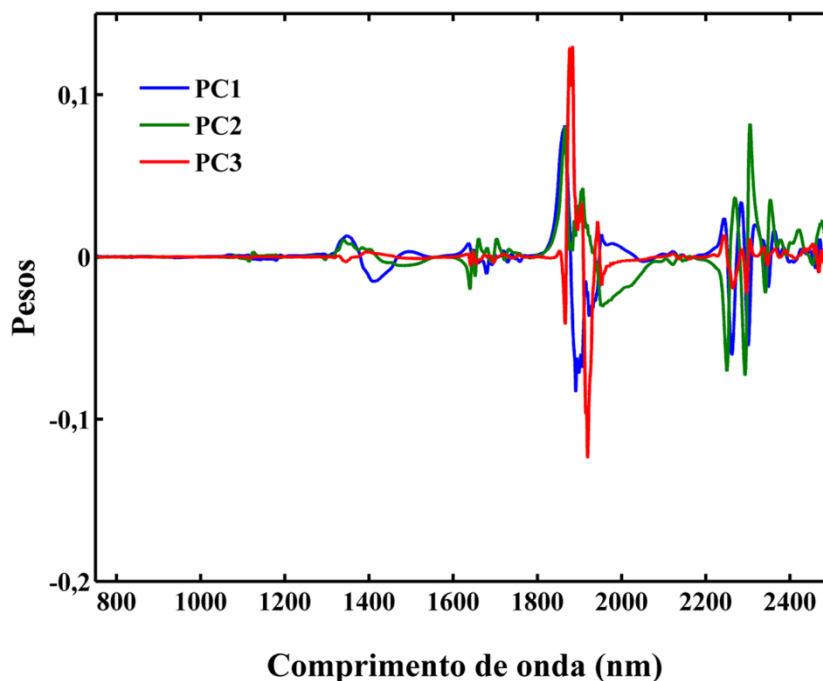


Figura 4.5 – Gráfico dos pesos para as três primeiras PC's.

De acordo com a **Figura 4.5** é possível observar que para PC1, responsável por separar a icaridina das amostras de DEET e IR 3535, possui variáveis com maior peso na faixa de 1.800 – 2.000 nm, esta região está relacionada a ligações C = O e H<sub>2</sub>O, presentes na estrutura molecular dos princípios ativos e na formulação das amostras. Nos *loadings* de PC2, a região que possui mais informação varia na faixa de 2.200 – 2.500 nm, onde se encontram as bandas de combinações de C - H e C - C. Por fim, a PC3 que, possivelmente, representa o aumento da concentração nos compostos, apresenta variáveis com maiores pesos na região de 1.800 a 2.200 nm.

#### 4.3.2 Métodos de Reconhecimento de Padrões Supervisionados

A **Tabela 4.3** apresenta a taxa de classificação correta obtida pelos modelos LDA com seleções de variáveis SPA, SW e GA e também para o PLS-DA, para o conjunto de treinamento com todos os pré-processamentos estudados.

**Tabela 4.3.** Taxa de classificação correta (TCC) obtidos com os modelos LDA/SPA, LDA/SW, LDA/GA e PLS-DA para o conjunto de treinamento. O número de variáveis selecionadas está entre parênteses.

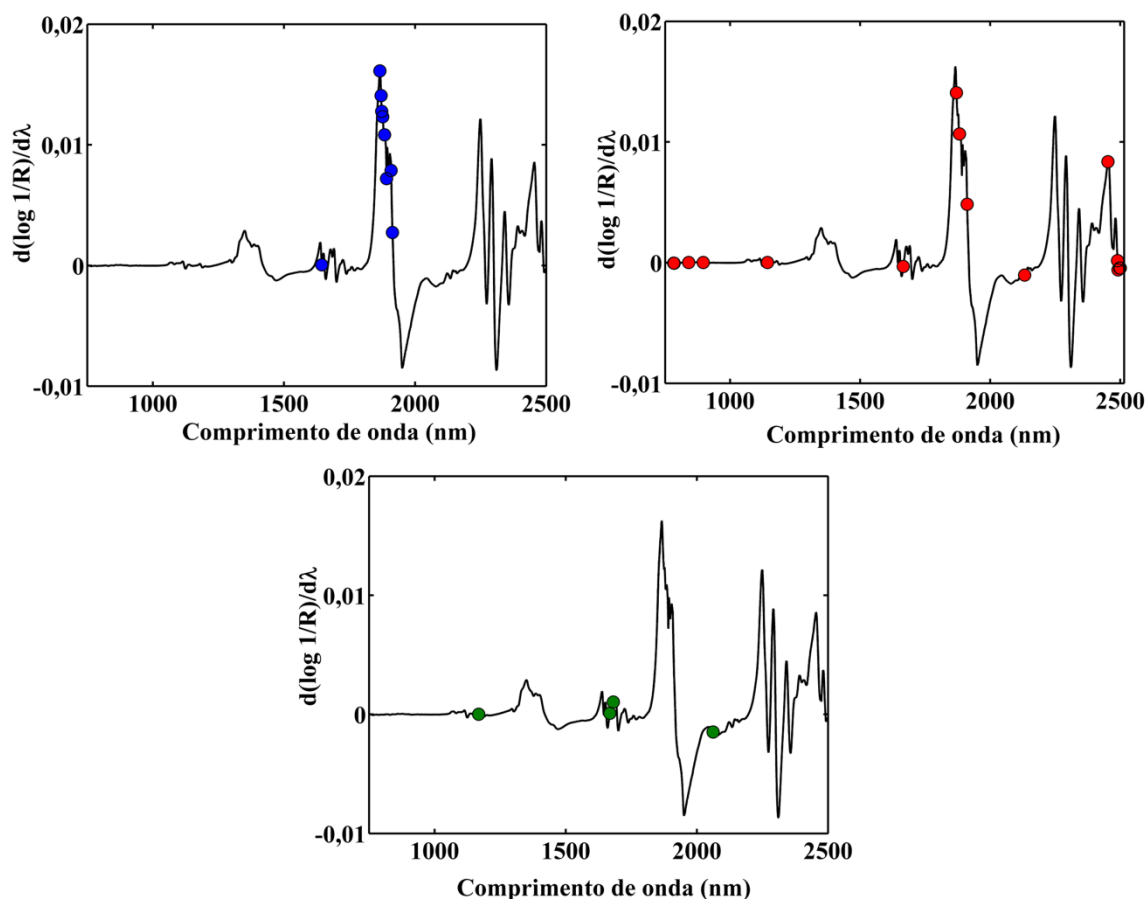
Pré - Processamento	Taxa de classificação Correta (%)			
	LDA/SPA	LDA/SW	LDA/GA	PLS-DA
<b>Originais</b>	96,6 (6)	97,9 (6)	99,2 (9)	96,66 (5)
<b>Correção linha de base offset</b>	98,3 (6)	99,2 (4)	98,3 (8)	98,3 (6)
<b>1º Der. S.G 11*</b>	<b>98,3 (9)</b>	<b>99,2 (15)</b>	<b>98,3 (4)</b>	<b>97,5 (8)</b>
<b>1º Der. S.G 21*</b>	98,3 (4)	99,2 (8)	98,3 (5)	95 (9)
<b>2º Der. S.G 21*</b>	98,3 (3)	99,2 (9)	98,3 (5)	93,3 (4)

\*Nº de pontos empregados na derivação Savitzky-Golay.

De acordo com a **Tabela 4.3**, os melhores resultados foram obtidos com os dados pré-processados. Entretanto, nos espectros com correção offset observou-se ainda que os espectros apresentavam uma flutuação na linha de base. Portanto, o pré-processamento escolhido foi a primeira derivada de Savitzky – Golay com polinômio de segunda ordem com janela de 11 pontos este pré-processamento proporcionou um resultado, satisfatório, em todos os modelos de classificação. Os melhores resultados serão detalhados e apresentados nas próximas seções.

#### 4.3.2.1 Modelo LDA

Na **Figura 4.6** são apresentadas as variáveis selecionadas e utilizadas na construção dos modelos LDA/SPA, LDA/SW e LDA/GA para o NIR.

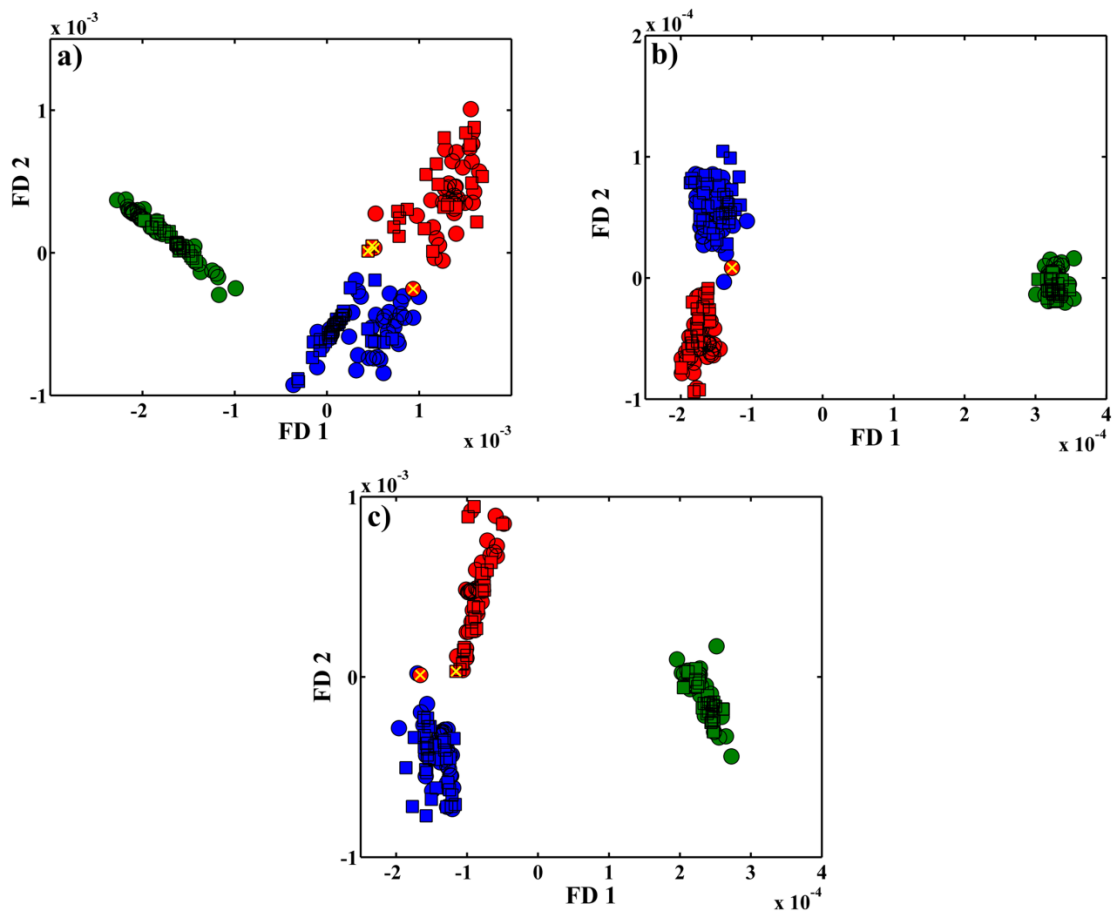


**Figura 4.6** - Espectros médios do conjunto de dados com indicação das variáveis selecionadas pelo SPA (●), SW (●) e GA (●) em modelos de classificação LDA.

As variáveis selecionadas estão distribuídas ao longo de todo o espectro, principalmente quando do SW é aplicado. O SPA selecionou variáveis em torno da região de 1.600 nm, que corresponde ao terceiro sobretom de CH, e também na região de 1.800 – 1.900 nm em que ocorrem ligações C = O presente nas moléculas dos analitos estudados. O SW e GA também selecionaram na região do comprimento de onda 1600 nm, porém o SW selecionou na região de combinação de CH, CC e CH<sub>3</sub> (2.100 – 2.500 nm).

Os gráficos dos escores obtidos pelo LDA com seleções de variáveis pelo SPA, SW e GA podem ser observados na **Figura 4.7**.

É possível observar, no gráfico dos escores, que uma melhor separação das classes de DEET, icaridina e IR 3535 são evidenciados principalmente pelo LDA/SW. As amostras de icaridina encontram-se posicionados nos escores negativos de FD1 e com valores de FD2 em torno de zero.

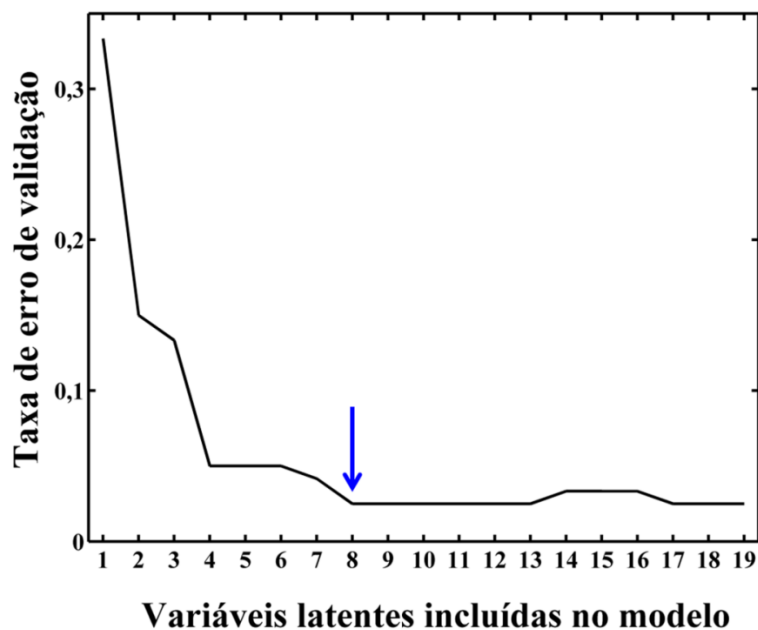


**Figura 4.7** - Gráfico de escores obtido por LDA usando algoritmos de seleção de variáveis a) SPA, b) SW e c) GA. ●:DEET, ●: Icaridina, ●: IR 3535. ●: Amostras de treinamento; ■: Amostras de teste

Quando os escores de LDA são comparados com os de PCA uma observação deve ser feita, a separação entre as classes de DEET e IR 3535 são muito mais significativas quando são aplicados métodos de reconhecimento de padrões supervisionados. Como observa-se na **Figura 4.7** a FD1 foi a responsável por separar a classe de icaridina, das classes de DEET e IR 3535 em todos os gráficos. Já a FD2 promoveu a separação entre as classes de DEET e IR 3535. As amostras marcadas com um ponto amarelo são amostras de IR 3535 classificadas erradamente na classe das amostras de DEET. No gráfico dos escores LDA/SW apenas uma amostras de DEET foi classificada erradamente na classe das amostras de IR 3535 para o conjunto de treinamento.

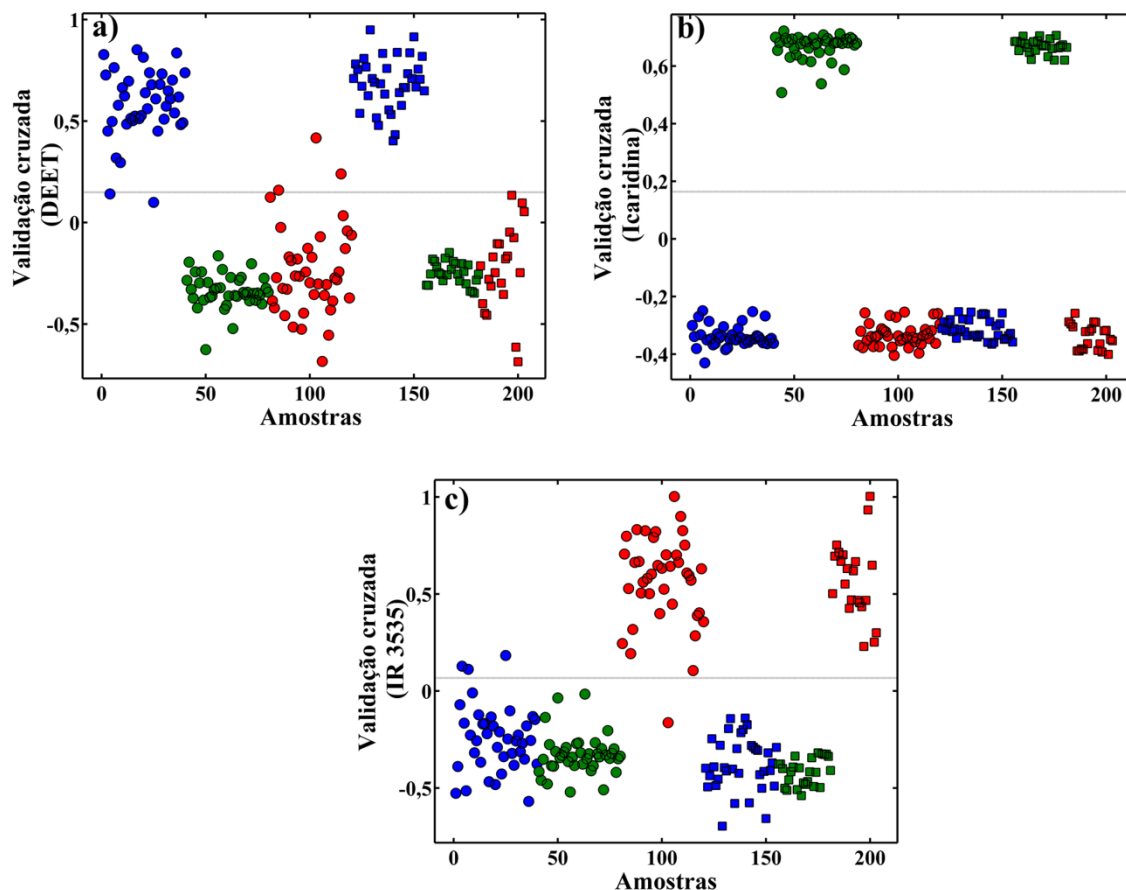
## 4.3.2.2 Modelos PLS-DA

O número ótimo de fatores utilizado na construção do modelo PLS-DA foi obtido de acordo com o menor erro de validação cruzada, como apresentado na **Figura 4.8**. A curva exibe uma menor taxa de erro com 8 variáveis latentes para o NIR.



**Figura 4.8** - Taxa de erro de validação cruzada *versus* o número de variáveis latentes. A seta identifica o número de variáveis latentes selecionadas.

Os valores estimados para os modelos PLS/DA desenvolvido para as três classes de repelentes são apresentadas para os conjuntos de treinamento e teste (**Figura 4.9**).



**Figura 4.9** – Valores de classe estimados pelo PLS-DA versus o gráfico de amostras de treinamento e teste. a) DEET, b) Icaridina e c) IR 3535. ●: DEET, ●: Icaridina, ●: IR 3535. ●: Amostras de treinamento; ■: Amostras de teste. Valores de limiar: a) 0,15; b) 0,16; c) 0,06.

Como observado na **Figura 4.9** as amostras que estiverem acima do limiar está classificada erradamente na classe que também se encontra acima da linha. No modelo desenvolvido para as amostras DEET (**Figura 4.9a**), três amostras da classe de IR 3535 estão acima do limiar, demonstrando que essas amostras foram classificadas incorretamente como amostras da classe DEET. O mesmo acontece quando se apresenta o modelo para as amostras de IR 3535 (**Figura 4.9b**), sendo que três amostras do conjunto de treinamento de DEET estão acima do limiar, e uma amostra de IR 3535 abaixo do limiar.

### 4.3.3 Comparação das metodologias de classificação

Na **Tabela 4.4** são apresentados os resultados detalhados para os modelos LDA/SPA, LDA/SW, LDA/GA e PLS-DA utilizando o conjunto de teste. Esses valores expressam tanto as classificações corretas como as classificações incorretas.

**Tabela 4.4-** Resultados da classificação para o conjunto de testes obtidos com modelos LDA/SPA, LDA/SW, LDA/GA e PLS-DA, para o NIR. A taxa de classificação correta obtida por cada modelo é indicada entre parênteses. N é o número de amostras preditas empregadas neste estudo.

NIR	N	LDA-SPA (9)			LDA-SW (15)			LDA-GA (4)			PLS-DA (4)		
		Classe predita			Classe predita			Classe predita			Classe predita		
Classe Verdadeira	N	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
DEET (1)	35	35	-	-	35	-	-	35	-	-	35	-	-
Icaridina (2)	26	-	26	-	-	26	-	-	26	-	-	26	-
IR 3535 (3)	22	2	-	20	-	-	22	1	-	21	-	-	22

Para uma avaliação do conjunto de teste são apresentados na **Tabela 4.4** o resumo de classificação. Resultados satisfatórios acertando todas as amostras em sua classe foram encontrados para os modelos LDA/SW e PLS/DA. No LDA/SPA observa-se que 2 amostras da classe 3 foram incorretamente classificadas como pertencente a classe 1. Para o LDA/GA uma amostra da classe 3 foi classificada como sendo da classe 1.

Na **Tabela 4.5** são apresentados os valores de sensibilidade, especificidade e exatidão obtidas para o conjunto de teste das amostras de repelentes.

**Tabela 4.5-** Parâmetros de desempenho dos resultados dos modelos LDA/SPA, LDA/SW, LDA/GA e PLS-DA para o conjunto de teste das amostras de DEET (1), Icaridina (2) e IR3535 (3).

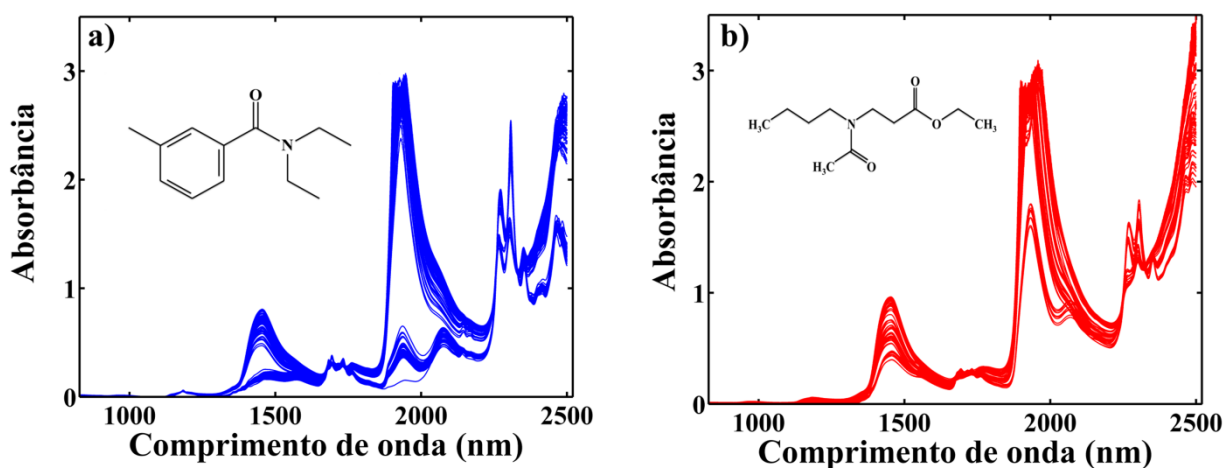
Modelos	Sensibilidade			Especificidade			Exatidão (%)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
LDA/SPA	1	1	0,909	0,976	1	1	97,5	100	97,5
LDA/SW	1	1	1	1	1	1	100	100	100
LDA/GA	1	1	0,954	0,987	1	1	98,7	100	98,7
PLS-DA	1	1	1	1	1	1	100	100	100

É observado na **Tabela 4.5** que as melhores exatidão, sensibilidade e especificidade foram obtidas com os modelos LDA/SW e PLS/DA que classificaram corretamente 100% das amostras de teste. O parâmetro sensibilidade para o IR 3535 com os modelos MLR com seleções de variáveis SPA e GA foram inferiores quando comparados ao PLS-DA e LDA/SW, uma vez que os erros foram provenientes de amostras de IR 3535 classificadas como DEET.

#### 4.4 Estudos de calibração (NIR)

##### 4.4.1.1 Espectros

A **Figura 4.10** apresenta os espectros NIR das amostras de DEET e IR 3535 na faixa de 750 – 2.500 nm.

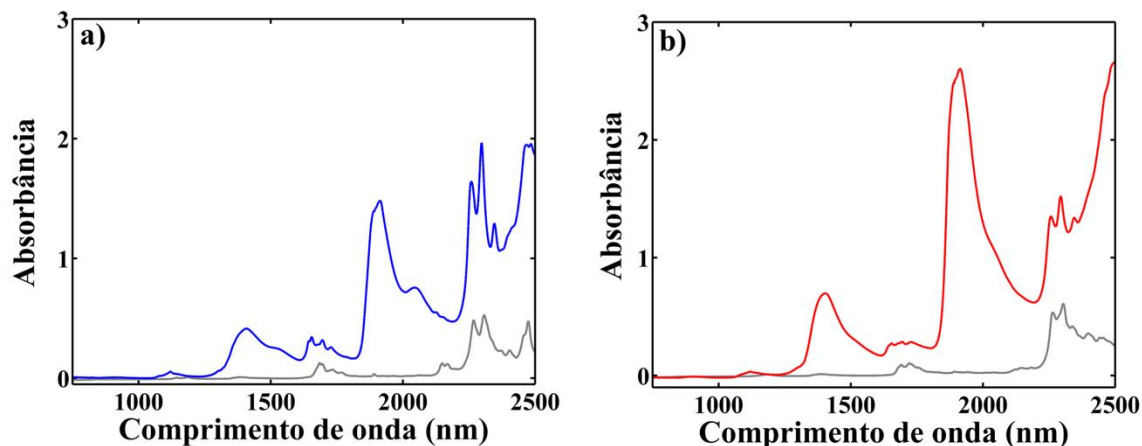


**Figura 4.10** - Espectros originais a) DEET b) IR 3535

É possível observar na **Figura 4.10** que tanto o grupo de espectros DEET (**Fig 4.10a**) quanto o grupo de espectros IR 3535 (**Fig. 4.10b**) apresentam algumas amostras com bandas de maior intensidades diferentes da região entre 1.900 a 2.100 nm. Isso pode ser atribuído à existência de amostras de diferentes fabricantes e excipientes (álcool, perfume, glicerina, água, entre outros) utilizados neste estudo.

