



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA -UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS



Área de Concentração: Ciência de Alimentos

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE
IVERMECTINA EM LEITE DE VACA COM USO DE ESPECTROSCOPIA DE
INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER COM
REFLECTÂNCIA TOTAL ATENUADA (FTIR-ATR)

Autora: Valdirene Rodrigues Santana

ORIENTADOR: Prof. Dr. Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes

ITAPETINGA

BA-BRASIL

Fevereiro/2017

VALDIRENE RODRIGUES SANTANA

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE
IVERMECTINA EM LEITE DE VACA COM USO DE ESPECTROSCOPIA DE
INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER COM
REFLECTÂNCIA TOTAL ATENUADA (FTIR-ATR)**

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes

Co-orientadores: Prof^a. Dr^a. Sibelli Passini Barbosa Ferrão

Prof. Dr. Leandro Soares Santos

ITAPETINGA
BAHIA-BRASIL
Fevereiro/2017

637
S231v

Santana, Valdirene Rodrigues

Validação de metodologia para detecção e quantificação de ivermectina em leite de vaca com uso de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier com reflectância total atenuada (FTIR-ATR) / Valdirene Rodrigues Santana. Itapetinga: UESB, 2016.

75 p.

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de concentração em Ciência de Alimentos para obtenção do título de "Mestre". Sob a orientação do Prof. DSc. Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes e co-orientação da Prof^a. Sibelli Passini Barbosa Ferrão e do Prof. DSc. Leandro Soares Santos.

1. Ivermectina - Leite de vaca. 2. Leite de vaca - Espectroscopia. 3. Leite de vaca - Espectroscopia FTIR-ATR I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. II. Fernandes, Sérgio Augusto de Albuquerque. III. Título.

CDD(21):637

Catálogo na fonte:

Angélica Renata de Castro - CRB/6 - 2746

Bibliotecária Documentalista

Índice sistemático para desdobramento por assunto:

1. Ivermectina - Leite de vaca
2. Leite de vaca - Espectroscopia
3. Leite de vaca - Espectroscopia FTIR-ATR



Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
Programa de Pós-Graduação
Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos



Áreas de Concentração: Engenharia de Alimentos
Ciência de Alimentos

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE IVERMECTINA EM LEITE DE VACA COM USO DE ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER COM REFLECTANCIA TOTAL ATENUADA (FTIR-ATR).

Autor (a): VALDIRENE RODRIGUES SANTANA

Orientador (a): Prof.º Dr. Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes

Coorientadores: Prof.ª Dr.ª Sibelli Passini Barbosa Ferrão

Prof.º Dr. Leandro Soares Santos

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIA DE ALIMENTOS**, pela Banca Examinadora.

Prof.º Dr. Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes (UESB)

Prof.ª Dr.ª Sílmara Almeida de Carvalho (UESB)

Prof.ª Dr.ª Camila Messias Barbosa Santos (UESB)

Itapetinga-BA, 22 de fevereiro de 2017.

"Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer. "

Mahatma Gandhi

À minha mãe, maior amor da minha vida

Ao meu pai por estar sempre me esperando

Aos meus irmãos, Wágneton e Vanessa, que são meu incentivo e minha força.

Aos meus Ninos, Rayanne e Raysson, meus grandes amores e inspiração

Ao meu marido, Hércules, meu refúgio em todos os momentos de angústia durante esses 2 anos.

Então, a vocês, minha família, por quem dedicarei todo o meu esforço em todos os dias da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me acompanhar e me iluminar durante todo o tempo durante o curso.

À minha mãe, por sempre acreditar em mim, incentivar, guiar, acolher e ser a maior razão das minhas lutas e vitórias.

Ao meu pai, Valdivino, por sempre me esperar, ansiosamente, a cada período distante.

Aos meus irmãos, Wágneton e Vanessa, por serem meus pilares, minha força, por toda confiança de que sempre estarei do lado de vocês e, de fato, estarei.

Aos meus ninos, Rayanne e Raysson, meus grandes amores, fonte da minha força, alívio das minhas angústias, meus presentinhos de Deus.

Ao meu marido, Hércules, pela compreensão, companheirismo, incentivo e por estar sempre presente, ainda que fisicamente distante.

Ao meu tio, José Márcio, por sempre fazer papel de pai, inclusive durante o curso.

Às minhas amigas-irmãs, Danuta e Sheyla, pela fiel amizade, companheirismo e conversas nas madrugadas que foram tão importantes nos momentos mais difíceis nesse tempo.

Ao meu, mais que orientador, um verdadeiro amigo todo esse tempo, Sérgio Fernandes, por toda paciência e orientação que dedicou a mim.

Aos professores Leandro Soares e Camila Messias pelos ensinamentos e disponibilidade.

Às minhas amigas, Acsa, Rebeca, Josi e Karine, pelo apoio nos momentos mais difíceis em Itapetinga e por aliviarem os fardos que, muitas vezes, carreguei.

Aos meus colegas de mestrado, por participarem da minha conquista.

Ao programa de pós-graduação em Engenharia Ciência de Alimentos pela realização do curso.

Aos amigos e companheiros de trabalho do IFNMG – Campus Salinas, Karina, José Aparecido, Fábio, Edilene e Dênis, pelo esforço que fizeram para que eu pudesse realizar o curso e a Osmar e a professora Araci pela oportunidade de fazê-lo em condição de afastamento.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
I REFERENCIAL TEÓRICO	1
1.1 Introdução.....	1
1.2 A produção de leite	2
1.3 O leite.....	3
1.4 Uso de medicamentos veterinários e segurança do leite.....	4
1.5 Avermectinas	6
1.5.1 Ivermectinas	8
1.6 Espectroscopia de Infravermelho.....	10
1.6.1 Espectroscopia Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	15
1.6.2 Aplicação da Espectroscopia de Infravermelho na indústria de alimentos.....	17
1.7 Quimiometria	20
1.7.1 Análise de Componentes Principais.....	21
1.7.2 Análise Discriminante	22
1.8 Redes Neurais Artificiais (RNA).....	24
1.9 Referências Bibliográficas	26
II OBJETIVOS	38
2.1 Objetivo geral	38
2.2 Objetivos específicos	38
III CAPÍTULO 1 - USO DA ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER COM REFLECTÂNCIA TOTAL ATENUADA (FTIR-ATR) ASSOCIADO A QUIMIOMETRIA COMO TESTE DE TRIAGEM PARA IVERMECTINA EM LEITE.....	39
RESUMO.....	39

ABSTRACT.....	40
1 INTRODUÇÃO	41
2 MATERIAL E MÉTODOS	42
2.1 Origem das amostras	42
2.2 Delineamento experimental.....	42
2.3 Preparo das amostras	42
2.4 Análise espectrofotométrica vibracional.....	43
2.5 Caracterização e comparação dos espectros das amostras	43
2.6 Medidas de Dispersão e Padronização da Matriz de Dados.....	43
2.6.1 Construção das matrizes de dados utilizadas nas técnicas multivariadas.....	43
2.7 Análise Estatística	44
2.7.1 Análise de Componentes Principais	44
2.7.2 Análise discriminante	45
2.8 Redes Neurais Artificiais	45
2.8.1 Arquitetura e desenvolvimento das RNA's.....	45
2.8.2 Treinamento e Validação.....	46
2.8.2.1 Predição	46
2.8.2.2 Classificação.....	47
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
3.1 Caracterização e comparação das amostras de Ivermectina (IVM) e Leite	48
3.2 Análise Estatística Multivariada.....	51
3.2.1 Análise de Componentes Principais	51
3.2.2 Análise discriminante	53
3.3 Redes neurais artificiais	55
3.3.1 Predição	55
3.3.2 Classificação.....	56
4 CONCLUSÃO	57
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura Química da Ivermectina.....	9
Figura 2. Mudança no momento dipolo de molécula heteronuclear diatômica.....	12
Figura 3. Modos Vibracionais	6
Figura 4. O sistema FTIR	20
Figura 5. Espectro do Leite por FTIR.....	24

CAPÍTULO 1

Figura 1. Espectro no Infravermelho da Ivermectina	48
Figura 2. Espectro no Infravermelho do leite puro.....	49
Figura 3. Médias dos pontos de máxima intensidade de absorção da Ivermectina, Leite e o leite adulterado (10µg/L e 20µg/L)	51
Figura 4. Escores das amostras de IVM, Leite, Leite adulterado (2 a 10 µg/L) - A e Leite adulterado (12 a 20 µg/L) - B em relação a CP1 e CP2, em que: A* - I vs L; B* - I vs L vs A vs B; C* - L vs A vs B.....	53
Figura 5. Coeficiente de determinação dos dados experimentais e preditos (dados normalizados 0-1) das amostras de leite puro e adulterado para a rede utilizando a função Tangente Hiperbólica	56
Figura 6. Valores de RMSE e ciclos da rede com três camadas intermediárias contendo 45 neurônios cada utilizando a função Tangente Hiperbólica.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Produção anual de leite por Região (1000 litros)	2
Tabela 2. Participação de cada estado na produção de leite na região Nordeste.....	3
Tabela 3. IDA e LMR de avermectinas no leite.	8
Tabela 4. Graus de liberdade de moléculas poliatômicas lineares e não lineares.	12
Tabela 5. Regiões do espectro eletromagnético e amostras a que se aplicam.....	13
Tabela 6. Correlação entre as vibrações e as faixas espectrais.....	14
Tabela 7. Regiões espectrais do leite em FTIR.	19

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Descrição dos grupos usados nas análises de componentes principais (ACP), análise discriminante (AD) e Redes Neurais (RN).....	44
Tabela 2. Arquiteturas das redes neurais utilizadas.....	46

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACP - Análise de Componentes Principais

AD - Análise Discriminante

CLAE-EM/EM - Cromatografia Líquida De Alta Eficiência Acoplada À Espectrometria De Massas

CLAE-FL - Cromatografia Líquida De Alta Eficiência Com Detector De Fluorescência

CP's - Componentes Principais

FAO – Food and Agriculture Organization

ATR - Reflectância Total Atenuada

FTIR – Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

FT-NIR- Espectroscopia no Infravermelho Próximo com Transformada de Fourier

GABA - Ácido Gama-Aminobutírico

IDA - Ingestão Diária Aceitável

IN – Instrução Normativa

IVM - Ivermectina

Lactonas Macrocíclicas (LM)

LMR - Limites Máximos de Resíduos

Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)

MLP - Perceptron Multi-Camadas

PAMVet - Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos

PNCRC - Plano Nacional de Controle de Resíduos

RIISPOA - Regulamento Da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal

RMSE – Raiz Quadrada do Erro Médio

RNA - Rede Neural Artificial

UV – Ultravioleta

RESUMO

SANTANA, V. R. **Validação De Metodologia Para Detecção e Quantificação De Ivermectina Em Leite de Vaca Com Uso De Espectroscopia De Infravermelho Com Transformada de Fourier Com Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR)**. Itapetinga, BA: UESB, 2016. 76. p. Dissertação. (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos).

As Ivermectinas (IVM), do grupo das Avermectinas e da família das Lactonas Macrocíclicas são usadas rotineiramente em animais de produção como endo e ecto-parasitários e como outros medicamentos, tem seus resíduos no leite controlados oficialmente. Desenvolvemos o estudo do tema e apresentamos o conhecimento atual da realidade da produção de leite, do uso da IVM em animais leiteiros e o controle de seus resíduos no leite, além do uso da espectroscopia associada à quimiometria na análise de alimentos. Para detecção e quantificação de IVM em leite usa-se oficialmente a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Esta técnica consome muito tempo, requer o uso de muitos reagentes químicos e o descarte de seus resíduos, além da insalubridade do ambiente nos laboratórios. Este conjunto de informações criou a demanda para o desenvolvimento de novas técnicas, que consigam mitigar estes efeitos. Assim, surge a Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) que apresenta maior agilidade no processo, menor custo e tem sido utilizada em análise de alimentos. A utilização dessa técnica para a detecção de IVM em leite não foi testada e preencher esta lacuna foi o nosso objetivo. Apresentamos no capítulo 1 os resultados de nosso estudo de validação metodológica com o uso da Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier associada à quimiometria na detecção de Ivermectina no leite. Leite de vacas sadias que não tratadas com IVM foi utilizado no estudo. O delineamento experimental foi desenvolvido para a obtenção dos dados representativos dos espectros do leite adulterado com IVM (diluições sucessivas no leite), leite puro e padrão de IVM (tratamentos). A análise de componentes principais classificou o leite adulterado e o leite puro, distintamente. No mesmo sentido as análises discriminantes classificaram as amostras em leite puro e adulterado da mesma forma que as redes neurais artificiais. Baseados nos resultados indicamos o uso da espectroscopia FTIR-ATR como teste de triagem de resíduos de IVM em leite.

Palavras chave: análise discriminante, redes neurais artificiais, medicamentos veterinários.

*Orientador: Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes, Dr. UESB e Co-orientadores: Sibelli Passini Barbosa Ferrão, Dr^a. UESB e Leandro Soares Santos, Dr. UESB.

ABSTRACT

SANTANA, V. R. Validation of the methodology for detection and quantification of Ivermectin in cow's milk using Fourier transform infrared spectroscopy with attenuated total reflectance (FTIR-ATR). Itapetinga, BA: UESB, 2016. 75. p. Dissertation. (MSc in Food Science and Engineering, Food Sciences Concentration Area).

Originally the Ivermectin (IVM) are from the Avermectin group and the Mactrocyclic Lacton family and are routinely used in animal production as anti-parasitic agents (endo and ecto). Like other medicines, their residues in the milk are officially controlled. This study was developed for the know a current knowledge of the reality of milk production, the use of IVM in dairy animals and the control of its residues in milk, besides the use of spectroscopy associated to chemometric analysis in food evaluation. For the detection and quantification of Ivermectin in milk it is officially used the High-Performance Liquid Chromatography. This technique is time consuming, requires the use of many chemical reagents and the disposal of its residues, in addition, an unhealthy environment in the laboratories are created. Based on this information the necessity of a new techniques, that can mitigate these effects, was observed. Thus, Fourier transform infrared with attenuated total reflectance (FTIR-ATR) appears as technical that presents greater agility in the process, lower cost and has been used in food analysis. However, the use of FTIR-ATR for the detection of IVM in milk was not tested and filling this gap was our goal. We present in Chapter 1 the results of our study with the use of FTIR-ATR associated with chemometric in the detection of Ivermectin in milk. Milk from healthy cows that had not been treated with IVM was used in the study. The experimental design was developed to obtain the representative data of the spectra of adulterated milk with IVM (successive dilutions in milk), pure milk and standard of IVM (treatments). Principal component analysis results classified adulterated milk and pure milk distinctly. In the same sense, discriminant analyzes and artificial neural networks classified the samples into pure and adulterated milk. Based on the results, we indicate the use of FTIR-ATR spectroscopy as a screening test for IVM residues in milk.

Keywords: artificial neural networks, discriminant analyzes, veterinary medicine

I REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Introdução

Produzido em todo o território nacional, o leite representa um dos principais produtos da agropecuária brasileira, gerando emprego e renda no campo. Associado aos fatores de ordem econômica e social, tem-se fator nutricional, por ser este fonte de nutrientes necessários aos seres humanos.

A contaminação do leite representa riscos à saúde dos consumidores e estão relacionadas tanto a parâmetros microbiológicos quanto químicos. Os contaminantes microbiológicos originam-se em função das condições higiênicas de obtenção do leite assim como devido às condições sanitárias na ordenha e no cuidado com os animais. Por sua vez, as contaminações químicas ocorrem devido à presença de resíduos de medicamentos usados de forma inadequada, como as Avermectinas, utilizadas no combate a endo e ectoparasitas. As Avermectinas são um dos grupos da família da Lactonas Macrocíclicas, que possuem como destaque as Ivermectinas, usadas na sanidade animal.

Os medicamentos de uso veterinários são regulados pela ANVISA e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e são continuamente monitorados por estes órgãos. As técnicas utilizadas oficialmente utilizam a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (CLAE-FL) ou acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM/EM). Estas técnicas demandam maior tempo laboral, limitando assim o número de amostras a serem analisadas, usam reagentes químicos, gerando resíduos que causam danos ambientais e são equipamentos caros, contudo, são precisos.

Estudos são desenvolvidos para a criação de técnicas auxiliares à cromatografia líquida, que sirvam como testes de triagem, que serviriam para avaliar maior número de amostras, e indicando apenas as amostras positivas otimizando o controle de resíduos de medicamentos de uso veterinários no leite

Nesse contexto surge a Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier, técnica que realiza análises de forma rápida e eficiente de diversos materiais por meio da análise de espectros criados a partir da composição da amostra. Essa técnica vem sendo amplamente utilizada na indústria de alimentos e em laboratórios para realização do monitoramento da composição dos produtos e, conseqüentemente, viabilizar o controle de qualidade de alimentos.

Este estudo apresenta evidências positivas do uso da Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier na detecção de Ivermectina em leite associada à quimiometria, como ferramenta de controle de resíduos desta substância em leite.

1.2 A produção de leite

O leite é um dos principais produtos da agropecuária brasileira. Com produção aproximada de 35 milhões de toneladas de leite por ano, o Brasil ocupa a quarta posição no ranking mundial, perdendo apenas para Estados Unidos, Índia e China (FAO 2010; IBGE, 2015), importando ainda cerca de 130 mil toneladas de produtos lácteos, equivalente à 1,1 bilhão de litros de leite (ZOCCAL, 2016).

A produção de leite no Brasil ocorre de forma distribuída em todo o território nacional, com maior contribuição das regiões Sul e Sudeste, no entanto, o maior percentual de crescimento na produção de leite para o período de 2013/2014 ocorreu na região Nordeste, enquanto a região Sudeste teve um aumento inferior à média nacional (Tabela 1).

Tabela 1. Produção anual de leite por Região (1000 litros)

Região	2013	2014	Variação em 1 ano
Centro-Oeste	5.016.292	4.969.238	-0,9%
Sudeste	12.019.947	12.169.774	1,2%
Sul	11.774.331	12.200.824	3,6%
Norte	1.846.420	1.946.149	5,4%
Nordeste	3.598.250	3.888.286	8,1%
Total	34.255.240	35.174.271	2,7%

Fonte:IBGE, 2015.

Na região Nordeste, a Bahia é o estado que mais contribui na produção de leite anual, apesar disso, sua produtividade (L/vaca/ano) está abaixo da média da região e é a segunda menor entre estes estados, superando apenas a produtividade do Piauí (Tabela 2).

Tabela 2. Participação de cada estado na produção de leite na região Nordeste.

Estado	Quantidade (1000 L) 2013	Quantidade (1000 L) 2014	Varição 2013/2014	Produtiv. 2014 (L/vaca/ano)
Maranhão	385.880	393.030	1,9%	631
Piauí	82.542	79.957	-3,1%	571
Ceará	455.452	494.024	8,5%	851
Rio Grande do Norte	209.150	232.338	11,1%	904
Paraíba	157.258	170.479	8,4%	797
Pernambuco	561.829	656.673	16,9%	1.396
Alagoas	252.135	304.674	20,8%	1.887
Sergipe	331.406	345.020	4,1%	1.466
Bahia	1.162.598	1.212.091	4,3%	586
Total	3.598.250	3.888.286	8,1%	818

Fonte: IBGE, 2015.

