

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS PATO BRANCO
CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO

ELLEN DIANE MARIA

**DESENVOLVIMENTO DE MODELOS DE CALIBRAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO
PARA DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS EM LEITE POR MEIO DE
ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO NIR E QUIMIOMETRIA.**

Pato Branco - PR

2019

ELLEN DIANE MARIA

**DESENVOLVIMENTO DE MODELOS DE CALIBRAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO
PARA DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS EM LEITE POR MEIO DE
ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO - NIR E QUIMIOMETRIA.**

Trabalho de conclusão de curso, apresentado à Comissão de Diplomação do Curso de Bacharelado em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Pato Branco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Química.
Orientador: Vanderlei Aparecido de Lima

Pato Branco - PR

2019

TERMO DE APROVAÇÃO

O trabalho de diplomação intitulado Desenvolvimento de Modelos de Calibração e Classificação para Detecção de Resíduos de Medicamentos em leite por meio de espectroscopia de IV NIR e Quimiometria foi considerado APROVADO de acordo com a ata da banca examinadora N°9.2.2019-B de 2019.

Fizeram parte da banca os professores.

Vanderlei Aparecido de Lima

Tatiane Luiza Cadorin Oldoni

Solange Teresinha Carpes

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus que me concedeu o dom da vida e que esteve presente em todos os meus passos, me guiando e iluminando meu caminho.

Agradeço aos meus pais Cátia e Eloi, por sempre apoiarem minhas escolhas e por estarem presentes em minha vida. Agradeço também a minha avó Beatriz que por longos anos me ofereceu amor, carinho e um lar.

A minha irmã Kelly que nunca mediu esforços para me manter feliz, a conclusão desta etapa só se tornou possível, pois sempre esteve presente me apoiando nos momentos mais difíceis. Aos meus irmãos Eidryan e Gregory, meu sobrinho Kayan, meu cunhado Ledoir e demais familiares por trazerem mais felicidade aos meus dias.

Ao meu amado Jackson por ser um companheiro de vida maravilhoso, que aceitou compartilhar todos os meus sonhos e objetivos fazendo até mesmo o impossível para que os mesmos fossem realizados. Sou eternamente grata por você confiar e acreditar no meu potencial, até mesmo quando nem eu acreditava.

Ao meu orientador, Prof^o Dr^o Vanderlei Aparecido de Lima por ter confiado a mim este trabalho, por todos os ensinamentos transmitidos, por todo apoio dedicado e por toda sua contribuição em minha vida acadêmica. Agradeço também, a todos os professores do Departamento de Química que durante o período da graduação transmitiram diariamente todos os seus conhecimentos e experiências. E em especial, aos professores Edimir A. Pereira, Márcio B. Rodrigues, Liliam C. Angelo e Simone Beux, os quais tive a gratificante oportunidade de ser orientada durante períodos de iniciação científica e estágios.

A Luana Bach, Éder, Luis Felipe e demais colegas que estiveram presentes em minha graduação tornando os dias mais leves e inesquecíveis. A Elinéia, Gilvania, Amanda e demais amigos por me alegrarem em momentos de lazer e por todo apoio.

A Central de Análises da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) pela realização das análises de NIR e a UTFPR pela bolsa de apoio à execução de Trabalhos de Conclusão de Cursos – TCC concedida para a realização

deste trabalho e pela disponibilização da utilização dos laboratórios para realização desta pesquisa.

Enfim, a todos aqueles que tiveram presentes de alguma forma em minha vida e tornaram possível a realização deste trabalho.

EPIGRAFE

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis."

José de Alencar

RESUMO

MARIA, Ellen Diane. **Desenvolvimento de modelos de calibração e classificação de resíduos de medicamentos em leite por meio de Espectroscopia de Infravermelho NIR e Quimiometria**. 2019. 68f. Monografia (Bacharelado em Química) – Departamento de Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2019.