Os sobretons e bandas de combinação observados nos espectros NIR são devidos a ligações C – H e O – H [171]. O intervalo 1.345 – 1.800 é uma região informativa para DEET e IR 3535, que corresponde aos primeiros sobretons de CH [171]. Na região entre 1.800 – 2.200 nm o sinal torna-se saturado devido às amostras conterem grandes quantidades de água na sua composição [172]. Na região entre 2.200 – 2.500 nm, as bandas de combinação, estão presentes as ligações CH e CC, presentes nas moléculas dos analitos [172].

A **Figura 4.11** mostra os espectros médio NIR das amostras e dos padrões DEET (**Figura 4.11a**) e IR 3535 (**Figura 4.11b**).



**Figura 4.11** – Espectros médio NIR das amostras a) DEET (azul) b) IR 3535 (vermelho) e dos padrões (cinza) dos respectivos princípios ativos.

De acordo com a **Figura 4.11** os padrões apresentam uma maior informação na região em torno das regiões de 1.600 – 1.800 nm e 2.100 – 2.500 nm.

Na primeira faixa está localizada na região do primeiro sobretom que apresenta combinações de OH, estiramento de C=O presentes na molécula de DEET e IR 3535. A faixa que apresenta a maior intensidade nos padrões é a que está localizada na banda de combinação (2.100-2.500 nm).

#### 4.4.2 Modelos de calibração multivariada

Os modelos de calibração foram construídos relacionando os espectros originais e pré-processados com as concentrações de DEET e IR 3535 obtidos pelo método HPLC-DAD proposto (**capítulo 3**).

As **Tabelas 4.6 e 4.7** apresentam os resultados obtidos pelo PLS, *i*PLS, MLR/SPA, MLR/SW e MLR/GA para os conjuntos de calibração na determinação de DEET (**Tabela 4.6**) e IR 3535 (**Tabela 4.7**) para os diferentes pré-processamentos.

**Tabela 4.6-** Resultados obtidos para os modelos PLS, *i*PLS, MLR/SPA, MLR/SW e MLR/GA para o DEET. Os valores entre parênteses correspondem aos números de fatores ou variáveis empregadas nos modelos. A faixa de calibração do parâmetro é apresentada entre colchetes, cv (validação cruzada).

DEET [5 – 30 % (m m <sup>-1</sup> )]						
Pré-Processamento	Parâmetros	PLS	<i>i</i> PLS	MLR/SPA	MLR/SW	MLR/GA
Originalis	$r_{cv}$	0,98	0,99	0,98	0,99	0,99
	RMSECV	1,22 (10)	1,05 (6)	1,17 (6)	1,19 (4)	0,86 (10)
Correção de linha de base <i>offset</i>	$r_{cv}$	0,98	0,99	0,97	0,98	0,99
	RMSECV	1,35 (10)	0,96 (8)	1,52 (6)	1,23 (3)	0,88 (10)
1º Derivada S.G 11*	$r_{cv}$	0,98	<b>0,99</b>	<b>0,98</b>	<b>0,99</b>	0,99
	RMSECV	1,30 (7)	<b>0,90 (5)</b>	<b>1,16 (2)</b>	<b>0,29 (16)</b>	0,86 (10)
1º Derivada S.G 21*	$r_{cv}$	<b>0,98</b>	0,99	0,98	0,99	<b>0,99</b>
	RMSECV	<b>1,15 (7)</b>	0,92 (7)	1,26 (2)	0,72 (7)	<b>0,76 (10)</b>
2º Derivada S.G 21*	$r_{cv}$	0,58	0,96	0,92	0,99	0,97
	RMSECV	5,09 (2)	2,26 (6)	2,43 (1)	0,99 (14)	1,40 (10)

\*Número de pontos empregados na derivação Savitzky-Golay.

Com base nos resultados apresentados na **Tabela 4.6** para determinação de DEET, é possível perceber que diferentes pré-processamentos apresentaram resultados satisfatórios para os modelos empregados, com baixos valores de RMSECV. Sendo assim, os pré-processamentos que estão em negrito foram escolhidos por apresentar menores valores de RMSECV e maiores valores de  $r_{cv}$ . Os resultados mais detalhados para determinação de DEET são apresentados nas próximas seções.

**Tabela 4.7.** Resultados obtidos para os modelos PLS, *i*PLS, MLR/SPA, MLR/SW e MLR/GA para o IR 3535. Os valores entre parênteses correspondem aos números de fatores ou variáveis empregadas nos modelos. A faixa de calibração do parâmetro é apresentada entre colchetes, cv (validação cruzada).

IR 3535 [5 – 30 % (m m <sup>-1</sup> )]						
Pré-Processamento	Parâmetros	PLS	<i>i</i> PLS	MLR/SPA	MLR/SW	MLR/GA
Originais	$r_{cv}$	0,97	0,97	0,95	<b>0,98</b>	0,99
	RMSECV	1,47 (9)	1,33 (9)	1,83 (3)	<b>1,03 (6)</b>	0,87 (10)
Correção de linha de base <i>offset</i>	$r_{cv}$	<b>0,98</b>	0,98	<b>0,97</b>	0,98	0,99
	RMSECV	<b>1,20 (9)</b>	1,23 (5)	<b>1,46 (4)</b>	1,12 (4)	0,91 (9)
1º Derivada S.G 11*	$r_{cv}$	0,83	<b>0,98</b>	0,92	0,98	0,99
	RMSECV	3,11 (9)	<b>1,04 (3)</b>	2,27 (2)	1,37 (27)	0,77 (10)
1º Derivada S.G 21*	$r_{cv}$	0,96	0,98	0,92	0,94	<b>0,99</b>
	RMSECV	2,44 (10)	1,21 (4)	2,19 (3)	2,23 (27)	<b>0,75 (10)</b>
2º Derivada S.G 21*	$r_{cv}$	0,30	0,44	0,88	0,96	0,98
	RMSECV	5,91 (1)	4,21 (1)	2,57 (1)	1,81 (26)	1,08 (8)

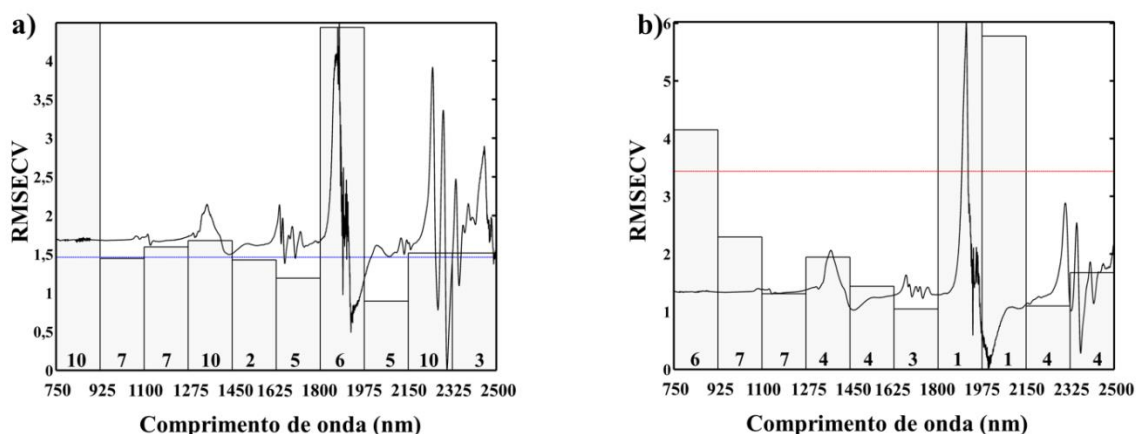
\*Número de pontos empregados na derivação Savitzky-Golay

Assim como para o DEET, os melhores resultados escolhidos para determinação do IR 3535 (**Tabela 4.7**) foram baseados nos menores valores de RMSECV e  $r_{cv}$  apresentados em negrito.

#### 4.4.2.1 Avaliação dos modelos de calibração desenvolvidos

#### 4.4.2.2 *i*PLS

A **Fig. 4.12ab** ilustra o procedimento de seleção de intervalos pelo *i*PLS para DEET e IR3535. Os comprimentos de onda no eixo horizontal correspondem aos limites do lado esquerdo dos 10 intervalos espectrais considerados. Um espectro pré-processado médio normalizado é mostrado para facilitar a interpretação do gráfico. Cada barra vertical indica o valor RMSECV obtido pelo modelo PLS local para o intervalo correspondente. O número de variáveis latentes para cada modelo é dado na parte inferior da barra. A linha pontilhada horizontal indica o valor RMSECV para o modelo PLS aplicado ao espectro completo. O intervalo com menor RMSECV obtido corresponde aos comprimentos de onda na faixa de 1.975 – 2149 nm para DEET, e 1.625- 1.799 nm para IR 3535.



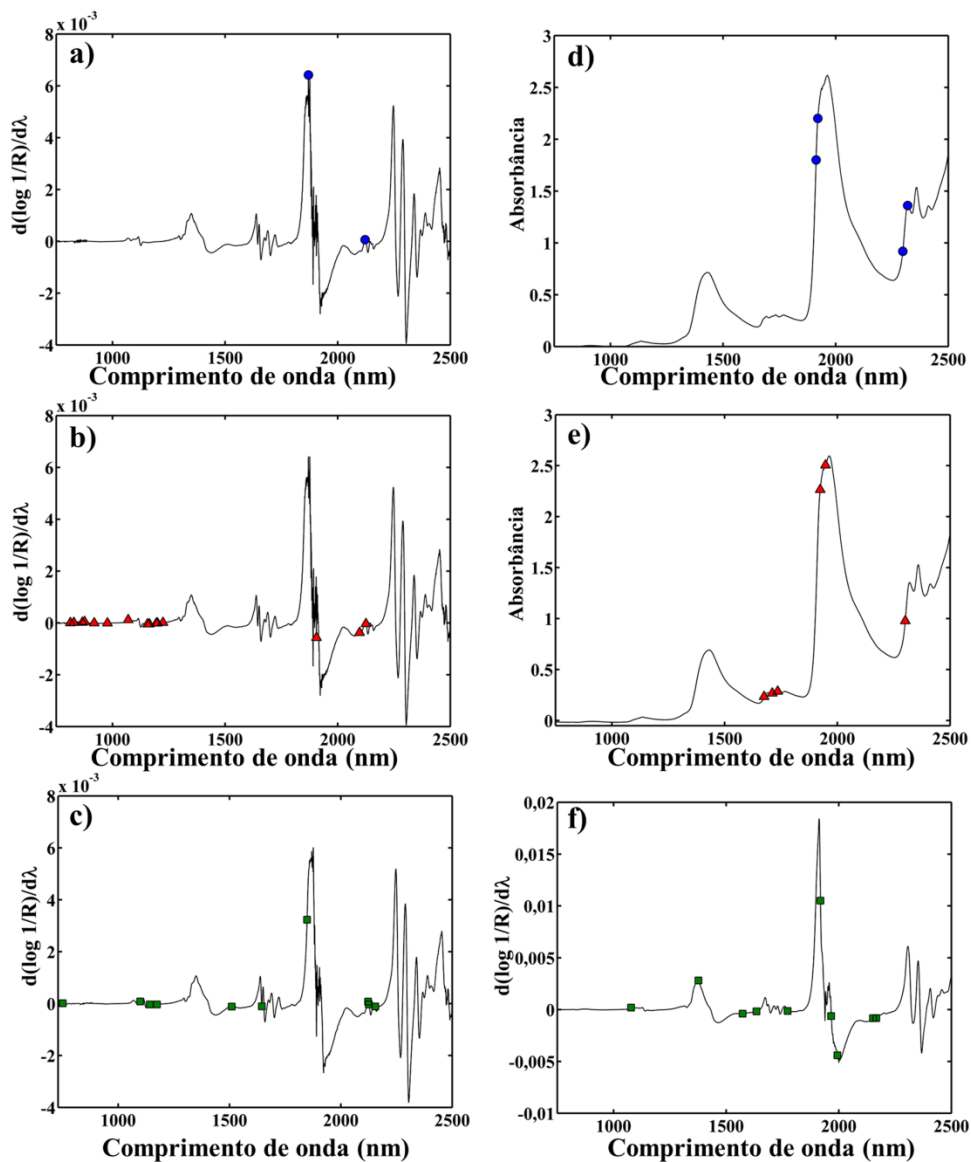
**Figura 4.12** - Intervalos de variáveis selecionadas pelo *i*PLS a) DEET e b) IR 3535

Como pode ser visto acima, a área selecionada pelo *i*PLS para o DEET é uma região em que padrão também apresenta sinal, e para o IR 3535 a faixa selecionada é a faixa do primeiro sobretom, a qual também apresenta sinal no espectro do padrão do princípio ativo IR 35353.

Portanto, a faixa selecionada pelo *i*PLS representa uma região de bandas de absorção diretamente relacionadas aos princípios ativos encontrados nos repelentes.

#### 4.3.2.2 Seleções de variáveis

A **Figura 4.13** mostra as variáveis selecionadas pelo SPA, SW e GA para o modelo MLR para DEET e IR 3535.



**Figura 4.13** - Espectros NIR médios do conjunto de dados com indicação das variáveis selecionadas pelos algoritmos SPA (●), SW (▲) e GA (■), para DEET (a, b e c) e IR 3535 (d, e e f).

Como observado na **Figura 4.13** para o DEET, todos os modelos selecionaram variáveis onde o padrão apresentou resposta, porém o SPA selecionou apenas duas variáveis, sendo uma variável correspondente à região que o *i*PLS também selecionou, que está em torno da região de 2200 – 2300 nm a qual corresponde as bandas de combinações das ligações CH e CC, presentes na estrutura molecular do DEET. Para o IR 3535, o SPA selecionou variável também nas bandas de combinações. O SW e GA selecionaram variáveis na mesma região em que o *i*PLS apresentou menor RMSECV, esta região (1600 – 1800 nm) corresponde a região do primeiro sobretom das ligações CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub> e CH, sendo esta uma região bastante informativa.

### **4.3.3** *Análises dos modelos de calibração*

Os resultados de predição dos modelos de regressão PLS, *i*PLS e MLR com seleções de variáveis desenvolvidos para determinar o teor de DEET e IR 3535 usando a espectroscopia NIR estão resumidos na **Tabela 4.8**.

**Tabela 4.8-** Resultados obtidos pelos modelos PLS, *i*PLS, MLR/SPA, MLR/SW e MLR/GA para o conjunto de predição em termos de RMSEP, valores de correlação e de determinação, LOD e LOQ. N é o número de amostras de predição.

DEET [(5 – 30% m m <sup>-1</sup> )]								
Modelos	N	RMSEP (%m m <sup>-1</sup> )	r <sub>pred</sub>	R <sup>2</sup>	REP (%)	VS ou VL*	LOD	LOQ
PLS	50	0,98	0,99	0,97	10,72	7	0,02	0,05
<i>i</i> PLS	50	0,70	0,99	0,99	7,07	5	0,02	0,08
MLR-SPA	50	0,74	0,99	0,99	7,51	2	0,07	0,22
MLR-SW	50	1,18	0,98	0,96	11,97	16	1,47	4,46
MLR-GA	50	0,72	0,99	0,99	7,87	10	0,23	0,70
IR 3535 [(5 – 30%)]								
Modelos	N	RMSEP (%m m <sup>-1</sup> )	r <sub>pred</sub>	R <sup>2</sup>	REP (%)	VS ou VL*	LOD	LOQ
PLS	25	0,64	0,99	0,99	5,11	9	0,06	0,19
<i>i</i> PLS	25	1,17	0,98	0,96	8,62	3	0,02	0,07
MLR-SPA	25	1,07	0,98	0,96	8,52	4	0,14	0,42
MLR-SW	25	1,03	0,98	0,96	8,03	6	0,03	0,10
MLR-GA	25	1,27	0,98	0,95	9,37	10	0,45	1,38

\*VS: Variáveis Seleccionadas/ VL: Variáveis Latentes

Na comparação entre os modelos PLS e *i*PLS para o DEET, os valores de RMSEP e REP, apresentaram melhores resultados para o modelo com seleções de intervalos com 0,70%  $\text{m m}^{-1}$  e 7,07, respectivamente. Em termos de capacidade preditiva para o IR 3535, o PLS aplicado ao espectro completo apresentou resultados melhores que *i*PLS, exceto para os valores de LOQ, que para o *i*PLS resultados mais satisfatórios foram encontrados.

Para os modelos MLR utilizando seleções de variáveis aplicados ao princípio ativo DEET, resultados satisfatórios foram encontrados para o SPA e GA que apresentaram valores aproximados ao *i*PLS. Comparando o SPA com o *i*PLS apenas duas variáveis foram selecionadas, uma sendo indicada na região selecionada pelo *i*PLS, o que torna o modelo mais simples. O modelo MLR/SW apresentou um maior valor de RMSEP, LOD e LOQ comparado aos outros modelos desenvolvidos, este fato pode estar associado a uma expressiva quantidade de variáveis selecionadas e na região com baixa intensidade do sinal.

Para o princípio ativo IR 3535, os modelos MLR com seleções de variáveis SPA e SW apresentaram resultados semelhantes de RMSEP,  $r$ ,  $r^2$  e REP, exceto o LOD e LOQ que para o MLR/SW apresentou os melhores resultados. Quando comparados ao modelo PLS, os resultados com seleções de variáveis apresentaram valores altos de RMSEP e REP. O modelo MLR/GA apresentou altos valores de LOD e LOQ, quando comparado aos outros modelos.

A **Tabela 4.9** apresenta uma avaliação da significância estatística entre os valores de RMSEP de todos os modelos desenvolvidos, aplicando um teste  $F$  a um nível de confiança de 95%.

**Tabela 4.9-** Resultados para o teste F (nível de confiança de 95%) obtidos na comparação dos valores dos modelos PLS, iPLS, MLR-SPA, MLR/SW e MLR/GA

Modelos	DEET		IR 3535	
	F <sub>calculado</sub>	F <sub>crítico</sub>	F <sub>calculado</sub>	F <sub>crítico</sub>
PLS e iPLS	1,96		0,29	
PLS e MLR/SPA	1,75		0,36	
PLS e MLR/SW	1,45		2,59	
PLS E MLR/GA	1,85		0,25	
iPLS e MLR/SPA	1,12	1,60	0,84	2,12
iPLS e MLR/SW	2,84		0,77	
iPLS E MLR/GA	1,06		1,18	
MLR/SPA e MLR/SW	2,54		0,93	
MLR/SPA e MLR/GA	1,06		0,71	
MLR/SW e MLR/GA	2,69		0,66	

Como observado na **Tabela 4.9**, para os modelos PLS e MLR/SW, iPLS e MLR/SPA, iPLS e MLR/GA e MLR/SPA e MLR/GA para o DEET, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os valores de RMSEP obtidos com os modelos construídos, demonstrando que não existe diferença na entre esses modelos.

Para o IR 3535, apenas o PLS e MLR/SW apresentou diferenças significativas. Para os demais modelos, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada.

A **Tabela 4.10** apresenta um teste *t*-pareado aplicado ao nível de confiança de 95%.

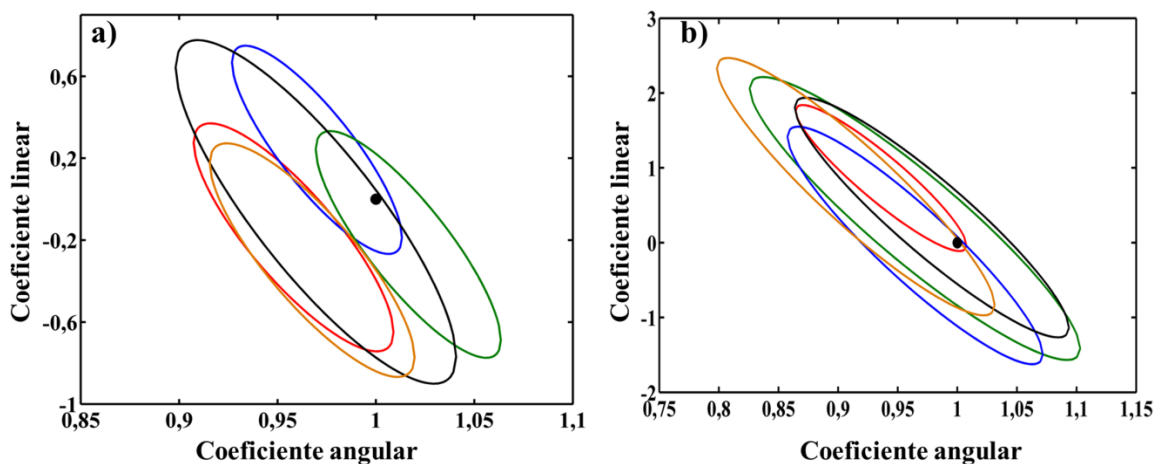
**Tabela 4.10-** Resultados para o teste *t*-pareado (95% de confiança) obtidos na comparação dos valores de referências e valores previstos pelos modelos.

Modelos	DEET		IR 3535	
	$t_{\text{calculado}}$	$t_{\text{critico}}$	$t_{\text{calculado}}$	$t_{\text{critico}}$
PLS	4,97		0,41	
<i>i</i> PLS	0,44	2,00	2,42	2,09
MLR/SPA	0,54		0,50	
MLR/SW	2,25		0,29	
MLR/GA	5,13		1,65	

Para o princípio ativo DEET, os modelos PLS, MLR/SW e MLR/GA apresentaram valores acima do valor de  $t_{\text{critico}}$ . Para o *i*PLS e MLR/SPA, através do teste *t*-pareado, não foram indicadas diferenças estatisticamente significativas entre os modelos previstos e de referência.

Para o IR 3535, apenas o modelo *i*PLS apresentou valor de  $t_{\text{calculado}}$  acima do  $t_{\text{critico}}$ , apresentando, assim, uma diferença estatisticamente significativa. Os demais modelos desenvolvidos não apresentaram nenhuma diferença ao nível de 95% de confiança foi encontrada entre os valores previstos e de referência.

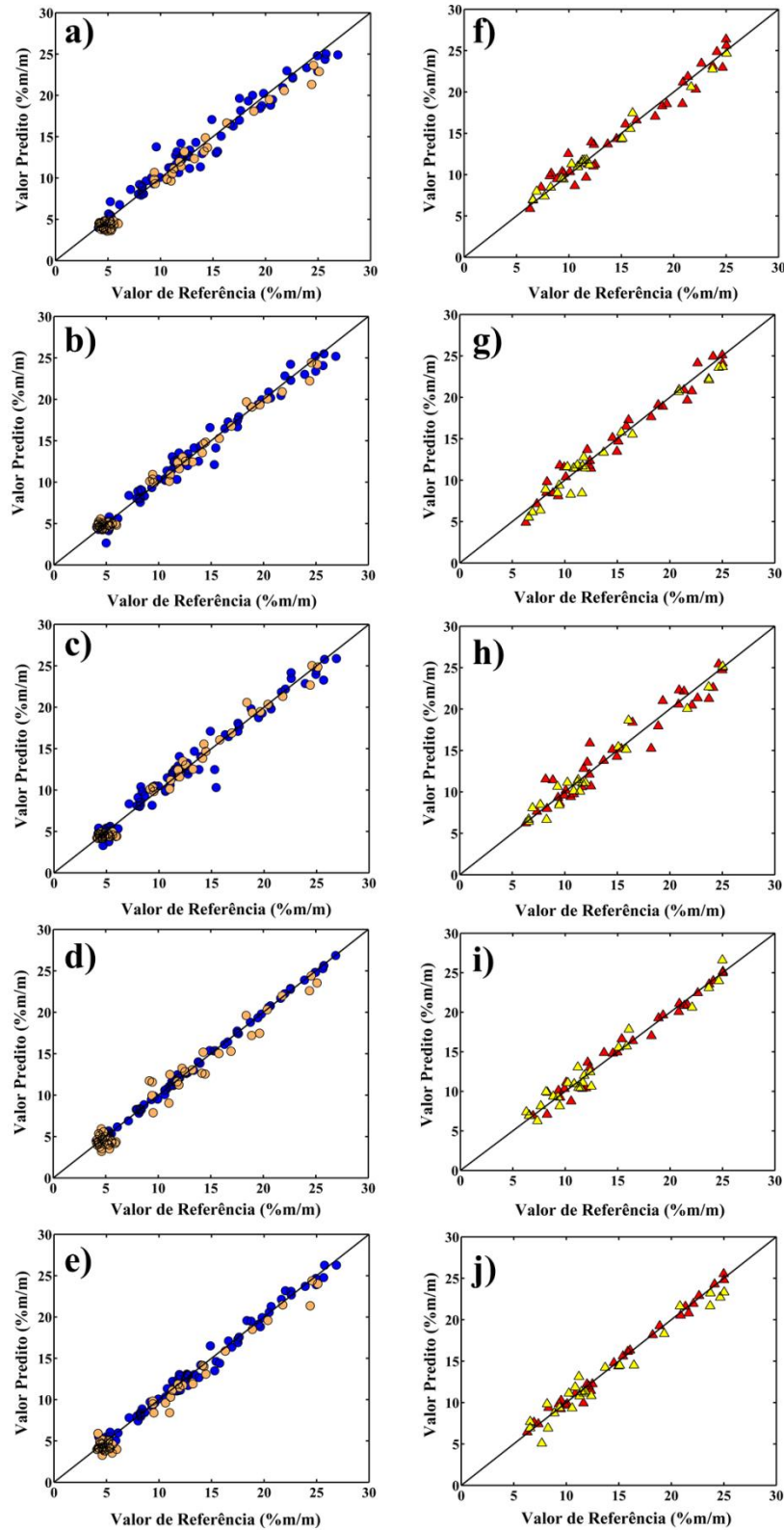
A acurácia do modelo foi avaliada por meio do teste EJCR (**Figura 4.14**), que permite a inclusão dos pontos 0 e 1 na região de confiança da articulação elíptica da inclinação e no intercepto a ser investigado.