Em função da demanda maior que a produção, o Nordeste é uma região importadora de leite, no entanto, há possibilidades de aumentar a produção de leite melhorando sua produtividade por meio de melhorias nas técnicas hoje empregadas, uma vez que, a região produz, atualmente, pouco mais de 10% do leite nacional (EMBRAPA, 2015).

A produção leiteira no país acompanhou o processo de urbanização e ao observar os municípios brasileiros, é incomum encontrar um deles que não tenha pelo menos uma vaca leiteira. E essa atividade leiteira é importante tanto para o desempenho econômico do país em relação a atender a demanda interna do produto, quanto para se tornar fornecedor no mercado internacional e principalmente por gerar empregos para os cidadãos (ZOCCAL et al., 2008; TRENNEPOHL, 2010).

1.3 O leite

A produção e a composição do leite são influenciados por diversos fatores, entre eles, é possível destacar fatores ambientais, genéticos, manejo, fase de lactação e a alimentação animal (AGANGA et al., 2002; CERDÓTES et al., 2004; RESTLE et al., 2004; NORO et al., 2006; ZANELA et al., 2006).

Segundo o Regulamento Da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), o leite é o produto obtido pela ordenha completa e ininterrupta, sob condições higiênicas, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 1997). O leite é um alimento complexo composto por água, glicídeos, proteínas, gorduras e minerais e, em função da sua importância nutricional, sendo, inclusive, a principal fonte de cálcio para a alimentação humana. O Ministério da Saúde recomenda que o leite ou seus derivados sejam consumidos diariamente em três porções (BRASIL, 2006).

A qualidade do leite está associada ao fator nutricional, rico em nutrientes necessários à saúde humana, assim como às características higiênico-sanitária, pois este pode conter agentes causadores de zoonoses e produtos químicos não naturais (PEREIRA, 2014).

No mundo, o consumo de leite e derivados tem aumentado entre 2 e 3% ao ano. Cinquenta por cento deste consumo tem ocorrido devido ao crescimento populacional mundial, e a outra metade devido ao aumento do consumo per capita, com expectativas, de crescimento contínuo da demanda mundial (IFCN, 2013)

A indústria de laticínios está entre as 4 primeiras atividades industriais alimentícias no Brasil, o que revela sua importância econômica, com estimativa de, aproximadamente, 10% de participação no faturamento total da indústria de alimentos do país. Na cadeia produtiva de leite, a indústria processadora é o elo mais forte e dinâmico e o maior responsável pelas transformações e alterações de posturas nos demais segmentos da cadeia (VIANA & FERRAS, 2007; CARVALHO, 2010).

1.4 Uso de medicamentos veterinários e segurança do leite

Animais que produzem alimentos, a exemplo de bovinos, comumente recebem tratamentos com medicamentos veterinários, como antiparasitários. Estes medicamentos podem deixar resíduos no leite e representam risco à saúde humana. No sentido de diminuir a contaminação do leite por medicamentos e ou agrotóxicos no leite, a FAO, juntamente com organismos de diversos países, criou o *CODEX Alimentarius*, que entre outras coisas, determina os limites máximos permitidos para os diversos agentes medicamentosos no leite e em outros alimentos.

Agências reguladoras nacionais e regionais estabelecem Limites Máximos de Resíduos (LMR) para cada medicamento com uso aprovado, seguindo o padrão do *CODEX Alimentarius*, os dados de monitoramento desses resíduos em leite são de grande importância para conhecer e avaliar a exposição humana a esses contaminantes por meio

dos alimentos (SILVA et al., 2014). A OMS/FAO designou o JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) como o comitê responsável pela avaliação e controle da IDA (Ingestão Diária Aceitável), que é expressa em $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso corpóreo, de aditivos alimentares, contaminantes e drogas veterinárias (JARDIM & CALDAS, 2009).

O número de medicamentos veterinários utilizados em animais de produção é expressivo, isso ocorre em função da sua importância econômica e essa prática pode resultar em resíduos desses medicamentos em produtos de origem animal, o que gera preocupação entre os consumidores, uma vez que, os possíveis riscos à saúde humana ocasionados pelo uso de medicamentos veterinários nos animais podem estar associados à presença de resíduos medicamentos veterinários nos alimentos e, esses podem ocorrer quando o uso dos medicamentos não observa Boas Práticas de Uso de Medicamentos Veterinários, em especial as especificações de uso (ANVISA, 2003; NETTO et al., 2005; CASELANI, 2014.)

Os animais destinados à produção de alimentos que recebem tratamento medicamentoso devem receber cuidados específicos, para inibir a ocorrência de resíduos dos medicamentos nos alimentos. Dessa forma, é necessário observar o período de carência que representa o tempo para que o contaminante atinja concentrações seguras no organismo do animal em tratamento. Este intervalo é o tempo entre a última administração da dose do medicamento e o momento permitido para o uso do alimento oriundo desses animais (SPINOSA et al., 2011; BRASIL, 1997).

Os resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos podem causar reações alérgicas, infecções diversas, alterações na microbiota intestinal além de efeitos carcinogênicos ou teratogênicos em função da exposição prolongada a estas substâncias (BOTSOGLOU & FLETOURIS, 2001; DOYLE, 2006). Entretanto, nem todos os medicamentos veterinários acarretam resíduos que provocam danos à saúde humana ou animal e, quando são nocivos, os problemas só ocorrem caso a quantidade de resíduo seja superior ao LMR permitido (BRASIL, 1999).

Visando avaliar e atuar na prevenção de riscos relacionados à contaminação do leite e outros alimentos por resíduos de medicamentos, foram criados no Brasil o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos (PAMvet) e o Programa Nacional de Controle de Resíduos de Contaminantes (PNCRC). O objetivo do PAMvet é promover o controle de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal para o consumo humano por meio de fiscalização e análises em amostras de todo o país, enquanto o PNCRC que é coordenado pelo

Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) trata-se de um programa de fiscalização baseado na análise de risco que visa monitorar os sistemas de produção e a qualidade dos produtos de origem vegetal e animal, ou seja, uma ferramenta de gerenciamento de risco (ANVISA, 2003; BRASIL, 2012).

O leite que apresenta resíduos de substâncias químicas é considerado fraudado e, por isso, impróprio para o consumo humano, pois não atende aos requisitos de qualidade necessários para que tenha padrão de qualidade considerado aceitável (FONSECA et al., 2001; VENTURINI et al., 2007; MENDES et al., 2008).

A preocupação por oferecer produtos de qualidade e que possam ser ingeridos pelo consumidor é um problema mundial, e assim, faz-se necessário a busca de detecções em produtos adulterados e com qualidade inferior no mercado (EGITO et al., 2006). Produtos adulterados geram inúmeros prejuízos para indústria processadora de lácteos, pois, essa alteração leva a uma redução dos produtos, redução de valor nutricional, bem como um risco a saúde dos consumidores devido a presença de substâncias nocivas, tais como: neutralizante de acidez, agentes antimicrobianos, reconstituintes de densidade, entre outras (CORTEZ et al., 2010; BRASIL, 2006).

Diversas técnicas de rotina são utilizadas para detecção de fraudes e novas metodologias estão sendo desenvolvidas em virtude da necessidade de respostas de diferentes tipos de adulteração que estão sendo utilizados (CORTEZ et al., 2010; BRASIL, 2006).

1.5 Avermectinas

As avermectinas, substâncias que pertencem ao grupo das Lactonas Macroclílicas (LM), são os anti-helmínticos mais utilizados na medicina veterinária que são, em sua maioria, produzidas a partir da bactéria *Streptomyces avermitilis*. Esses compostos agem sobre a membrana das células musculares dos nematoides causando danos irreversíveis com conseqüente paralisia e morte dos parasitos. As avermectinas atuam no controle de diversas espécies, tais como, *Dityocalus viviparus*, *Haemonchus contortus*, *Strongyloides spp.* e *Ascaris spp.*, adicionalmente, as avermectinas podem atuar também no controle de artrópodes como carrapato, piolhos, ácaros que causam sarnas e larvas de insetos (BURG et al., 1979).

As avermectinas foram descobertas em 1976, no entanto seu uso em animais só começou em 1981 com a utilização das ivermectinas, desde então, as avermectinas tem

sido utilizadas em diversos animais e seres humanos no controle de doenças parasitárias (VERCRUYSSSE & REW, 2002).

Essas substâncias são praticamente insolúveis em água e possuem alta lipossolubilidade, o que facilita que esses medicamentos se depositem no local onde foram aplicados por via subcutânea, essa deposição faz com que o medicamento permaneça no organismo do animal por período prolongado (LANUSSE & PRICHARD, 1993; NETTO et al., 2005).

As avermectinas podem ser classificadas, de acordo com características estruturais, em “A ou B”, “1 ou 2” e “a ou b”. As estruturas que possuem um grupo metoxila no carbono 5 são classificadas como avermectinas “A”, já as que possuem uma hidroxila nessa posição são classificadas como avermectinas “B”; quando possuem uma ligação dupla entre os carbonos 22 e 23, são classificadas como da série “1”, quando, nessa posição, ocorre uma ligação simples com um grupo hidroxila no carbono 23, são classificadas como sendo da série “2”; quando, no carbono 25, ocorre a presença do grupo sec-butil, a avermectina é classificada na série “a”, mas se, nessa posição ocorrer um grupo isopropil, é classificada como da série “b” (LUMARET et al., 2012; ÔMURA & CRUMP, 2004; CANGA, 2009).

O metabolismo das avermectinas ocorre principalmente no fígado e sua eliminação é feita por meio da bile no material fecal, na urina e nas glândulas mamárias dos animais em fase de lactação, podendo acarretar resíduos no leite por um período de até 28 dias após o tratamento (BALDANI et al., 1999).

As técnicas utilizadas para determinação de avermectinas no leite, de acordo com o MAPA, pelos seus laboratórios oficiais, que são os Laboratórios Nacionais Agropecuários, Lanagros, são CLAE-FL (Cromatografia líquida de alta eficiência – detecção de fluorescência) e CLAE EM/EM (cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial) (BRASIL, 2011).

A utilização de avermectinas no rebanho leiteiro apresenta o inconveniente de que essas substâncias causam níveis de resíduos prolongados no leite (SCHENCK & LAGMAN, 1999) e sua utilização no Brasil havia sido proibida em 2014, porém, a Instrução Normativa 6 de 27 de março de 2015 revoga a anterior, liberando a sua utilização (BRASIL, 2015).

No Brasil, os LMR de antiparasitários no leite são estabelecidos pela IN nº 11 de 22 de maio de 2012 que trata do Programa de Resíduos e Contaminantes em Carnes (Bovina, Aves, Suína e Equina), Leite, Pescado, Mel, Ovos e Avestruz e, segundo o

CODEX Alimentarius, a utilização das avermectinas deve estar dentro de um padrão aceitável, para isso, limita a ingestão diária admissível (IDA) para uso nos animais como mostra a (Tabela 3) (*CODEX*, 2015; BRASIL, 2012).

Tabela 3. IDA e LMR de avermectinas no leite.

Avermectina	LMR ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de leite)	IDA ($\mu\text{g}/\text{kg}$ peso corpóreo)
Abamectina	10	0 – 2
Doramectina	15	0 – 0,5
Ivermectina	10	0 – 1

Fonte: *CODEX Alimentarius* 2015 e BRASIL 2012

Segundo Ferreira e colaboradores (2012), pesquisas que de monitoramento de resíduos de medicamentos em leite realizadas entre 2000 e 2012 apontaram que, em 70% das amostras analisadas, foi confirmada a presença de avermectinas e, em vários casos, a presença desses contaminantes ocorreu em quantidades superiores a LMR.

1.5.1 Ivermectinas

Dentre o grupo das avermectinas, as ivermectinas se destacam, tendo sido o primeiro membro das LMs a ser comercializado e utilizado como antiparasitário em animais a partir de 1981. Esse medicamento é um composto que contém, no mínimo 80% de 22,23-diidroavermectina B1a, $\text{C}_{48}\text{H}_{74}\text{O}_{14}$, de peso molecular 875,1 g/mol e menos de 20 % de 22, 23-diidroavermectina B1b $\text{C}_{47}\text{H}_{72}\text{O}_{14}$, de peso molecular 861,1 g/mol, esses percentuais se referem à amostra de IVM na sua forma cristalina, sem etanol ou dimetilformamida (YATES et al., 2003; ÔMURA & CRUMP 2004; CANGA et al., 2009).

A IVM é o principal fármaco utilizado em animais no controle antiparasitário, essa utilização ocorre em função do amplo espectro de ação desse medicamento no combate a diversos nematoides, pois apresenta ação contra quase todas as espécies de nematoides gastrointestinais de importância patogênica e econômica em bovinos, entretanto, sua eficácia varia de acordo com o parasita alvo (CAMPBELL & BENZ, 1984; LANUSSE & PRICHARD, 1993), entretanto, a IVM.

O mecanismo de ação da IVM consiste no estímulo à liberação do neurotransmissor inibidor GABA (ácido gama-aminobutírico), sob o efeito do GABA, ocorre a inibição da neurotransmissão dos estímulos por meio da abertura dos canais de cloro permitindo o influxo de íons cloreto, esse processo promove a paralisia da

musculatura e morte do parasita, possibilitando a sua eliminação. Esses canais só ocorrem em invertebrados, por isso, a IVM só pode ser utilizada no controle de parasitas (CAMPBELL & BENZ, 1984; ARENA et al., 1995).

A Ivermectina apresenta alta lipossolubilidade, o que faz com que ela permaneça no organismo animal por períodos prolongados e que possibilita sua excreção por meio do leite (SUTHERLAND & CAMPBELL, 1990). A lipossolubilidade da IVM é a principal propriedade físico-química que explica a absorção da IVM por via subcutânea, uma vez que a pele pode ser considerada uma camada lipídica de várias camadas (BAGGOT & MCKELLAR, 1994).

De acordo com Silva e colaboradores (2012), quando utilizada, o prazo de carência da Ivermectina nos bovinos é de 122 dias, os mesmos autores ressaltam que não deve ser feito o uso desse medicamento em animais cujo leite se destina ao consumo humano. Entretanto, ocorre também o emprego da IVM contra parasitoses em humanos, essa prática vem se intensificando a partir da década de 1990 no controle a diversas doenças parasitárias, tais como oncocercose, strongiloides, ancylostomas, sarcoptes, carrapatos e piolhos (FERNANDES et al., 2001).

A matéria prima de IVM é constituída normalmente de isômeros estruturais que diferenciam em um grupamento CH_3 na ligação como o carbono 25 da estrutura (SANTOS, 2013). IVM é formada por grupos hidroxilas, metoxilas, lactona macrocíclica, anéis tetrahidropirano e tetrahydrofurano e ésteres e (Figura 1).

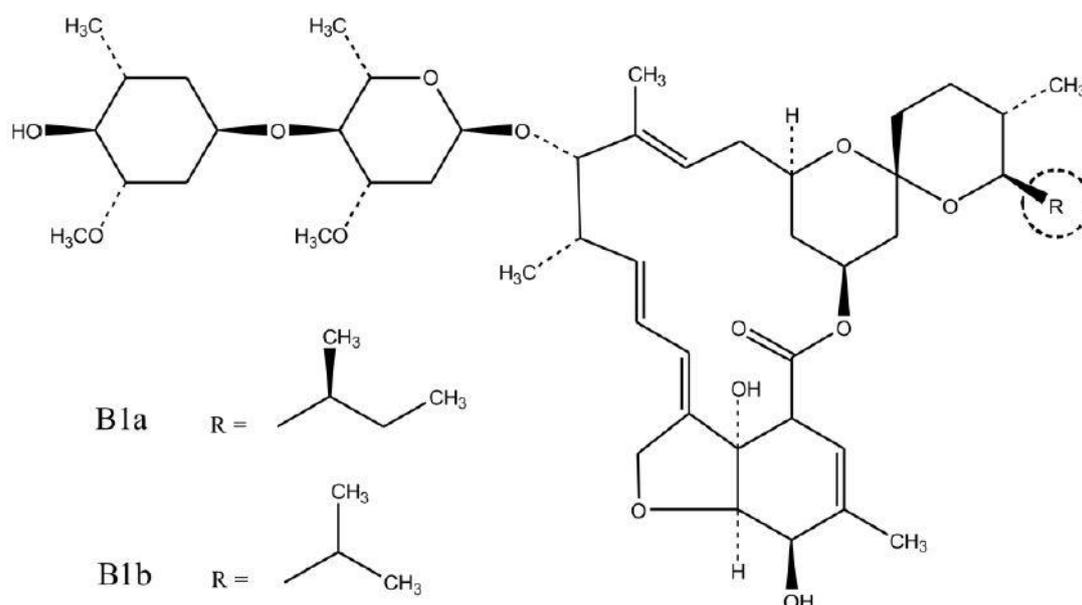


Figura 7. Estrutura Química da Ivermectina
Adaptado de CANGA et al., 2009; SANTOS, 2013.

Uma das dificuldades relacionadas à utilização dessa substância é a carência de orientação técnica. Esse problema já foi identificado em diversas propriedades rurais, o que evidencia o problema da utilização das ivermectinas (SILVA et al., 2012). O mesmo autor ressalta danos que podem ser causados por essa substância à saúde humana como, urticária, edema, dores de cabeça, tontura, náusea, vômito, diarreia e dores abdominais.

A metodologia utilizada no Brasil, sob recomendação da ANVISA, para a determinação de Ivermectina em leite é a Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (ANVISA, 2005). O controle de resíduos de IVM no leite no Brasil é realizado pelo PNCRC e o PAMVet. O relatório PAMVet, que realizava o levantamento, entre outras coisas, da ocorrência de resíduo de IVM no leite no Brasil, apontou em sua última publicação, elaborado entre 2006 e 2007, que das 600 amostras de leite analisadas em todo o Brasil, 43% delas apresentaram resíduo de IVM, ainda que abaixo do LMR (ANVISA, 2009).

1.6 Espectroscopia de Infravermelho

A espectroscopia no infravermelho é uma técnica versátil baseada na interação entre radiação eletromagnética e a matéria. A partir desta, é possível observar os níveis de energia de átomos ou moléculas observando os espectros obtidos na medida. No caso das moléculas, existem 3 níveis de energia que podem ser observados em regiões espectrais diferentes: eletrônicos, vibracionais e rotacionais. As transições eletrônicas são observadas na região ultravioleta ou visível, as vibracionais são observadas na região do infravermelho, já as rotacionais são observadas na região de microondas (SALA, 2008).

A região do infravermelho compreende entre a faixa superior da região de microondas e a faixa inferior da região ultravioleta ou visível, que compreende a faixa de frequência entre 10^2 e $0,8 \text{ Hz}$. Nesta região ocorrem as vibrações moleculares, no entanto, para que um modo vibracional seja ativo e realize absorção da radiação eletromagnética. Isso ocorre quando há variação no momento dipolo da molécula em estudo, ou seja, pelo menos 1 dos componentes, momento de transição, deve ser diferente de 0, esta é a regra de seleção da espectroscopia de infravermelho (STUART, 2004; BRUICE, 2006; SALA, 2008).