A presença de resíduos de medicamentos em leite, como as Avermectinas, causa diversos problemas para a saúde humana e prejuízos para indústrias lácteas sendo necessária a realização de análises que permitam a detecção da presença destes constituintes. A maioria das análises realizadas com este objetivo necessita de um grande volume de amostra, longo tempo de execução e geram resíduos químicos. Desta forma, este trabalho apresentou como proposta desenvolver modelos de calibração multivariada para detecção e quantificação de Abamectina e Doramectina em leite cru por meio da técnica de Infravermelho Próximo (NIR) associada com Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS). Além disto, este trabalho objetivou a construção de modelos de classificação para diferenciar Abamectina e Doramectina por meio de espectroscopia NIR combinado com Máquina de Vetor de Suporte (SVM). As amostras de leite cru foram dopadas separadamente com diferentes concentrações de Abamectina e Doramectina, e após adulteração foram gerados os espectros NIR de todo o conjunto de amostras em espectrofotômetro FT-NIR MPA. Modelos de PLS foram construídos e foram testados diferentes pré-tratamentos no conjunto de dados espectrais. Quatro modelos por meio de PLS foram construídos no software *ChemoStat*, dois para cada tipo de medicamento e a qualidade dos modelos foi avaliada por meio dos valores de R^2 , RMSEC, RMSEP e RMSECV. Por meio do software *Weka* foi gerado o modelo de classificação dos dois medicamentos, Abamectina e Doramectina. A qualidade do modelo de classificação foi avaliada pelas figuras de mérito: acurácia, precisão, taxa positiva de acerto e área sob a curva (curva ROC). O modelo de classificação SVM apresentou ótimos resultados tanto na calibração quanto na validação do modelo, pois todas as figuras de mérito apresentaram valores adequados para esta modelagem. Os modelos PLS construídos obtiveram valores de R^2 superiores a 0,90 e baixos valores de RMSEC na calibração, entretanto os resultados da validação não foram tão satisfatórios para nenhum dos medicamentos, devido a apresentarem R^2 inferiores a 0,55, o que demonstra a necessidade de ajustes e aperfeiçoamentos na técnica proposta. O desenvolvimento deste trabalho evidencia que a utilização da técnica espectroscópica NIR apresenta excelentes vantagens e que pode ser aplicada no setor industrial, pois sua execução acontece em um curto tempo de análise, apresenta custo moderado e mínima geração de resíduos. Além disso, a partir do aperfeiçoamento dos métodos propostos, a aplicação dos mesmos pode ser realizada em conjunto, pois ambos os métodos, um para quantificação e outro para classificação de medicamentos em leite utilizam os mesmos dados espectrais, tornando possível a classificação destes tipos de acariciadas residuais em leite.

Palavras-chave: Abamectina, doramectina, quimiometria, regressão e classificação.

ABSTRACT

MARIA, Ellen Diane. **Development of calibration and classification models for detection of drug residues in milk by NIR infrared spectroscopy and chemometrics.** 2019. 68f. Monografia (Bacharelado em Química) – Departamento de Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2019.

The presence of drug residues in milk, such as Avermectins, causes several problems for human health and damages to the dairy industries, being necessary to perform analyzes to detect the presence of these constituents. Most analyzes performed for this purpose require a large sample volume, long run time and generate chemical waste. Thus, this work presented the proposal to develop multivariate calibration models for detection and quantification of Abamectin and Doramectin in raw milk by the Near Infrared (NIR) technique associated with Partial Least Squares Regression (PLS). In addition, this work aimed to construct classification models to differentiate Abamectin and Doramectin by NIR spectroscopy combined with Support Vector Machine (SVM). Raw milk samples were doped separately with different concentrations of Abamectin and Doramectin, and after tampering the NIR spectra were generated from the entire sample set on the FT-NIR MPA spectrophotometer. PLS models were constructed and different pretreatments were tested on the spectral data set. Four models using PLS were built using ChemoStat software, two for each type of drug and the quality of the models was evaluated using the values of R², RMSEC, RMSEP and RMSECV. Weka software generated the classification model for the two drugs, Abamectin and Doramectin. The quality of the classification model was assessed by the merit figures: accuracy, precision, positive hit rate and area under the curve (ROC curve). The SVM classification model presented excellent results both in the calibration and validation of the model, as all merit figures presented adequate values for this modeling. The built PLS models obtained R² values higher than 0.90 and low RMSEC values in the calibration, however the validation results were not as satisfactory for any of the drugs, due to their R² lower than 0.55, which shows the need for adjustments and improvements in the proposed technique. The development of this work shows that the use of the NIR spectroscopic technique has excellent advantages and that it can be applied in the industrial sector, since its execution takes place in a short analysis time, has a moderate cost and minimal waste generation. Moreover, from the improvement of the proposed methods, their application can be performed together, since both methods, one for quantification and another for classification of medicines in milk use the same spectral data, making possible the classification of these types of drugs. residual caresses in milk.