**Figura 4.14** - Elipse de confiança para o a) DEET e b) IR 3535 obtidas para os modelos PLS (linha vermelha), *i*PLS (linha azul), MLR/SPA (linha verde), MLR/SW (linha preta) e MLR/GA (linha laranja).

Na **Figura 4.14a** para o DEET, o EJCR para os modelos *i*PLS, MLR/SPA e MLR/GA mostrou que não existem diferenças estatisticamente significativas entre os valores do princípio ativo de referência e os valores previstos pelos modelos, que estão de acordo com os valores apresentados pelo  $t_{\text{calculado}}$ . Este fato é indicativo de que erros proporcionais e constantes não estejam presentes e, assim, a capacidade preditiva dos modelos seja satisfatória. As elipses dos modelos PLS e MLR/GA não contêm o ponto ideal. Para o IR 3535 (**Figura 4.14b**), todos os modelos contêm o ponto ideal, novamente, indicando que os valores preditos pelos modelos não apresentam diferença significativa com 95% de confiança quando comparados aos valores de referência.

As **Figuras 4.15** mostram os valores previstos *versus* valores de referência para PLS, *i*PLS, MLR/SPA, MLR/SW e MLR/GA para DEET e IR 3535. Como observado na **Figura 4.15**, as amostras de calibração e predição estão distribuídas aleatoriamente em torno da linha da bissetriz, ao longo de toda extensão de valores  $y$ , tanto para o DEET quanto para o IR 3535.

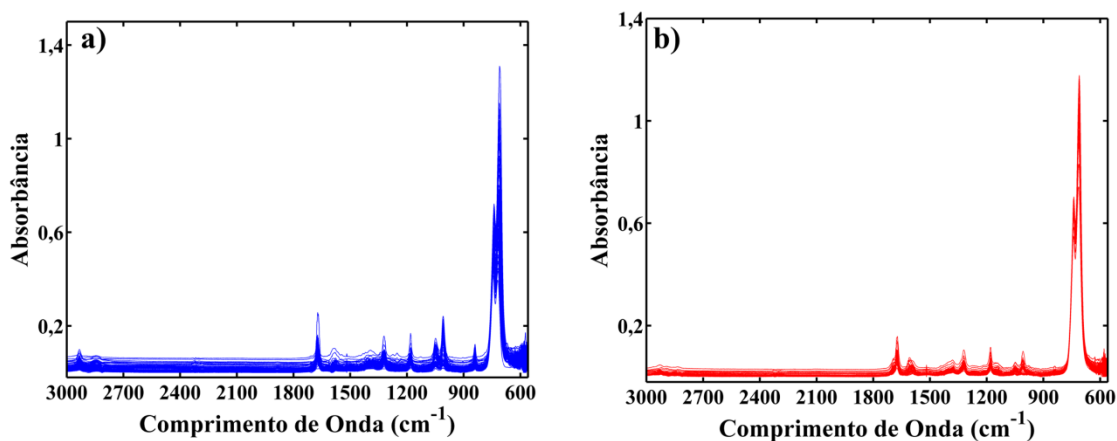


**Figura 4.15** - Gráfico dos valores preditos *versus* os valores de referências obtidos pelos modelos PLS (a e f), *i*PLS (b e g), MLR/SPA (c e h), MLR/SW (d e i) e MLR/GA (e e j) Para DEET Amostras de calibração (●) e amostra de predição (○) e IR 3535 Amostras de calibração (▲) e amostra de predição (△).

## 4.5 Estudo de Calibração (MIR)

### 4.5.1. Espectros

Os espectros MIR de DEET e IR 3535 são apresentados na **Figura 4.16**.



**Figura 4.16** - Espectros originais no infravermelho médio para a) DEET b) IR 3535

Na **Figura 4.16ab**, observa-se, em particular, os valores de absorbância em torno de  $900 - 600 \text{ cm}^{-1}$  estão relacionados à região de deformação angular fora do plano da ligação C-H do anel aromático para o DEET. Esta região também é chamada de impressão digital do composto estudado, no caso DEET e IR 3535. Outra região importante está nos comprimentos de onda  $1200 - 1500$  em que ocorrem as bandas da ligação C - N [173].

Assim como na seção anterior, foram construídos modelos de calibração para 5 tipos de pré-processamentos com concentrações dos princípios ativos encontradas através do método HPLC-DAD aqui proposto.

As **Tabelas 4.11** e **4.12** demonstram os resultados obtidos pelo PLS, *i*PLS, MLR/SPA, MLR/SW e MLR/GA para os conjuntos de calibração.

**Tabela 4.11** - Resultados obtidos para os modelos PLS, *i*PLS, MLR/SPA, MLR/SW e MLR/GA para o DEET. Os valores entre parênteses correspondem aos números de fatores ou variáveis empregadas nos modelos. A faixa de calibração do parâmetro é apresentada entre colchetes, *cv* (validação cruzada).

DEET [5 – 30 % (m m <sup>-1</sup> )]						
Pré-Processamento	Parâmetros	PLS	<i>i</i> PLS	MLR/SPA	MLR/SW	MLR/GA
Originalis	<i>r<sub>cv</sub></i>	<b>0,99</b>	<b>0,92</b>	0,95	0,95	0,97
	RMSECV	<b>1,97 (8)</b>	<b>2,48 (7)</b>	1,87 (3)	1,91 (61)	1,54 (20)
Correção de linha de base <i>offset</i>	<i>r<sub>cv</sub></i>	0,94	0,90	0,95	0,89	0,98
	RMSECV	2,05 (8)	2,83 (7)	1,94 (10)	2,80 (2)	1,33 (20)
1º Derivada S.G 11*	<i>r<sub>cv</sub></i>	0,96	0,86	<b>0,96</b>	<b>0,96</b>	0,97
	RMSECV	1,85 (10)	2,69 (5)	<b>1,76 (7)</b>	<b>1,70 (5)</b>	1,48 (15)
1º Derivada S.G 21*	<i>r<sub>cv</sub></i>	0,98	0,90	0,95	0,95	<b>0,98</b>
	RMSECV	1,98 (10)	2,75 (8)	1,91 (13)	1,96 (17)	<b>1,24 (10)</b>
2º Derivada S.G 21*	<i>r<sub>cv</sub></i>	0,95	0,91	0,96	0,93	0,98
	RMSECV	1,90 (10)	2,66 (7)	1,80 (15)	2,36 (61)	1,36 (20)

\*Número de pontos empregados na derivação Savitzky-Golay

**Tabela 4.12** - Resultados obtidos para os modelos PLS, *i*PLS, MLR/SPA, MLR/SW e MLR/GA para o IR 3535. Os valores entre parênteses correspondem aos números de fatores ou variáveis empregadas nos modelos. A faixa de calibração do parâmetro é apresentada entre colchetes, cv (validação cruzada).

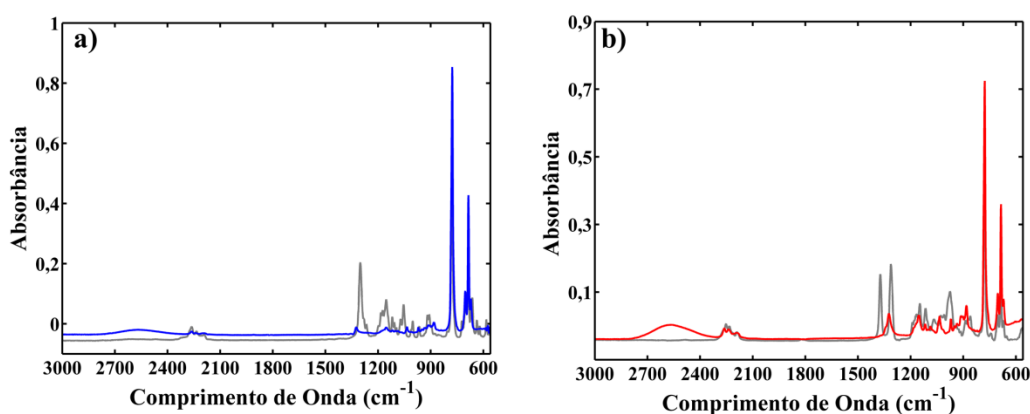
IR 3535 [5 – 30 % (m m <sup>-1</sup> )]						
Pré-Processamento	Parâmetros	PLS	<i>i</i> PLS	MLR/SPA	MLR/SW	MLR/GA
Originalis	$r_{cv}$	0,97	0,96	0,99	0,98	0,99
	RMSECV	1,43 (3)	1,82 (3)	0,40 (20)	1,20 (2)	0,84 (20)
Correção de linha de base <i>offset</i>	$r_{cv}$	<b>0,98</b>	0,97	0,99	0,99	0,99
	RMSECV	<b>1,20 (5)</b>	1,57 (5)	1,12 (8)	1,17 (2)	0,95 (6)
1º Derivada S.G 11*	$r_{cv}$	0,98	0,97	0,99	<b>0,99</b>	<b>0,99</b>
	RMSECV	1,72 (3)	1,53 (3)	1,07 (6)	<b>0,65 (5)</b>	<b>0,49 (10)</b>
1º Derivada S.G 21*	$r_{cv}$	0,98	0,96	<b>0,99</b>	0,97	0,99
	RMSECV	1,41 (3)	1,74 (3)	<b>0,53 (18)</b>	1,46 (2)	0,53 (10)
2º Derivada S.G 21*	$r_{cv}$	0,97	<b>0,97</b>	0,99	0,98	0,99
	RMSECV	1,70 (4)	<b>1,48 (4)</b>	0,64 (15)	1,17 (3)	0,55 (9)

\*N número de pontos empregados na derivação Savitzky-Golay

De acordo com as **Tabelas 4.11 e 4.12**, para o repelente DEET e IR 3535, é observado que os melhores resultados ocorreram para diferentes pré-processamentos de acordo com cada modelo aplicado. Os melhores resultados estão em negrito e seus resultados detalhados são apresentados nas próximas seções.

#### 4.5.2 Avaliação dos modelos desenvolvidos

A **Figura 4.17** apresenta os espectros médio MIR dos padrões DEET (**Figura 4.17a**) e IR 3535 (**Figura 4.17b**).



**Figura 4.17** – Espectros médio das amostras a) DEET (azul) b) IR 3535 (vermelho) e dos padrões (cinza) dos respectivos princípios ativos.

Conforme ilustrado na **Figura 4.16**, os padrões apresentam informação na região de  $2.400 - 2.100 \text{ cm}^{-1}$ , porém uma maior quantidade de informação está presente na região entre  $1.500$  a  $600 \text{ cm}^{-1}$ . A  $1390 - 1370 \text{ cm}^{-1}$  corresponde às ligações  $\text{CH}_3$ . As ligações C-N podem ser observadas na região em torno de  $1340 - 1250 \text{ cm}^{-1}$ . Na região de aproximadamente  $920 \text{ cm}^{-1}$  ocorre ligações de OH. Por fim, na região em torno de  $900 - 600 \text{ cm}^{-1}$  ocorrem as ligações C - H [173].

##### 4.5.2.1 iPLS

Um *iPLS* foi realizado nos dados espectrais de DEET e IR 3535 e são apresentados na **Figura 4.18**.

Como mencionado nos resultados da espectrometria NIR, os números de onda no eixo horizontal correspondem aos limites do lado esquerdo dos 10 intervalos espectrais considerados. Um espectro pré-processado médio normalizado é mostrado para facilitar a interpretação do gráfico. Cada barra vertical indica o valor RMSECV obtido pelo modelo PLS local para o intervalo correspondente. O número de variáveis latentes para cada modelo é dado na parte inferior da barra. A linha pontilhada horizontal indica o valor RMSECV para o modelo PLS aplicado ao espectro completo. O intervalo com menor RMSECV obtido corresponde aos comprimentos de onda na faixa de 2.067 - 1.822  $\text{cm}^{-1}$  para DEET e 1332 - 1087  $\text{cm}^{-1}$  para IR 3535.

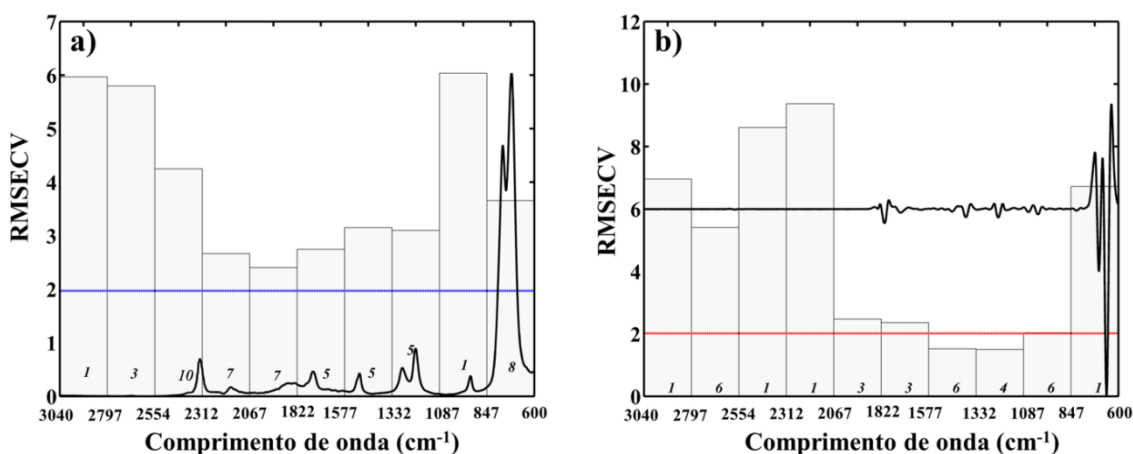
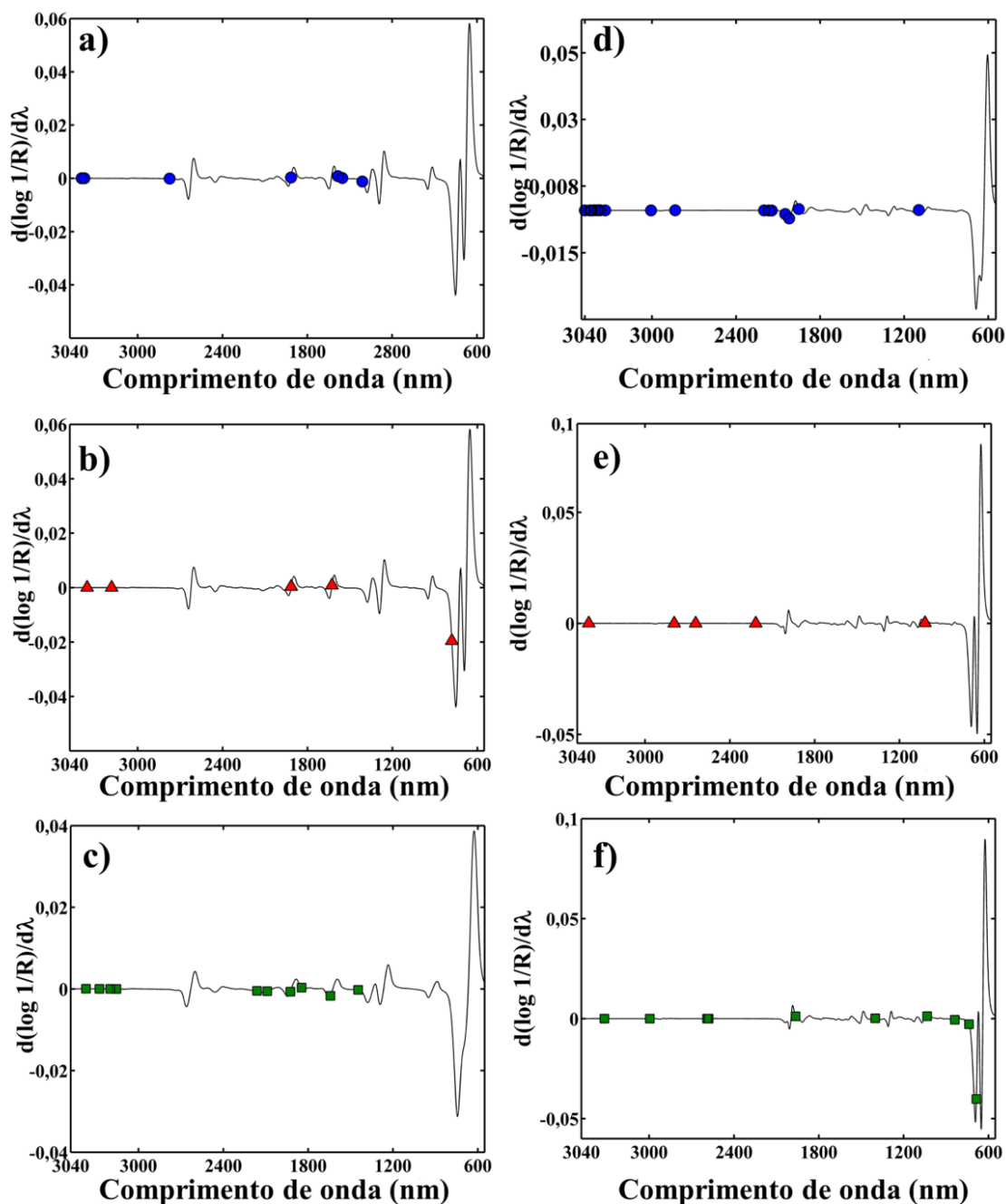


Figura 4.18 - Intervalos de variáveis selecionadas pelo iPLS a) DEET e b) IR 3535

#### 4.5.2.2 Seleções de Variáveis

A Figura 4.19 apresenta as variáveis selecionadas pelo SPA, SW e GA para os modelos MLR para DEET e IR 3535.



**Figura 4.19** - Espectros MIR médios do conjunto de dados com indicação das variáveis selecionadas pelos algoritmos SPA (•), SW (▲) e GA (■), para DEET (a, b e c) e IR 3535 (d, e e f).

Observa-se na **Figura 4.19abc** para o DEET, que os três algoritmos selecionaram variáveis em regiões informativas na faixa de  $3040 - 3000 \text{ cm}^{-1}$  onde ocorre as bandas de C – H de alcenos e C – H de aromáticos. Na região em torno de  $1700 - 1300 \text{ cm}^{-1}$  é uma região em que ocorrem ligações de C = O de cetonas,  $\text{CH}_3$  e C – N. Na faixa entre  $730 - 675 \text{ cm}^{-1}$  em que o algoritmo SW também selecionou uma variável nessa região corresponde a ligação C – H. Nas amostras contendo o princípio ativo IR 3535 (**Figura**

**4.19def)**, por apresentarem espectros semelhantes com o do DEET, as variáveis foram selecionadas em regiões parecidas com as do DEET

### 4.5.3 Análises dos modelos de calibração

A **Tabela 4.13** apresenta os resultados dos parâmetros de desempenho avaliados em termos do conjunto de predição.

**Tabela 4.13.** Resultados obtidos pelos modelos PLS, *i*PLS, MLR/SPA, MLR/SW e MLR/GA para o conjunto de predição (em termos de RMSEP, valores de correlação e de determinação. N é o número de amostras de predição.

DEET						
Modelos	N	RMSEP (%m m <sup>-1</sup> )	r <sub>pred</sub>	R <sup>2</sup>	Rep (%)	VS ou VL*
<b>PLS</b>	40	1,38	0,97	0,94	15,05	8
<b><i>i</i>PLS</b>	40	2,13	0,94	0,86	23,32	7
<b>MLR-SPA</b>	40	1,39	0,96	0,93	15,64	7
<b>MLR-SW</b>	40	1,90	0,95	0,87	21,40	7
<b>MLR-GA</b>	40	1,46	0,96	0,92	16,34	10
IR 3535						
Modelos	N	RMSEP (%m m <sup>-1</sup> )	r <sub>pred</sub>	R <sup>2</sup>	Rep (%)	VS ou VL*
<b>PLS</b>	20	1,69	0,96	0,91	12,33	5
<b><i>i</i>PLS</b>	20	2,00	0,95	0,90	14,03	4
<b>SPA-MLR</b>	20	2,72	0,94	0,81	20,17	18
<b>MLR-SW</b>	20	3,11	0,93	0,76	21,83	5
<b>MLR-GA</b>	20	2,50	0,94	0,82	17,56	10

\*VS= variáveis selecionadas/ VL = variáveis latentes

Conforme apresentado na **Tabela 4.13**, resultados para o MIR foram satisfatórios, principalmente, quando aplicamos o PLS e MLR/SPA para DEET e PLS e *i*PLS para o IR 3535. Comparando os modelos PLS e *i*PLS para o DEET e IR 3535, nota-se uma diferença entre os valores de RMSEP, apresentando o menor valor para o PLS (1,38% e 1,69%), respectivamente.

Nos modelos MLR desenvolvidos com seleções de variáveis, o SPA proporcionou o menor RMSEP para o DEET e o GA para o IR 3535.

Um teste *F* (**Tabela 4.14**), com um nível de confiança de 95% entre os valores de RMSEP de todos os modelos desenvolvidos foi avaliado.

**Tabela 4.14.** Resultados para o teste *F* (nível de confiança de 95%) obtidos na comparação dos valores de referências e valores previstos pelos modelos PLS, *i*PLS, MLR-SPA, MLR/SW e MLR/GA

Modelos	DEET		IR 3535	
	$F_{\text{calculado}}$	$F_{\text{critico}}$	$F_{\text{calculado}}$	$F_{\text{critico}}$
PLS e <i>i</i> PLS	0,41		0,71	
PLS e MLR/SPA	0,99		0,39	
PLS e MLR/SW	1,89		3,38	
PLS E MLR/GA	0,89		0,45	
<i>i</i> PLS e MLR/SPA	0,43	1,69	1,85	2,12
<i>i</i> PLS e MLR/SW	0,80		2,42	
<i>i</i> PLS E MLR/GA	0,45		1,56	
MLR/SPA e MLR/SW	1,86		1,31	
MLR/SPA e MLR/GA	0,91		1,18	
MLR/SW e MLR/GA	1,69		1,55	

O teste *F* não indicou diferenças estatisticamente significativas entre os valores de RMSEP obtidos com o modelo PLS, *i*PLS, MLR/SPA e MLR-GA, porém o MLR/SW apresentou um alto valor de RMSEP para DEET afetando, assim, a correlação. Para o IR 3535 apenas os modelos PLS e MLR/SW quando comparados apresentaram diferenças significativas entre os valores de RMSEP, de fato o MLR/SW apresentou valor de RMSEP elevado comparado aos outros modelos.

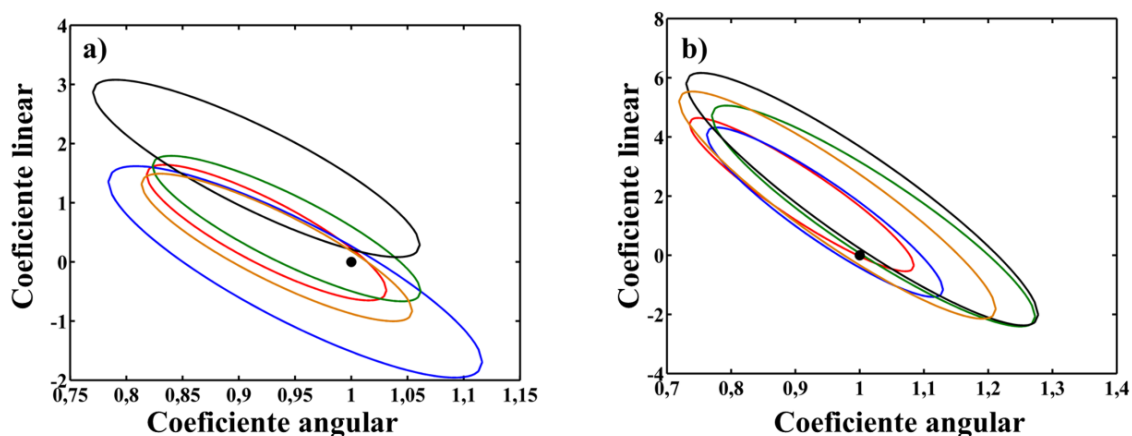
Um teste  $t$  pareado (**Tabela 4.15**) ao nível de confiança de 95% foi realizado para avaliar se os valores preditos estão próximos aos valores de referência.

**Tabela 4.15.** Resultados para o teste  $t$  (nível de confiança de 95%) obtidos na comparação dos valores dos modelos PLS,  $i$ PLS, MLR-SPA, MLR/SW e MLR/GA.