A radiação infravermelha foi descoberta em 1800 por Herschel e, por volta de 1900, Coblentz obteve espectros de absorção no infravermelho de grande número de compostos orgânicos em estado sólido, líquido e vapor, desde então, esta técnica vem

sendo utilizada para identificar um determinado composto, ou ainda, determinar a composição de uma amostra qualitativa e quantitativamente, trabalhando com componentes que apresentam ligações químicas, não sendo possível a análise de componentes monoatômicos (SALA, 2008; SALIBA et al., 2009).

A absorção de energia de radiação infravermelha por uma molécula orgânica acarreta a vibração dessa molécula, e promove a formação de bandas de um espectro que irá refletir estes movimentos vibracionais. A razão entre a energia transmitida e a energia recebida pela molécula é chamada de transmitância e o inverso do logaritmo decimal desta medida é a absorbância (Equação 1) (SILVERSTEIN et al., 1994; STUART, 2004):

$$A = -\text{Log}(T) = \text{Log} (1/T) \quad \text{Equação 1}$$

Em que:

A é a Absorbância e T é a Transmitância

As posições das bandas de um espectro podem ser expressas em números de onda (cm^{-1}) ou em comprimentos de onda (μm), por sua vez, as unidades de medida das intensidades de cada banda do espectro são expressas em percentual de Transmitância (%) ou Absorbância (A) e essa denominação depende do modo utilizado para a captação das informações para a geração do espectro (STUART, 2004; SALA, 2008).

As intensidades e energias das absorções na região do infravermelho são influenciadas por diversos fatores que podem contribuir para a ampliação e alternância das intensidades das bandas. As bandas do espectro eletromagnético podem ser alargadas em função da colisão entre as moléculas, no caso dos gases, do efeito Doppler, quando a radiação é deslocada para outra direção, além de existir uma relação direta entre o tempo de vibração e a largura da banda correspondente, uma vez que, quanto menor o tempo de duração de um estado vibracional, menos definida é a energia desse modo e, conseqüentemente, resultará no alargamento da banda de absorção deste espectro, o que é conhecido como Princípio da incerteza de Heisenberg (STUART, 2004; SALA, 2008).

Os modos vibracionais de uma molécula podem ser classificados de duas formas: deformações axiais (estiramentos) e deformações angulares. A deformação axial ocorre quando acontece a deformação no eixo da molécula, os comprimentos das ligações aumentam e diminuem sistematicamente provocando a vibração molecular. Por sua vez, a deformação angular consiste no movimento de um grupo de átomos em relação à molécula. As deformações angulares podem ocorrer de forma simétrica ou assimétrica e,

nos dois casos, pode ocorrer dentro ou fora do plano conforme apresentado na (Figura 2) (STUART, 2004).

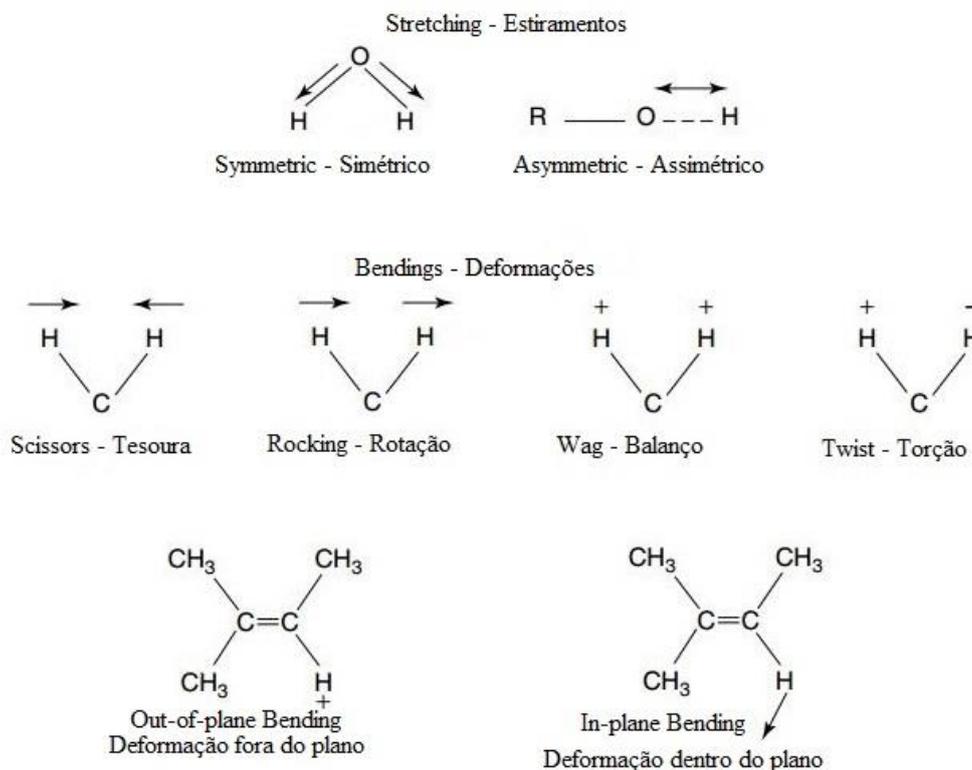


Figura 8. Modos Vibracionais

Fonte: Adaptado de STUART, 2004.

A quantidade de modos vibracionais de uma molécula varia de acordo com o tamanho da sua estrutura. Em uma molécula com um determinado número de átomos (N), existem $3N$ graus de liberdade, destes, 3 são dos movimentos de translação e 3 dos movimentos de rotação, portanto, $3N-6$ graus de liberdade vibracional, porém, moléculas lineares tem apenas 2 graus de liberdade rotacional, assim tem $3N-5$ graus de liberdade vibracional (Tabela 4).

Tabela 4. Graus de liberdade de moléculas poliatômicas lineares e não lineares.

Tipos de Graus de liberdade	Moléculas Lineares	Moléculas não lineares
Translacional	3	3
Rotacional	2	3
Vibracional	$3N-5$	$3N-6$
Total	$3N$	$3N$

Adaptado de STUART, 2004; SALA, 2008.

As regiões espectrais podem ser expressas por submúltiplos de metro, assim é comum encontrar em espectroscopia as medidas de Å, nm e µm que equivalem, respectivamente a 10^{-10} m, 10^{-9} m e 10^{-6} m. Apesar disso, as medidas mais comuns na área da espectroscopia são dadas em números de onda cm^{-1} que correspondem à quantidade de comprimentos de onda que estão contidos em 1 cm e tem a vantagem de apresentar linearidade com a energia, ou seja, é proporcional à energia do fóton. O número de onda é obtido por meio da relação entre a frequência e o comprimento de onda (Equação 2) (STUART, 2004; SALA, 2007; SALA, 2008).

$$\tilde{\nu} = 1/\lambda = \nu/c \quad \text{Equação 2}$$

Em que:

$\tilde{\nu}$ = número de onda;

λ = comprimento de onda da radiação no vácuo e

ν = frequência

c = velocidade da luz

A região do infravermelho eletromagnético pode ser dividida em três partes principais e a escolha da região a ser utilizada depende do tipo de amostra que se deseja avaliar, sendo que a região denominada de infravermelho médio é a de maior interesse para fins analíticos (MENDHAM et al., 2002; HOLLER et al., 2009.) (Tabela 5).

Tabela 5. Regiões do espectro eletromagnético e amostras a que se aplicam.

Região do espectro	Comprimento de onda µm	Número de onda cm^{-1}	Amostras a que se aplicam
Próximo (região das harmônicas)	0,8 – 2,5	12550 - 4000	Materiais comerciais sólidos ou líquidos e misturas gasosas
Médio (Região de vibração- rotação)	2,5 – 50	4000 – 200	Sólidos, líquidos ou gases puros, misturas complexas de líquidos, sólidos ou gases
Distante (Região de rotação)	50 – 1000	200 - 10	Amostras sólidas, líquidas e gasosas

Fonte: MENDHAM et al. (2002); HOLLER et al. (2009).

A identificação dos compostos presentes na amostra pode ser feita por meio da associação entre os grupos funcionais e a região do espectro em que cada um deles apresenta absorção da radiação eletromagnética para grupos funcionais (Tabela 6).

Tabela 6. Correlação entre as vibrações e as faixas espectrais.

Tipo de vibração	Atribuição	Frequência cm^{-1}
Estiramento C-H	Alcanos	3000-2850
	Alcenos	3100-3000
Torção fora do plano C-H	Alcenos	1000-650
Estiramento C-H	Alcinos	3300-3250
Estiramento C-H	Aromáticos	3150-3050
Torção fora do plano C-H	Aromáticos	900-690
C-H	Aldeídos	2900-2700
C=C	Alceno	1680-1600
C=C	Aromáticos	1600-1475
C≡C	Alcinos	2250-2100
C=O	Aldeídos	1740-1720
	Cetonas	1730-1700
	Ácidos Carboxílicos	1725-1700
	Ésteres	1750-1730
	Amidas	1700-1640
	Anidridos	1810-1760
	Cloreto ácido	1800
C-O	Alcoóis, éteres, ésteres, ácidos carboxílicos, anidridos	1300-1000
O-H	Ácidos carboxílicos	3400-2400
	Alcoóis e fenóis	3650-3600 e 3400-3200
N-H (estiramentos)	Aminas e amidas primárias e secundárias	3500-3100
N-H (torções)	Aminas e amidas primárias e secundárias	1640-1550
C-N	Amidas	1350-1000

Fonte: PAVIA et al. (2010).

A espectroscopia de infravermelho tem se tornado cada vez mais importante na análise qualitativa e quantitativa de materiais, pois é uma técnica que apresenta extensa

utilização em laboratórios analíticos industriais e laboratórios de pesquisa diversos (FIORINI, 2000). O uso da Espectroscopia no Infravermelho está de acordo com os conceitos políticos da química verde, que visa reduzir o tempo, custo e geração de resíduos das análises (FERREIRA, 2013).

Tradicionalmente desde meados de 1940 os aparelhos utilizados para a obtenção de espectros eram aparelhos dispersivos. Na análise por meio destes aparelhos, a radiação atravessa a amostra e é refletida por um sistema de espelhos, passa por fendas estreitas e seguem para um detector e, em seguida para um registrador. Este sistema apresenta fraca potência de radiação infravermelho, dificultando sua medição, necessita de grades de difração apuradas, a precisão é afetada pelo frequente desalinhamento do sistema óptico, alto valor em relação sinal ruído e é lento. Para resolver esse problema, iniciou-se o uso de instrumentos não dispersivos como o (FTIR) (FIORINI, 2000; STUART, 2004).

1.6.1 Espectroscopia Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) produz gráficos por meio da análise das amostras, identificando os componentes ali presentes e a informação dos espectros dessas amostras ocorre mais rapidamente quando comparado com outros instrumentos dispersivos (SALIBA et al., 2009; PAVIA et al., 2010; THERMO, 2016).

O FTIR tem como princípio o interferômetro de Michelson, sistema que consiste em um espelho fixo, um espelho móvel e um divisor de feixes (*beam-splitter*) que transmite metade da radiação para o espelho móvel e reflete a outra metade para o espelho fixo. Estes espelhos refletem os dois feixes para um divisor, onde são recombinados e passam pela amostra, que retém parte da energia, e em seguida pelo detector, dando origem a um interferograma. Após a geração do interferograma, este é submetido ao método matemático de transformação de Fourier, que converte os dados do interferograma em um espectro que relaciona a intensidade com a frequência (Figura 3) (FIORINI, 2000; STUART, 2004; PAVIA et al., 2010).

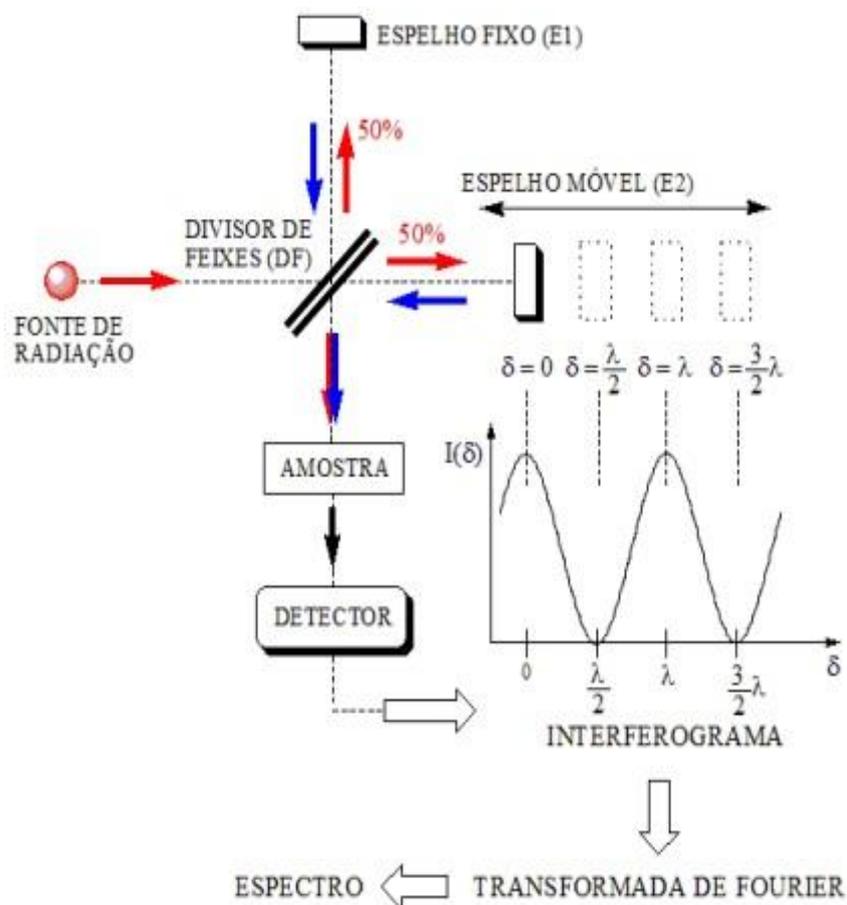


Figura 9. Esquema do caminho óptico de um feixe de luz IR no espectrômetro do FTIR
Fonte: RODRIGUES, 2012.

O espectro resultante da análise por meio do FTIR representa a absorção e transporte molecular, criando uma impressão digital molecular da amostra, com a presença de cada componente. Como não há uma mesma impressão digital para duas estruturas moleculares, estruturas diferentes não são capazes de produzir o mesmo espectro, isso faz com que a espectroscopia de infravermelhos seja utilizada para vários tipos de análise, apresentando vantagens como precisão e velocidade de análise (THERMO, 2016).

A transformação de Fourier é um método matemático que trouxe significativos avanços para a espectroscopia de infravermelho. Sua utilização propicia a redução do tempo de obtenção dos espectros permitindo adequar funções não periódicas como problemas de comunicações e processamento de sinais (STUART, 2004).

Dentre os métodos de análise por FTIR, o ATR tem provocado avanços nas análises de amostras sólidas e líquidas, pois não requer laborioso preparo de amostras e produz espectros reproduzíveis. Esse método, que está associado ao FTIR, utiliza o

fenômeno da reflectância total interna por meio de um cristal com alto índice de refração e baixo índice de absorção na região do infravermelho. O acessório ATR realiza as medições das mudanças que ocorrem no feixe de radiação infravermelha ao entrar em contato com a amostra. Quando o feixe de radiação passa do cristal para a amostra, ocorre a reflexão. A fração do feixe de luz incidente que é refletida aumenta conforme aumenta o ângulo de incidência, e quando excede um determinado ângulo crítico (α) a reflexão é completa. Essa técnica pode ser utilizada na análise pastas, adesivos e pós que não podem ser analisados como pastilhas ou filmes (STUART, 2004; SOUZA, 2009).

Quando comparado aos instrumentos dispersivos, o FTIR apresenta algumas vantagens, dentre estas, as principais são: vantagem de Fellgett, vantagem de Jacquinot e a vantagem da velocidade (STUART, 2004).

A vantagem de Fellgett ou vantagem de multiplexação refere-se ao fato de que este sistema oferece a melhor relação sinal/ruído por unidade de tempo proporcional à raiz quadrada do número de resolução dos elementos que estão sendo monitorados, isso possibilita que o detector receba todas as informações dos componentes durante a leitura do interferograma, isto resulta em melhor resolução dos elementos que estão sendo monitorados, uma vez que, a relação sinal/ruído é determinada pelo tempo de observação (VANASSE & SAKAI, 1967; STUART, 2004).

A vantagem de Jacquinot refere-se ao fato de que neste sistema ocorre menor perda luminosa entre o feixe da fonte e o detector, isto ocorre por que o FTIR não requer a utilização da fenda ou qualquer outro dispositivo de restrição que reduza a transferência da potência, assim, toda a energia emitida pela fonte passa pela amostra, o que resulta em ganho de energia no detector e aumento da razão sinal/ruído. O aumento da razão sinal/ruído resulta em melhores interpretação dos resultados e utilização dos dados (VANASSE & SAKAI, 1967; STUART, 2004;).

Além das vantagens de Jacquinot e Fellgett, a utilização do FTIR possibilita maior precisão da frequência, a luz dispersa não afeta o detector, uso de feixe mais amplo e obtenção mais fácil dos dados, maior velocidade do leitor, que permite monitoramento das amostras submetidas a rápidas mudanças, não submete as amostras a efeitos térmicos e emissões de radiação pela amostra não afetarão o espectro (FIORINI, 2000).

1.6.2 Aplicação da Espectroscopia de Infravermelho na indústria de alimentos

A indústria de alimentos vem utilizando a espectroscopia de infravermelho no controle de qualidade dos produtos. Na indústria de bebidas alcoólicas, a espectroscopia

de infravermelho tem sido utilizada na determinação de parâmetros das bebidas e licores (ARZBERGER & LACHENMEIER, 2008), na determinação de ácidos orgânicos em vinhos (REGMI et al., 2012), na caracterização e classificação de vinhos e bebidas destiladas (PALMA & BARROSO, 2002).

Em laticínios, já foi verificada a eficácia da técnica para análise de leite e derivados com a finalidade de avaliar a composição dessas amostras, além de detectar a presença de adulterantes nesses alimentos (IÑÓN et al., 2004, KAROUI & BAERDEMAKE, 2007), determinação de sólidos não gordurosos (BASSBASI et al., 2014), determinação de proteínas (KHER et al., 2007), composição físico química (ADLER et al., 2013), entre outros diversos trabalhos que vem utilizando a Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier na análise de leite e derivados lácteos (BUNACIU et al., 2016).

Hewavitharana e Brakel (1997) utilizaram o (FTIR) associado às técnicas quimiométricas, como a análise de regressão de mínimos quadrados parciais (PLS) e a regressão de componentes principais (PCR) para a quantificação rápida e direta de caseína no leite cru e os resultados foram satisfatórios.

Em um trabalho desenvolvido por Luiz e colaboradores (2014), com a finalidade de avaliar a qualidade do leite de maneira rápida (interessante para indústria), utilizou-se a Espectroscopia no Infravermelho Próximo com Transformada de Fourier (FT-NIR) associada à Análise de Componentes Principais (ACP) em amostras de leite pasteurizado tipo “A” integral homogeneizado comercializado na região de Juiz de Fora, Minas Gerais. Os resultados obtidos foram satisfatórios, pois as amostras pré-contaminadas foram facilmente detectadas. Ressaltando que a técnica multivariada (ACP) foi essencial para obtenção dos resultados.