keyword: Abamectin, doramectin, chemometrics, regression and classification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Gráfico do consumo per capita de Leite no Brasil.	17
Figura 2- Estrutura geral da Avermectinas.	19
Figura 3- Representação esquemática do espectro eletromagnético.	23
Figura 4- Esquematização de espectrofotômetro de infravermelho.....	24
Figura 5- SVM aplicada no exemplo das balinhas vermelhas e azuis.....	27
Figura 6 - Fluxograma do processo de análise de amostras de leite dopado com doramectina e abamectina.	33
Figura 7- Espectro de NIR das amostras de leite adulteradas com Abamectina.	42
Figura 8- Espectro de NIR das amostras de leite adulteradas com Doramectina.	42
Figura 9- Gráfico de loading para o conjunto de dados espectrais de abamectina e doramectina para o desenvolvimento dos modelos de regressão, onde as regiões amarelas correspondem às faixas excluídas do conjunto de dados.....	44
Figura 10- Espectro de NIR das amostras de leite adulteradas com Abamectina com By Range + SNV.....	45
Figura 11- Gráfico de outliers conjunto Abamectina: a) Calibração; b) Validação.	46
Figura 12- Determinação das variáveis latentes para o modelo Abamectina.....	47
Figura 13- Relação entre os valores reais e os valores preditos obtidos pelos modelos com o tratamento By Range + SNV para os teores de Abamectina em Leite.	49
Figura 14- Relação entre os valores reais e os valores preditos obtidos pelos modelos com o tratamento MSC para os teores de Abamectina em Leite.	49
Figura 15- Espectro de NIR das amostras de leite adulteradas com Abamectina com MSC.	50
Figura 16- Gráfico de outliers conjunto Doramectina: a) Calibração; b) Validação.	51
Figura 17- Determinação do número ideal de variáveis latentes para o modelo Doramectina.	52
Figura 18- Relação entre os valores observados e os valores preditos obtidos pelos modelos com o tratamento MSC para os teores de Doramectina em Leite.	54
Figura 19- Relação entre os valores observados e os valores preditos obtidos pelos modelos com o tratamento SNV para os teores de Doramectina em Leite.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição centesimal média do Leite.....	16
Tabela 2- LMR's de Avermectinas.	21
Tabela 3- Limites da Região do Infravermelho.	23
Tabela 4- Composição das amostras dopadas com Abamectina e Doramectina.....	34
Tabela 5 - Parâmetros utilizados na aquisição dos espectros de NIR.....	37
Tabela 6- Faixas espectrais excluídas do desenvolvimento dos modelos.....	44
Tabela 7- Modelos de calibração para quantificação de Abamectina em Leite.....	47
Tabela 8- Resultados calibração e validação para modelos da Abamectina em Leite.	48
Tabela 9- Modelos de calibração para quantificação de Doramectina em Leite.....	52
Tabela 10- Resultados calibração e validação para modelos da Doramectina em Leite.	53
Tabela 11- Resultados do modelo de classificação SVM para Avermectinas em Leite.	57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2.1 GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1 LEITE BOVINO	16
3.2 RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS EM LEITE	18
3.3 MEDICAMENTOS ANTIPARASITAS	19
3.4 EFEITOS DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS NO LEITE	20
3.5 MÉTODOS PARA A DETECÇÃO DE RESÍDUOS NO LEITE	21
3.6 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR)	22
3.6 QUIMIOMETRIA	22
3.7.1 Classificação de Matrizes por Aprendizado de Máquina (AM)	27
3.7.2 Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS)	27
3.7.3 Pré-tratamento de Dados	27
3.7.3.1 Alisamento de savitsky-golay	27
3.7.3.2 Derivadas	27
3.7.3.3 Correção multiplicativa de espalhamento (MSC)	27
3.7.3.4 Padronização normal de sinal (SNV)	27
3.7.3.5 Centragem dos dados na média	30
3.8 VALIDAÇÃO	30
3.8.1 Validação Cruzada e Validação Externa	30
3.8.2 Amostras Anômalas	31
3.8.3 Escolha das Variáveis	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 COLETA DO LEITE	33
4.2 DOPAGEM DAS AMOSTRAS	34
4.3 AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS DE NIR	36
4.4 REGRESSÃO POR MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS	37
4.4.1 Pré-tratamento dos Dados	37
4.4.2 Desenvolvimento dos Modelos de Calibração	38
4.4.3 Validação dos Modelos	38
4.4 CLASSIFICAÇÃO POR MÁQUINA DE VETOR DE SUPORTE	37
4.5.1 Calibração do Modelo de Classificação	39
4.5.2 Validação do Modelo de Classificação	39