Modelos	DEET		IR 3535	
	$t_{\text{calculado}}$	$t_{\text{critico}}$	$t_{\text{calculado}}$	$t_{\text{critico}}$
PLS	0,90		1,61	
$i$ PLS	1,91	2,02	1,38	2,09
MLR/SPA	0,23		1,80	
MLR/SW	2,17		1,85	
MLR/GA	1,53		1,61	

Para o princípio ativo DEET, o modelo MLR/SW apresentou valor de  $t_{\text{calculado}}$  acima do valor de  $t_{\text{critico}}$ . Enquanto que para o IR 3535, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os valores previstos pelos modelos e os valores de referência.

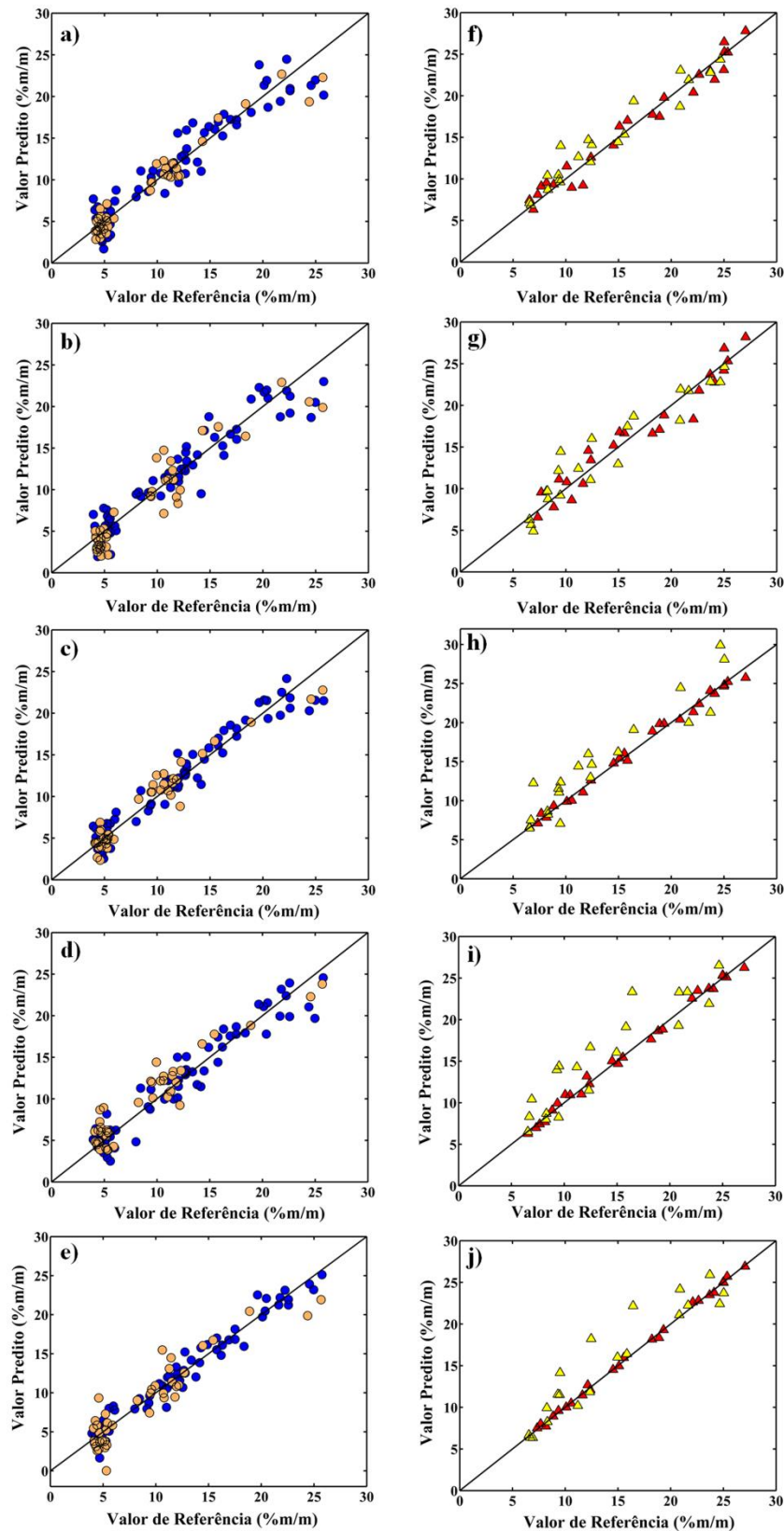
Para corroborar os dados apresentados até aqui, foi realizado um teste EJCR para os modelos PLS e MLR com seleções de variáveis apresentados na **Figura 4.20**.



**Figura 4.20** - Elipse de confiança para o a) DEET e b) IR 3535 obtidas para os modelos PLS (linha vermelha),  $i$ PLS (linha azul), MLR/SPA (linha verde), MLR/SW (linha preta) e MLR/GA (linha laranja).

Através das elipses apresentadas acima nota-se que tanto para o DEET quanto para o IR 3535 apenas o MLR/SW não contém o ponto ideal, isso explica um maior RMSEP quando o modelo foi predito.

A **Figura 4.21** ilustra o gráfico dos valores previstos *versus* os valores de referência para os modelos desenvolvidos para o princípio ativo DEET. Como observado há um pouco de espalhamento das amostras quando comparadas com as amostras do NIR, tanto para DEET quanto para IR 3535. No entanto, os pontos estão distribuídos aleatoriamente ao longo da linha de bissetriz em todo intervalo dos valores de y.

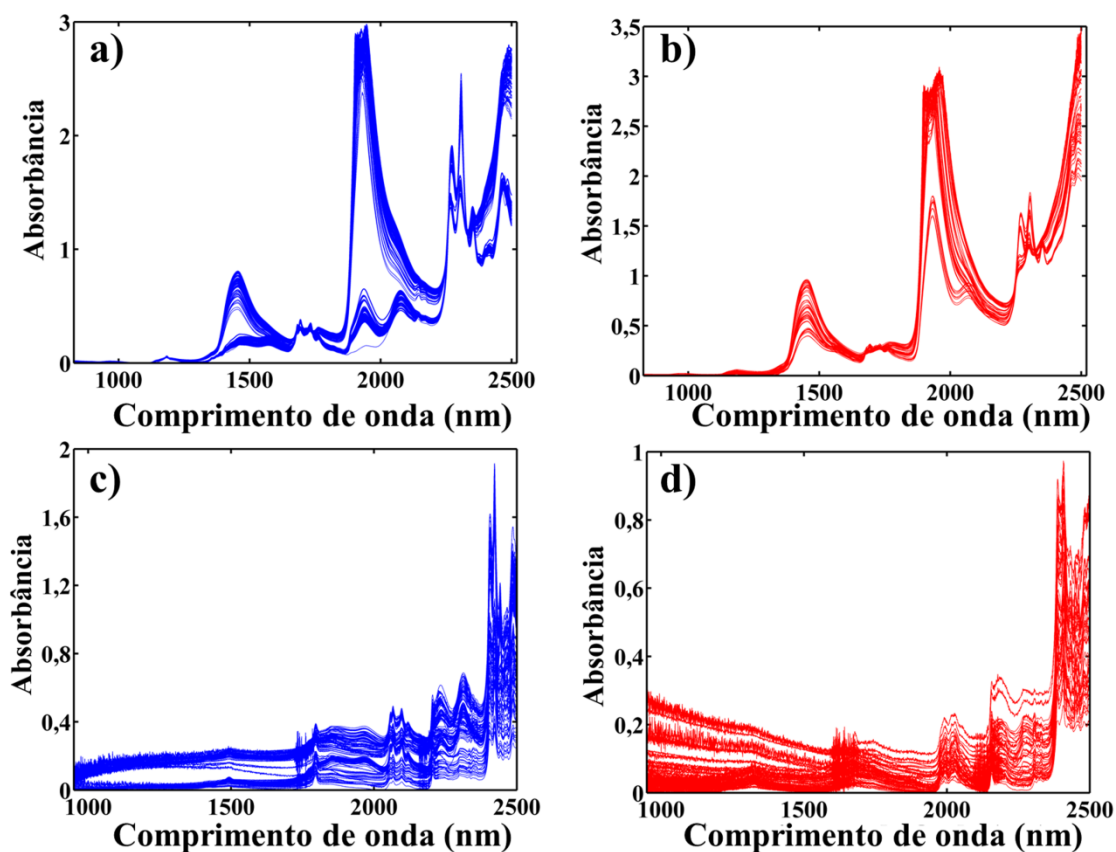


**Figura 4.21** - Gráfico dos valores preditos *versus* os valores de referências obtidos pelos modelos PLS (a e f), *i*PLS (b e g), MLR/SPA (c e h), MLR/SW (d e i) e MLR/GA (e e j) Para DEET Amostras de calibração (●) e amostra de predição (○) e IR 3535 Amostras de calibração (▲) e amostra de predição (△).

## 4.6 Estudos de transferência de calibração

### 4.6.2 Espectros

Na **Figura 4.22** são apresentados os espectros NIR originais na região de 750 a 2.500 nm para o equipamento primário e 1000 a 2.500 nm para o equipamento secundário. O equipamento chamado primário é o mesmo utilizado para o desenvolvimento dos modelos de calibração apresentados na **seção 4.4.2**.



**Figura 4.22** - Espectros completos para os equipamentos primário e secundário a e c) DEET e b e d) IR 3535

Como mencionado na **seção 4.3.2**, as amostras do equipamento secundário passaram por uma etapa de diluição na proporção 1:1 com  $\text{CCl}_4$ , pois houve uma saturação do sinal na banda de combinação (2.200 – 2.500 nm).

Na **Figura 4.22** observa-se uma diferença na intensidade entre os espectros do equipamento primário (**Figura 4.22ab**) e os espectros do equipamento secundário (**Figura 4.22cd**).

Para contornar problemas como espalhamentos das amostras foram realizados pré-processamentos nos espectros do equipamento primário e secundário.

As **Tabelas 4.15** e **4.16** apresentam os resultados em termos de RMSEP e  $r^2$  para todos os pré-processamentos realizados nos equipamentos primário e secundário, respectivamente.

**Tabela 4.15-** Valores  $r^2$  e RMSEP das amostras de DEET e IR 3535 a partir de diferentes pré-processamentos na matriz de dados NIR primário. As variáveis selecionadas e latentes encontram-se entre parênteses. A faixa de calibração do parâmetro é apresentada entre colchetes.

DEET [(5 – 30%)]			
Pré-Processamento	Modelos	$r^2$	RMSEP
1° Derivada S.G 7P*	PLS	0,97 (6)	1,03
	MLR/SPA	0,98 (2)	0,78
1° Derivada S.G 11P*	PLS	0,97 (6)	0,98
	MLR/SPA	0,98 (2)	0,78
1° Derivada S.G 21P*	PLS	<b>0,97 (6)</b>	<b>0,95</b>
	MLR/SPA	<b>0,98 (2)</b>	<b>0,76</b>
Correção de linha de base offset	PLS	0,95 (7)	1,13
	MLR/SPA	0,98 (4)	1,13
IR 3535 [(5 – 30%)]			
Pré-Processamento	Modelos	$r^2$	RMSEP
1° Derivada S.G 7P*	PLS	0,14 (7)	5,78
	MLR/SPA	0,78 (5)	2,95
1° Derivada S.G 11P*	PLS	0,57 (2)	4,01
	MLR/SPA	0,82 (2)	2,28
1° Derivada S.G 21P*	PLS	0,87 (9)	2,37
	MLR/SPA	0,81 (8)	2,72
Correção linha de base offset	PLS	<b>0,94 (7)</b>	<b>1,37</b>
	MLR/SPA	<b>0,91 (6)</b>	<b>1,74</b>

\*Número de pontos empregados na derivação Savitzky-Golay

**Tabela 4.16-** Valores  $r^2$  e RMSEP das amostras de DEET e IR 3535 a partir de diferentes pré-processamentos na matriz de dados NIR secundário. As variáveis selecionadas e latentes encontram-se entre parênteses. A faixa de calibração do parâmetro é apresentada entre colchetes.

DEET [(5 – 30%)]			
Pré-Processamento	Modelos	$r^2$	RMSEP
1º Derivada S.G 7P*	PLS	0,93 (5)	1,45
	MLR/SPA	0,91 (13)	1,61
1º Derivada S.G 11P*	PLS	0,91 (3)	1,58
	MLR/SPA	0,91 (4)	1,56
1º Derivada S.G 21P*	PLS	0,91 (3)	1,52
	MLR/SPA	0,90 (2)	1,65
Correção de linha de base offset	PLS	0,93 (6)	1,61
	MLR/SPA	0,93 (7)	1,65
IR 3535 [(5 – 30%)]			
Pré-Processamento	Modelos	$r^2$	RMSEP
1º Derivada S.G 7P*	PLS	0,85 (6)	2,45
	MLR/SPA	0,88 (9)	2,13
1º Derivada S.G 11P*	PLS	0,93 (6)	1,57
	MLR/SPA	0,87 (6)	2,16
1º Derivada S.G 21P*	PLS	0,94 (3)	1,41
	MLR/SPA	0,93 (4)	1,55
Correção de linha de base offset	PLS	0,91 (6)	1,98
	MLR/SPA	0,88 (9)	2,23

\*Número de pontos empregados na derivação Savitzky-Golay

De acordo com os resultados apresentados nas **tabelas 4.15 e 4.16**, os menores RMSEP e maiores  $r^2$  foram obtidos com o equipamento primário. Para o DEET o melhor resultado foi com a primeira derivada de Savitzky-Golay com polinômio de segunda ordem com janela de 11 pontos, enquanto que para o IR 3535, os melhores valores foram alcançados com a correção de linha de base *offset*. Sendo assim, os resultados apresentados a partir daqui serão para esses pré-processamentos. Para o efeito de apresentação serão adotadas as seguintes notações:

**RMSEP<sup>P</sup>** – RMSEP das amostras de predição registradas no equipamento primário e previstas nos modelos construídos com os espectros do equipamento primário;

**RMSEP<sup>S</sup>** – RMSEP das amostras de predição registradas no equipamento secundário e previstas nos modelos construídos com os espectros do equipamento secundário;

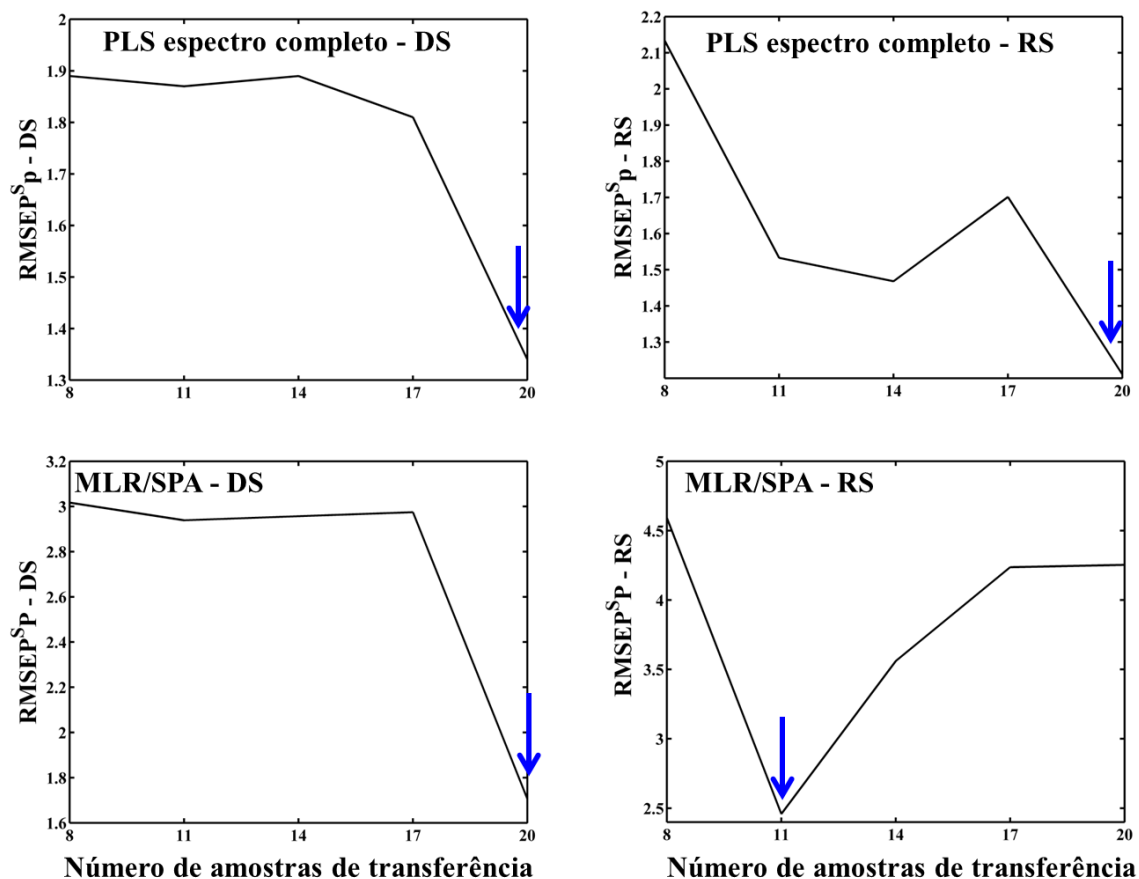
**RMSEP<sup>S<sub>P</sub></sup>** – RMSEP das amostras de predição registradas no equipamento secundário e previstas nos modelos construídos com os espectros do equipamento primário;

**RMSEP<sup>S<sub>P</sub>-DS</sup>** – RMSEP das amostras de predição obtidas pelos modelos dos espectros padronizados e previstas nos modelos construídos com os espectros do equipamento primário;

**RMSEP<sup>S<sub>P</sub>-RS</sup>** – RMSEP das amostras de predição obtidas pelos modelos dos espectros padronizados e previstas nos modelos construídos com os espectros do equipamento primário.

#### 4.6.3 *Transferência de Calibração*

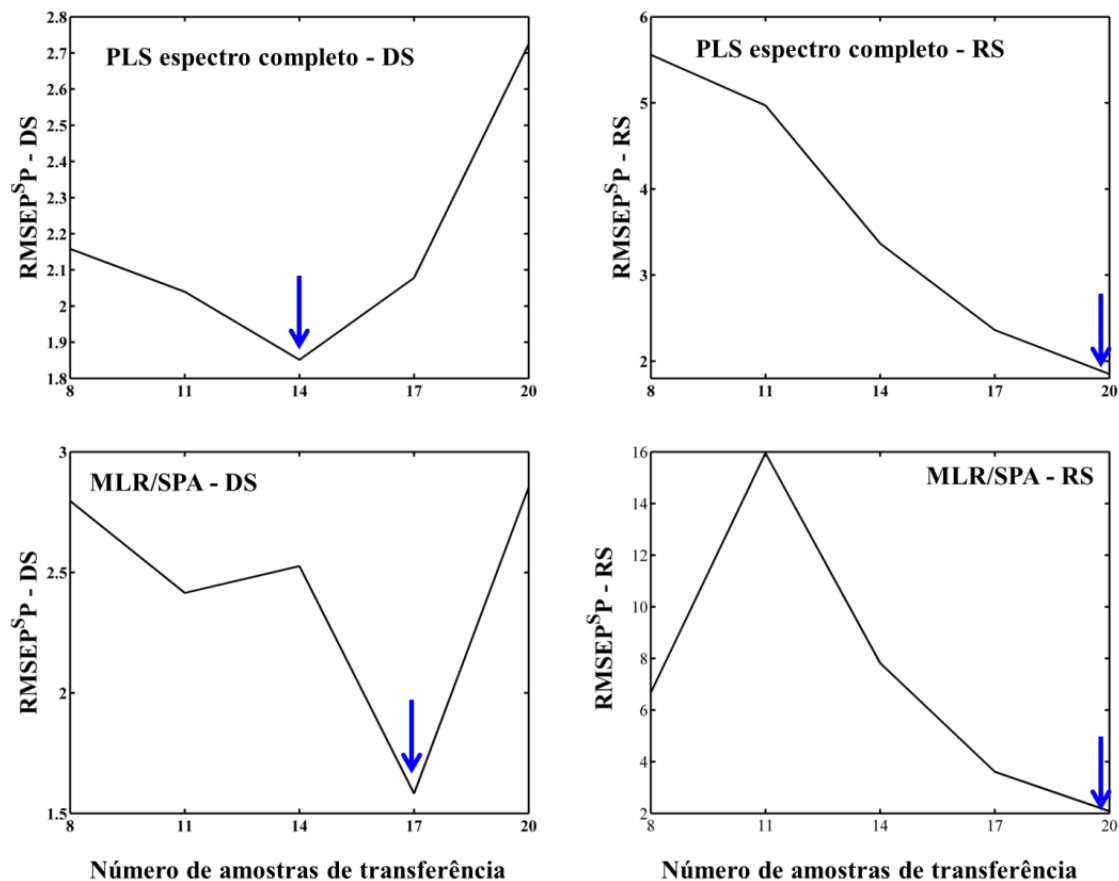
Na **Figura 4.23** é apresentado o número de amostras de transferência em função dos valores de RMSEP utilizando as técnicas de padronização DS e RS para DEET.



**Figura 4.23** - RMSEP em função do número de amostras de transferência após padronização com as técnicas DS e RS, para o parâmetro DEET.

Na **Figura 4.23** pode-se observar que em três modelos o  $RMSEP_p^S$  diminui quando o número de amostras de transferência aumenta, exceto para o modelo PLS com a técnica de padronização RS em que com 17 amostras de transferência o  $RMSEP_p^S$  tem um pequeno aumento e diminui significativamente com 20 amostras. Para o MLR/SPA–RS, o menor valor de RMSEP é com 11 amostras de transferência.

A **Figura 4.24** ilustra o número de amostras de transferência em função dos valores de RMSEP utilizando as técnicas de padronização DS e RS para IR 3535.



**Figura 4.24-** RMSEP em função do número de amostras de transferência após padronização com as técnicas DS e RS, para o parâmetro IR 3535.

Na **Figura 4.24** é observado que os valores de RMSEP variam para cada um dos modelos construídos independentemente do número de amostras utilizados. Para o PLS-DS, 14 amostras de transferência apresentam um menor valor de RMSEP e para o MLR/SPA-DS, o menor valor de RMSEP foi alcançado para 17 amostras de transferência. Já para os modelos com padronização reversa, PLS-RS e MLR/SPA-RS, um menor valor de RMSEP foi obtido com 20 amostras de transferência.

Os resultados encontrados pelos modelos de calibração obtidos pelas técnicas DS, RS e PDS são apresentados na **Tabela 4.17**.

**Tabela 4.17-** Valores de RMSEP obtidos com os modelos PLS espectro completo e MLR/SPA antes e depois das técnicas de padronização DS, RS e PDS para determinação de DEET e IR 3535. O número de fatores e variáveis latentes é indicado entre parênteses.

Técnicas		DEET		IR 3535	
		PLS	MLR/SPA	PLS	MLR/SPA
Sem padronização	RMSEP <sup>P</sup> <sub>P</sub>	0,98	0,78	1,37	1,73
	RMSEP <sup>S</sup> <sub>S</sub>	1,58	1,56	1,41	1,55
	RMSEP <sup>S</sup> <sub>P</sub>	7,95	5,82	25,43	25,18
DS	RMSEP <sup>S</sup> <sub>P-DS</sub>	1,34 (6) <sup>a</sup>	1,71 (2) <sup>c</sup>	1,85 (9) <sup>b</sup>	1,58 (10) <sup>a</sup>
RS	RMSEP <sup>S</sup> <sub>P-RS</sub>	1,21 (3) <sup>b</sup>	2,84 (2) <sup>c</sup>	1,85 (3) <sup>a</sup>	2,08 (5) <sup>c</sup>
PDS [3]	RMSEP <sup>S</sup> <sub>P-PDS</sub>	5,75 (6)	6,41 (2)	5,88 (7)	6,04 (6)
PDS [5]	RMSEP <sup>S</sup> <sub>P-PDS</sub>	5,51 (6)	5,56 (2)	5,71 (7)	5,85 (6)
PDS [9]	RMSEP <sup>S</sup> <sub>P-PDS</sub>	5,20 (6)	5,31 (2)	5,83 (7)	11,91 (6)
PDS [13]	RMSEP <sup>S</sup> <sub>P-PDS</sub>	5,12 (6)	5,58 (2)	5,96 (7)	11,27 (6)

<sup>a</sup>17 amostras de transferência/ <sup>b</sup>14 amostras de transferência/<sup>c</sup>20 amostras de transferência

\*Os valores em colchetes indicam a quantidade pontos nas janelas utilizadas no PDS.

\*A faixa de calibração para os dois parâmetros é de 5 – 30 (% m m<sup>-1</sup>).