Em análises de leite por FTIR, as vibrações moleculares decorrentes dos seus principais constituintes, gordura, proteínas e carboidratos, ocorrem em diferentes faixas espectrais apresentando bandas distintas em cada faixa conforme apresentado na Tabela 7.

Tabela 7. Regiões espectrais do leite em FTIR.

Número de onda (cm⁻¹)	Grupo Funcional	Associação	Modo Vibracional
3438	OH	Água	Estiramento simétrico
2920	CH ₂	Lipídeos	Estiramento assimétrico
2850	CH ₂	Lipídeos	Estiramento simétrico
2350	CH ₂	Lipídeos	Estiramento Simétrico
1747	C = O	Lipídeos	Estiramento simétrico
1660 – 1650	Amida	Proteína	Estiramento
1547 – 1541	Amida	Proteína	Deformação angular
1241	Amida	Proteína	Estiramento
1160	C - O	Lipídeos	Estiramento
1150 – 1030	(C – O) (C – C) (C – O – O)	Carboidratos	Estiramento
1000 – 800	Anel de vibração	Carboidratos	Deformação angular
722	(CH ₂) _n	Lipídeos	Deformação angular
700	N – H	Proteína	Deformação angular

Fonte: STUART, 2004; AERNOUTS, 2011.

Por meio da associação entre a faixa espectral onde ocorrem as vibrações moleculares que resultam em absorção da radiação infravermelho e as funções orgânicas que as provocam, é possível identificar e quantificar os compostos do leite. Utilizando esta técnica, Heuer e colaboradores (2001) realizaram estudo da composição do leite avaliando a presença de cetona na amostra (Figura 4).

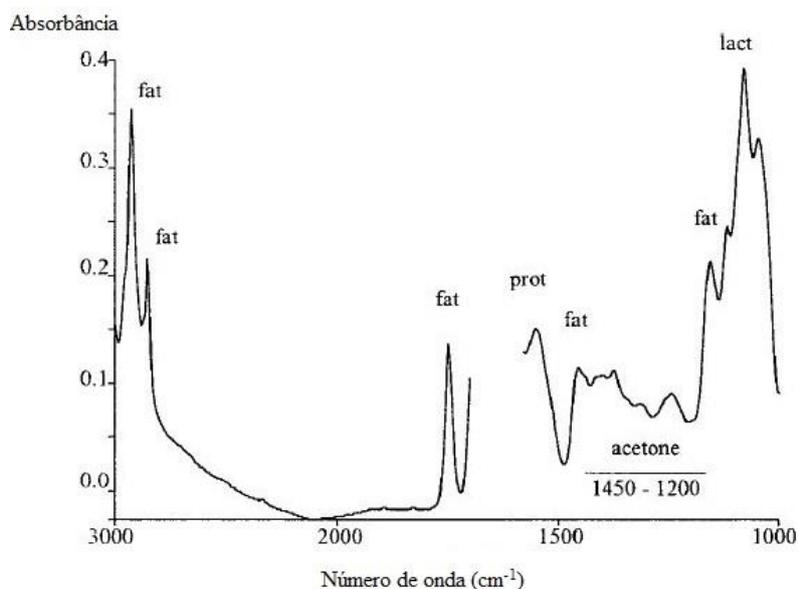


Figura 10. Espectro do Leite por FTIR.

Fonte: HEUER, 2001

1.7 Quimiometria

O uso de computadores para analisar dados químicos foi crescente nos últimos anos e a aquisição de dados, principalmente na área analítica passou a produzir grande quantidade de informações, muitas vezes complexa e variada, atingindo um número elevado de variáveis que podem ser medidos em uma única amostra, como exemplo, é possível citar as medidas de absorção em milhares de comprimentos de onda que são registrados em um espectro. De posse de tal quantidade de dados, surgiu a necessidade de ferramentas mais precisas para tratá-los, o que deu origem à Quimiometria que destina-se à análise de dados químicos de natureza multivariada com uso de ferramentas vindas da matemática, estatística e informática (FERREIRA et al., 1999).

Análise multivariada de dados se refere a um conjunto de técnicas estatísticas que permitem a análise simultânea de múltiplas variáveis, desse modo, qualquer técnica que tenha como objetivo analisar duas ou mais variáveis pode ser considerada, a princípio, como multivariada, no entanto, para que a análise seja considerada realmente como multivariada, todas as variáveis devem ser aleatórias e inter-relacionadas entre si, dessa forma, seus efeitos não podem ser interpretados separadamente (HAIR JÚNIOR et al., 2009).

A escolha dos métodos multivariados se dá a partir dos objetivos a serem alcançados durante pesquisa. Sabe-se que a análise multivariada gera hipóteses e não criam confirmações sobre o conjunto de dados, pois é uma análise exploratória de dados.

Entretanto, algumas vezes pode ser utilizada para confirmação dos eventos (HAIR JÚNIOR et al., 2009).

Segundo Ferreira, 1996, os objetivos gerais, para os quais a análise multivariada conduz são:

- Redução de dados ou simplificação estrutural: o fenômeno sob estudo é representado da maneira mais simples possível, sem sacrificar informações valiosas e tornando as interpretações mais simples;
- Ordenação e agrupamento: agrupamento de objetos (tratamentos) ou variáveis similares, baseados em dados amostrais ou experimentais;
- Investigação da dependência entre variáveis: estudos das relações estruturais entre variáveis muitas vezes é de interesse do pesquisador;
- Predição: relações entre variáveis devem ser determinadas para o propósito de predição de uma ou mais variável com base na observação de outras variáveis;
- Construção e teste de hipóteses.

Segundo Regazzi (2000), as técnicas de análise multivariada foram desenvolvidas para resolver problemas específicos, principalmente de Biologia e Psicologia, porém, podem ser também utilizadas para resolver outros tipos de problemas em diversas áreas do conhecimento.

1.7.1 Análise de Componentes Principais

A ACP é uma técnica ou uma formulação matemática utilizada na redução da dimensão de dados com menor perda possível da informação (JOLLIFFE, 1986). A análise de componentes principais visa explicar a estrutura de covariância por meio de poucas combinações lineares das variáveis originais do estudo, sendo que, essencialmente, o número de componentes principais é igual ao número de variáveis estudadas. Os componentes principais são gerados em ordem decrescente de variância, assim, o componente principal 1 possui maior informação estatística que o componente principal 2 e assim sucessivamente. Esta técnica tem como principais objetivos reduzir o número de variáveis e facilitar a interpretação das análises realizadas (FERREIRA, 1996; NETO & MOITA, 1998; HAIR JÚNIOR et al., 2009).

Cada componente principal apresenta propriedades importantes, tais como: são independentes entre si, representam em ordem decrescente o máximo de informação, em termos da variação total contida nos dados e são formados por meio uma combinação

linear de todas as variáveis originais (NETO & MOITA, 1998; VARELA, 2008). O sistema de coordenadas que dá origem aos componentes principais baseia-se na combinação entre autovetores e autovalores conforme a Equação 3 (MINGOTI, 2007).

$$CP_i = a_{i1} Z_1 + a_{i2} Z_2 + a_{i3} Z_3 + \dots + a_{i,n} Z_n \quad \text{Equação 3}$$

Em que: CP é a componente principal; a corresponde aos autovetores, que são fatores de ponderação que define a contribuição de cada variável para uma CP numa combinação aditiva e linear e Z, os autovalores, que representam a variância de cada CP.

A ACP é uma técnica não supervisionada, portanto, não pode ser usada para prever o comportamento de uma nova amostra. Ao inserir uma nova amostra no conjunto de dados, é necessário que um novo modelo seja construído (MASSARD et al., 1998). Este conjunto de dados é composto por n amostras e p variáveis inerentes a cada elemento amostral (HOTELLING, 1933).

Em vista disso, a ACP é uma técnica estatística empregada para identificar um pequeno número de aspectos que podem ser úteis na identificação de uma possível relação entre um conjunto de muitas variáveis correlacionadas entre si. Também estimando a maior correlação existente entre as variáveis (MAROCO, 2007).

O objetivo desta técnica é explicar a variância e covariância dos vetores, composto por variáveis, por meio do cálculo das CP's (MINGOTI, 2007). Desta forma, a tarefa do pesquisador que trabalha com estatística multivariada é interpretar a distribuição dos pontos no gráfico de componentes principais e identificar as variáveis originais com maior peso na combinação linear das componentes principais mais importantes (NETO & MOITA, 1998).

1.7.2 Análise Discriminante

A Análise Discriminante (AD) é um método utilizado para identificar as variáveis que discriminam os grupos e, assim, quando há uma nova observação é capaz de prever e distinguir qual o grupo mais adequado a que ela deverá pertencer, de acordo com suas características. Para que o objetivo desta técnica seja alcançado, a AD gera funções discriminantes ou combinações lineares que aumentam a distinção dos grupos relatados pelas variáveis dependentes (FÁVERO et al., 2009). Essa técnica é utilizada para separar amostras em grupos distintos, de acordo com características já conhecidas (REIS, 2001).

A AD é uma ferramenta utilizada para indicar as variáveis que discriminam naturalmente dois ou mais grupos. A análise discriminante dispõe de alguns objetivos como, identificar as variáveis que melhor se diferenciam entre dois ou mais grupos, utilizar as variáveis para criar uma função discriminante que represente de forma ponderada as dissimilaridades entre os grupos e aplicar a função discriminante para classificar novas amostras nos grupos (MAROCO, 2007; MINGOTI, 2007).

Essa análise se torna eficiente quando ocorre baixa taxa de erro, ou seja, resulta em alta taxa de classificação das amostras (HAIR JÚNIOR et al., 2009). Segundo Johnson & Wichern (1999), para que haja menores erros, a regra de classificação deve levar em consideração as probabilidades e os custos de má classificação, além de observar as variâncias das populações se são iguais ou não. Pois, quando se assume que as variâncias das populações são iguais, as funções discriminantes são consideradas lineares e quando diferentes são consideradas quadráticas.

Os coeficientes das funções discriminantes são indicadores da importância ou da contribuição que as variáveis originais exercem para cada função discriminante. Ao obter a função discriminante ela é utilizada para dividir regiões de alocação, separando o conjunto de dados de acordo com a similaridade das amostras (REGAZZI, 2000).

Na utilização da AD, quando há um grupo de observações cujos componentes já são distinguidos eles são utilizados para estimar os pesos da função discriminante de acordo com alguns critérios, com a minimização dos erros de classificação (SUEYOSHI & GOTO, 2009). A Análise discriminante determina uma equação de regressão linear, que é utilizada para prognosticar o grupo que a amostra em estudo pertence (MINGOTI, 2007; SOUZA et al., 2009). A equação é apresentada da seguinte forma:

$$D = a + v_1X_1 + v_2X_2 + v_3X_3 + \dots + v_iX_i \quad \text{Equação 4}$$

Em que:

D é a função discriminante;

v é o coeficiente discriminante ou o peso atribuído a cada variável;

X é o escore das variáveis estudadas;

a é uma constante;

i é o número de variáveis preditoras.

1.8 Redes Neurais Artificiais (RNA)

A Rede Neural Artificial (RNA) pode ser compreendida como um grupo de neurônios artificiais interconectados entre si formando vários subgrupos de camadas (entrada, intermediárias e saída) em sua estrutura que são conectadas uma com as outras. RNA é capaz de acumular os conhecimentos adquiridos na aprendizagem (experiência) e disponibilizar esses conhecimentos para posterior utilização (HAYKIN, 1999).

O desenvolvimento da RNA teve como princípio o desejo de obter um sistema que executasse atividades inteligentes semelhantes às exercidas pelo cérebro humano. Uma importante vantagem das redes neurais é a sua capacidade de estabelecer as relações existentes dentro de um conjunto de dados experimentais, tendo eles tanto o comportamento linear como o não linear (RAI et al., 2005).

Perceptron Multi-Camadas (MLP) é uma das arquiteturas mais utilizadas nas redes neurais artificiais. A topologia desse tipo de RNA consiste em uma camada de entrada, uma ou mais camadas ocultas/intermediárias e uma camada de saída. Uma ou duas camadas intermediárias são bem sugeridas na maioria dos estudos (VILLIERS et al., 1993). De acordo com Hornik e colaboradores (1989) isso ocorre devido ao fato de que os resultados podem ser os mesmos ao aumentar o número de neurônios na camada escondida ou aumentar o número de camadas escondidas.

A Figura 5 mostra um exemplo de uma rede de com duas camadas intermediárias ou escondidas, tipicamente utilizada na resolução de vários problemas complexos. É nessas camadas que ocorre a extração de informações dos dados, estabelecendo as relações existentes entre os dados de entrada e os dados de saída.

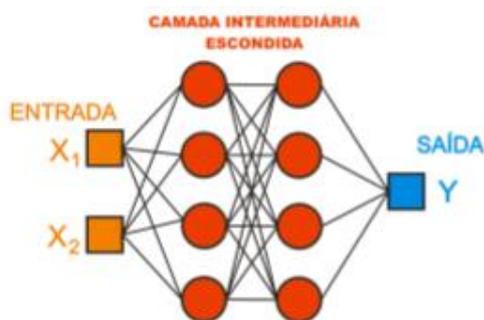


Figura 11. Rede com dois neurônios na camada de entrada, quatro neurônios em cada camada intermediária e um neurônio na saída.

Fonte: GARCIA, 2004.

As RNA's têm sido aplicadas com sucesso em várias áreas de pesquisa química, matemática, engenharia, medicina e psicologia devido a uma boa adaptação em diversos campos de pesquisa e aos bons resultados apresentados (RAMADHAS et al. 2006).

O algoritmo *Backpropagation*, também conhecido como retropropagador do erro, é um algoritmo de aprendizado supervisionado que utiliza a técnica de gradiente descendente para atingir o seu objetivo que é minimizar a função de erro entre a saída real e a desejada. É muito utilizado na topologia de redes neurais *feedforward* com algoritmo de aprendizagem, pois é capaz de resolver muitos problemas de reconhecimento de padrões (BRAGA et al., 2007).

Segundo Haykin (2001) durante a fase de treinamento do algoritmo *Backpropagation* duas etapas são estimuladas para cada padrão de entrada apresentado, sendo que uma consiste no processamento para a frente e a outra no processamento para trás. Na primeira etapa ocorre um fluxo das unidades de entrada em direção as de saída e os pesos sinápticos permanecem sem alteração. Posteriormente, a função de ativação é aplicada e assim os neurônios de saída são produzidos. Após a produção dos neurônios da camada de saída, o algoritmo *Backpropagation* inicia a etapa de treinamento para o padrão indicado. Duas condições são utilizadas como critério de parada da etapa de treinamento: número máximo de iteração estipulada pelo pesquisador e convergência da rede. Essa convergência se dá a partir do momento em que o somatório dos erros da camada de saída atinge um valor de erro aceitável para o problema em questão (DURÃES, 2009).

O treinamento de redes MLP utilizando o algoritmo *Backpropagation* possui uma sensibilidade relacionada a critérios de superfície de erro, e assim surgem dificuldades na convergência em regiões de baixo gradiente e de mínimos. Ao considerar os efeitos de segunda ordem no gradiente descendente, pode-se minimizar essa dificuldade. Outras possibilidades para ajudar no aceleração do algoritmo bem como reduzir os efeitos dos mínimos locais é utilizar taxas de aprendizado decrescente, usar um termo de momento durante desempenho da rede e adicionar ruído aos dados. (BRAGA et al., 2007).

O algoritmo *Resilient Backpropagation* foi criado com a finalidade de evitar e/ou corrigir os problemas encontrados no *Backpropagation*, ele possui uma taxa de aprendizagem dinâmica que é atualizada a cada conexão estabelecida entre os neurônios e assim diminui o erro de forma individual para cada neurônio (OLIVEIRA et al, 2015)

1.9 Referências Bibliográficas

- ADLER, A. A.; DAHL, A. V.; JENSEN, S. K.; THUEN, E.; GUSTAVSSON, A. M.; STEINSHAMN, H. Fatty acid composition, fat-soluble vitamin concentrations and oxidative stability in bovine milk produced on two pastures with different botanical composition. **Livestock Science**. v. 154. p. 93 – 102, 2013.
- AGANGA, A.A.; AMARTEIFIO, J.O.; NKILE, N. Effect of stage of lactation on nutrient composition of Tswana sheep and goat's milk. **Journal of Composition and Analysis**, v.15, n.5, p.533-543, 2002.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo – PAMVet**. Brasília, 2009.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo – PAMVet**. Brasília, 2005.
- ARENA, J. P.; LIU, K. K.; PARESS, P. S.; GRAZIER, E. G.; CULLY, D. F.; MROZIK, H.; SCHAEFFER, J. M. The mechanism of action of avermectins in *Caenorhabditis elegans*: correlation between activation of glutamate-sensitive chloride current, membrane binding, and biological activity. **The Journal of Parasitology**, v. 81, n. 2, p. 286-294, 1995.
- ARZBERGER, U.; LACHENMEIER, D. W. Fourier transform infrared spectroscopy with multivariate analysis as a novel method for characterizing alcoholic strength, density, and total dry extract in spirits and liqueurs. **Food Analytical Methods**. v.1, n. 1 p. 18-22, 2008.
- BAGGOT, J.D.; MCKELLAR, Q. A. The absorption, distribution and elimination of antihelmintic drugs: the role of pharmacokinetics. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. v. 17, n. 16, p. 409-419, 1994.
- BALDANI, L. A.; SOUSA, R. V. de.; MIGUEL, A. G. **Farmacologia dos principais antiparasitários de uso na medicina veterinária**. Universidade Federal de Lavras. Lavras, 1999.

- BASSBASI, M.; PLATIKANOV, S.; TAULER, R.; OUSSAMA, A. FTIR-ATR determination of solid non fat (SNF) in raw milk using PLS and SVM chemometric methods. **Food Chemistry**. v. 146. p. 250 – 254. 2014.
- BOTSOGLOU, N. A.; FLETOURIS, D. J. **Drug residues and public health. Part 2: Residues in food. In: Drug residues in food: pharmacology, food safety, and analysis**. Marcel Dekker. Nova Iorque p. 269- 298, 2001.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, **Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999**. Altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal - PNCR e os Programas de Controle de Resíduos em Carne - PCRC, Mel – PCRM, Leite – PCRL e Pescado – PCRP. Brasília, 1999.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Análise de Resíduos e Contaminantes em Alimentos**. Brasília, 2011
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº11, de 22 de Maio de 2012**. Subprograma de Monitoramento em Carnes (Bovina, Suína, de Aves, de Avestruz e Equina), em Leite, Ovos, Mel e Pescado do exercício de 2012, referente ao Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal – PNCRC. Brasília, 2012
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº11, de 22 de Maio de 2012**. Subprograma de Monitoramento em Carnes (Bovina, Suína, de Aves, de Avestruz e Equina), em Leite, Ovos, Mel e Pescado do exercício de 2012, referente ao Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal – PNCRC. Brasília, 2012.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria SDA No 22, de 07 de Abril de 2015**. Brasília, 2015.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto n. 2.244, de 4 de junho de 1997**. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal-RIISPOA. Brasília, 1997.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 06 de 27 de março de 2015**. Revoga a Instrução Normativa nº 13, de 29 de maio de 2014. Diário Oficial da União, Brasília, 2015.

- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006**. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Diário Oficial da União, Brasília, 2006.
- BRUICE, P. Y. **Química Orgânica**. 4 ed. São Paulo: Pearson/Prentice Hall, 2006.
- BUNACIU, A. A.; ABOUL-ENEIN, H.; HOANG, V. D. Vibrational spectroscopy used in milk products analysis: A review. **Food Chemistry**. v. 196, p. 877-884. 2016.
- BURG, R.W.; MILLER B.M.; BAKER E.E.; BIRNBAUM J.; CURRIE S.A.; HARTMAN R.; KONG Y.L.; MONAGHAN R.L.; OLSON G.; PUTTER I.; TUNAC J.B.; WALLICK H.; STAPLEY E.O.; OIWA R.; OMURA S. 1979. Biosynthesis; Chemistry; Mechanisms of Action and Resistance: Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 15, n. 3, p.361-367, 1979.
- CAMPBELL, W. C.; BENZ, G. W. Ivermectin: a review of efficacy and safety. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 7, n. p. 1-16, 1984.
- CANGA, A. G; PRIETO, A. M. S.; LIÉBANA, M. J. D.; MARTÍNEZ, M. F.; VEGA, M. S.; VIEITEZ, J. J. G. The pharmacokinetics and metabolism of ivermectin in domestic animal species. **The Veterinary Journal**, v. 179, n. 1, p. 25-37, 2009.
- CARVALHO, G. R. **A Indústria de laticínios no Brasil: passado, presente e futuro. Circular Técnica**. Embrapa Gado de Leite. Juiz de Fora, MG, Dezembro, 2010.
- CASELANI, K. Resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**. Umuarama, v. 17, n. 3, p. 189-197, 2014.
- CERDÓTES, L.; RESTLE, J.; ALVES FILHO, D.C. et al. Produção e composição do leite de vacas de quatro grupos genéticos submetidas a dois manejos alimentares no período de lactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.3, p.610-622, 2004.
- CERQUEIRA, M. M. O. P.; SOUZA, F. N.; CUNHA, A.F.; PICININ, L.C.A.; LEITE, M.O.; PENNA, C.F.A.M.; SOUZA, M.R.; FONSECA, L.M. Detection of

antimicrobial and anthelmintic residues in bulk tank milk from four different mesoregions of Minas Gerais State – Brazil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**; v.66, n.2, p.621-625, 2014.

CODEX Alimentarius Commission. **Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs in Foods**. Updated as at the 38nd Session of the Codex Alimentarius Commission (2015).

CORTEZ, M.A.S.; DIAS, V.G.; MAIA, R.G.; COSTA, C.C.A. Características físico-químicas e análise sensorial do leite pasteurizado adicionado de água, soro de queijo, soro fisiológico e soro glicosado. **Rev Inst Latic Cândido Tostes**. v. 65, n. 376, p. 18-25, 2010.

DOYLE, M. E. Veterinary drug residues in processed meats - potential health risk: A review of the scientific literature. **Food Research Institute** University of Wisconsin–Madison. 2006

DURÃES, R. L. **Validação de Modelos Baseados em RNA Utilizando Análise Estatística de Dados e Lógica**. Belo Horizonte: CEFET-MG, 2009, 35-36 p.

EGITO, A.S.; ROSINHA, G.M.S, LAGUNA, L.E.; MICLO, L.; GIRARDET J.M.; GAILLARD, J.L. Método eletroforético rápido para detecção da adulteração do leite caprino com leite bovino. **Arq Bras Med Vet. Zootec**. v. 58, n. 5, 2006.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Agropecuária. **Desafios para a produção de leite no Nordeste**. 2015. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/2697798/artigo-desafios-para-a-producao-de-leite-no-nordeste>>. Acesso em: 10 de maio de 2015.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Homepage da FAO, 2010. Disponível em: www.fao.org. Acesso em: 20 de janeiro de 2016.

FÁVERO, L. P.; BELFIORE, P.; SILVA, F. L.; CHAN, B. L. **Análise de dados: modelagem multivariada para tomada de decisões**. Rio de Janeiro: Elsevier, 646 p. 2009.

- FERNANDES, D. L. E. **Composição química e propriedades organolépticas do leite de cabra de raça Charnequeira**. Dissertação para obtenção do grau de mestre em Engenharia Alimentar e Processamento de Alimentos – Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, 2013.
- FERNANDES, J. B. V. D.; GORN, P. G. V.; MATAYOSHI, S. Tratamento da fitiríase palpebral com Ivermectina. **Arq Bras Oftalmol.** n 64, n. 2, p. 157-158, 2001.
- FERREIRA D. F. Análise multivariada. Lavras. **UFLA**. 394p. 1996.
- FERREIRA, D. S. **Aplicação de espectroscopia no infravermelho e análise multivariada para previsão de parâmetros de qualidade em soja e quinoa**. 2013. 119 f. Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.
- FERREIRA, G. R.; SPISSO, B. F.; HORA, I. M. DE C. DA, MONTEIRO, M. A.; PEREIRA, M. R.; COSTA, R. P.; CARLOS, B. DE S. Panorama da ocorrência de resíduos de medicamentos veterinários em leite no Brasil. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 19, n. 2, p. 30-49, 2012.
- FERREIRA, M.M.C.; ANTUNES, A.M.; MELGO, M.S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v.22, n. 5, p.724-731, 1999.
- FIORINI, E. DE J. **Fourier Transform Infrared Spectroscopy**. UNICAMP, 2000
- FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V.; PEREIRA, C. C. Qualidade higiênica do leite: efeitos sobre a qualidade dos produtos lácteos e estratégias de controle. In: Vilela D.; Martins, C. E.; Bressan, M.; Carvalho, L. A. (Ed.). Sustentabilidade da pecuária de leite no Brasil: qualidade e segurança alimentar. Goiânia: CNPq; Serrana Nutrição Animal; **Embrapa Gado de Leite**. p. 141-161, 2001.
- GARCIA, H.L.; ALVES J. P. H.; CARVALHO F. O. **Modelagem de processos de eutrofização em reservatórios usando a técnica de redes neurais**. In: XV Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Curitiba, Set, 2004.
- HAIR JÚNIOR, J. F.; BLACK, W. C.; BABIN, B. J.; ANDERSON, R. E; TATHAM, R. L. Análise multivariada de dados. 6ed. **Bookman**, 2009.

- HAYKIN S. **Neural networks: a comprehensive foundation**. New York: Prentice Hall, 1999.
- HAYKIN, S. **Neural Networks: A Comprehensive Foundation**, 2nd ed.. Prentice Hall: New Jersey, 2001.
- HEUER, C.; LUINGE, H. J.; LUTZ, E. T. G.; SCHUKKEN, Y. H.; VAN DER MAAS, J. H.; WILMINK, H.; NOORDHUIZEN, J. P. T. M. Determination of acetone in cow milk by Fourier transform infrared spectroscopy for the detection of subclinical ketosis. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 3, p. 575–582, 2001.
- HEWAVITHARANA, A. K.; BRAKEL, B. V. Fourier transform infrared spectrometric method for rapid determination of casein in raw milk. **Analyst**, v. 122, p. 701–704, 1997.
- HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6 ed. **Bookman**. 2. 2009.
- HORNIK K.; STINCHCOMBE M.; E WHITE H. Multilayer feedforward networks are universal approximators, **Neural Networks**, v. 2, n. 5, p. 359–366, 1989.
- HOTELLING, H.; Analysis of a complex of statistical variables into Principal Components. **The Journal of Education Psychology**, v 24, n. 6, p. 417-441, 1933.
- IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa Pecuária Municipal**, 2015
- IÑÓN, F. A.; GARRIGUES, S.; GUARDIÃ, M. de la. Nutritional parameters of commercially available milk samples by FTIR and chemometric techniques. **Analytica Chimica Acta**. v. 513, n. 2, 401-412, 2004.
- INTERNATIONAL FARM O COMPARISON NETWORK (IFCN), **11th IFCN Supporter Conference**. Kiel, Alemanha. 2013.
- JARDIM, A. N.O.; CALDAS E. D. Exposição humana a substâncias químicas potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para saúde. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1898-1909, 2009.

- JOHNSON, R. A.; WICHERN, D. W. Applied multivariate statistical analysis. 4th ed. Upper Saddle River, New Jersey: **Prentice-Hall**, 1999, 815 p.
- JOLLIFFE IT. **Principal component analysis**. New York: Springer-Verlag, 1986.
- KAROUI, R.; BAERDEMAEKER, J. DE. A review of the analytical methods coupled with chemometric tools for the determination of the quality and identity of dairy products. **Food Chemistry**. v. 102, n. 3, p. 621 – 640, 2007.
- KHER, A.; UDABAGE, P.; MCKINNON, I. MCNAUGHTON, D.; AUGUSTIN, M. A. FTIR investigation of spray-dried milk protein concentrate powders. **Vibrational Spectroscopy**. v. 44, n. 2, p. 375 – 381, 2007
- LANUSSE, C.E. y PRICHARD, R.K. Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. **Veterinary Parasitology**, v. 49 n. 2, p. 123 158, 1993.
- LOBATO, L.; RATH, S.; REYES, F. G. R. Ocurrence of ivermectin in bovine milk from the Brazilian retail market. **Food Additives and Contaminants**, v. 23, n.7, p. 668–673, 2006.
- LUIZ, L. C.; BELL, M. J. V.; ROCHA, R. A.; MENDES, T. O.; ANJOS, V. C. Análise de resíduos de diclofenaco sódico veterinário em leite por espectroscopia no infravermelho próximo. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**. v. 18, n. 3, p. 219 – 224, 2014.
- LUMARET, J. P.; ERROUISSI, F.; FLOATE, K.; RÖMBKE, J.; WARDHAUGH, K. A review on the toxicity and non-target effects of macrocyclic lactones in terrestrial and aquatic environments. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. v. 13, n. 6 , p. 1004-1060, 2012.
- MAROCO, J. Análise Estatística com utilização do SPSS. 3 Ed. Lisboa. **Edições Sílabo**, 2007.
- MASSARD, D. L.; VANDEGINSTE, B.G.M.; BUYDENS, L. M. C.; JONG, S. De, LEWI, P. J.; SMEYERS-VERBEKE, J. **Handbook of Chemometrics and Qualimetrics**. Parte B. Elsevier, 1998.

- MENDES, C. G.; SAKAMOTO, S. M.; SILVA, J. B. A.; LEITE, A. Í. Pesquisa de resíduos de beta-lactâmicos comercializado clandestinamente no município de Mossoró, RN, utilizando o delvotest sp. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 75, n. 1, p. 95-98, 2008.
- MENDHAM, J.; DENNEY, R. C.; BARNES, J. D.; THOMAS, M. J. K. Vogel: **Análise Química Quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro, LTC, 2002.
- MINGOTI, S.A. **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada**. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais. 295p. 2007.
- NETO, J. M. N.; MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, v. 21, n. 4, p. 467-469, 1998.
- NETTO, D.P.; LOPES, M. O.; OLIVEIRA, M. C. de S.; NUNES, M. P.; MACHINSKI JUNIOR, M.; BOSQUIROLI, S; L.; BENATTO, A.; BENINI, A.; BOMBARDELLI, A. L. de C.; VEDOVELLO FILHO, D.; MACHADO, E.; BELMONTE, I. L.; ALBERTON, M.; PEDROSO, P. P.; SCUCATO, E. da S. Levantamento dos principais fármacos utilizados no rebanho leiteiro do Estado do Paraná. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**. v. 27, n. 1, p.145-151, 2005.
- NORO, G.; GONZÁLEZ, F.H.D.; CAMPOS, R.; DÜRR, J.W. Fatores ambientais que afetam a produção e a composição do leite em rebanhos assistidos por cooperativas no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 1129-1135, 2006.
- OLIVEIRA, P. T.; BARBAR S. J.; SOARES S. A. **Predição do tráfego de rede de computadores usando redes neurais tradicionais e de aprendizagem profunda**. Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Faculdade de Computação, FACOM, 2015.
- ÕMURA, S.; CRUMP, A. The life and times of ivermectin - a success story.
- PALMA, M.; BARROSO, C. G. Application of FT-IR spectroscopy to the characterisation and classification of wines, brandies and other distilled drinks. **Talanta**. v. 58, n. 2, p. 265-271, 2002.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

- PEREIRA, J. A. **Efeitos da composição físico-química e higiênico-sanitária do leite na produção de queijo Minas**. 85 f. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2014.
- RAMADHAS, A. S.; JAYARAJ, S.; MURALEEDHARAN, C. PADMAKUMARI, K. Artificial neural networks used for the prediction of the cetane number of biodiesel. **Renew. Energ.**; v. 31, n. 15, p. 2524-2533, dec. 2006.
- REGAZZI, A.J. **Análise multivariada, notas de aula INF 766**, Departamento de Informática da Universidade Federal de Viçosa, v.2, 2000.
- REGMI, U.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Direct determination of organic acids in wine and wine-derived products by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and chemometric techniques. **Analytica Chimica Acta**. v. 732, n. 30, p. 137-144, 2012.
- REIS, E. **Estatística Multivariada Aplicada**. 2 ed. Lisboa. Edições Sílabo; Lisboa, 2001.
- RESTLE, J.; PACHECO, P.S.; PASCOAL, L.L. Efeito da pastagem, da produção e composição do leite no desempenho de bezerros de diferentes grupos genéticos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.3, p.691-703, 2004.
- RODRIGUES, L. N. **Espectroscopia por FTIR de variedades híbridas de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratados para a produção de etanol celulósico**. Dissertação (Mestrado em física). Universidade Federal de Juiz de Fora, 2012.
- SALA, O. Uma introdução à espectroscopia atômica – o átomo de hidrogênio. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1773-1775, 2007.
- SALA, O. **Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho**. 2 ed. São Paulo, UNESP, 2008. 276p.
- SALGADO, F. M. M. **O futuro do leite no Brasil: uma análise de ambiente da cadeia produtiva de lácteos**. 73 f. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.
- SALIBA E. O. S. de; OLIVEIRA M. C. de; FARIA E. P.; RODRIGUEZ N. M.; RIBEIRO L. G. P, BORGES I.; MOREIRA G. R. **Avaliação da concentração de amido na**

raiz de genótipos de mandioca através das técnicas enzimáticas, Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIV) e análise particular por difração a laser (Partica). 46^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Maringá- PR, pag.1-3, 2009.

SANTOS, F. C. M. D. **Estudo de Pré-formulação da Ivermectina: Caracterização e Estabilidade do Fármaco.** 102f. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.

SCHENCK, F.J.; LAGMAN, L.H. Multiresidue determination of abamectin, doramectin, ivermectin, and moxidectin in milk using liquid chromatography and fluorescence detection. **Journal of AOAC International**, v. 82, n. 6, p. 1340-1344, 1999.

SILVA, E. P.; SOUZA, J. R.; CALDAS, E. D. Resíduos de Medicamentos Veterinários em Leite e Ovos. **Química Nova**. v. 37, n. 1, p. 111-122, 2014.

SILVA, T. P. P.; MOREIRA, J. C.; PERES, F. Serão os carrapaticidas agrotóxicos? Implicações na saúde e na percepção de riscos de trabalhadores da pecuária leiteira. **Ciência e & Saúde Coletiva**, v. 17, n. 2, p. 311-325, 2012.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C. MORRILL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.** 5 ed. Guanabara Koogan S.A.; Rio de Janeiro, 1994.

SOUZA, R. M. ATR: Avanço da Espectroscopia de Infravermelho na Análise de Materiais Plásticos. **Boletim de Tecnologia e Desenvolvimento de Embalagens - ITAL**, v. 21, n. 3, 2009.

SOUZA, U. R.; SILVA, F. L. da, GRIFFITH, J. J.; LIMA, J. E. de, QUINTELA, M. C. A.; COSTA, E. C. V. Determinantes dos novos contratos de fomento florestal na mesorregião do vale do rio doce, Minas Gerais. **Árvore**, v. 33, n. 2, p. 377-386, Viçosa, 2009.

SPINOSA H.S.; GORNIAC S.L.; BERNARDI M.M. **Farmacologia aplicada à veterinária.** 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 918p. 2011.

STUART, B. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications.** John Wiley & Sons, 2004.

- SUEYOSHI, T.; GOTO, M. Methodological comparison between DEA (data envelopment analysis) and DEA-DA (discriminant analysis) from the perspective of bankruptcy assessment. **European Journal of Operational Research**, v. 199, n. 2, p. 561-575, 2009.
- SUTHERLAND, I. H.; CAMPBELL, W. C. Development, pharmacokinetics and mode of action of ivermectin. **Acta Leiden**, v. 59, n. 12, p. 161-168, 1990.
- THERMO. **Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry**. Thermo Nicolet, Madison, USA. Disponível em: http://www.niu.edu/analyticallab/_pdf/ftir/FTIRintro.pdf. Acesso em: 12 de março de 2016.
- TRENNEPOHL, D. **Avaliação da contribuição potencial das principais atividades agropecuárias para o desenvolvimento econômico da região noroeste do Rio Grande do Sul**. Tese (Doutorado em Desenvolvimento Regional) - Universidade de Santa Cruz do Sul, 2010.
- VANASSE, G. A.; SAKAI, H. **II Fourier Spectroscopy: In Progress in optics**. V. 6, p. 259-330, 1967.
- VARELA, C. A. A. **Análise Multivariada Aplicada as Ciências Agrárias: Análise de Componentes Principais**. UFRRJ. Seropédica, 2008.
- VENTURINI, K. S.; SARCINELLI, M. F.; SILVA, L. C. Da. **Características do leite**. Universidade Federal do Espírito Santo/Pró-Reitoria de Extensão, Programa Institucional de Extensão. (Boletim Técnico – PIE - UFES: 01007), Vitória, 2007. Disponível em <http://www.agais.com/telomc/b01007_caracteristicas_leite.pdf>. Acesso em 17 de março de 2015.
- VERCRUYSSSE J.; REW, R. S. **Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy**. CAB International, Wallingford, UK, 2002.
- VIANA, G.; FERRAS, R. Um estudo sobre a organização da cadeia produtiva do leite e sua importância para o desenvolvimento regional. **Revista Capital Científico do Setor de Ciências Sociais Aplicadas**, v. 5, n. 1, 2007.

- VILLIERS, J.; BARNARD E.; Backpropagation neural nets with one and two hidden layers, **IEEE Transactions on Neural Networks**, v. 4, n. 1, p. 136–141, Jan 1993.
- WALSTRA, P.; JENESS, R. **Química y física lactológica**. Acribia, 405 p. 1987.
- YATES, D. M.; PORTILL, O, V.; WOLSTENHOLME, A. J. The avermectin receptors of *Haemochus contortus* and *Caenorhabditis elegans*. **International Journal for Parasitology, Stuttgart**, v. 33, p.1183-1193, 2003.
- ZANELA, M.B. FISHER, V.; RIBEIRO, M. E. R.; STUMPF JUNIOR, W.; ZANELA, C.; MARQUES, L. T.; MARTINS, P. R. De G. **Qualidade do leite em sistemas de produção na região sul do Rio Grande do Sul**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.41. 2006.
- ZOCCAL, R. **Alguns números do leite**. Balde Branco, 2016. Disponível em: <http://www.baldebranco.com.br/alguns-numeros-do-leite/> Acesso em: 15 de outubro de 2016.
- ZOCCAL, R.; CARNEIRO, A. V.; JUNQUEIRA, R. ZAMAGNO, M. A nova pecuária leiteira brasileira. In: BARBOSA, S. B. P.; BATISTA, A. M. V.; MONARDES, H. **3º Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite**. Recife: CCS Gráfica e Editora, 2008. p. 85-95.

II OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar e validar a utilização do FTIR na detecção e quantificação de Ivermectina em leite.

2.2 Objetivos específicos

- Obter o espectro referência para o leite in natura sem adulteração por meio da espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR);
- Obter o espectro referência para da Ivermectina por meio da espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR);
- Criar e validar metodologia de utilização do FTIR associada a técnicas de análise multivariada e Redes Neurais Artificiais para a classificação de amostras em grupos que identifiquem a presença ou ausência de Ivermectina no leite.

III CAPÍTULO 1 - USO DA ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER COM REFLECTÂNCIA TOTAL ATENUADA (FTIR-ATR) ASSOCIADO A QUIMIOMETRIA COMO TESTE DE TRIAGEM PARA IVERMECTINA EM LEITE.

RESUMO

As Ivermectinas (IVM) são usadas rotineiramente na produção animal para tratamento de um amplo espectro de doenças parasíticas. O seu uso em vacas leiteiras pode deixar resíduos no leite, cujos níveis não devem ultrapassar, segundo o *Codex Alimentarius*, 10 µg/L. A principal técnica empregada na detecção da IVM em leite é a HPLC-FL, no entanto, esta técnica é laboriosa e exige o uso de reagentes químicos e equipamentos caros, o que dificulta o monitoramento de maior número de amostras. O objetivo do presente estudo foi utilizar a espectrofotometria no infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR-ATR) associada a técnicas multivariadas, a fim de superar as desvantagens ora apresentadas. Foram coletadas amostras de leite de 10 vacas sadias não tratadas com IVM durante três períodos. Estas amostras foram fracionadas e adicionado padrão de IVM, obtendo-se as seguintes concentrações: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20 µg/L de leite. Na região espectral entre 4000 a 600 cm⁻¹, foram observados no FTIR-ATR, 16 e 29 picos cujas absorbâncias máximas foram correspondentes às vibrações das ligações dos respectivos grupos funcionais presentes no leite e no padrão de IVM, respectivamente. As absorbâncias dos 45 picos foram inicialmente submetidas a Análise de Componentes Principais (ACP), que indicou redução de dimensionalidade de 45 para 16 variáveis de importância para o estudo. Observamos clara distinção na dispersão gráfica do CP1 e CP2A entre as amostras de leite puro, leite adicionado de IVM e padrão de IVM. Utilizando as 16 variáveis selecionadas na ACP realizou-se a classificação das amostras em leite adicionado de IVM e leite puro, utilizando-se a Análise Discriminante e as Redes Neurais Artificiais (RNA). Ambas as técnicas foram capazes de classificar corretamente 100% das amostras, mesmo quando estão presentes pequenas concentrações de IVM como 2 µg /L. A RNA quando utilizada para prever a concentração de IVM em leite não foi eficiente comprovado pelos valores de RMSE elevados e correlação não significativa entre os valores preditos pela rede e os experimentais. Assim, FTIR-ATR associado a técnicas multivariadas pode ser usado como teste de triagem de IVM em leite.

Palavras-chave: Triagem, Ivermectina, Leite, Espectroscopia

ABSTRACT

Ivermectin's (IVM) are routinely used in animal production and its use in lactating animals may leave residues in milk. Liquid chromatography is the main technique employed in the detection of IVM in milk; however, this technique is laborious and requires chemical reagents, which makes it difficult to monitor a greater number of samples. The goal of this study was evaluated the Fourier transform infrared with attenuated total reflectance (FTIR-ATR) associated with multivariate techniques as a screening test for IVM in milk. Milk samples from 10 healthy cows not treated with IVM were collected during three periods. These samples were fractionated and IVM standard added (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 and 20 $\mu\text{g/L}$ of milk). In the spectral region between 4000 and 600 cm^{-1} , 16 and 29 peaks were observed, whose maximum absorbance's corresponded to the vibrations of the respective functional groups (milk and IVM, respectively). The absorbance of the 45 peaks was initially subjected to Principal Component Analysis (PCA), which indicated reduction from 45 to 16 variables of importance for the study. We observed a clear distinction in the graphic dispersion (PC1 and PC2) between the samples of pure milk, milk added with IVM and standard of IVM. Using the 16 variables selected in the PCA, was carried out Discriminant Analysis and Artificial Neural Networks (ANN). Both techniques were able to sample classify (100%). Thus, FTIR-ATR associated with multivariate techniques can be used as a screening test for IVM in milk.

Key words: Screening, Ivermectin, Milk, Spectroscopy

1 INTRODUÇÃO

As Avermectinas (abamectinas, doramectinas, emamectinas, eprinomectinas, ivermectinas e selamectinas) são anti-helmínticos e ectoparasitas semi-sintéticos pertencentes às Lactonas Macrocíclicas usadas em animais e seres humanos, rotineiramente, e em sua maioria, produzidas a partir da bactéria *Streptomyces avermitillis* (WEISHER & BROWN, 2001; VERCRUYSSSE & REW, 2002). Neste grupo as Ivermectinas (IVM) se destacam. A IVM é um composto que contém, no mínimo 80% de 22,23-diidroavermectina B1a e menos de 20 % de 22, 23-diidroavermectina B1b (YATES et al., 2003; CANGA, et al., 2009; ESCRIBANO et al., 2012).

Na União Europeia, assim como Canadá, Estados Unidos e Japão resíduos de IVM em leite de animais para consumo humano não são permitidos. Por sua vez, o *Codex Alimentarius* indica como limite máximo de resíduos no leite (LMR) 10 ng·mL⁻¹, similar ao permitido no Brasil, enquanto a Austrália permite até 50 ng·mL⁻¹ (BRASIL, 1986; BRASIL, 2003; CERKVENIK-FLAJS et al., 2010; BRASIL, 2012; ESCRIBANO, et al., 2012).

As técnicas descritas para quantificação de IVM em leite, e em geral, são mais laboriosas, devido à complexidade da matriz, exigem pessoal treinado e equipamentos caros e usam muitos reagentes químicos (DANAHER et al., 2006; CERKVENIK-FLAJS, et al., 2010; ESCRIBANO et al., 2012), o que dificulta o monitoramento. Assim, buscando-se agilidade neste processo, testes de triagem para LM tem sido buscados em todo o mundo, contudo, os relatos indicam o uso da cromatografia líquida como teste de triagem (JEONG et al., 2012; WEI et al., 2015; OZDEMIR & KAHRAMAN, 2016), o que não resolve o problema da velocidade de avaliação de amostras e do uso de reagentes químicos.

A espectrometria de infravermelho tem sido usada em leite para caracterizar parâmetros nutricionais (IÑÓN et al., 2004; BASSBASI et al., 2014), adulteração por mistura de leite de distintas espécies (RECIO et al., 2004; NICOLAOU et al., 2010) entre outros usos (CAPUANO et al., 2014), porém, não tem sido usada no monitoramento de IVM.

As técnicas de determinação/quantificação de IVM, em geral cromatográficas, são trabalhosas, requerem maior tempo de análise e uso de reagentes químicos. Olhando para o futuro, testes de triagem auxiliarão o monitoramento desenvolvido por laboratório de

controle, atualmente desenvolvido em grande número de amostras, assim, estes se concentrarão em amostras que necessitam confirmação (TOLDRA & REIG, 2006). Assim, o uso de espectroscopia associada à quimiometria (técnicas estatísticas e matemáticas usadas para análise de informações químicas) tem se destacado na avaliação de alimentos, por sua facilidade, agilidade e baixo custo (NICOLAOU et al., 2010). Nesse sentido, propomos uma nova técnica que sirva como teste de triagem, possibilitando o aumento do número de amostras a serem confirmadas, sendo nosso objetivo o desenvolvimento/validação do uso de espectroscopia no infravermelho médio por transformada de Fourier na detecção de resíduos de Ivermectina em leite.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Origem das amostras

O leite foi obtido de vacas sadias, com adequado controle sanitário e grau de sangue zebuíno, em rebanho comercial da Fazenda Santo Antônio em Itapetinga – BA e que não receberam tratamento com Ivermectina (IVM). Para a análise de IVM, foi utilizado padrão de IVM Sigma Aldrich.

2.2 Delineamento experimental

Para a realização do experimento, foram coletadas amostras de 500 mL de leite de 10 vacas, no turno matutino, em 3 períodos distintos com intervalos de 1 semana, totalizando a coleta de 30 parcelas. Após homogeneização de cada amostra, foram retiradas alíquotas para diluições sucessivas até a obtenção das concentrações pré-definidas.

As amostras de leite cru sem IVM foram adulteradas com o padrão de IVM nas concentrações de: 0 (leite puro), 2, 4, 6, 8, 10 (limite máximo permitido), 12, 14, 16, 18 e 20 µg de IVM/L de leite em cada uma das parcelas, resultando em 30 amostras para cada tratamento, assim, 300 amostras de leite adulterado, 30 amostras de leite puro, além de 30 amostras de padrão de IVM.

2.3 Preparo das amostras

Após a adição de IVM às amostras, estas foram colocadas em eppendorfs identificados individualmente, cobertos com papel alumínio em toda a sua abertura e realizados diversos furos no papel para viabilizar a posterior liofilização e, após acondicionadas, as amostras foram congeladas à $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. O excedente do material não utilizado nos eppendorfs foi colocado em frascos plásticos, identificado

individualmente e armazenado sob as mesmas condições de congelamento mencionadas anteriormente, essa medida foi adotada como forma de garantir a reserva desse material em caso de dano ou perda das amostras liofilizadas.

Após o congelamento, as amostras de leite puro e leite adulterado com IVM foram liofilizadas à $-48\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ e 0,100 mBar por 24 horas em liofilizador de bancada, modelo FreeZone 4,5 L, marca Labconco (Kansas City, USA).

2.4 Análise espectrofotométrica vibracional

Os espectros das amostras de leite, IVM e do leite com as distintas concentrações de IVM foram determinados com o uso da espectroscopia por reflectância total atenuada acoplada, na região do infravermelho médio $4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ por transformada de Fourier (ATR-FTIR), em equipamento modelo Cary 630, marca Agilent (Santa Clara, USA). Os dados foram obtidos com uso do software Microlab e o Resolution Pro, marca Agilent (Santa Clara, USA), para posterior caracterização e comparação dessas amostras.

2.5 Caracterização e comparação dos espectros das amostras

Para a caracterização das amostras, os espectros dessas foram analisados de acordo com as características das bandas que constituíam cada um. A partir das características das bandas dos espectros, foram descritas as propriedades às quais estas se relacionavam e, a partir dessas informações, foi realizada a comparação dos espectros e, conseqüentemente, das amostras (Stuart, 2004).

2.6 Medidas de Dispersão e Padronização da Matriz de Dados

Para a Análise de Componentes Principais e Análise Discriminante, os dados originais dos espectros foram padronizados a partir do desvio padrão e do coeficiente de variação. Essa padronização consistiu na criação de nova variável (Y) de média equivalente a zero e desvio padrão igual 1, para a eliminação das diferenças entre as medidas das variáveis a serem estudadas (Equação 1).

$$Y = \frac{x-\mu}{\sigma}$$

Equação 5

Em que: Y = Variável padronizada; X = Variável original; μ = Média, e σ = Desvio padrão

2.6.1 Construção das matrizes de dados utilizadas nas técnicas multivariadas.

Os resultados das análises foram organizados em conjuntos de dados e, desses, foram construídas as matrizes que avaliariam os efeitos das variáveis (números de onda)

sobre as amostras. Para a separação das amostras foram construídas, inicialmente, 4 matrizes (A_1 , A_2 , A_3 e A_4) com X número de amostras (Leite, IVM ou leite adulterado com IVM) e Z número de variáveis, inicialmente igual a 45 (16 variáveis referentes ao leite e 29 referentes à IVM), que seriam reduzidas à medida em que fosse realizada a ACP, formando assim, as matrizes $X \times Z$.

A_1 consistiu em uma matriz 60x45, (30 amostras de leite e 30 amostras de padrão de IVM); A_2 consistiu em uma matriz 360x45, as 60 amostras anteriores somadas as 300 amostras de leite adulterado com IVM; A_3 consistiu em uma matriz 330x45, 30 amostras de leite puro, leite adulterado com IVM com níveis de 2 a 10 $\mu\text{g/L}$ (150 amostras) e leite adulterado com IVM com níveis de 12 a 20 $\mu\text{g/L}$ (150 amostras); A_4 consistiu em uma matriz 330x45, 30 amostras de leite puro e 300 amostras leite adulterado. Para todas as matrizes, os valores de Z correspondiam aos 45 números de onda onde ocorrem vibrações moleculares no leite ou na IVM. Os grupos de amostras utilizados em cada análise e as simbologias utilizadas estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos grupos usados nas análises de componentes principais (ACP), análise discriminante (AD) e Redes Neurais (RN).

População	Símbolo	Número de amostras	Inclusão de Ivermectina ($\mu\text{g/L}$)	Análises
Ivermectina	I	30	Padrão de IVM	ACP
Leite	L	30	0	ACP, AD e RN
Leite A	A	150	≥ 2 e ≤ 10 $\mu\text{g/L}$	ACP, AD e RN
Leite B	B	150	≥ 12 e ≤ 20 $\mu\text{g/L}$	ACP, AD e RN
Leite adulterado	C	300	≥ 2 e ≤ 20 $\mu\text{g/L}$	AD

2.7 Análise Estatística

2.7.1 Análise de Componentes Principais

Após o tratamento dos dados e obtenção das médias padronizadas conforme o item 2.6, as variáveis Y foram utilizadas para a ordenação de um novo sistema de coordenadas com eixos ortogonais (Equação 2).

$$CP_i = a_{i,1}Z_1 + a_{i,2}Z_2 + a_{i,3}Z_3 + \dots + a_{i,n}Z_n$$

Equação 6

Em que: $i = 1, 2, 3, \dots, n$, sendo:

CP_i : i-ésimo componente principal;

$a_{i,1}, a_{i,2}, a_{i,3}, \dots, a_{i,n}$, elementos do i-ésimo autovetor (a_i) normalizado, associado ao i-ésimo autovalor (Z_i) do i-ésimo componente principal (CP_i).

A partir dessa equação, foram obtidos os Componentes Principais (CP's) em ordem decrescente de variância, em que, o CP_i explica maior variação dos dados quando comparado a CP_{i+1} e assim sucessivamente. Essa ordenação possibilitou a redução do número de variáveis, inicialmente igual a 45. Para a seleção dos CP's, foram utilizados os critérios de Kaiser, onde foram selecionados os primeiros CP's que acumulam percentual de variância superior a 70% e autovalor maior que 1, conforme descrito em Jolliffe (1972) e Mardia e colaboradores (1979) que torna passível de descarte variáveis de forte correlação com CP's de menor autovalor (variância). Associados a esses critérios, foi definido que as variáveis seriam excluídas em função da classificação das amostras pelos CP's.

2.7.2 Análise discriminante

Funções matemáticas foram desenvolvidas para classificar as amostras da matriz A_3 (Y x Z), com 330 amostras (Leite, Leite A e Leite B) (Y) e 16 variáveis (Z) e A_4 também com 330 amostras, (Leite e Leite adulterado com IVM) e as mesmas variáveis (Z), selecionadas na análise de componentes principais. Os dados foram aleatorizados e divididos em dois grupos: um de treinamento (80%) e o outro de validação (20%) para cada grupo de amostras para obtenção da função discriminante linear, sendo que o último grupo verificaria a capacidade de generalização da função.

2.8 Redes Neurais Artificiais

2.8.1 Arquitetura e desenvolvimento das RNA's

Após coleta, os dados gerados foram normalizados e inseridos no *software Java Simulator Neural Network (Java NNS) – Java Neural Network Simulator 1.1* (Fischer et al., 2001), o qual é baseado no *SNNS - Stuttgart Neural Network Simulator*.

A rede escolhida para realização do presente trabalho foi a do Tipo *Perceptron de Múltiplas Camadas (MLP)* e o algoritmo utilizado foi o *Resilient Propagation* que possui uma taxa de aprendizado dinâmica facilitando o processo de aprendizagem. As arquiteturas das redes testadas é apresentada na Tabela 2.

Na primeira e na segunda camada escondida foram testados de 10 a 50 neurônios para que pudesse ser feita a escolha da melhor configuração. Para o desenvolvimento da rede foram observados o sistema e a taxa de aprendizagem. Rai e colaboradores (2005)

mostram que a taxa de aprendizagem auxilia na variação de pesos de conexão durante a constituição da rede, a faixa específica para essa taxa varia entre 0,05 e 0,75. A taxa de aprendizagem utilizada neste trabalho foi de 0,2.

Tabela 2. Arquiteturas das redes neurais utilizadas

Rede Usada	Rede Neural De Retropropagação	
	Classificação	Predição
Aprendizagem	Supervisionado	Supervisionado
Função de Ativação	Logística	Tangente Hiperbólica
Nº variáveis de entrada	16	16
Nº de camadas intermediárias	1 a 3	1 a 2
Nº de neurônios nas camadas intermediárias	10 a 100	10 a 50
Nº variáveis de saída	1	3
Sistema de Aprendizagem	<i>Resilient Propagation</i>	<i>Resilient Propagation</i>
Taxa de aprendizagem	0,2	0,2
Ciclos	100 a 300	100 a 300

2.8.2 Treinamento e Validação

2.8.2.1 Predição

O conjunto total de dados (330 amostras) foi dividido em dois conjuntos, aprendizagem e validação. Essa separação foi realizada empregando o modo aleatório e critério de mínimo e máximo. O primeiro conjunto com 80% dos dados (264 dados) foi utilizado para o treinamento da rede e o segundo conjunto com 20% dos dados (66 dados), foi utilizado para validação. Para a construção da rede, foram utilizados os escores das 16 variáveis selecionadas na ACP e utilizada na AD.

Os dados de entrada e de saída foram normalizados automaticamente pelo software usado (Equação 3) (NEURALWARE, 2000).

$$X_{i, norm} = \frac{x_i - x_{mín}}{x_{máx} - x_{mín}}$$

Equação 7

Em que $x_{i, norm}$ representa os dados normalizados; x_i , os dados experimentais; $x_{mín}$, o valor mínimo dos dados; $x_{máx}$, o valor máximo dos dados .

Os desempenhos das diferentes formações da RNA foram comparados de acordo com o coeficiente de correlação (R) entre dados de saída experimentais e preditos e raiz do erro quadrado médio (RMSE) (Equação 4). A correlação de aprendizagem e verificação de iterações dos RNA's criados foram calculados a partir de dados normalizados.