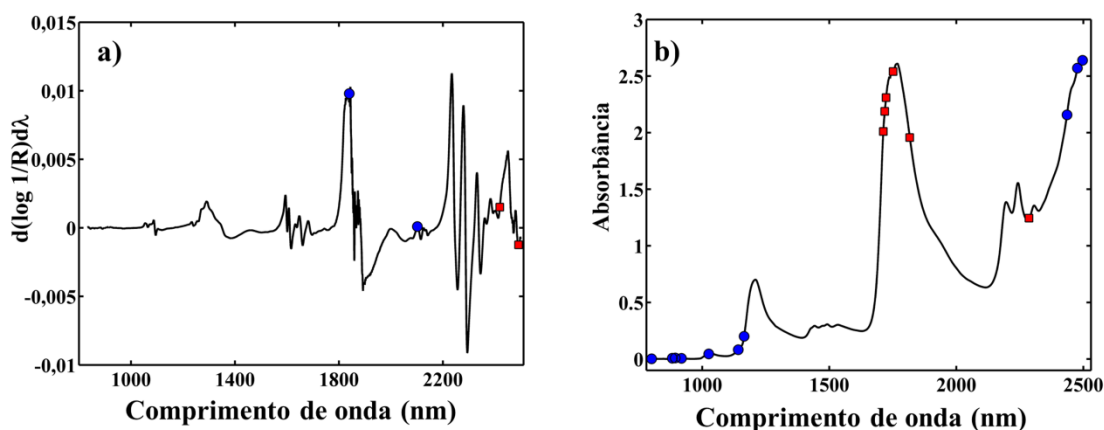
Na **Tabela 4.17** é observado que quando as amostras de predição medidas no equipamento secundário foram testadas em modelos desenvolvidos pelo equipamento primário, os valores de RMSEP aumentaram significativamente. Após utilizar técnicas de padronização DS e RS, os valores de RMSEP reduziram substancialmente. Para a técnica DS, o melhor resultado foi alcançado com o modelo PLS espectro completo com um RMSEP de 1,34% para DEET e MLR/SPA com RMSEP 1,58% para o IR 3535. Porém, um teste *F* em nível de 95% de confiança mostrou que entre os modelos PLS e MLR/SPA tanto para DEET (*f*<sub>cal</sub> = 1,62) quanto para IR 3535 (*f*<sub>cal</sub>= 1,37) não houve diferença estatisticamente significativa.

A técnica de padronização RS apresentou resultados satisfatórios encontrados para o modelo PLS com RMSEP de 1,21% e 1,85% para DEET e IR 3535, respectivamente. No entanto, o teste *F* apresentou diferença significativa entre os

valores de RMSEP para DEET ( $f_{cal}=5,53$ ) e nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada para os valores de RMSEP alcançados para IR 3535.

Para o PDS, o modelo PLS apresentou o menor valor de RMSEP, mais especificamente com janela de 13 e 5 pontos, para DEET e IR 3535, respectivamente. No entanto, quando comparados às técnicas de padronização DS e RS, os valores de RMSEP para a técnica PDS são relativamente altos. Com isso, os resultados obtidos pelos modelos empregando a padronização PDS não foram satisfatórios para transferência de calibração na determinação de DEET e IR 3535 em amostras de repelentes.

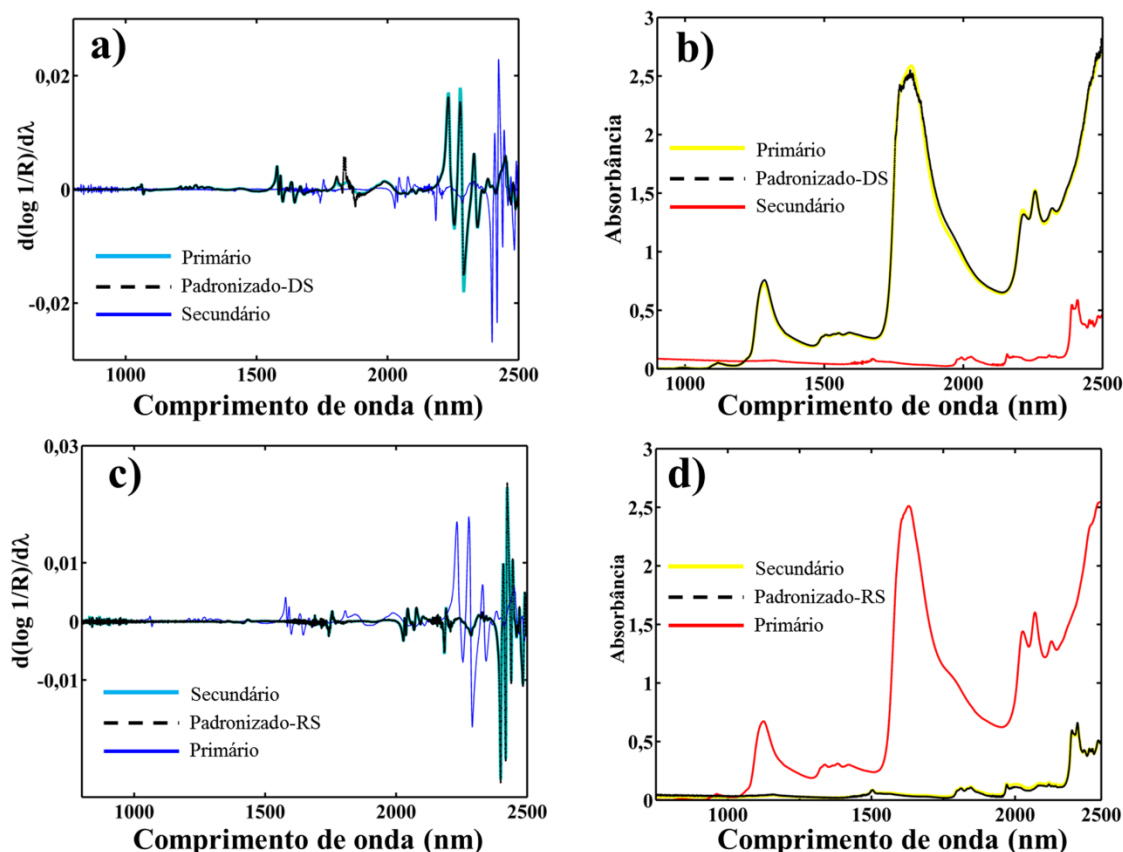
As variáveis selecionadas pelo modelo MLR/SPA são apresentadas na **Figura 4.25**.



**Figura 4.25** - Representação das variáveis selecionadas pelo algoritmo SPA para os princípios ativos a) DEET e b) IR 3535 para as técnicas DS (•) e RS (■).

Para o DEET, as variáveis selecionadas pelo SPA para a técnica de padronização DS estão na região dos comprimentos de onda de 1.840 nm e 2.101 nm, e para a técnica RS foram selecionadas variáveis na região entre 2400 – 2500 nm, estas são regiões das bandas de combinações de CH e CC. Enquanto que para o IR 3535, quando o MLR/SPA foi aplicado aos dados padronizados com a técnica DS as variáveis foram selecionadas na região onde se encontra o primeiro sobretom de CH, e para a técnica RS quando o SPA foi aplicado selecionou cinco variáveis, sendo uma variável selecionada na região entre 2200 a 2300 nm onde estão presentes as bandas de combinações das ligações  $\text{CH}_3$ .

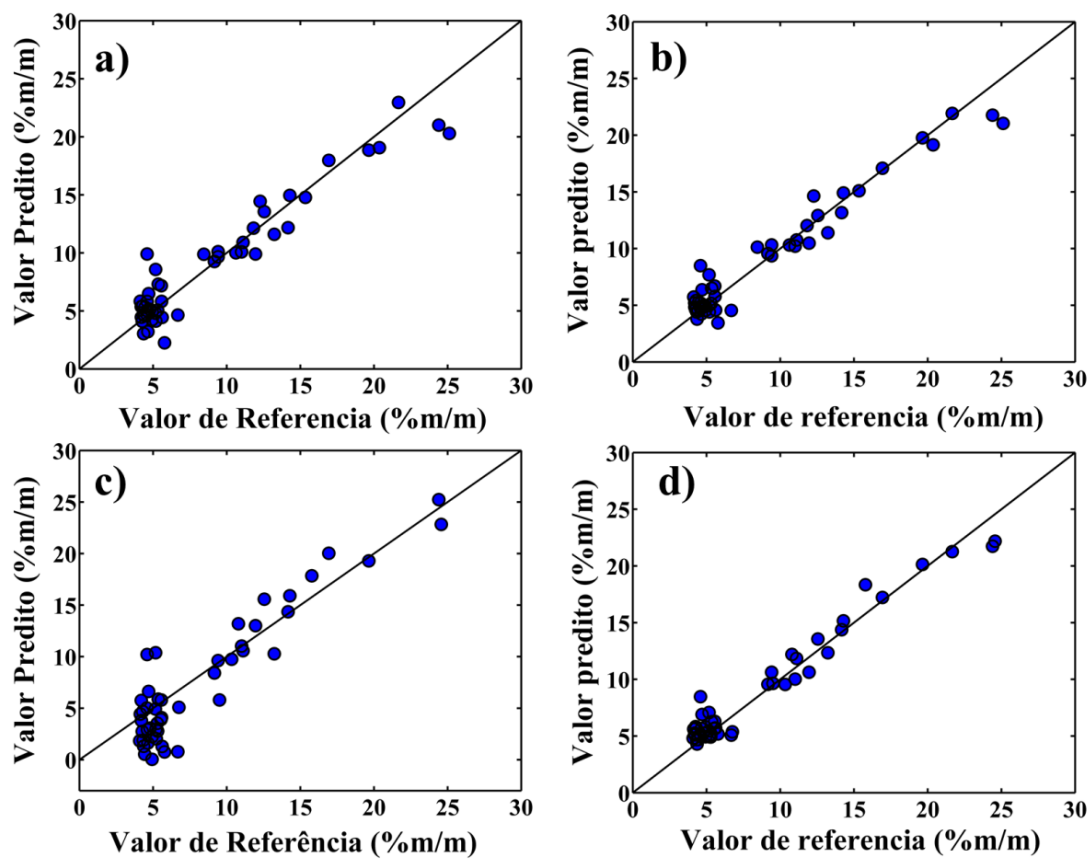
A **Figura 4.26** apresenta os espectros médios dos repelentes para os dois equipamentos (primário e secundário), antes e depois da padronização com a técnica de padronização DS.



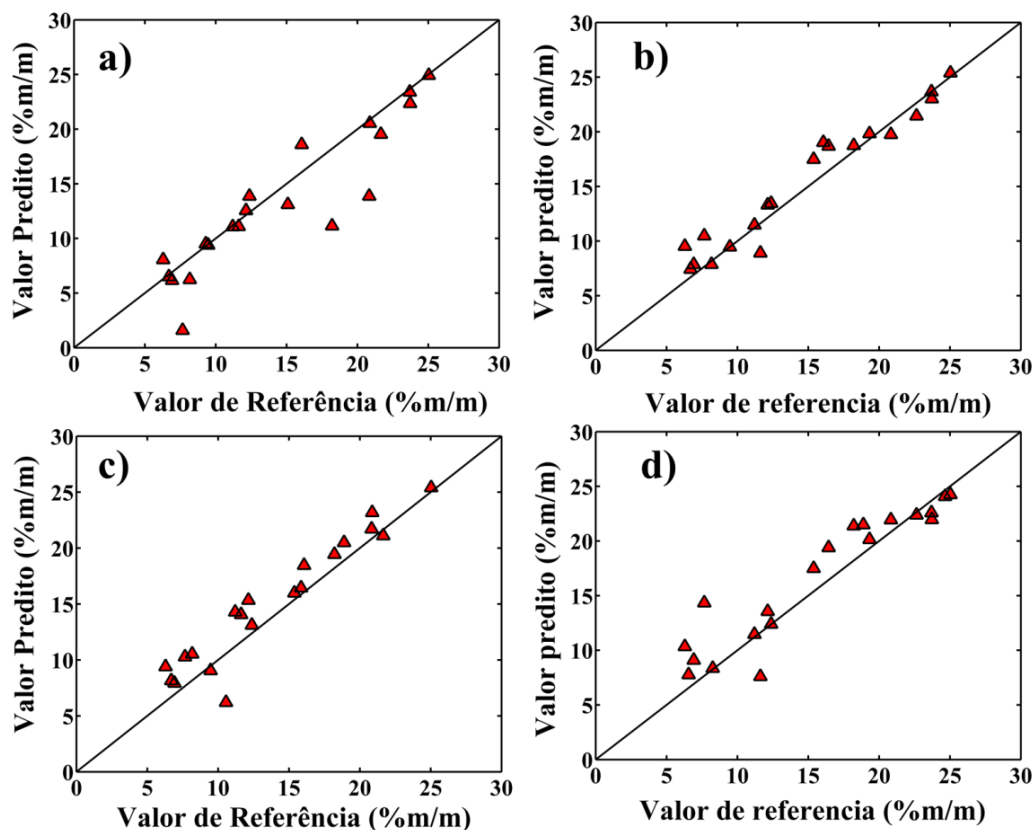
**Figura 4.26** - Espectros médios NIR das amostras de DEET (azul) e IR 3535 (vermelho) obtidos utilizando os instrumentos primários e secundários antes e depois da padronização pelos métodos a e b) DS e c e d) RS

Os espectros de predição do equipamento secundário, apesar de terem passado por um processo de diluição, assemelham-se muito com os espectros do equipamento primário (sem qualquer tipo de preparo de amostra). Isso representa que tanto o deslocamento da banda quanto a diluição das amostras do equipamento secundário foram contornados através das padronizações DS e RS.

As **Figuras 4.27 e 4.28** apresentam os gráficos dos valores preditos *versus* os valores de referência obtidos através do conjunto de predição das amostras padronizadas de DEET e IR 3535, respectivamente.



**Figura 4.27-** Gráfico dos valores preditos *versus* referência dos subconjuntos de predição dos modelos pelos métodos DS e RS, para o DEET. a) PLS – DS, b) PLS– RS, c) MLR/SPA– DS e d) MLR/SPA – RS.



**Figura 4.28** - Gráfico dos valores preditos *versus* referência dos subconjuntos de predição dos modelos pelos métodos DS e RS, para o IR 3535. a) PLS – DS, b) PLS– RS, c) MLR/SPA– DS e d) MLR/SPA – RS.

Nos gráficos dos valores preditos *versus* referência, pode-se observar um desempenho satisfatório com todas as amostras bem distribuídas ao longo da bissetriz, para o DEET.

Para o IR 3535, um maior espalhamento das amostras são observados quando aplica-se o MLR/SPA à técnica de padronização RS.

## 4.7 CONCLUSÕES

Foram apresentadas, neste capítulo, metodologias para classificação, calibração e transferência de calibração baseadas na espectrometria no infravermelho próximo e médio.

A PCA foi aplicada aos dados de classificação no NIR, e foi possível observar a tendência de agrupamentos entre os princípios ativos, principalmente entre DEET e IR 3535 devido às semelhanças espectrais.

Para análise supervisionada ou classificatória, modelos PLS-DA e LDA com seleções de variáveis SPA, SW e GA foram aplicados e alcançaram uma TCC satisfatória. Porém, os melhores resultados foram para o PLS-DA e MLR/SW atingindo uma TCC de 100% para classificação de princípios ativos em amostras de repelentes.

No estudo em que envolve a determinação de DEET e IR 3535 em amostras de repelentes foram desenvolvidos modelos de calibração multivariada com PLS, *i*PLS e MLR com seleções de variáveis SPA, SW e GA, que foram validados e comparados. Os resultados de predição foram satisfatórios, com baixos valores de RMSEP.

Para os dados obtidos pelo NIR, os modelos PLS e *i*PLS apresentaram valores semelhantes de  $r$ ,  $r^2$ , LOD e LOQ, porém houve uma diferença entre os valores de RMSEP e REP, em que o *i*PLS apresentou resultados mais satisfatórios com RMSEP de 0,70% e um REP de 7,07%. Entre os modelos que utilizam seleções de variáveis, os melhores resultados foram alcançados para MLR/SPA e MLR/GA, que obtiveram desempenhos similares. Esses modelos quando comparados ao *i*PLS apresentaram valores de REP e RMSEP próximos, isto pode ter ocorrido porque o SPA e GA selecionaram variáveis no intervalo indicado pelo *i*PLS. Um teste  $F$  foi realizado a um nível de 95% confiança e indicou que entre esses três modelos não apresentam diferenças estatisticamente significativas. O teste  $t$ -pareado indicou que apenas para o *i*PLS e MLR/SPA não ocorriam diferenças estatisticamente significativas entre os valores de referência e previsto pelo modelo. Quando o MLR com seleções de variáveis foi aplicado aos dados do princípio ativo de IR 3535, observou-se que as métricas de desempenho como RMSEP,  $r$ ,  $r^2$  e REP foram mais satisfatórias quando o modelo SPA e SW foram utilizados. Contudo apenas MLR/SW apresentou melhores resultados de LOD e LOQ.

Para os modelos PLS e *i*PLS foi possível observar que o primeiro modelo possui melhor RMSEP, contudo, através do teste  $F$  é possível observar que não há diferenças estatisticamente significativas entre os modelos desenvolvidos. Enquanto que para o teste  $t$ -pareado o *i*PLS apresentou um  $t_{\text{calculado}}$  maior que o  $t_{\text{crítico}}$ .

Para os dados gerados pelo MIR é possível concluir que os melhores resultados são gerados pelo modelo PLS nos princípios ativos de DEET e IR 3535 com RMSEP de 1,38% e 1,69%, respectivamente. Elevados valores de REP foram encontrados quando comparados à espectrometria NIR. Isto pode ter ocorrido, porque as informações no MIR são fragmentadas ao longo de todo espectro, portanto ao aplicar modelos que utilizem o espectro completo (PLS), estes apresentam resultados mais satisfatórios quando comparados aos modelos que utilizem seleções de variáveis.

As técnicas de padronização DS e RS são alternativas quando ocorrem mudanças na integridade das amostras, sejam elas químicas ou físicas, mudanças nos equipamentos ou utilização de um equipamento menos robusto.

Para o estudo de transferência de calibração, a determinação de DEET e IR 3535 apresentaram baixos valores de RMSEP quando utilizado as técnicas de padronização DS e RS. Mais especificamente quando o PLS é aplicado ao espectro completo (RMSEP baixou de 7,95% para 1,34% e 1,21%), para o DEET. Para o IR 3535, os menores valores de RMSEP foram alcançados com MLR/SPA (RMSEP baixou de 25,18% para 1,58% e 1,85%). O PDS não apresentou resultados satisfatórios com altos valores de RMSEP.

O teste  $F$  não indicou diferença estatisticamente significativa entre os valores de RMSEP obtidos pelos modelos. Portanto, as duas estratégias podem ser utilizadas para determinar DEET e IR 3535 em um equipamento secundário.

5

CONCLUSÕES GERAIS

## 5 CONCLUSÕES GERAIS

Nesta tese, foram desenvolvidas metodologias baseadas em HPLC-DAD e espectrometria no infravermelho (NIR e MIR) para estudos na classificação e determinação de princípios ativos em repelentes de insetos.

Na etapa de validação de método HPLC-DAD, realizada através da calibração univariada pode-se concluir que o método possui boa seletividade. As curvas analíticas apresentaram significância nas regressões, de acordo com os resultados obtidos pela ANOVA, bem como a razão Hortwitz, que apresentou resultados dentro dos limites estabelecidos pela EURACHEM.

Na etapa de classificação, foi desenvolvida a partir da espectrometria NIR e ferramentas quimiométricas, a identificação de três classes de repelentes de insetos (DEET, icaridina e IR 3535). O modelo de classificação PLS-DA desenvolvido apresentou o melhor resultado com especificidade e sensibilidade iguais a 1.

No segundo momento, foram determinados DEET e IR 3535 por NIR e MIR acoplados com a calibração multivariada, utilizando como referência os dados encontrados na metodologia HPLC-DAD. Resultados de predição foram satisfatórios, com baixos valores de RMSEP quando comparados à faixa de concentração (5%-30%  $m^{-1}$ ). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas de acordo com um teste  $F$ , entre os modelos  $i$ PLS e MLR/SPA para o DEET e para todos os modelos desenvolvidos para o princípio ativo IR 3535.

Para a espectrometria MIR, um teste  $F$  indicou diferença significativa apenas para o modelo MLR/SW com os demais modelos desenvolvidos, apresentando um  $F_{\text{calculado}}$  acima do valor de  $F_{\text{crítico}}$  para o DEET e IR 3535. Assim como o teste  $t$ -pareado indicou que há diferença estatisticamente significativa entre os valores de referência e os preditos pelo modelo MLR/SW, tanto para o DEET quanto para o IR 3535.

A espectrometria NIR apresenta-se vantajosa quando comparada ao MIR, uma vez que baixos valores de RMSEP e REP foram alcançados.

Para estudos com transferência de calibração entre equipamentos NIR de marcas e configurações diferentes, os resultados apresentaram uma diminuição significativa no RMSEP quando aplicados às amostras de predição nos dados padronizados, para o DS e RS.

Como vantagens, as metodologias propostas e desenvolvidas neste trabalho apresentaram bons desempenhos para classificar e quantificar princípios ativos em repelentes de insetos.

Finalmente, concluir que esta tese é relevante para que se realize, por órgãos de vigilância, o controle da qualidade dos repelentes disponíveis no mercado.

### 5.1 Propostas futuras

- ✓ Analisar a amostra de icaridina através do HPLC-DAD;
- ✓ Investigar o tempo que o repelente permanece na pele através da análise do suor na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD); avaliar a cinética de permanência de repelentes na pele através de estudos de transpiração utilizando a técnica HPLC-DAD
- ✓ Realizar medidas de repelentes no equipamento NIR portátil para uma nova transferência de calibração e classificação.

## REFERÊNCIAS

## REFERÊNCIAS

1. F. A. Mendonça, A. V. Sousa, D. A. Dutra, Saúde Pública, urbanização e dengue no Brasil. *Sociedade & Saúde*, 21 (2009) 257 – 269.
2. WHO- World Health Organization. Vector-borne Diseases. Disponível em: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>. Acessado em: Março de 2018.
3. M. S. Fradin, J. F. Day, Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites. *The New England Journal of Medicine*, 347 (2002), 13-18.
4. Brasil, 2018. Ministério da Saúde: Boletim Epidemiológico. Disponível em: <http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/abril/19/BE-2018-13-SE-11-Publicacao.pdf> . Acessado em Maio de 2018.
5. E. Lupi, C. Hatz, P. Schagenhauf. The efficacy of repellents against Aedes, Anopheles, Culex and Ixodes spp. e A literature review. *Travel Medicine and Infectious Disease*. 11 (2013) 374-411.
6. B. O. Siqueira, A. S. Rodrigues, L. B. D’Almeida, E. P. Santos, E. R. Junior. Trends in insect repellent formulations: A review. *International Journal of Pharmaceutical*, 25 (2018) 190 – 221.
7. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Uso de repelentes e aplicação de inseticidas. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/anvisa-esclarece>. Acessado em Março 2018.
8. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 19 2013. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/>>. Acessado em: Março de 2018.
9. USEPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos. DEET. Disponível em: <https://www.epa.gov/insect-repellents/deet>. Acessado em : Abril de 2018.
10. K. L. Schwartz, T. Chan, N. Rai, K. E. Murphy, W. Whittle, M. A. Drebot, J. Gubbay, A. K. Bogglid. Zika virus infection in a pregnant Canadian traveler with congenital fetal malformations noted by ultrasonography at 14 - weeks gestation, *4:2* (2018) 1-7.

11. A. M. A. Sibaja, C. Fandaruff, M. T. L. Delgado. N,N-diethyl-meta-toluamide (DEET) in repellent solutions: development and validation of an analytical method. *Revista Brasileira de Farmácia*, 94 (2013) 273-278.
12. WHO. Organização Mundial de Saúde. TECHNICAL DEET. Full specification WHO/SRpT/1.R2 1999, revised 10 December 1999. Disponível em: <<http://www.who.int/whopes/quality/en/deet.pdf>>. Acessado em: Dezembro de 2017.
13. E. von Elert, K. Preuss, P. Fink. Infodisruption of inducible anti-predator defenses through commercial insect repellents? *Environmental Pollution*. 210 (2016) 18-26.
14. R. Rodil, M. Moeder. Stir bar sorptive extraction coupled to thermodesorption–gas chromatography–mass spectrometry for the determination of insect repelling substances in water samples. *Journal of Chromatography A*. 1178 (2008) 9-16.
15. A. W. Abu-Qare, M. B. Abou-Donia. Simultaneous determination of malathion, permethrin, DEET (*N,N*-diethyl-*m*-toluamide), and their metabolites in rat plasma and urine using high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 26 (2001) 291-299.
16. S. Kasichayanula, J. D. House, T. Wang, X. Gu. Simultaneous analysis of insect repellent DEET, sunscreen oxybenzone and five relevant metabolites by reversed-phase HPLC with UV detection: Application to an in vivo study in a piglet model. *Journal of Chromatography B*. 822 (2005) 271-277.
17. J. U. Porep, D. R. Kammerer, R. Carle. On-line application of near infrared (NIR) spectroscopy in food production. *Trends in Food Science & Technology*. 46 (2015) 211-230.
18. J. A. Pierna, P. Vermeulen, O. Amand, A. Tossens, P. Dardenne, V. Baeten. NIR hyperspectral imaging spectroscopy and chemometrics for the detection of undesirable substances in food and feed. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 117 (2012) 233-239.
19. L. M. Dale, A. Thewis, C. Boudry, I. Rotar, F. S. Păcurar, O. Abbas, P. Dardenne, V. Baeten, J. Pfister, J. A. F. Pierna. Discrimination of grassland species and their classification in botanical families by laboratory scale NIR hyperspectral imaging: Preliminary results. *Talanta*. 116 (2013) 149-154.

20. S. Serranti, A. Gargiulo, G. Bonifazi. Classification of polyolefins from building and construction waste using NIR hyperspectral imaging system. *Resources, Conservation and Recycling*. 61 (2012) 52-58.
21. I. Tomuta, L. Rus, I. Rares, L. L. Rus. High-throughput NIR-chemometric methods for determination of drug content and pharmaceutical properties of indapamide tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 84 (2013) 285-292.
22. K. Yekpe, N. Abatzoglou, B. Bataille, R. Gosselin, T. Sharkawi, J-S. Simard, A. Cournoyer. Predicting the dissolution behavior of pharmaceutical tablets with NIR chemical imaging. *International Journal of Pharmaceutics*. 486 (2015) 242-251.
23. E. Deconinck, J. L. Bothy, B. Desmedt, P. Courselle, J. O. De Beer. Detection of whitening agents in illegal cosmetics using attenuated total reflectance-infrared spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 98 (2014) 178-185.
24. J. Skvaril, K. Kyprianidis, A. Avelin, M. Odlare, E. Dahlquist. Utilization of Near Infrared (NIR) Spectrometry for Detection of Glass in the Waste-based Fuel. *Energy Procedia*. 75 (2015) 734-41.
25. S. J. Mazivila, F. B. Santana, H. Mitsutake, L. C. Gontijo, D. Q. Santos, W. Borges Neto. Discrimination of the type of biodiesel/diesel blend (B5) using mid-infrared spectroscopy and PLS-DA. *Fuel*. 142 (2015) 222-226.
26. C. Tan, X. Qin, M. Li. Comparison of chemometric methods for brand classification of cigarettes by near-infrared spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*. 51 (2009) 276-282.
27. B. J. Wylie, M. Hauptman, A. D. Woolf, R. H. Goldman. Insect Repellants During Pregnancy in the era of the *zika* virus. *Obstetrics & Gynecology*. 128 (2016) 1111 – 1115.
28. M. Semmler, F. Abdel-Ghaffar, J. Schmidt, H. Mehlhom. Evaluation of biological and chemical insect repellents and their potential adverse effects. *Parasitol Res*. 113 (2014) 185 – 188.

29. K. A. Backen, R. M. A. Sjerps, M. Schriks, A. P. van Wezel. Toxicological risk assessment and prioritization of drinking water relevant contaminants of emerging concern. *Environment International*. 118 (2018) 293–303.
30. J. Scott, T. Hossain, C. Vidson, M. Smith, R. Xue. Laboratory evaluation of citronella, picaridin, and deet repellents against *psorophora ciliata* and *psorophora howardii*. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 30(2) (2014) 136 – 137.
31. PROTESTE. Repelentes: confirma o teste com 10 marcas e saiba qual o melhor. Disponível em: <<http://www.proteste.org.br/>>. Acessado em: Março 2018.
32. Ministério da Saúde. Saúde amplia público-alvo para utilização de repelentes. Disponível em: < <http://portalms.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/42607-saude-amplia-publico-alvo-para-utilizacao-de-repelentes/>>. Acessado em: Março de 2018.
33. D. Wiles, J. Yee, U. Castillo, J. Russel, H. Spiller, M. Casavant. A Lethal Case of DEET Toxicity Due to Intentional Ingestion. *J. Anal. Toxicol.* 38 (2014) 696 – 698.
34. S. Merel, S. A. Snyder. Critical assessment of the ubiquitous occurrence and fate of the insect repellent N,N-diethyl-m-toluamide in water. *Environment International*. 96 (2016) 98 – 117.
35. USEPA. Book Reregistration Eligibility Decision (RED):DEET, EPA738-R-98-010. City: United States Environmental Protection Agency; 1998. Reregistration Eligibility Decision (RED):DEET, EPA738-R-98-010.
36. T. M. Katz, J. H. Miller, A. A. Hebert. Insect repellents: historical perspectives and new developments. *J. Am. Acad. Dermatol.* 58 (2008) 865–871.
37. F. B. Antwi, L. M. Shama, R. K. Peterson. Risk assessments for the insect repellents DEET and picaridin. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 51 (2008) 31–36.
38. D. N. Roy, D. Goswami, A. Pal. The insect repellents: A silent environmental chemical toxicant to the health. 50 (2017) 91 - 102.
39. D. B. Barr, C. V. Ananth, X. Yan, S. Lashley, J. C. Smulian, T. A. Ledoux, P. Hore, M. G. Robson. Pesticide concentrations in maternal and umbilical cord sera and their relation to birth outcomes in a population of pregnant women and newborns in New Jersey. *Science of The Total Environment*. 408 (2010) 790 – 795.

40. E. L. Weickerham, B. Lozoff, N. Kaciroti, Y. Xia, J. D. Meeker. Reduced birth weight in relation to pesticide mixtures detected in cord blood of full-term infants. *Environment International*. 47 (2012) 80 – 85.
41. E. H. Roland, J. Jan, J. Rigg. Toxic encephalopathy in a child after brief exposure to insect repellents. *Can Med Assoc J*. 132 (1985) 155 – 156.
42. S. D. Constanzo, A. J. Watkinson, E. J. Murby, D. W. Kolpin, M. W. Sandstrom. Is there a risk associated with the insect repellent DEET (N,N-diethyl-m-toluamide) commonly found in aquatic environments? *Science of the Total Environment*. 384 (2007) 214 – 220.
43. R. Ma, B. Wang, S. Lu, Y. Zhang, L. Yin, J. Huang, S. Deng, Y. Ang, G. Yu. Characterization of pharmaceutically active compounds in Dongting Lake, China: Occurrence, chiral profiling and environmental risk. *Science of The Total Environment*. 557-558 (2016) 268 – 275.
44. A. Standler, A. Schatzl, C. W. Kjumpfl, W. Buch Berger. Determination of the Insect Repellent Bayrepel in Pool and Lake Water by Gas Chromatography after Preconcentration with Solid-Phase Extraction and Stir-Bar-Sorptive Extraction. *Microchim. Acta*. 148 (2004) 151 – 156.
45. T. J. Naucke, R. Kropke, G. Benner, J. Schulz, K. P. Wittern, A. Rose. Field evaluation of the efficacy of proprietary repellent formulations with IR3535 and picaridin against *Aedes aegypti*. *Parasitol Res*. 77 (2007) 101 - 169.
46. World Health Organization. Ethyl butylacetylaminopropionate also know as IR3535. Disponível em:  
<[http://www.who.int/whopes/quality/en/IR3535\\_eval\\_april\\_2006.pdf](http://www.who.int/whopes/quality/en/IR3535_eval_april_2006.pdf)>  
Acessado em: Outubro de 2016.
47. C. H. Collins, G. L. Braga, P. S. Bonato, Fundamentos de Cromatografia. (2006) Campinas: Editora da UNICAMP.
48. E. S. Sousa. Desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para determinação de resíduos de agrotóxicos em hortaliças empregando cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos. 2016. 101f. Dissertação (Mestrado de Química) – Universidade Federal da Paraíba – UFPB, João Pessoa, 2016.
49. F. M. Lanças. Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE. (2009) Campinas, SP: Editora Átomo.

50. B. Barros Neto, M. F. Pimentel, M. C. U. Araújo. Recomendações para calibração em química analítica – parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). *Quim. Nova.* 25 (2002) 856 – 865.
51. M. F. Pimentel, B. Barros Neto. Calibração: Uma revisão para Químicos Analíticos. *Química Nova.* 19 (1996) 268 – 277.
52. B. Barros Neto, I. S. Scarminio, R. E. Bruns. Como fazer experimentos, 3<sup>a</sup> Ed. Campinas. Editora Unicamp, 2007.
53. EURACHEM/CITAC Guide CG4, Quantifying Uncertainty in Analytical measurement. (2012) 3<sup>o</sup> Edição.
54. M. Ribani, C. B. G. Bottoli, C. H. Collins. Jardim, I.C. S. F. Melo, L.F.C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. *Quim. Nova.* 27 (2004) 771-780.
55. P. Valderrama, J. W. B. Braga, R. J. Poppi,. Estado da Arte de Figuras de Mérito em Calibração Multivariada. *Quim. Nova.* 32 (2009) 1278-1287.
56. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução RE n°899, de 29/05/2003.
57. INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, DQO-CGRE-008, 2007.
58. A. Krueve, R. Rebane, K. Kipper, M. L. Odelkop, H. Evard, K. Herodes, P. Ravio, I. Leito, Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: Part I. *Anal. Chim. Acta.* 44 (2015) 870, 29.
59. W. T. S. Vilar, E. S. Sousa, L. Neto, M. C. U. Araújo, M. J. C. Pontes. Development and validation of a HPLC method to quantify DEET and IR 3535 in insect repellents. (2018), DOI: 10.1039/C8AY00486B.
60. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília. Mapa/ACS, 2011.72 p.
61. D. Moreno-Gonzalez, A. M. Garcia-Campana, Salting-out assisted liquid-liquid extraction coupled to ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of tetracycline residues in infant foods, *Food Chem*, 221 (2017) 1763 – 1769.

62. P. Valderrama. Avaliação de figuras de mérito em calibração multivariada na determinação de parâmetros de controle de qualidade em indústria alcooleira por Espectroscopia no infravermelho próximo. 135f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas- SP, 2005.
63. D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman. Princípios de análise instrumental. (2002) 5. ed. São Paulo: Bookman.
64. D. A. Burns, E. W. Ciurczak. Handbook of Near-Infrared Analysis. (2001) New York: Marcel Dekker.
65. K. M. G. Lima, I. M. Raimundo Jr, A. M. S. S. Silva, M. F. Pimentel. Sensores ópticos com detecção no infravermelho próximo e médio. Química Nova. 32 (2009) 1635 – 1643.
66. O. Sala. I<sub>2</sub> uma molécula didática. Química Nova. 31 (2008) 914 – 920.
67. C. Pasquini. Near infrared spectroscopy: Fundamentals, pratics, aspects and analytical applications. 14 (2003) 198 – 219.
68. A. C. Silva. Desenvolvimento de metodologias analíticas para identificação de não conformidade em amostras de álcool combustíveis. 2013. 98f. Dissertação (Mestrado de Química) – Universidade Federal da Paraíba – UFPB, João Pessoa, 2016.
69. J. Coates. A review of current new technology: Used in instrumentation for industrial vibrational spectroscopy, Spectroscopy. 14 (1999) 21-34.
70. M. J. C. Pontes. Algoritmo das Projeções Sucessivas para seleção de variáveis espectrais em problemas de classificação. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, 2009, Tese de doutorado, 123p.
71. C. Pasquini. Near infrared spectroscopy: A mature analytical technique with new perspectives e A review. Analytica Chimica Acta. 1026 (2018) 8-36.
72. S. Shafiee, S. Minaei. Combined data mining/NIR spectroscopy for purity assessment of lime juice. Infrared Physics & Technology. 91 (2018) 193 – 199.
73. K. Thirunavukkarasu, P. Rajkumar , S. Selvaraj, R. Suganya, M. Kesavan, S. Gunasekaran, S. Kumaresan. Vibrational (FT-IR and FT-Raman), electronic (UVeVis), NMR (1H and 13C) spectra and molecular docking analyses of anticancer molecule 4- hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde. Journal Molecular Structure. 1173 (2018) 307 – 320.

74. R. Bhuvanewari, M. Divya Bharathi, G. Anbalagan, G. Chakkaravarthi, K. Sakthi Murugesan. Molecular structure, vibrational spectroscopic (FT-IR, FT-Raman), NBO, HOMO and LUMO analysis of morpholinium oxalate by density functional method. *Journal Molecular Structure*. 1173 (2018) 188 – 195.
75. A. Landréa, N.P.A. Sabya, B.G. Barthèsb, C. Ratiéa, A. Guerinc, A. Etayoc, B. Minasnyd, M. Bardya, J.-D. Meunier, S. Cornue. Prediction of total silicon concentrations in French soils using pedotransfer functions from mid-infrared spectrum and pedological attributes. 331 (2018) 70 – 80.
76. J. F. Holler, D. A. Skoog, S. R. Crouch. *Princípios de Análise instrumental*. 6a Edição ed. Bookman, 2009.
77. V. Visani. Teor de óleo de alho em cápsulas gelatinosas por espectroscopia no infravermelho médio e técnicas quimiométricas. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB. 2017. Tese de Doutorado, 142f.
78. L. de F. B. Lira. Desenvolvimento de Métodos Analíticos para Monitoramento da Qualidade do Biodiesel e suas Misturas. Recife, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPE. 2010. Tese de doutorado, 124p.
79. A. R.. Caneca, M. F. Pimentel, R. K. H. Galvão, C. E. Matta, F. R. Carvalho, I. M. Raimundo Jr., C. Pasquini, J. J. R. Rohwedder. Assessment of infrared spectroscopy and multivariate techniques for monitoring the service condition of diesel-engine lubricating oils, *Talanta*, 70 (2006) 344 - 352.
80. F. V. C. Vasconcelos. Uso da região espectral de sobretons para determinação do teor de biodiesel e classificação de misturas diesel/biodiesel adulteradas com óleo vegetal. 2011. 93 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.
81. K. R. Beebe, R. J. Pell, M. B. Seasholtz. *Chemometrics A Practical Guide*. New York: John Wiley & Sons, 1998.
82. F. A. Honorato. Previsão de propriedades das gasolinas do Nordeste empregando espectroscopia NIR/MIR e transferência de calibração. 2006. 106 f. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.
83. A. Savitzky, M. J. E. Golay, Smoothing and differentiation of data by simplified least-squares procedures. *Analytical Chemistry*. 8 (1964) 1627 – 1639.
84. Z. Basati, B. Jamshidi, M. Rasekh, Y. Abbaspour-Gilandeh. Detection of sunn pest-damaged wheat samples using visible/near-infrared spectroscopy based on

- pattern recognition. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 203 (2018) 308 – 314.
85. A. G. González. Use and misuse of supervised pattern recognition methods for interpreting compositional data. *Journal of Chromatography A*. 1158 (2007) 215 - 225.
86. P. R. M. Correia, M. M. C. Ferreira, Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos, *Química Nova*, 30 (2007) 481 – 487.
87. M. M. C. Ferreira, A. M. Antunes, M. S. Melgo, P. L. O. Volpe. *Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial*. *Química Nova*. 22 (1999) 724 - 731.
88. J. M. Moita Neto, G. C. Moita, Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. *Química Nova*. 21 (1998) 467 - 469.
89. L. Lenhardt, R. Bro, I. Zeković, T. Dramićanin, M. D. Dramićanin, Fluorescence spectroscopy coupled with PARAFAC and PLS DA for characterization and classification of honey, *Food Chemistry*. 175 (2015) 284 - 291.
90. B. G. Botelho, N. Reis, L. S. Oliveira, M. M. Sena. Development and analytical validation of a screening method for simultaneous detection of five adulterants in raw milk using mid-infrared spectroscopy and PLS-DA, *Food Chemistry*. 181 (2015) 31 – 37.
91. P. H. G. D. Diniz, M. F. Pistonesi, M. B. Alvarez, B. S. F. Band, M. C. U. Araújo. Simplified tea classification based on a reduced chemical composition profile via successive projections algorithm linear discriminant analysis (SPA-LDA). *Journal of Food Composition and Analysis*. 39 (2015) 103 – 110.
92. M. R. Almeida, C. H. V. Fidelis, L. E. S. Barata, R. J. Poppi, Classification of Amazonian rosewood essential oil by Raman spectroscopy and PLS-DA with reliability estimation. *Talanta*. 117 (2013) 305 - 311.
93. U. T. C. P. Souto, M. F. Barbosa, H. V. Dantas, A. S. Pontes, W. S. Lyra, P. H. G. D. Diniz, M. C. U. Araújo, E. C. Silva. Identification of adulteration in ground roasted coffees using UV-Vis spectroscopy and SPA-LDA, *LWT - Food Science and Technology*. 63 (2015) 1037 – 1041.
94. W. T. S. Vilar, R. M. Aranha, E. P. Medeiros, M. J. C. Pontes. Classification of Individual Castor Seeds Using Digital Imaging and Multivariate Analysis, *Journal of Brazilian Chemical Society*. 26 (2015) 102 – 109.

95. A. S. Marques, E. P. Moraes, M. A. A. Júnior, A. D. Moura, V. F. A. Neto, R. M. Neto, K. M. G. Lima. Rapid discrimination of klebsiella pneumoniae carbapenemase 2 – producing and non-producing *klebsiella pneumoniae* strains using near-infrared spectroscopy (NIRS) and multivariate analysis. *Talanta*. 134 (2015) 126 – 131.
96. K. Y. Peerbhay, O. Mutanga, R. Ismail. Commercial tree species discrimination using airborne AISA Eagle hyperspectral imagery and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) in KwaZulu-Natal, South Africa, *ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing*.. 79 (2013) 19 – 28.
97. M. J. C. Pontes, C. F. Pereira M. F. , Pimentel, F. V. C. Vasconcelos, A. G. B. Silva. Screening analysis to detect adulteration in diesel/biodiesel blends using near infrared spectrometry and multivariate classification. *Talanta*. 85 (2011). 2159 – 2165.
98. R. A. Fisher. The use of multiple measurements in taxonomic problems, *Annals of Eugenics*. 7 (1936) 179–188.
99. D. Ballabio, V. Consonni. Classification tools in chemistry. Part 1: linear models PLS-DA. *Analytical Methods*. 5 (2013) 3790 – 3798.
100. R. E. Bruns, J. F. G. Faigle. *Quimiometria*. *Química Nova*. 8 (1985) 84 - 99.
101. F. F. Gambarra-Neto. Classificação de óleos vegetais utilizando voltametria de onda quadrada e métodos quimiométricos. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, 2008. Dissertação de Mestrado, 98p.
102. M. I. S. Gonçalves, W. T. S. Vilar, E. P. Medeiros, M. J. C. Pontes. A novel strategy for the classification of naturally colored cotton fibers based on digital imaging and pattern recognition techniques. 7 (2015) 5869 – 5875.
103. M. J. C. Pontes, R. K. H. Galvão, M. C. U. Araújo, P. N. T. Moreira, O. D. P. Neto, G. E. José, T. C. B. Saldanha. The successive projections algorithm for spectral variable selection in classification problems, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 78 (2005) 11 – 18.
104. A. C. Silva, J. E. M. Paz, L. F. B. L. Pontes, S. G. Lemos, M. J. C. Pontes. An electroanalytical method to detect adulteration of ethanol fuel by using multivariate analysis. *Electrochimica Acta*. 11 (2013) 160 – 164.
105. T. Naes, T. Isaksson, T. Fearn, T. A. Davies. *User-Friendly Guide To Multivariate Calibration And Classification*. Chichester: Nir Publications, 2002.

106. H. C. Goicochea, A. C. Olivieri. Chemometric assisted simultaneous spectrophotometric determination of four-component nasal solutions with a reduced number of calibration samples. *Anal. Chim. Acta.* 453 (2002) 289 -300.
107. J. W. B. Braga. Aplicação e validação de modelos de calibração de segunda ordem em química analítica. Campinas-SP, Tese de doutorado. UNICAMP, 2008.
108. S. da S. Simões. Desenvolvimento de métodos validados para a determinação de captopril usando espectrometria NIR e calibração multivariada. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB. 2008. Tese de doutorado, 83p
109. R. G. Brereton, G. R. Lloyd. Partial least squares discriminant analysis: taking the magic away. *J Chemometrics* 28 (2014) 213-225.
110. M. C. U. Araújo, T. C. B. Saldanha, R. K. H. Galvão, T. Yoneyama, H. C. Chame, V. Visani. The Successive Projections Algorithm For Variable Selection In Spectroscopic Multicomponent Analysis. *Chemometrics And Intelligent Laboratory Systems.* 57 (2001) 65 - 73.
111. R. K. H. Galvão, M. C. U. Araújo, E. C. Silva, G. E. José, S. F. C. Soares, H. M. Paiva. Cross-validation for the selection of spectral variables using the successive projections algorithm. *Journal Of Brazilian Chemical Society.* 18 (2007) 1580 – 1584.
112. D. D. S. Fernandes, V. E. Almeida, M. M. Fontes, M. C. U. Araújo, G. Vêras, P. H. G. D. Diniz. Simultaneous identification of the wood types in aged cachaças and their adulterations with wood extracts using digital images and SPA-LDA. *Food Chemistry.* (2018) [doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.035](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.035)
113. T. C. B. Moraes, D. R. Rodrigues, U. T. C. P. Souto, S. G. Lemos. A simple voltammetric electronic tongue for the analysis of coffee adulterations. *Food Chemistry.* (2018). [doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.136](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.136)
114. Y. Li, T. Fang, S. Zhu, F. Huang, Z. Chen, Y. Wang. Detection of olive oil adulteration with waste cooking oil via Raman spectroscopy combined with *i*PLS and SiPLS. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* 189 (2018) 37 – 43.
115. L. Norgaard, A. Saudland, J. Wagner, J. P. Nielsen, L. Munck, S. B. Engelsen. Interval Partial Least-Squares Regression (*i*PLS): A Comparative Chemometric Study with an Example from Near Infrared Spectroscopy. *Applied Spectroscopy.* 54 (2000) 413 - .419.

- 116.S. F. C. Soares, R. K. H. Galvão, M. J. C. Pontes, M. C. U. Araújo. A New Validation Criterion for Guiding the Selection of Variables by the Successive Projections Algorithm in Classification Problems. *Journal Brazilian Chemistry Society*. 25 (2014) 176 - 181.
- 117.M. Forina, S. Lanteri, M. Casale. Multivariate calibration. *Journal of Chromatography A*. 1158 (2007) 61 - 93.
- 118.S. Bandyopadhyay, C. A. Murthy, S. K. Pal. Pattern classification with genetic algoritms. *Pattern Recognition Letters*. 16 (1995) 801 – 808.
- 119.P. A. C Filho, R. J. Poppi. Algrítmo Genético em química. *Química Nova*. 22 (1999) 405 – 411.
- 120.S. F. C. Soares. Um novo método para transferência de modelos de calibração NIR e uma nova estratégia para classificação de sementes de algodão usando imagens hiperespectral NIR. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em química, UFPB, 2016. Tese de Doutorado. 121 p.
- 121.A. Borin, R. J. Poppi. Application of mid spectroscopy and iPLS for the quantification of contaminants in lubricating oil. *Vibrational Spectroscopy*. 37 (2005) 27 – 32.
- 122.R. W. Kennard, L. A. Stone. Computer-aided design of experiments, *Technometrics*.11 (1969) 137 – 148.
- 123.R. K. H. Galvão, M. C. U. Araujo, G. E. Jose, M. J. C. Pontes, E. C. Silva, T. C. B. Saldanha. A method for calibration and validation subset partitioning. *Talanta*. 67 (2005) 736 - 740.
- 124.F. A. Honorato, B. B. Neto, M. N. Martins, R. K. H. Galvão, M. F. Pimentel, Transferência de Calibração em Métodos Multivariados, *Quimica Nova*. 30 (2007) 1301 - 1312.
- 125.R. N. Feudale, N. A. Woody, H. U. Tan, A. J. Myles, S. D. Brown, J. Berré. Transfer of multivariate calibration models: a review *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 64 (2002) 181 – 192.
- 126.T. Fearn. Standardisation and calibration transfer for near infrared instruments: a review. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. 9 (2001) 229 - 244.
- 127.F. Despagne, D. L. Massart, M. Jansen, H. Daalen, Intersite transfer of industrial calibration models. *Analytica Chimica Acta*. 406 (2000) 233 – 245.

128. E. D. T. Moreira, M. J. C. Pontes, R. K. H. Galvão, M. C. U. Araújo. Near infrared reflectance spectrometry classification of cigarettes using the successive projections algorithm for variable selection. *Talanta*. 79 (2009) 1260 – 1264.
129. S.D. Brown. Transfer of Multivariate Calibration Models. *Comprehensive Chemometrics*. Oxford: Elsevier (2009) 345 – 378.
130. Y. Wang, D. J. Veltkamp, B. R. Kowalski. Multivariate Instrument Standardization. *Analytical Chemistry*. 63 (1991) 2750 – 2756.
131. K. D. T. M. Milanez. Seleção de variáveis robustas para transferência de modelos de classificação empregando o Algoritmo das Projeções Sucessivas. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em química, UFPB, 2017. Tese de Doutorado. 132 p.
132. M. C. J, Bergo. Transferência de calibração na discriminação de mogno e espécies semelhantes utilizando NIRS e PLS-DA. 2014. 133 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade de Brasília, Brasília, 2014.
133. C. S. Gondim, R. G. Junqueira, S. V. C. Souza. Tendências em validação de métodos de ensaios qualitativos. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. 70 (2011) 433 – 447.
134. H. A. Dantas Filho, R. K. H. Galvão, M. C. U. Araújo, E. C. Silva, T. C. B. Saldanha, G. E. José, C. Pasquini, I. Raimundo Jr., J. J. R. Rohwedder. A strategy for selecting calibration samples for multivariate modeling. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 72 (2004) 83 – 91.
135. E. Bouveresse, D. L. Massart. Standardisation of near-infrared spectrometric instruments: A review. *Vibrational Spectroscopy*. 11 (1996) 3 – 15.
136. A. L. B. Brito. Desenvolvimento de métodos analíticos para monitoramento da qualidade de farinhas funcionais e cafés. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em química, UFPB, 2018. Tese de Doutorado. 155 p.
137. A. D. McEachran, M. L. Hedgespeth, S. R. Newton, R. McMahan, M. Strynar, D. Shea, E. G. Nichols. Comparison of emerging contaminants in receiving waters downstream of a conventional wastewater treatment plant and a forest-water reuse system. *Environmental Science and Pollution Research*, 13 (2018) 12451 – 12463.
138. P. Kuklenyik, S. E. Baker, A. M. Bishop, P. Morales-A, A. M. Calafat, On-line solid phase extraction-high performance liquid chromatography–isotope dilution–tandem mass spectrometry approach to quantify N,N-diethyl-m-

- toluamide and oxidative metabolites in urine. *Analytica Chimica Acta*. 787 (2013) 267 – 273.
139. P. K. Behniwal, J. She. Development of HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of metabolites of organophosphate pesticides, synthetic pyrethroids, herbicides and DEET in human urine. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 97 (2016) 546 – 562.
140. T. Wang, S. Kasichayanula, X. Gu. In vitro permeation of the repellent DEET and the sunscreen oxybenzone across human skin. 310 (2006) 110 – 117.
141. Z. Yu, Y. Sun, G. Z. C. Zhang, Degradation of DEET in aqueous solution by water falling film dielectric barrier discharge : Effect of three operating modes and analysis of the mechanism and degradation pathway, *Chemical Engineering Journal*. 317 (2017) 90 – 102.
142. K. S. Tay, N. A. Rahman, M. R. Bin Abas, Chemical oxidation of N,N-diethyl-mtoluamide by sulfate radical-based oxidation: kinetics and mechanism of degradation. 10 (2013) 103 – 112.
143. S. C. Marselos, H. A. Archontaki, Development and validation of a reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the determination of ethyl-3-(N-n-butyl-N-acetyl)aminopropionate in an insect repellent semi-solid formulation. 946 (2002) 295 – 299.
144. A. Krueve, R. Rebane, K. Kipper, M. L. Odelkop, H. Evard, K. Herodes, P. Ravio, I. Leito. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part II, *Anal. Chim. Acta*. 870 (2015) 8 – 28.
145. T. Angelo, F. Q. Pires, G. M. Gelfuso, J. K.R. da Silva, T. Gratieri, M. S.S. Cunha- Filho. Development and validation of a selective HPLC-UV method for thymol determination in skin permeation experiments. *J. Chrom. B*. 1022 (2016) 81 – 86.
146. P. Kuklenik, S. E. Baker, A. M. Bishop, P. Morales-A, A. M. Calafat. On-line solid phase extraction-high performance liquid chromatography–isotope dilution–tandem mass spectrometry approach to quantify N,N-diethyl-m-toluamide and oxidative metabolites in urine. *Analytica Chimica Acta*. 787 (2013) 267 – 273.
147. M. C. Miranda. Desenvolvimento de lipossoma com produto repelente de insetos e metodologia analítica. 2005. 147f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, 2005.