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_d - x_p)^2}$$

Equação 8

Em que n é o número de pontos de dados, e x_d e x_p são os valores experimentais e previstos dos níveis de contaminação das amostras testadas na rede: Leite, Leite A e Leite B, respectivamente.

2.8.2.2 Classificação

A rede neural artificial também foi utilizada para classificar os dados (Leite puro, Leite A e Leite B) que também foram separados em dois grupos (treinamento e validação). A entrada da rede foi constituída pelos dados originados no espectrofotômetro (FTIR), e a saída foi representada por um vetor multidimensional formado por uma matriz identidade, em que a dimensão corresponde a quantidade de grupos que compõem os dados utilizados, conforme a classificação a seguir:

(1,0,0) = Leite A

(0,1,0) = Leite B

(0,0,1) = Leite puro

Os conjuntos de dados, treinamento e validação, foram montados neste formato numérico, de modo que, cada amostra ao ser classificada corretamente teria o número 1 atribuído a ela e ao ser classificada erroneamente o número 0.

As redes foram testadas de forma a obter a que melhor se desempenhasse em relação ao menor RMSE (raiz do erro quadrático médio) obtido por meio da equação 4 e consequentemente a melhor taxa de classificação.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização e comparação das amostras de Ivermectina (IVM) e Leite

O espectro da Ivermectina (Figura 1) apresentou grande número de bandas estreitas, isto se deve ao tamanho da estrutura da Ivermectina (mínimo de 80% Ivermectina B1a – $C_{48}H_{74}O_{14}$ e máximo de 20% Ivermectina B1b – $C_{47}H_{72}O_{14}$) que apresenta diversas funções orgânicas, destacando-se grupos hidroxilas, metoxilas, anel tetrahydrofurano, anel tetrahydropirano, éteres, ésteres e álcoois, com ligações químicas que apresentam vibrações moleculares em diferentes faixas do espectro.

A formação de bandas estreitas e pontiagudas demonstrou que os modos vibracionais da IVM são bem definidos (STUART, 2004) e a predominância de bandas de pouca expressão nas faixas de 3150 a 3050, 1600 a 1475 cm^{-1} e 900 a 690 cm^{-1} evidencia a ausência de compostos aromáticos na estrutura da IVM (PAVIA,2010).

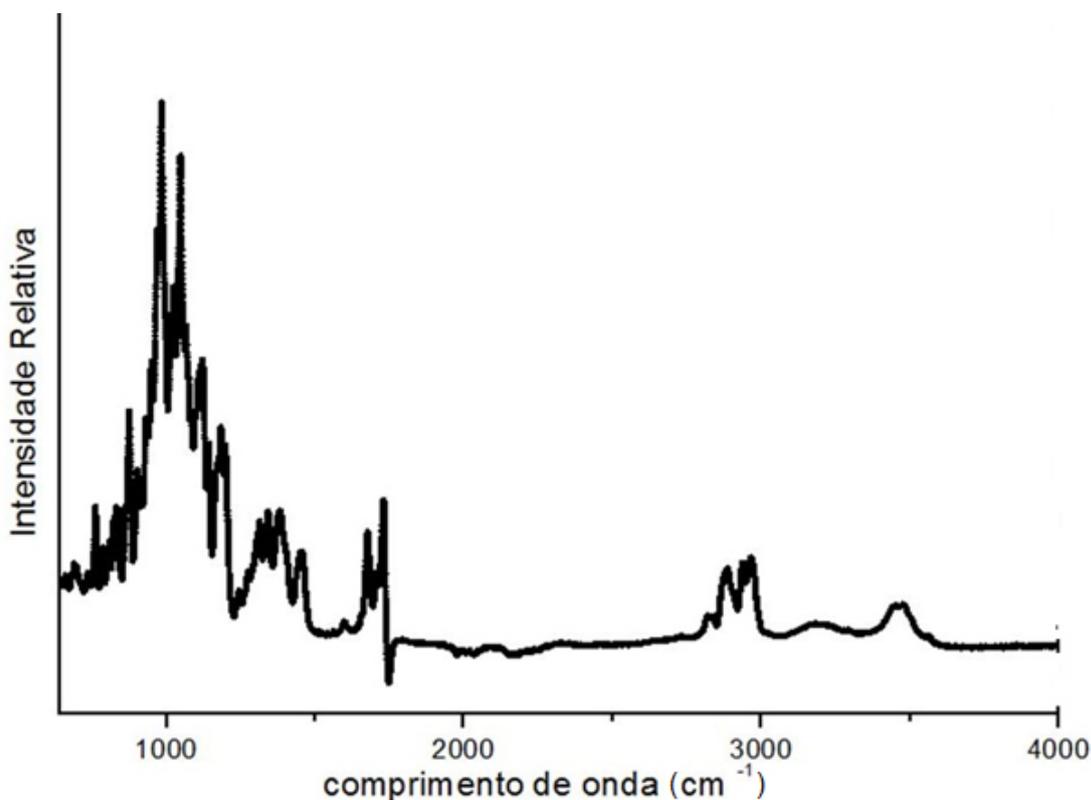


Figura 12. Espectro no Infravermelho da Ivermectina.

A análise das amostras de leite por FTIR, na região do infravermelho médio (4000 – 600 cm^{-1}) originou espectros com bandas características de gordura, proteína e lactose em diferentes faixas, observadas em 16 números de onda (Figura 2).

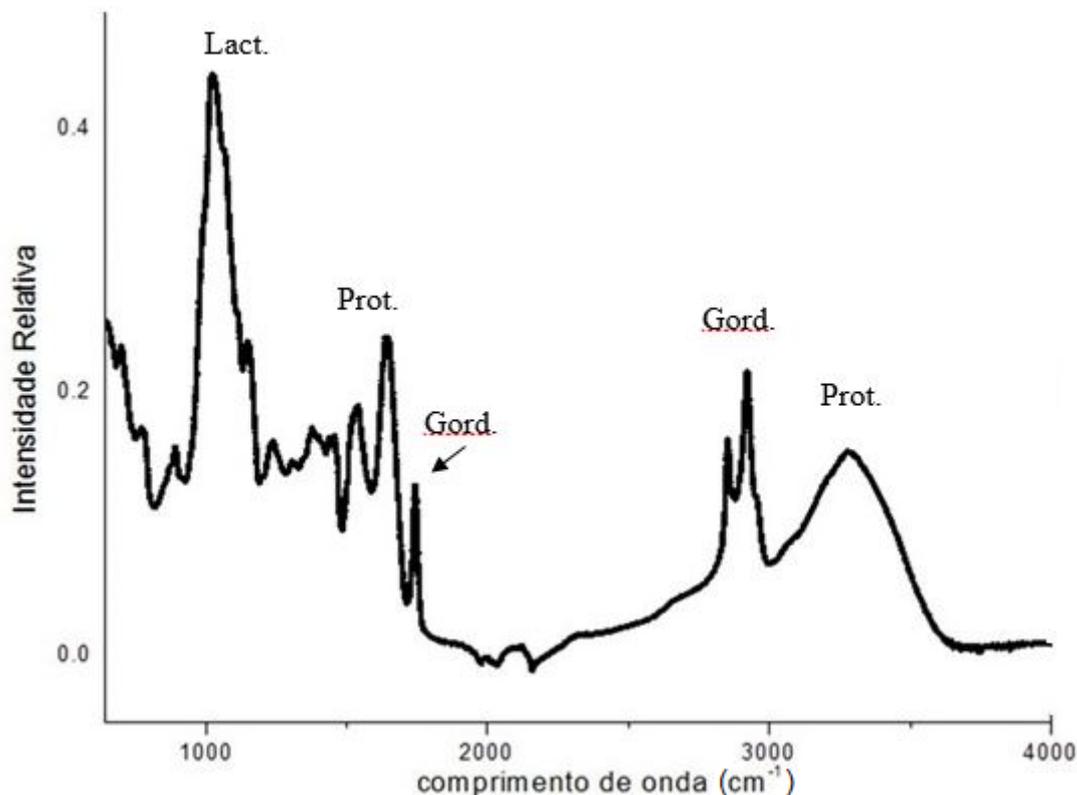


Figura 13. Espectro no Infravermelho do leite puro.

As bandas que caracterizam a gordura, ocorreram em função das vibrações das moléculas de ácidos graxos presentes em suas estruturas e apresentaram picos de absorção em 2919 e 2851 cm^{-1} (estiramento C=O), em 1742 cm^{-1} (estiramento C=O) e em 1458 e 1376 cm^{-1} (estiramento C-H) (HEUER, 2001; AERNOUTS, 2011; GRELET, 2015).

As vibrações características das estruturas das proteínas resultaram em bandas com picos de absorção em: 3278 cm^{-1} (Amida secundária - estiramento N-H), porém, nessa região espectral também ocorre vibração de estiramento do grupo O-H presente na água, com isso, é possível afirmar que a banda formada nessa região ocorre em função da presença de água e proteína; em 1647 cm^{-1} (Amida I - estiramento C=O), em 1541 cm^{-1} (Amida II - estiramento C-N e deformação angular N-H); em 1241 cm^{-1} (Amida III – estiramento C-N, deformação angular N-H, estiramento C=O e vibrações de deformação angular em O=C=N), em 768 cm^{-1} (Amida IV – estiramento O-C-N) e em 700 cm^{-1} (Amida V – deformação angular fora do plano N-H), (KONG & YU, 2007; AERNOUTS et al., 2011).

A lactose originou bandas nas regiões espectrais características das vibrações das moléculas de grupos carboxílicos presentes nas suas estruturas, com picos de absorção em 1148 cm^{-1} (estiramento C-O-C) e em 1023 cm^{-1} (estiramento C-O-C) (HEUER et al., 2001; GRELET et al., 2015).

A comparação dos espectros da Ivermectina e do Leite indica diferença entre eles, pois alguns picos são distintos (números de onda de máxima intensidade de absorção), assim como sua forma. Enquanto o leite apresenta bandas mais arredondadas, a IVM apresenta bandas mais estreitas, facilmente observado na faixa de 1150 a 750 cm^{-1} , onde se encontram bandas referentes à lactose, na faixa de 1737 a 1481 cm^{-1} , onde se encontram as bandas de gordura, e nas bandas de proteína, entre 2919 a 2851 cm^{-1} . Entretanto, apesar dessas diferenças, não foi possível encontrar uma banda no espectro da IVM fora das faixas onde ocorreram bandas no espectro do leite, o que impossibilitou a classificação de amostras de leite adulterado com IVM apenas pela identificação de uma banda distinta no espectro da matriz.

A avaliação dos pontos médios de máximas intensidades de absorção do Infravermelho nos espectros da IVM, leite e o leite adulterado ($10\mu\text{g/L}$ e $20\mu\text{g/L}$) demonstrou alterações em algumas regiões do leite adulterado em relação ao leite puro. Estas alterações foram observadas mais claramente nos seguintes pontos: 1457 cm^{-1} , associado à gordura; 3278 e 1647 cm^{-1} , associados à proteína; 1023 cm^{-1} , associado à lactose (Figura 3). Estas observações confirmaram que a presença da IVM no leite acarretou a ligação de componentes da IVM com os do leite, promovendo assim as alterações observadas no espectro e indicam a possibilidade de separação de amostras de leite puro e adulterado com IVM pelo método FTIR.

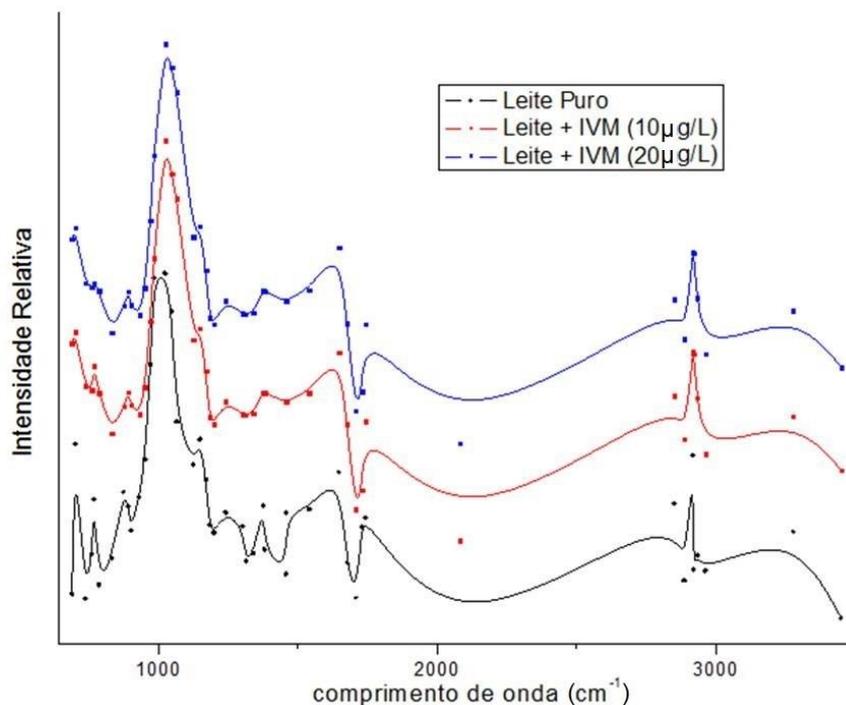


Figura 14. Médias dos pontos de máxima intensidade de absorção da Ivermectina, Leite e o leite adulterado (10µg/L e 20µg/L).

A razão de crescimento dessa intensidade de absorção evidencia que, quando presente no leite, apesar de não alterar o perfil do seu espectro, a IVM confere efeito aditivo a algumas dessas bandas que, por sua vez, apresentam intensidades de absorção alteradas.

Devido às pequenas diferenças visuais destacadas anteriormente no leite adulterado com IVM, as correlações dos espectros foram avaliadas com o uso de análises multivariadas como componentes principais (ACP), análise discriminante e redes neurais artificiais.

3.2 Análise Estatística Multivariada

3.2.1 Análise de Componentes Principais

O primeiro teste realizado de ACP avaliou as amostras de IVM e Leite. Como esperado, a ACP separou claramente essas amostras em 2 grupos (Figura 4a), confirmando a avaliação do espectro no infravermelho médio por transformada de Fourier, já destacada anteriormente. Nesta análise, a CP1 explicou a quase totalidade da variação dos dados (99,3%), enquanto CP2 explicou apenas 0,45%. As amostras de leite apresentaram correlação positiva com CP1, enquanto as amostras de IVM apresentaram correlação negativa, demonstrando assim a capacidade do CP1 separar o leite puro do

padrão de IVM. Para esta classificação, após a redução das variáveis, verificou-se que apenas 5 delas foram suficientes: 3278, 1647, 1541, e 1241 cm^{-1} (proteínas) e 1458 cm^{-1} (gordura), todas apresentaram correlação superior a 98% com o CP1, sendo indicados para explicar a separação da IVM do leite. Estas variáveis representam bandas características do leite, já que a Ivermectina não possui estas biomoléculas, o que indica a diferença entre elas. A lactose, apesar de não estar presente na IVM, não está entre as substâncias que diferenciam, dessa forma, o leite da IVM, pois nas faixas onde ocorrem bandas da lactose, também ocorrem bandas expressivas do espectro da IVM em função do estiramento C-O-C.

A ACP que avaliou as amostras de IVM, Leite e leite adulterado de 2 a 10 $\mu\text{g/L}$ (A) leite adulterado de 12 a 20 $\mu\text{g/L}$ (B) indicou a separação entre os tratamentos em 3 grupos: IVM, leite e leite adulterado. A análise não foi capaz de separar as amostras de leite adulterado por níveis de IVM (Figura 4b).

Esta análise indicou a redução de 45 para 23 variáveis que apresentaram alta correlação com CP1 que explica 76,1% da variação dos dados e, algumas com CP2, que explica 9,4% da variação, deixando clara a importância do CP1. Essas variáveis, que foram suficientes para a separação das amostras de IVM, Leite e leite adulterado, se referem a bandas características do leite: 3278 e 1458 cm^{-1} (gordura), 1647, 1541 e 1241 cm^{-1} (proteína); e variáveis relacionadas ao espectro da IVM: 3450, 2963, 2934, 2887, 1730, 1676, 1457, 1380, 1340, 1313, 1065, 1047, 970, 900, 832, 786, 761 e 726 cm^{-1} .

Na avaliação das amostras de Leite, Leite A e Leite B, a variação explicada pelo CP1 foi de 81,64% e pelo CP2, 6,95%, totalizando 88,6% (Figura 4c), houve redução até 16 variáveis que apresentaram alta correlação com CP1, todas associadas à faixas espectrais características de formação de bandas da Ivermectina: 3450, 2963, 2934, 2887, 1676, 1457, 1380, 1340, 1313, 1065, 1047, 900, 832, 786, 761 e 726 cm^{-1} . Estas variáveis indicam os efeitos da Ivermectina sobre o leite.

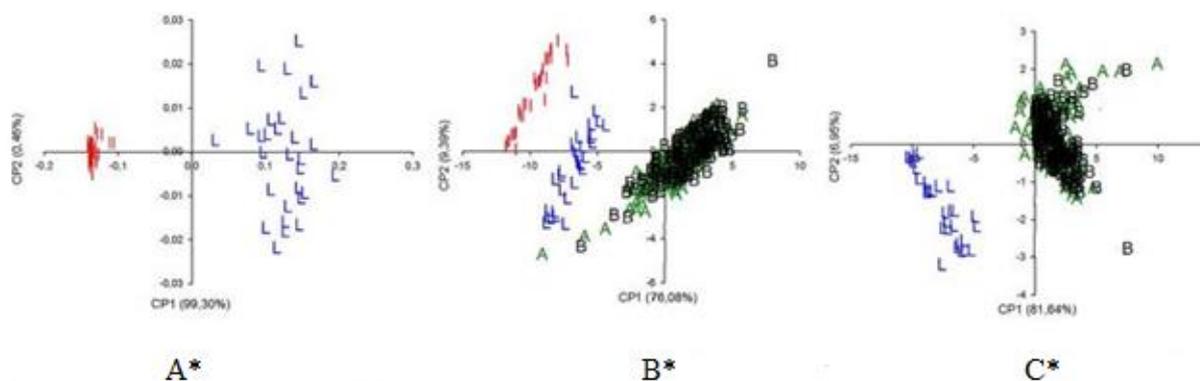


Figura 15. Escores das amostras de IVM, Leite, Leite adulterado (2 a 10 $\mu\text{g/L}$) - A e Leite adulterado (12 a 20 $\mu\text{g/L}$) - B em relação a CP1 e CP2, em que: A* - I vs L; B* - I vs L vs A vs B; C* - L vs A vs B.

3.2.2 Análise discriminante

A análise discriminante das amostras permitiu determinar três funções lineares (Equações 5, 6 e 7) das variáveis que minimizaram a dispersão nos grupos avaliados e elevaram a razão existente entre eles, possibilitando a definição dos grupos de leite, leite A e Leite B. Nestas funções, foram atribuídos pesos (coeficientes discriminantes) a cada variável, assim, estes pesos foram multiplicadores para os resultados intensidade de absorção obtidos nas análises em cada variável (números de onda).

Os resultados da análise discriminante permitiram a previsão do grupo em que as amostras se encaixaram, especificamente no grupo adulterado. As funções discriminantes evidenciaram a relação dessas variáveis à presença de IVM no leite, uma vez que, o aumento dos valores escores dessas variáveis ocorre à medida que se verifica a presença de IVM no leite.

$$\begin{aligned}
\text{Leite} = & -15,30147 - 0,86161 * Y3450 - 11,00694 * Y2963 + 4,87254 * Y2934 + \\
& 11,00828 * Y2887 + 0,69160 * Y1676 - 4,03767 * Y1457 + 2178238 * \\
& Y1380 - 33,69269 * Y1340 + 28,16606 * Y1313 + 24,01355 * Y1065 - 20,89078 * \\
& Y1047 + 9,09333 * Y900 - 2,48619 * Y832 + 36,97411 * Y786 - 53,93883 * \\
& Y761 + 45,82136 * Y736
\end{aligned}$$

Equação 9

$$\begin{aligned}
\text{Leite A} = & -15,33151 - 2,06059 * Y3450 - 10,69601 * Y2963 + 3,80826 * \\
& Y2934 + 12,62285 * Y2887 + 0,74960 * Y1676 - 1,42954 * Y1457 + 25,74307 * \\
& Y1380 - 39,05799 * Y1340 + 25,95683 * Y1313 + 30,99277 * Y1065 - 23,94909 * \\
& Y1047 + 7,21802 * Y900 - 0,16348 * Y832 + 41,35095 * Y786 - 48,43452 * \\
& Y761 + 31,8434 * Y73
\end{aligned}$$

Equação 10

$$\begin{aligned}
\text{Leite B} = & -383,71473 + 4,20025 * Y3450 + 52,54298 * Y2963 - 22,52935 * \\
& Y2934 - 50,03985 * Y2887 - 1,35053 * Y1676 + 10,40666 * Y1457 - \\
& 115,77251 * Y1380 + 168,49672 * Y1340 - 127,55194 * Y1313 - 160,11690 * \\
& Y1065 + 125,46721 * Y1047 - 40,52560 * Y900 + 6,87775 * Y832 - 196,02447 * \\
& Y786 + 242,87243 * Y761 - 168,64826 * Y736
\end{aligned}$$

Equação 11

A capacidade de treinamento apresentou taxa de classificação de 52,5% para o Leite A, 64,1% para o Leite B e 100% para o Leite (L). Por sua vez, no procedimento de validação, utilizado para avaliar a capacidade de generalização do método, a capacidade de previsão para as amostras foi de 46,67%, 70% e 100%, para o Leite A, Leite B e Leite, respectivamente.

Os resultados obtidos demonstram que 100% das amostras de leite foram classificadas corretamente. No entanto, as amostras adulteradas apresentaram resultados diferentes. As amostras de leite A apresentaram redução no percentual de amostras classificadas corretamente na validação quando comparada ao treinamento, enquanto as amostras do leite B tiveram melhor classificação na validação quando comparada ao treinamento. Destacamos que nenhuma das amostras adulteradas, nos grupos A e B, se comportou como sendo leite.

A taxa de classificação apresentada demonstrou que a técnica foi capaz de separar leite e leite adulterado com IVM, no entanto, a técnica foi ineficiente para separar as

categorias de leite adulterado, uma vez que amostras de leite contaminado com concentrações entre 2-10 µg/L foram classificadas como sendo entre 12- 20 µg/L e vice-versa.

Uma vez que a análise discriminante não apresentou eficiência para separação de leite adulterado por níveis de IVM, procedeu-se nova análise utilizando-se os mesmos dados e procedimentos anteriores, porém, nesta nova análise foram considerados apenas 2 grupos: leite e leite adulterado com IVM 2-20µg/L (matriz A₄), objetivando otimizar a capacidade discriminatória das funções. Assim, foram obtidas 2 novas funções discriminantes (Equações 8 e 9).

$$\begin{aligned} \text{Leite} = & -385,178 + 4,15016 * Y_{3450} + 52,76146 * Y_{2963} - 22,6744 * \\ & Y_{2934} - 50,1425 * Y_{2887} - 1,35251 * Y_{1676} + 10,59049 * Y_{1457} - 115,997 * \\ & Y_{1457} + 168,8462 * Y_{1340} - 128,163 * Y_{1313} - 160,345 * Y_{1065} + 125,7791 * \\ & Y_{1047} - 40,7844 * Y_{900} + 7,03231 * Y_{832} - 196,534 * Y_{786} + 244,1068 * \\ & Y_{761} - 170,066 * Y_{736} \end{aligned} \quad \text{Equação 12}$$

$$\begin{aligned} \text{Leite Adulterado (A + B)} = & -15,3545 - 1,45869 * Y_{3450} - 10,8951 * Y_{2963} + \\ & 4,36414 * Y_{2934} + 11,85005 * Y_{2887} + 0,72297 * Y_{1676} - 2,7615 * Y_{1457} + \\ & 23,82731 * Y_{1457} - 36,4789 * Y_{1340} + 27,17989 * Y_{1313} + 27,56192 * Y_{1065} - \\ & 22,4854 * Y_{1047} + 8,19945 * Y_{900} - 1,34543 * Y_{832} + 39,28334 * Y_{786} - \\ & 51,4196 * Y_{761} + 39,07456 * Y_{736} \end{aligned} \quad \text{Equação 13}$$

Nesta nova etapa, verificou-se que, quando comparada à análise anterior, ocorreu o aumento da taxa de classificação, sendo de 100% tanto para leite quanto leite adulterado nas fases de treinamento e validação. Estes resultados indicaram que a análise discriminante foi precisa ao separar amostras de leite das amostras de leite adulteradas, confirmando os resultados obtidos na análise de componentes principais, o que robustece a possibilidade do uso da espectrometria por infravermelho médio com transformada de Fourier como teste de triagem para a detecção da contaminação do leite por IVM.

3.3 Redes neurais artificiais

3.3.1 Predição

Entre as redes neurais testadas (com uma ou duas camadas intermediárias), utilizando-se as 16 variáveis selecionadas na ACP, a rede que apresentou menor erro foi constituída por 16 neurônios na camada de entrada, 1 camada intermediária com 50 neurônios e 1 neurônio na camada de saída. Os dados de entrada foram as variáveis que

classificam as amostras de acordo com a quantidade de IVM, os neurônios da camada intermediária foram utilizados para extrair informações que relacionavam a entrada com a saída e o neurônio de saída corresponde ao nível de contaminação do leite por IVM. Concordando com ACP e com a AD, a rede somente foi capaz de identificar a adulteração, porém, não foi capaz de quantificar a IVM presente nas amostras de leite.

Para a predição das amostras, o comportamento do erro, no decorrer do treinamento, diminuiu, enquanto permaneceu constante para validação. Não houve uma concentração dos pontos de dados em torno da linha de tendência linear e o valor de $R^2 = 0,266$ mostrou-se baixo (Figura 5), sendo assim a RNA desenvolvida não teve capacidade de predição da quantidade de IVM nas amostras.

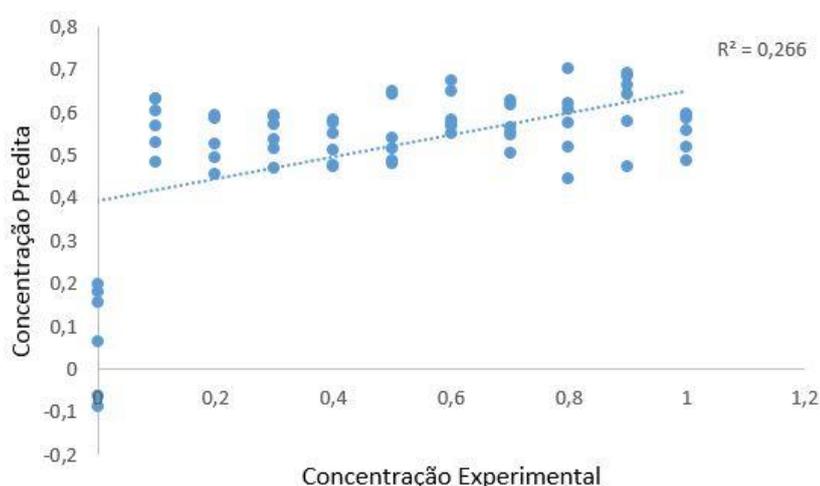


Figura 16. Coeficiente de determinação dos dados experimentais e preditos (dados normalizados 0-1) das amostras de leite puro e adulterado para a rede utilizando a função Tangente Hiperbólica.

3.3.2 Classificação

A classificação é uma das opções que pode ser desenvolvida utilizando-se a RNA para classificar amostras com características pertinentes a um determinado grupo. Diante disto, algumas arquiteturas de redes foram testadas com o intuito de encontrar uma rede com menor RMSE possível.

Para a classificação, foram testadas redes neurais com uma, duas ou três camadas intermediárias com a mesma finalidade da predição em escolher a rede que obtivesse um menor RMSE. Os resultados mostraram que a configuração da RNA composta de três camadas intermediárias com quarenta e cinco neurônios em cada, apresentou a melhor estrutura para a classificação de amostras tanto puras quanto adulteradas com IVM (Leite,

Leite A e Leite B). Apesar de ter encontrado um RMSE com valor baixo (0,4584) a taxa de classificação não foi satisfatória para os grupos de leite A e B, pois houve somente 46,67% de classificação correta, para cada um desses grupos, ao passo que as amostras sem adulteração obtiveram 100% de classificação correta.

Com o aumento dos ciclos, a curva de treinamento diminuiu e a de validação apresentou baixa variação, porém apresentou tendência de aumento, o que pode ter ocorrido em função da rede neural estar decorando os dados e suas características à medida que os dados são treinados pela rede (Figura 6).

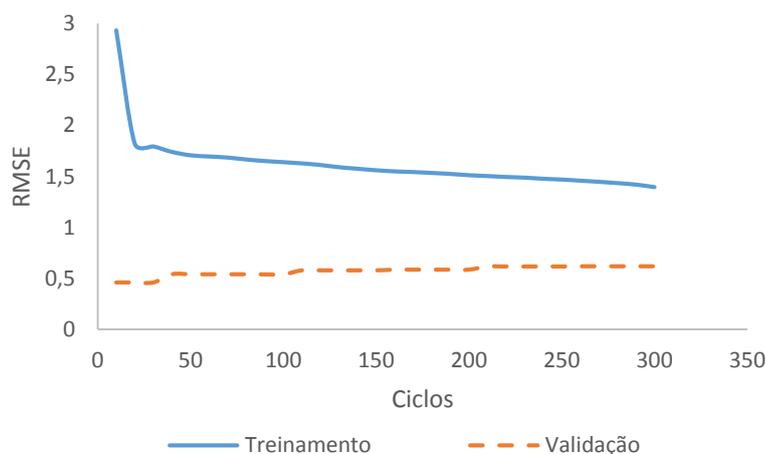


Figura 17. Valores de RMSE e ciclos da rede com três camadas intermediárias contendo 45 neurônios cada utilizando a função Tangente Hiperbólica.

O RMSE encontrado RMSE foi de 0,4584 e a taxa de classificação não foi satisfatória para os grupos de Leite A e B, pois houve somente 46,67% de acertos tanto para leite A quanto para leite B. Apenas as amostras sem adulteração obtiveram 100% de acertos na classificação.

4 CONCLUSÃO

Por meio da espectroscopia do infravermelho por transformada de Fourier, é possível obter espectros de referência de leite e IVM que tem modos vibracionais distintos, apesar disto, a técnica não é capaz de demonstrar a presença de IVM no leite por meio da avaliação visual dos espectros. No entanto, quanto associada a técnicas quimiométricas (Análise de Componentes Principais, Análise Discriminante e Redes Neurais Artificiais) pode ser utilizada como teste de triagem na detecção da presença de Ivermectina no leite, contudo, a técnica é ineficiente para a quantificação deste resíduo até o nível testado (20µg/L leite).

Acknowledgment

Agradecemos ao Deputado Federal Waldenor Pereira pela doação do espectrofotômetro infravermelho médio utilizado neste estudo e ao IF Salinas pela disponibilização de recursos financeiros, realizados por meio da liberação da primeira autora desenvolver sua dissertação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AERNOUTS, B.; POLSHIN, E.; SAEYS, W.; LAMMERTIN, J. Mid-infrared spectrometry of milk for dairy metabolomics: A comparison of two sampling techniques and effect of homogenization. **Analytica Chimica Acta**, v. 705, p. 88–97, 2011.
- BALDANI, L. A.; SOUSA, R. V. de., MIGUEL, A. G. Farmacologia dos principais antiparasitários de uso na medicina veterinária. **Universidade Federal de Lavras**. Lavras, 1999.
- BASSBASI, M.; PLATIKANOV, S.; TAULER, R.; OUSSAMA, A. FTIR-ATR determination of solid non fat (SNF) in raw milk using PLS and SVM chemometric methods. **Food Chemistry**. v. 146. p. 250 – 254. 2014.
- BRAGA, A.P.; CARVALHO, A.C.P.L.F.; LUDERMIR, T.B. **Redes neurais artificiais: teoria e aplicações**. LTC Editora S.A., Rio de Janeiro, 262p. 2000.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº11, de 22 de Maio de 2012**. Subprograma de Monitoramento em Carnes (Bovina, Suína, de Aves, de Avestruz e Equina), em Leite, Ovos, Mel e Pescado do exercício de 2012, referente ao Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal – PNCRC. Brasília, 2012.
- BUNACIU, A. A.; ABOUL-ENEIN, H.; HOANG, V. D. Vibrational spectroscopy used in milk products analysis: A review. **Food Chemistry**. v. 196, p. 877-884. 2016.
- CANGA, A. G; PRIETO, A. M. S.; LIÉBANA, M. J. D.; MARTÍNEZ, M. F.; VEGA, M. S.; VIEITEZ, J. J. G. The pharmacokinetics and metabolism of ivermectin in domestic animal species. **The Veterinary Journal**, v. 179, n. 1, p. 25–37, 2009.

- CAPUANO, E.; RADEMAKER, J.; VAN DEN BIJGAART, H.; VAN RUTH, S. M. Verification of fresh grass feeding, pasture grazing and organic farming by FTIR spectroscopy analysis of bovine milk. **Food Research International**, v. 60, p. 59–65, 2014.
- CERKVENIK-FLAJS, V.; MILCINSKI, L.; SUSSINGER, A.; HODOSCEK, L.; DANAHER, M.; ANTONIC, J. Trace analysis of endectocides in milk by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 663, n. 2, p. 165–171, 2010.
- CERQUEIRA, M.M.O.P.; SOUZA, F.N.; CUNHA, A.F.; PICININ, L.C.A.; LEITE, M.O., PENNA, C.F.A.M.; SOUZA, M.R.; FONSECA, L.M. Detection of antimicrobial and anthelmintic residues in bulk tank milk from four different mesoregions of Minas Gerais State – Brazil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.66, n.2, p.621-625, 2014.
- DANAHER, M.; HOWELLS, L. C.; CROOKS, S. R. H.; CERKVENIK-FLAJS, V.; O'KEEFFE, M. Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices. **Journal of Chromatography B**, v. 844, n. 2, p. 175–203. 2006.
- ESCRIBANO, M.; SAN ANDRÉS, M. I.; LUCAS, J. J. CANGA, A. G. . Ivermectin Residue Depletion in Food Producing Species and its Presence in Animal Foodstuffs With a View to Human Safety. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 13, n.6, p. 987-998, 2012.
- FISHER, M. H.; MROZIK, H. In: Ivermectin and Abamectin; CAMPBELL, W.C., Ed.; Springer-Verlag: New York, **1989**; pp. 1-23.
- GRELET, C.; FERNÁNDES PIERNA, J. A.; DARDENNE, P.; BAETEN, V.; DEHARENG, F. Standardization of milk mid-infrared spectra from a European dairy network. **J. Dairy Sci**, v. 98, p. 1-11, 2015.
- HAYKIN, S. **Neural Networks: A Comprehensive Foundation**, 2nd ed.. Prentice Hall: New Jersey, 2001.

- HEUER, C.; LUINGE, H. J.; LUTZ, E. T. G.; SCHUKKEN, Y. H.; VAN DER MAAS; J. H.; WILMINK, H.; NOORDHUIZEN, J. P. T. M. Determination of acetone in cow milk by Fourier transform infrared spectroscopy for the detection of subclinical ketosis. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 3, p. 575–582, 2001.
- IÑÓN, F. A.; GARRIGUES, S.; GUARDIÀ, M. de la. Nutritional parameters of commercially available milk samples by FTIR and chemometric techniques. **Analytica Chimica Acta**. v. 513, n. 2, p. 401-412, 2004.
- JEONG, I. S.; KWAK, B.M.; AHN, J. H.; JEONG, S. H. Determination of pesticide residues in milk using a QuEChERS-based method developed by response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 133, n.2, p. 473–481, 2012.
- JOLLIFFE, I. T. Discarding variables in a principal component analysis - I: artificial data. **Applied Statistics**, Londres, v. 21, n. 2, p. 160-173, 1972.
- KONG, J.; YU, S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 39, n. 8, p. 549–559, 2007.
- LOBATO, L.; RATH, S.; REYES, F. G. R. Occurrence of ivermectin in bovine milk from the Brazilian retail market. **Food Additives and Contaminants**, v. 23, n. 7, p. 668–673, 2006.
- LOBATO, L.; RATH, S.; REYES, F. G. R. Occurrence of ivermectin in bovine milk from the Brazilian retail market. **Food Additives and Contaminants**, v. 23, n.7, p. 668–673, 2006.
- MARDIA, K. V.; KENT, J. T.; BIBBY, J. M. **Multivariate analysis**. London: Academic, 1979. 520 p
- MARDIA, K. V.; KENT, J. T.; BIBBY, J. M. **Multivariate analysis**. London: Academic, 1979. 520 p
- NICOLAOU, N.; XU, Y.; GOODACRE, R. Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis for the detection and quantification of different milk species. **J. Dairy Sci.** v. 93, n. 12, p. 5651–5660, 2010.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. Introdução à espectroscopia. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

- RAI, P.; MAJUMDAR, G.C.; DASGUPTA, S.; S. DE. Prediction of the viscosity of clarified fruit juice using artificial neural network: a combined effect of concentration and temperature. **Journal Food Engineering**, v. 68, n. 4, p. 527-533, 2005.
- RECIO, I; GARCIA-RISCO, M. R.; AMIGO, L; MOLINA, E.; RAMOS, M.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J. Detection of Milk Mixtures in Halloumi Cheese. **J. Dairy Sci.** v. 87, n. 6, p. 1595–1600, 2004.
- STUART, B. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**. John Wiley & Sons, 2004.
- VERCRUYSSSE J.; REW, R. S. **Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy**. CAB International, Wallingford, UK, 2002.
- WEI, H.; TAO, Y.; CHEN, D.; XIE, S.; PAN, Y.; LIU, Z.; HUANG, L.; YUANA, Z. Development and validation of a multi-residue screening method for veterinary drugs, their metabolites and pesticides in meat using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 32, n. 5, 686–701, 2015. <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2015.1008588>
- YATES, D. M.; PORTILL, O, V.; WOLSTENHOLME, A. J. The avermectin receptors of *Haemochus contortus* and *Caenorhabditis elegans*. **International Journal for Parasitology**, Stuttgart, v. 33, p.1183-1193, 2003.