- 148.M. C. Pietrogrande, G. Basaglia. GC-MS analytical methods for the determination of personal-care products in water matrices. *Trends in Analytical Chemistry*. 26 (2007) 1086 – 1094.
- 149.T. H. Broschard, A. M. Bohlmann, S. Konietzny, U. M. D. Schauer, W. Dekant. Biotransformation and toxicokinetics of the insect repellent IR3535® in male and female human subjects after dermal exposure. *Toxicol. Lett.* 218 (2013) 246 – 252.
- 150.L. Yiin, J. Tian, C. Hung. Assesment of dermal absorption of DEET containing insect repellent and oxybenzone-containing sunscreen using human urinary metabolites. *Environmente Sci. Pollut. Res*, 22 (2015) 7062 – 7070.
- 151.M. I. Azilawati, D. M. Rashim, B. Jamilah, I. Amin, Validation of a reverse-phase high-performance liquid chromatography method for the determination of amino acids in gelatins by application of 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidylcarbamate reagent, *J. Chrom. A*. 1353 (2016) 49 – 56.
- 152.A. Krueve, A. Künnapas, K. Herodes, I. Leito, Matrix effects in pesticide multiresidue analysis by liquid chromatography–mass spectrometry, *J. Chrom. A*.1187 (2008) 58 – 66.
- 153.M. I. Azilawati, D. M. Rashim, B. Jamilah, I. Amin, Validation of a reverse-phase high-performance liquid chromatography method for the determination of amino acids in gelatins by application of 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidylcarbamate reagent. *J. Chrom. A*. 1353 (2016) 49 – 56.
- 154.B. Swarbrick, Advances in instrumental technology, industry guidance and data management systems enabling the widespread use of near infrared spectroscopy in the pharmaceutical/biopharmaceutical sector, *J. Near Infrared Spectrosc.* 22 (2014) 157 – 168.
- 155.F. A. Honorato, R. K. H. Galvão, M. F. Pimentel. Robust modeling for multivariate calibration transfer by the successive projections algorithm *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 76 (2005) 65 - 72.
- 156.O. E. Noord. Multivariate calibration standardization. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 25 (1994) 85 – 97.
- 157.E. Deconinck. J. L. Bothy, B. Desmedt, P. Courselle, J. O. De Beer. Detection of whitening agents in illegal cosmetics using attenuated total reflectance-infrared

- spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 98 (2014) 178 – 185.
- 158.F. B. Santana, L. C. Gontijo, H. Mitsutake, S. J. Mazivila, L. M. Souza, W. Borges Neto. Non-destructive fraud detection in rosehip oil by MIR spectroscopy and chemometrics. *Food Chemistry*. 209 (2016) 228 – 233.
- 159.S. Lafhal, P. Vanloot, I. Bombarda, R. Valls, J. Kister, N. Dupuy. Raman spectroscopy for identification and quantification analysis of essential oil varieties: a multivariate approach applied to lavender and lavandin essential oils. *Journal of Raman Spectroscopy*. 46 (2015) 577 – 585.
- 160.A. Guillemain, K. Degardin, Y. Roggo. Performance of NIR handheld spectrometers for the detection of counterfeit tablets. *Talanta*. 165 (2017) 632 – 640.
- 161.F. A. Sanches, R. B. Abreu, M. J. C. Pontes, F. C. Leite, D. J. Costa, R. K. Galvão, M. C. U. Araújo. Near-infrared spectrometric determination of dipyrone in closed ampoules. *Talanta*. 15 (2012) 84 – 86.
- 162.V. H. Silva, J. L. Gonçalves, F. V. Vasconcelos, M. F. Pimentel, C. F. Pereira. Quantitative analysis of mebendazole polymorphs in pharmaceutical raw materials using near-infrared spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 115 (2015) 587 – 593.
- 163.S. Y. Tankeu, I. Vermaak, . G. P. P. Kamatou, A. M. Viljoen. Vibrational spectroscopy and chemometric modeling: An economical and robust quality control method for lavender oil. *Industrial Crops and Products*. 59 (2014) 234 – 240.
- 164.M. Cascant, J. Kuligowski, S. Garrigues, M. Guardia. Determination of sugars in depilatory formulations: A green analytical method employing infrared detection and partial least squares regression. *Talanta*. 85 (2011) 1721 – 1729.
- 165.E. L. Bergman, H. Brage, M. Josefson, O. Svensson, A. Spar'én. Transfer of NIR calibrations for pharmaceutical formulations between different instruments. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41 (2006) 89–98.
- 166.L. S. Pereira, M. F. Carneiro, B. G. Botelho, M. M. Sena. Calibration transfer from powder mixtures to intact tablets: A new use in pharmaceutical analysis for a known tool. *Talanta*. 147 (2016) 351 – 357.

167. M. Boiret, L. Meunier, Y. Ginot. Tablet potency of Tianeptine in coated tablets by near infrared spectroscopy: Model optimisation, calibration transfer and confidence intervals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 54 (2011) 510 – 516.
168. N. F. Péres, J. Ferré, R. Boqué. Calculation of the reliability of classification in discriminant partial least-squares binary classification. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 95 (2009) 122 – 128.
169. F. V. C. Vasconcelos, P. F. B. Souza Jr., M. F. Pimentel, M. J. C. Pontes, C. F. Pereira, Using near-infrared overtone regions to determine biodiesel content and adulteration of diesel/biodiesel blends with vegetable oils. *Anal. Chim. Acta* 716 (2012) 101 – 107.
170. M. J. C. Pontes, A. M. J. Rocha, M. F. Pimentel, C. F. Pereira, Determining the Quality of Insulating Oils Using Near Infrared Spectroscopy and Wavelength Selection. *Microchem. J.* 98 (2011) 254 – 259.
171. Z. Xiabo, Z. Jiewen, M. J. W. Povey, M. Holmes, M. Hanpin. Variables selection methods in near-infrared spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*. 667 (2010) 14 – 32.
172. J. J. Workman Jr. Interpretative spectroscopy for Near Infrared. *Applied Spectroscopy Reviews*. 31 (2006) 251 – 320.
173. D. L. Pavia, G. M. Lampman, G. S. Kriz, J. R. Vyvyan. *Introdução a espectroscopia* (2013) São Paulo: Cengage Learning.

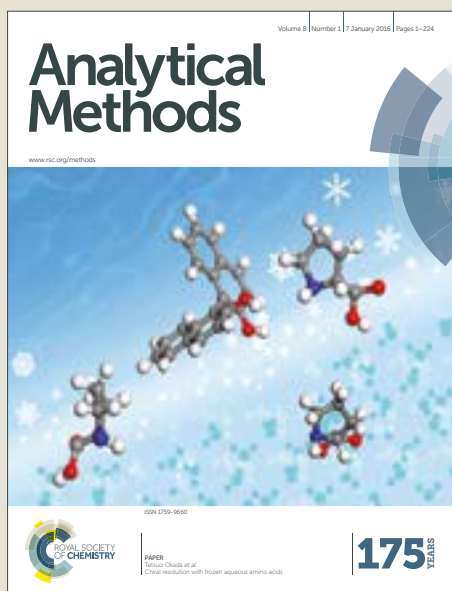
# APÊNDICE

# Analytical Methods

Accepted Manuscript



This article can be cited before page numbers have been issued, to do this please use: W. T. S. Vilar, E. S. Sousa, L. Pinto, M. C. de Araujo Ugulino and M. J. C. . Pontes , *Anal. Methods*, 2018, DOI: 10.1039/C8AY00486B.



This is an Accepted Manuscript, which has been through the Royal Society of Chemistry peer review process and has been accepted for publication.

Accepted Manuscripts are published online shortly after acceptance, before technical editing, formatting and proof reading. Using this free service, authors can make their results available to the community, in citable form, before we publish the edited article. We will replace this Accepted Manuscript with the edited and formatted Advance Article as soon as it is available.

You can find more information about Accepted Manuscripts in the [author guidelines](#).

Please note that technical editing may introduce minor changes to the text and/or graphics, which may alter content. The journal's standard [Terms & Conditions](#) and the ethical guidelines, outlined in our [author and reviewer resource centre](#), still apply. In no event shall the Royal Society of Chemistry be held responsible for any errors or omissions in this Accepted Manuscript or any consequences arising from the use of any information it contains.

1  
2  
3 **Development and validation of a HPLC method to quantify DEET and**  
4  
5 **IR 3535 in insect repellents**  
6  
7  
8  
9  
10

11  
12  
13  
14 **Welma T. S. Vilar<sup>a</sup>, Emanuella S. Sousa<sup>a</sup>, Licarion Pinto<sup>a</sup>, Mário César Ugulino de**  
15  
16 **Araújo<sup>a</sup>, Márcio José Coelho Pontes<sup>a,\*</sup>**  
17  
18

19  
20  
21 *<sup>a</sup>Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB,*  
22  
23 *Brazil.*  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44

45  
46  
47 \* Corresponding Author

48  
49 E-mail: [marciocoelho@quimica.ufpb.br](mailto:marciocoelho@quimica.ufpb.br) (Márcio José Coelho Pontes)

50  
51 Phone/Fax: + 55 83 3216 7438. Universidade Federal da Paraíba, Departamento de  
52  
53 Química – Laboratório de Automação e Instrumentação em Química  
54  
55 Analítica/Quimiometria (LAQA), CEP 580051-970 – João Pessoa, PB, Brazil.  
56  
57  
58  
59  
60

## Abstract

The increasing cases of dengue, chikungunya, yellow fever and zika virus have caused many people to use repellents to try to protect themselves from the *Aedes Aegypt* mosquito that transmits these diseases. There are a variety of products that have different ingredients, concentration, times of action and prices. However, not all repellent can be used by children, pregnant women and in some cases, medical guidance is required. Repellents are classified as cosmetics and the two most commonly used contains N, N-diethyl-3-methylbenzamide (DEET) and ethyl-3-(N-n-butyl-N-acetyl) aminopropionate (IR3535) as active ingredients. This is a report on the development of a rapid and reliable HPLC-DAD method, validated for the quantification of DEET and IR 3535 in insect repellent. The following chromatographic parameters were used: a mobile phase of water/acetonitrile at a 80:20 (v/v) ratio, flow-rate 0.3 mL min<sup>-1</sup>, and a detection wavelength of 210 nm. Before analysis, samples were diluted 20.000 and 10.000 times in water/acetonitrile (90:10, v/v) for DEET and IR 3535, respectively. The method was validated and presented satisfactory linearity (0.25 – 22 mg L<sup>-1</sup>, r<sup>2</sup> = 0.9986 and 0.5 – 40 mg L<sup>-1</sup>, r<sup>2</sup> = 0.9976), Limit of Quantification (LOQ) (0.09 and 0.06 mg L<sup>-1</sup>), with the intra and inter days calculated using the Horwitz ratio of less than 2, recoveries (89.2 – 111.6 % and 94.7 – 109.2%) for DEET and IR 3535, respectively. It is important to highlight that there is no reference method that allow the quantification of both active ingredients, simultaneously, in the analyzed samples, which is proposed in this work.

**Keywords:** N,N-diethyl-3-methylbenzamide; ethyl-3-(N-n-butyl-N-acetyl) aminopropionate; insect repellents; HPLC-DAD.

## Introduction

The dengue, yellow fever, and the chikungunya epidemics, as well as increasing cases of microcephaly associated to the zika virus, have caused the Brazilian population, especially pregnant women, to resort to the use of repellents as a way to protect themselves from the *Aedes Aegypt* mosquito<sup>1</sup>. According to WHO (World Health Organization)<sup>2</sup> thirty-one countries have reported incidences of microcephaly and other deformities in the nervous system associated with the zika virus infection.

A great variety of active ingredients are available as repellents at the market. The concentration levels, action time and price makes the choice of repellent important to avoid health problems for consumers, problems such as intoxication and skin absorption<sup>3,4</sup>. According to the Brazilian health security agency, named The Brazilian Health Regulatory Agency (ANVISA)<sup>5</sup>, skin repellents are classified as cosmetic, and the two main active ingredients registered are N, N-diethyl-3-methylbenzamide (DEET) and the ethyl-3-(N-n-butyl-N-acetyl) aminopropionate (IR3535).

DEET is more commonly used worldwide as repellent and is a synthetic chemical derived from a pesticide<sup>8,9</sup>, in high concentrations can be absorbed through the body, causing allergic intoxication, for example mucous irritation<sup>10,11</sup>. It can be found in formulations in the range of 5 to 100% (w/w). According to ANVISA resolution RDC n 19/2013<sup>12</sup>, repellent with a DEET concentration higher than 10% (w/w) may not be used on children younger than two years old. IR 3535 is claimed to be safer than other insecticides since it is a natural product derived from the natural  $\beta$ -alanine amino acid<sup>13</sup>, found in plants and animals. It was developed by Merk, and registered as a biopesticide by the Environmental Protection Agency (EPA). Repellents which contain IR 3535, therefore, are indicated to be used on children only older than six months because in high concentrations it may be absorbed by the skin<sup>14</sup> causing allergy and intoxication.

1  
2  
3 The use of DEET and IR3535 with 99% (w/w) is allowed in several countries, but  
4  
5 Brazilian legislation does not allow concentrations higher than 30% (w/w) in  
6  
7 commercial repellent samples.

8  
9 The WHO<sup>15</sup> indicates the use of univariate analysis in the middle infrared  
10  
11 region for the quantification of DEET. This method, however, is susceptible to the  
12  
13 presence of interferents and uses toxic reagents, such as carbon disulfide.

14  
15 A number of studies have been reported in the literature on the use of HPLC  
16  
17 for analysis of DEET and IR3535 in different matrices: (a) water<sup>16</sup> as emerging  
18  
19 contaminants, (b) biological fluids<sup>17-18</sup> (blood and urine), (c) in vivos study<sup>19-20</sup> which  
20  
21 are evaluated toxicity and duration of action of these repellents on the skin and (d)  
22  
23 degradation kinetics<sup>21-22</sup> (in this case, only DEET). In particular in the case of the  
24  
25 repellent IR3535, only a single work<sup>23</sup> has been reported in the literature involving the  
26  
27 determination of its concentration and repellent samples. However, few samples were  
28  
29 used (only six) and these were in a semi-solid phase. In addition, only samples in a  
30  
31 concentration of 8% w/w were evaluated. However, none of these studies used a  
32  
33 validated method to quantify both DEET and IR 3535 with simultaneous calibration in  
34  
35 respect to insect repellents. Given the above, the efficient monitoring of these  
36  
37 repellents is important for quality control, since high concentrations may cause health  
38  
39 damage, and concentrations below that indicated on the label do not guarantee  
40  
41 efficiency.

42  
43 In the present paper, the use of a high-performance liquid chromatography  
44  
45 coupled with a diode array detector (HPLC-DAD) is proposed for the quantification of  
46  
47 both DEET and IR 3535 in insect repellents sold in Brazil. The proposed method was  
48  
49 validated following the EURACHEM<sup>24</sup> criteria of selectivity, linear range, accuracy,  
50  
51 limit of quantification (LOQ), intraday and inter day precision<sup>25-27</sup>. A specific  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 advantage of this work is that the sample preparation step consists of a simple dilution,  
4  
5 since the selectivity is guaranteed by the chromatographic separation.  
6  
7

## 8 9 **Materials and methods**

### 10 11 *Reagents and samples*

12  
13 Standards of N, N-diethyl-3-methylbenzamide (DEET) were purchased from  
14  
15 Sigma Aldrich and ethyl-3-(N-n-butyl-N-acetyl) aminopropionate (IR 3535) was  
16  
17 donated by Merk (Darmstadt, Germany). Acetonitrile of HPLC grade, purchased from J.  
18  
19 T. Baker, and Ultrapure water obtained from a Milli-Q water purification system  
20  
21 (Milipore) were used in all procedures.  
22

23  
24 The analyzed repellents consist of 83 and 19 samples from different  
25  
26 manufacturers (brands) and with different concentrations of DEET and IR 3535,  
27  
28 respectively. The difference of the sample amount of each active ingredient is because  
29  
30 there are more DEET based repellent available in Brazilian market.  
31

32  
33 The concentration levels in the DEET and IR3535 in samples ranged from 5% to  
34  
35 30%. A simple dilution with a solution of acetonitrile and water (10:90, v/v) was carried  
36  
37 out as the sample preparation step. To permit quantification with the univariate  
38  
39 calibration curve, the samples were diluted 20,000 and 10,000 times for repellent with  
40  
41 DEET and IR 3535, respectively.  
42

### 43 44 45 *Chromatographic runs*

46  
47  
48 Chromatographic studies were performed on an Ultimate 3000 Dionex  
49  
50 chromatograph instrument, consisting of a quaternary pump, a manual injector fitted  
51  
52 with a 20  $\mu$ L fixed loop, and a UV-visible diode array detector. The analytical column  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 was a Dionex Acclaim<sup>®</sup> 120 C18 column of 50 mm x 2.1 mm, 3 $\mu$ m particle sizes, and  
4  
5 300 Å of pore size.

6  
7 A gradient elution was performed with purified Milli-Q water (solvent A) and  
8  
9 acetonitrile (solvent B) as follows: 0 – 5 min: 20 - 80% B linear gradient and ramped to  
10  
11 20% B at 5 – 7 min. The temperature was fixed at 30°C, and flow rate of 0.3 mL min<sup>-1</sup>  
12  
13 was used. The data were collected using the software Chromeleon, Version 6.80 with a  
14  
15 spectra acquisition frequency of 10 Hz.  
16  
17

#### 18 19 20 *Calibration, validation, and quantification of DEET and IR 3535*

21  
22 Stock standard solution of DEET (194 mg L<sup>-1</sup>) and IR 3535 (200 mg L<sup>-1</sup>) were  
23  
24 prepared by taking an appropriate volume and topping it to the mark with acetonitrile in  
25  
26 a 100 mL volumetric flask.  
27

28  
29 The 20 and 40 mg L<sup>-1</sup> standard solutions (stock 2) were prepared by taking an  
30  
31 appropriated amount of aliquot and diluting it with acetonitrile. The standard solutions  
32  
33 were stored at -20°C until use. The calibration set was prepared by diluting an  
34  
35 appropriated aliquot of stocks 1 and 2 with a solution of acetonitrile and water (10:90,  
36  
37 v/v), and stored at 4 °C before use.  
38

39  
40 The calibration samples set consisted of eleven mixtures of both DEET and IR  
41  
42 3535, with concentration levels ranging from 0.25 to 22 mg L<sup>-1</sup> for DEET and from 0.5  
43  
44 to 40 mg L<sup>-1</sup> for IR 3535, prepared and eluted in triplicate.  
45

46  
47 The precision study was carried out according to the criteria of the  
48  
49 EURACHEM validation guide<sup>24</sup>. In this work, four concentration levels equally spaced  
50  
51 ranging from 2 to 8 and 8 to 32 were prepared containing DEET and IR 3535 and eluted  
52  
53 in the chromatographic system with the proposed method. Each mixture was measured  
54  
55 seven times over four weeks, making it possible to perform a *t*-test and Relative  
56  
57  
58  
59  
60

Standard Deviation (RSD) to evaluate the intraday (repeatability) and the inter day precision (intermediate precision).

The RSD adequate value ranges depend on the concentration level, so this value was normalized using the Horwitz ratio criteria, calculated using Equations 1 and 2<sup>26</sup>.

$$RSD_{Hor} = C^{-0.15} \quad (1)$$

$$Hor\ Ratio = \frac{RSD\ (found)}{RSD_{Hor}\ (calculated)} \quad (2)$$

where, C is the concentration level used to calculate the RSD value based on Horwitz trumpet function ( $RSD_{Hor}$ ) and RSD corresponds to the value obtained from the experimental measurements.

In order to perform the recovery test and identify the presence of a matrix proportional effect<sup>24</sup>, four spikes were developed with concentrations equally spaced ranging from 2 to 8 and 8 to 32, for DEET and IR 3535, respectively. Two approaches were used to identify the proportional effect: (1) a comparison between slopes<sup>28-29</sup>, and (2) a pair *t* - test, since the spiked concentration was used at the same concentration level for both the standard mixture and the insect repellent samples.

#### *Calibration curve validation and figure of merits*

Each calibration sample was run three times with three authentic samples, making it possible to perform an ANOVA test for the calibration curve validation. The ANOVA test was used to identify the slope, intercept, the regression significance and lack of fit significance in the linear calibration curve.

1  
2  
3 The slopes of the calibration curves prepared for both DEET and IR 3535,  
4 constituted the model sensitivity and were used to calculate the limit of quantification  
5 (LOQ), as described in Equation 3.  
6  
7  
8  
9  
10

$$11 \quad \text{LOQ} = 10 \times \frac{\text{sd}}{S} \quad (3)$$

12  
13  
14  
15  
16  
17 where is calculated by the standard deviation of the area of thirty samples containing  
18 DEET and IR 3535 at 0.25 mg L<sup>-1</sup> and 0.50 mg L<sup>-1</sup>, respectively, eluted on three  
19 different days. *S* is the slope coefficient estimated by least squares. The value of 10 is  
20 calculated based on type I and II error<sup>29</sup>.  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Results and discussion

### *Calibration sample set*

All the samples were injected into the chromatographic system under the conditions describe in section 2.2. **Figure 1** shows the mean chromatograms for each level of the calibration standards, as well as the DEET and IR3535 spectra recorded at 210 nm.

**INSERT FIGURE 1 HERE**

The chromatograms were registered at 210 nm with a frequency of ten spectra per second. As can be seen in **Fig. 1a**, both DEET and IR 3535 were completely eluted in approximate 5 minutes, resulting in a short gradient run which increased the analytical frequency. **Fig. 1b** and **1c** shows the spectrum registered for DEET at 4.11 min retention time and for IR3535 at 4.78 min, respectively.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

There are no peak shape changes or misalignments, and the peak widths are less than 0.3 min for both analytes, even with a low flow rate of 0.3 mL min<sup>-1</sup>. The resolution parameters were adequate for a quantitative analysis with asymmetry of approximate 1 and resolution higher than 2.0<sup>30,31</sup>, even at the higher concentration of both analytes.

A *t*-test, *p* values and the hypothesis test for the calibration curve were carried out, all indicating that the intercept for both analytes models were statistically null. Therefore, the intercept was forced to zero. The regression parameters for both models are shown on **Table 1**. Then, an analysis of variance (ANOVA) was conducted for both the DEET and IR 3535 models, with the *F* value calculated higher than the tabulated value, indicating statistical significance for regression. Neither model presented a lack of fit, with the *F* value being calculated lower than the tabulated value, showing that the linear model was adequate to describe the proportions between peak areas and concentrations. The slope values, which are associated to the model sensitivity and determination coefficient (*R*<sup>2</sup>) are presented in **Table 1**.

**INSERT TABLE 1 HERE**

### *Selectivity and LOQ*

In **Fig 1a**, it is possible to observe that the method has a fast elution procedure, in which both analytes are well separated with a 2.35 resolution between peaks. As ten spectra per second was acquired on the UV region (200 – 400 nm), it was possible to perform a peak purity test by comparing the spectra along the analyte peak with the one registered in the retention time. For both analytes, these spectra matched 100% purity as expected for the analytical standard. Note that this is a crucial test for sample analysis

1  
2  
3 since interferences may preclude a univariate quantification. Of the 102 samples under  
4  
5 analysis, spectra match values higher than 98% for DEET and IR 3535 peaks indicate  
6  
7 satisfactory selectivity of both models. So, none of the excipients interfered with the  
8  
9 determination of DEET and IR 3535 under the experimental conditions used.  
10

11 The LOQ values were determined based on Equation 3. The calibration  
12  
13 mixture solution at the lowest concentration of DEET (0.25 mg L<sup>-1</sup>) and IR 3535 (0.50  
14  
15 mg L<sup>-1</sup>) were used to estimate the standard deviation of the instrumental response,  
16  
17 following the EUROCHEM criteria <sup>24</sup>.  
18

19 LOQ values were 0.099 mg L<sup>-1</sup> and 0.061 mg L<sup>-1</sup> for DEET and IR 3535,  
20  
21 respectively. Since the samples concentration of these active ingredients were higher  
22  
23 than this, the results were reasonable.  
24  
25  
26  
27  
28  
29

### *Precision and Accuracy*

30  
31 **Table 2** shows these results of the Horwitz ratio and calculated  $t$ -value ( $t_{cal}$ ) for  
32  
33 the first day (intraday), and between the mean values of the four days (inter day)  
34  
35 measurements. The Horwitz ratio values were lower than 2 for both intra and inter day  
36  
37 precision test and  $t_{cal}$  values were lower than the tabulated values, indicating satisfactory  
38  
39 results to implement a quantification analysis method.  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47

**INSERT TABLE 2 HERE**

48 The recovery results of this study are presented in **Table 3**, where it can be  
49  
50 seen that the recovery values, REC (%), ranged from 89.2 % - 111.6 % and 94.7% -  
51  
52 109.2% for all samples and spiked levels for both DEET and IR 3535 analysis,  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 respectively. No proportional matrix effect was identified, since ME (Matrix Effect)  
4  
5 was not higher than  $\pm 20\%$  <sup>32</sup>.  
6  
7  
8

9  
10 **INSERT TABLE 3 HERE**

11  
12  
13 *DEET and IR 3535 quantification in repellent samples*

14  
15 As shown in **Table 4**, the great majority of the samples had concentration  
16  
17 values lower than what was indicated on the label. In fact, monitoring of repellents is  
18  
19 important because, when the concentration value is lower than that indicated on the  
20  
21 product label, the action time of these repellents can be reduced and, consequently, the  
22  
23 effectiveness of the product may be decreased.  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60 **INSERT TABLE 4 HERE**

## Conclusions

In this paper, the HPLC-DAD method was developed and successfully applied to quantify both DEET and IR 3535 in insect repellent samples. The proposed method presents satisfactory linearity, LOQ, selectivity and recovery. It is free of interference and matrix effect, uses a simple dilution of the sample, 7 minutes elution with acetonitrile/water without additive or modifier. Moreover, it was used only 870 $\mu$ L of acetonitrile in accordance with green analytical chemistry principles of low solvent consumption. The proposed validated method allows the monitoring of DEET and IR3535 concentration in insect repellents, which is of vital importance since high concentrations may be harmful to the health of the population and a concentration below that described on the label compromises the action of these products to protect the population to from *Aedes Aegypt* mosquito-borne diseases. It is important to highlight that there is no reference method for this purpose.

## Acknowledgements

The authors acknowledge CNPq (420400/2016-8, 303649/2015-1,423601/2016-4, 302349/2016-2) and CAPES for financial support, research and scholar fellowships. They also thank sincerely the Merk® Company that kindly donated the standard of insect repellent of IR 3535. The English text of this paper has been revised by Sidney Pratt, Canadian, MAT (The Johns Hopkins University), RSAdip - TESL (Cambridge University).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## References

- 1 N.S de Carvalho, B. F de Carvalho, C. A. Fugaça, B. Doris, E. S. Biscaia, Zika virus infection during pregnancy and microcephaly occurrence: a review of literature and Brazilian data, *Braz J. of Infect. Dis*, 2016, **20**, 282 – 289.
- 2 WHO, World Helth Organization, <http://www.who.int/emergencies/zika-virus/situation-report/10-march-2017/en/>, 2017, accessed 31 October 2017.
- 3 D. Wiles, J. Yee, U. Castillo, J. Russel, H. Spiller, M. Casavant, A Lethal Case of DEET Toxicity Due to Intentional Ingestion, *J. Anal. Toxicol*, 2014, **38**, 696 – 698.
- 4 T. H. Broschard, A. M. Bohlmann, S. Konietzny, U. M. D. Schauer, W. Dekant, Biotransformation and toxicokinetics of the insect repellent IR3535<sup>®</sup> in male and female human subjects after dermal exposure, *Toxicol. Lett*, 2013, **218**, 246 – 252.
- 5 Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).  
[http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-asset\\_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/repelentes-e-inseticidas-perguntasrespostas/219201/pop\\_up?\\_101\\_INSTANCE\\_FXrpx9qY7FbU\\_viewMode=print&\\_101\\_INSTANCE\\_FXrpx9qY7FbU\\_languageId=en\\_US](http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/repelentes-e-inseticidas-perguntasrespostas/219201/pop_up?_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_viewMode=print&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_languageId=en_US), accessed 20 October 2017.
- 6 S. Merel, S. A. Snyder, Critical assessment of the ubiquitous occurrence and fate of the insect repellent N, N-diethyl-m-toluamide in water, *Environ. Int*, 2016, **96**, 96 – 117.
- 7 S. Licciardi, J. P. H erve, F. Darriet, J. M. Hougard, V. Corbel, Lethal and behavioural effects of three synthetic repellents (DEET, IR3535 and KBR 3023) on *Aedes aegypti* mosquitoes in laboratory assays, *Med. Vet. Entimol*, 2006, **20**, 288 – 293.

- 1  
2  
3 **8** S.D. Costanzo, A.J. Watkinson, E.J. Murby, D.W. Kolpin, M.W. Sandstrom, Is there a  
4 risk associated with the insect repellent DEET (N,N diethyl m toluamide) commonly  
5 found in aquatic environments?, *Sci. Total Environ*, 2007, **384**, 214 – 220.  
6  
7  
8  
9  
10 **9** P. Fink, J. Moelzner, R. Berghan, E. von Elert, Do insect repellents induce drift  
11 behaviour in aquatic non-target organisms?, *Water Research*, 2017, **108**, 32 – 38.  
12  
13  
14 **10** W. S. Leal, The enigmatic reception of DEET — the gold standard of insect  
15 repellents, *Curr. Opin. Insect Sci*, 2014, **6**, 93 – 98.  
16  
17  
18  
19 **11** D. R. Swale, B. Sun, F. Tong, J. R. Bloomquist, Neurotoxicity and Mode of Action  
20 of N,N -Diethyl- Meta -Toluamide (DEET), *PLoS ONE*, 2014, **9**, e103713.  
21  
22  
23  
24 **12** Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 19 2013.  
25 <http://portal.anvisa.gov.br/>, 2013, Accessed 20 November 2017.  
26  
27  
28  
29 **13** J. Islam, K. Zaman, S. Duarah, P. S. Raju, P. Chattopadhyay, Mosquito repellents:  
30 An insight into the chronological perspectives and novel discoveries, *Acta Trop*, 2017,  
31 **167**, 216 – 230.  
32  
33  
34  
35 **14** S. Kasichayanula, J. D. House, T. Wang, X. Gu, Percutaneous characterization of the  
36 insect repellent DEET and the sunscreen oxybenzone from topical skin application,  
37 *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 2007, **223**, 187 – 194.  
38  
39  
40  
41  
42 **15** TECHNICAL DEET. Full specification WHO/SRpT/1.R2 1999, revised 10  
43 December 1999. <http://www.who.int/whopes/quality/en/deet.pdf>, 1999, accessed 13  
44 November 2017.  
45  
46  
47  
48  
49 **16** A. D. McEachran, M. L. Hedgespeth, S. R. Newton, R. McMahan, M. Strynar, D.  
50 Shea, E. G. Nichols, Comparison of emerging contaminants in receiving waters  
51 downstream of a conventional wastewater treatment plant and a forest-water reuse  
52 system, *Environmental Science and Pollution Research*, 2018.  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1505-5>.

4  
5 **17** P. Kuklennyik, S. E. Baker, A. M. Bishop, P. Morales-A, A. M. Calafat, On-line solid  
6 phase extraction-high performance liquid chromatography–isotope dilution–tandem  
7 mass spectrometry approach to quantify N,N-diethyl-m-toluamide and oxidative  
8 metabolites in urine, *Analytica Chimica Acta*, 2013, 787, 267-273.

9  
10 **18** P. K. Behniwal, J. She, Development of HPLC-MS/MS method for the  
11 simultaneous determination of metabolites of organophosphate pesticides, synthetic  
12 pyrethroids, herbicides and DEET in human urine, *International Journal of*  
13 *Environmental Analytical Chemistry*, 2017, 97,

14  
15 **19** Kasichayanula, J. D. House, T. Wang, X. Gu, Simultaneous analysis of insect  
16 repellent DEET, sunscreen oxybenzone and five relevant metabolites by reversed-  
17 phase HPLC with UV detection: Application to an in vivo study in a piglet model,  
18 *Journal Chromatography*, 2005, 822, 271 – 277.

19  
20 **20** T. Wang, S. Kasichayanula, X. Gu, In vitro permeation of the repellent DEET and  
21 the sunscreen oxybenzone across human skin, 2006, 310, 110 – 117.

22  
23 **21** Z. Yu, Y. Sun, G. Z. C. Zhang, Degradation of DEET in aqueous solution by water  
24 falling film dielectric barrier discharge : Effect of three operating modes and analysis of  
25 the mechanism and degradation pathway, *Chemical Engineering Journal*, 2017, 317, 90  
26 – 102.

27  
28 **22** K. S. Tay, N. A. Rahman, M. R. Bin Abas, Chemical oxidation of N,N-diethyl-m-  
29 toluamide by sulfate radical-based oxidation: kinetics and mechanism of degradation,  
30 2013, 10, 103 – 112.

31  
32 **23** S. C. Marselos, H. A. Archontaki, Development and validation of a reversed-phase  
33 high-performance liquid chromatographic method for the determination of ethyl-3-(N-n-  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 butyl-N-acetyl)aminopropionate in an insect repellent semi-solid formulation, 2002,  
4  
5 946, 295 – 299.

6  
7  
8 **24** B. Magnusson, U. Ornemark, Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of  
9  
10 Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics,  
11  
12 2nd ed. 2014, ISBN 978-91-87461-59-0.

13  
14 [https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV\\_guide\\_2nd\\_ed\\_EN.pdf](https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf) ,  
15  
16 2014, accessed 15 December 2017.

17  
18  
19 **25** A. Kruve, R. Rebane, K. Kipper, M. L. Odelkop, H. Evard, K. Herodes, P. Ravio, I.  
20  
21 Leito, Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry  
22  
23 methods: Part I, *Anal. Chim. Acta*, 2015, **870**, 29 – 44.

24  
25  
26 **26** A. Kruve, R. Rebane, K. Kipper, M. L. Odelkop, H. Evard, K. Herodes, P. Ravio, I.  
27  
28 Leito, Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry  
29  
30 methods: Part II, *Anal. Chim. Acta*, 2015, **870**, 8 – 28.

31  
32  
33 **27** T. Angelo, F. Q. Pires, G. M. Gelfuso, J. K.R. da Silva, T. Gratieri, M. S.S. Cunha-  
34  
35 Filho. Development and validation of a selective HPLC-UV method for thymol  
36  
37 determination in skin permeation experiments, *J. Chrom. B*, 2016, **1022**, 81 – 86.

38  
39  
40 **28** M. I. Azilawati, D. M. Rashim, B. Jamilah, I. Amin, Validation of a reverse-phase  
41  
42 high-performance liquid chromatography method for the determination of amino acids  
43  
44 in gelatins by application of 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidylcarbamate  
45  
46 reagent, *J. Chrom. A*, 2016, **1353**, 49 – 56.

47  
48  
49 **29** M. C. Ortiz, L. A. Sarabia, M. S. Sánchez, Tutorial on evaluation of type I and type  
50  
51 II errors in chemical analyses: From the analytical detection to authentication of  
52  
53 products and process control, *Anal. Chim. Acta*, 2010, **674**, 123 – 142.  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

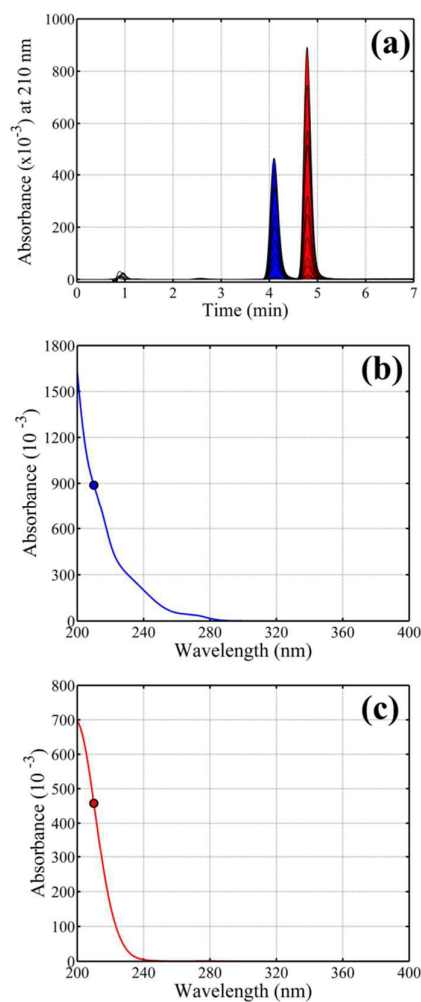
1  
2  
3 **30** L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. W. Dolan, Introduction to modern liquid  
4 chromatography, A John Wiley & Sons, New Jersey, 2010.

5  
6  
7 **31** C. H. Collins, G. L. Braga, P. S. Bonato, Fundamentos de Cromatografia,  
8 UNICAMP, Campinas, 2006.

9  
10  
11 **32** A. Kruve, A. Künnapas, K. Herodes, I. Leito, Matrix effects in pesticide multi-  
12 residue analysis by liquid chromatography–mass spectrometry, *J. Chrom. A*, 2008,  
13 **1187**, 58–66.

14  
15  
16 **33** D. Moreno-González, A. M. García-Campaña, Salting-out assisted liquid–liquid  
17 extraction coupled to ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass  
18 spectrometry for the determination of tetracycline residues in infant foods, *Food Chem*,  
19 2017, **221**, 1763 – 1769.  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Figure Caption



**Figure 1.** (a) Mean chromatograms of calibration standard mixture samples. DEET in blue and IR 3535 in red. (b) DEET and (c) IR 3535 spectrum for the higher concentration calibration standard. The blue and red dots represent the wavelength used for calibration and sample quantifications.

1  
2  
3 **Table and Captions**  
4  
5  
6

7 **Table 1.** Analytical parameters for the calibration curve of DEET and IR 3535  
8

Analyte	Work linear range (mg L <sup>-1</sup> )	Regression equation		
		Intercept (a)	Slope (b) <sup>a</sup>	R <sup>2</sup> <sup>b</sup>
<b>DEET</b>	0.25 – 22.00	-0.8229	7.2506	0.9986
<b>IR 3535</b>	0.50– 40.00	-0.1903	2.4009	0.9976

9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20 <sup>a</sup>Linear Regression analysis using the equation  $y = a + bx$ , where  $x$  is the concentration in mg L<sup>-1</sup>.

21 <sup>b</sup>R<sup>2</sup> is the determination coefficient.  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Table 2.** Univariate intra and inter day precision test for insect repellent quantification.

Active ingredient	Horwitz ratio								$t_{cal}^a$							
	Interday				Intraday				Interday (3.182)				Intraday (2.447)			
	L1	L2	L3	L4	L1	L2	L3	L4	L1	L2	L3	L4	L1	L2	L3	L4
<b>DEET</b>	1.17	1.24	1.15	0.25	0.76	1.76	0.54	1.2	0.55	1.07	1.36	0.39	0.27	1.17	0.50	1.44
<b>IR3535</b>	0.25	0.36	0.69	0.37	0.29	0.79	0.31	0.32	0.34	1.00	2.48	1.79	0.31	1.70	0.88	1.25

<sup>a</sup>Calculated t-values. The tabulated values are shown between parentheses for intraday (2.447) and inter day (3.182), which are 6 and 3 degrees of freedom, respectively. L1-L4 represents days 1 to 4.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Table 3.** Recovery studies for the determination of DEET and IR 3535.

DEET	Spiked levels (mg L <sup>-1</sup> )					ME <sup>c</sup>	
	0	2	4	6	8		
Sample 1 (5%) <sup>a</sup>	Found	4.45	7.67	10.93	14.16	16.87	-7.59
	REC (%) <sup>b</sup>	-	96.5	97.2	97.1	93.1	
Sample 2 (5%) <sup>a</sup>	Found	4.42	7.61	10.73	13.89	17.43	-4.72
	REC (%) <sup>b</sup>	-	95.6	94.6	94.7	97.6	
Sample 3 (10%) <sup>a</sup>	Found	9.23	12.21	15.65	18.51	21.38	-9.72
	REC (%) <sup>b</sup>	-	89.2	96.3	92.8	91.1	
Sample 4 (15%) <sup>a</sup>	Found	11.29	14.66	17.91	20.71	24.35	-5.15
	REC (%) <sup>b</sup>	-	101.1	99.3	94.1	97.9	
Sample 5 (5%) <sup>a</sup>	Found	5.07	8.12	11.31	14.31	17.45	-4.53
	REC (%) <sup>b</sup>	-	95.7	97.9	96.6	97.1	
Sample 6 (10%) <sup>a</sup>	Found	10.35	13.42	17.47	20.18	23.53	2.12
	REC (%) <sup>b</sup>	-	96.1	111.6	102.7	103.3	
IR3535	Spiked levels (mg L <sup>-1</sup> )					ME <sup>c</sup>	
	0	8	16	24	32		
Sample 7 (12.6%) <sup>a</sup>	Found	16.42	29.85	43.46	59.03	72.16	-0.41
	REC (%) <sup>b</sup>	-	100.8	101.4	106.5	104.5	
Sample 8 (12.6%) <sup>a</sup>	Found	12.35	24.98	40.39	54.94	69.70	2.40
	REC (%) <sup>b</sup>	-	94.7	105.1	106.5	107.5	
Sample 9 (10%) <sup>a</sup>	Found	6.79	20.45	34.97	49.22	62.73	-0.44
	REC (%) <sup>b</sup>	-	102.4	105.7	106.1	104.9	
Sample 10 (10%) <sup>a</sup>	Found	7.38	21.94	35.46	50.44	64.41	0.92
	REC (%) <sup>b</sup>	-	109.2	105.3	107.6	106.9	

<sup>a</sup> Concentrations reported for each repellent sample are shown between parentheses. <sup>b</sup> Calculated recovery.

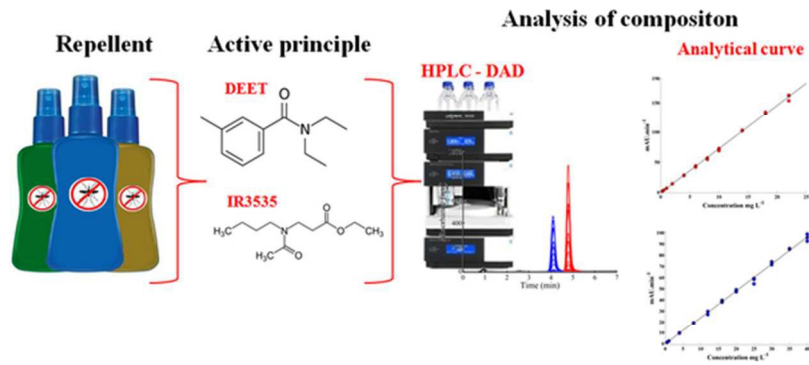
<sup>c</sup>ME = calibration/samples slope ratio [32,33].

 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Table 4.** Value described on the label and found through the HPLC-DAD method

Sample	Found (%)	Sample	Found (%)	Sample	Found (%)	Sample	Found (%)	Sample	Found (%)
1 (14.55%) <sup>a</sup>	10.62	22 (6.79%) <sup>a</sup>	5.78	43 (15%) <sup>a</sup>	17.44	64 (5%) <sup>a</sup>	4.99	85 (12.5%) <sup>b</sup>	12.49
2 (14.55%) <sup>a</sup>	14.80	23 (6.79%) <sup>a</sup>	5.98	44 (15%) <sup>a</sup>	12.76	65 (5%) <sup>a</sup>	5.28	86 (12.5%) <sup>b</sup>	13.76
3 (14.55%) <sup>a</sup>	9.51	24 (6.79%) <sup>a</sup>	4.65	45 (15%) <sup>a</sup>	12.79	66 (6.65%) <sup>a</sup>	4.59	87 (12.5%) <sup>b</sup>	10.85
4 (14.55%) <sup>a</sup>	9.16	25 (6.79%) <sup>a</sup>	5.31	46 (15%) <sup>a</sup>	15.30	67 (6.65%) <sup>a</sup>	4.43	88 (12.5%) <sup>b</sup>	9.94
5 (14.55%) <sup>a</sup>	8.45	26 (6.79%) <sup>a</sup>	4.69	47 (15%) <sup>a</sup>	11.45	68 (6.65%) <sup>a</sup>	4.36	89 (12.5%) <sup>b</sup>	10.85
6 (14.55%) <sup>a</sup>	9.41	27 (6.79%) <sup>a</sup>	4.13	48 (15%) <sup>a</sup>	16.20	69 (6.65%) <sup>a</sup>	4.09	90 (12.5%) <sup>b</sup>	11.27
7 (14.55%) <sup>a</sup>	10.83	28 (6.79%) <sup>a</sup>	5.18	49 (15%) <sup>a</sup>	11.57	70 (6.65%) <sup>a</sup>	6.68	91 (12.5%) <sup>b</sup>	10.25
8 (14.55%) <sup>a</sup>	11.01	29 (6.79%) <sup>a</sup>	4.19	50 (15%) <sup>a</sup>	12.03	71 (6.65%) <sup>a</sup>	4.62	92 (12.5%) <sup>b</sup>	11.44
9 (10%) <sup>a</sup>	7.16	30 (6.79%) <sup>a</sup>	5.16	51 (15%) <sup>a</sup>	13.80	72 (6.65%) <sup>a</sup>	5.22	93 (12.5%) <sup>b</sup>	11.68
10 (10%) <sup>a</sup>	8.24	31 (6.79%) <sup>a</sup>	5.54	52 (15%) <sup>a</sup>	11.29	73 (6.65%) <sup>a</sup>	4.93	94 (12.5%) <sup>b</sup>	11.97
11 (10%) <sup>a</sup>	8.16	32 (6.79%) <sup>a</sup>	4.67	53 (15%) <sup>a</sup>	11.83	74 (6.65%) <sup>a</sup>	5.28	95 (10%) <sup>b</sup>	6.70
12 (10%) <sup>a</sup>	9.34	33 (6.79%) <sup>a</sup>	5.19	54 (15%) <sup>a</sup>	12.66	75 (6.65%) <sup>a</sup>	4.93	96 (10%) <sup>b</sup>	6.92
13 (10%) <sup>a</sup>	8.00	34 (30%) <sup>a</sup>	22.25	55 (15%) <sup>a</sup>	12.70	76 (16%) <sup>a</sup>	11.96	97 (12.5%) <sup>b</sup>	11.63
14 (7%) <sup>a</sup>	4.60	35 (6.79%) <sup>a</sup>	5.56	56 (5%) <sup>a</sup>	5.98	77 (16%) <sup>a</sup>	11.27	98 (12.5%) <sup>b</sup>	9.36
15 (7%) <sup>a</sup>	5.35	36 (6.79%) <sup>a</sup>	4.70	57 (5%) <sup>a</sup>	4.94	78 (7.6%) <sup>a</sup>	5.23	99 (12%) <sup>b</sup>	6.29
16 (7%) <sup>a</sup>	4.33	37 (6.79%) <sup>a</sup>	5.89	58 (5%) <sup>a</sup>	5.34	79 (7.6%) <sup>a</sup>	5.41	100 (12%) <sup>b</sup>	6.56
17 (7%) <sup>a</sup>	4.78	38 (6.79%) <sup>a</sup>	4.29	59 (5%) <sup>a</sup>	5.06	80 (10%) <sup>a</sup>	11.36	101 (12%) <sup>b</sup>	6.56
18 (7%) <sup>a</sup>	5.62	39 (6.79%) <sup>a</sup>	4.26	60 (5%) <sup>a</sup>	6.10	81 (10%) <sup>a</sup>	12.17	102 (10%) <sup>b</sup>	8.86
19 (7%) <sup>a</sup>	6.76	40 (6.79%) <sup>a</sup>	4.94	61 (5%) <sup>a</sup>	3.95	82 (10%) <sup>a</sup>	8.23	103 (10%) <sup>b</sup>	10.56
20 (6.79%) <sup>a</sup>	4.58	41 (6.79%) <sup>a</sup>	4.45	62 (5%) <sup>a</sup>	4.80	83 (10%) <sup>a</sup>	7.91	104 (10%) <sup>b</sup>	9.30
21 (6.79%) <sup>a</sup>	5.58	42 (6.79%) <sup>a</sup>	4.20	63 (5%) <sup>a</sup>	5.22	84 (5%) <sup>a</sup>	4.25	105 (30%) <sup>b</sup>	27.05

<sup>a</sup>Label value of DEET and <sup>b</sup>IR 3535.



A novel HPLC-DAD method was developed and validated to accurately quantify DEET and IR 3535 in insect repellent sample.

31x16mm (600 x 600 DPI)