4.5.3 Figuras de Mérito (FOM)	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 VALORES DE REFERÊNCIA	37
5.2 ESPECTROS DE NIR.....	37
5.3 SELEÇÃO DAS FAIXAS ESPECTRAIS	37
5.4 DESENVOLVIMENTO DOS MODELOS PLS	37
5.4.1 Abamectina	45
5.4.1.1 Pré-Tratamento e remoção de outliers	45
5.4.1.2 Escolha das Variáveis Latentes (VL)	46
5.4.1.3 Modelos de calibração e validação	47
5.4.2 Doramectina.....	50
5.4.2.1 Pré-Tratamento e remoção de outliers	50
5.4.2.2 Escolha das Variáveis Latentes (VL)	52
5.4.2.3 Modelos de calibração e validação	53
5.4.3 Hipóteses	56
5.5 CLASSIFICAÇÃO POR MÁQUINA DE VETOR DE SUPORTE.....	37
CONCLUSÕES.....	61
REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

O leite bovino possui em sua composição proteínas, gorduras, carboidratos, sais minerais e vitaminas que proporcionam uma dieta rica em nutrientes e desta forma o tornam um alimento nobre. Seu consumo é favorável tanto para neonato, devido a ofertar proteção imunológica, quanto ao ser humano adulto (MÜLLER, 2002).

De maneira geral, “entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas [...]”(MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2011). Desta forma, por ser produzido diretamente pela região mamária da vaca, doenças sofridas pelo bovino acabam alterando as concentrações dos principais componentes do leite, influenciando em sua qualidade e rendimento produtivo.

Entre as principais doenças bovinas encontra-se a mastite, a tuberculose e as doenças parasitárias, que se não controladas podem gerar grandes prejuízos aos produtores de leite. Em função destas doenças, medicamentos veterinários devem ser ministrados ao animal para controle e eliminação da doença (OLIVEIRA, 2006).

Abamectina, Doramectina e Ivermectina são exemplos de medicamentos da classe avermectina que são utilizados no tratamento de doenças parasitárias. (RATH et al., 2016). Devido à utilização destes tratamentos, alguns resíduos dos medicamentos podem permanecer no leite. A presença desses resíduos na composição do leite representa riscos à saúde humana e prejuízos à indústria. O consumo de leite com resíduos de medicamentos pode causar sintomas alérgicos e tóxicos ao ser humano e acabam diminuindo o rendimento dos produtos lácteos na indústria leiteira (MÜLLER, 2015; SILVA et al., 2013).

Portanto, se faz necessário o controle e detecção destes resíduos de medicamentos no leite. Para determinação de medicamentos residuais em leite existem diversos métodos que podem ser aplicados, entre eles destacam-se: os kits rápidos microbiológicos, cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia em camada delgada e eletroforese capilar (RUELA et al., 2005). Apesar destes métodos apresentarem vantagens, os mesmos proporcionam significativas desvantagens, pois frequentemente são laboriosos, demandando demasiado tempo para as

análises, são dispendiosos e podem gerar resíduos indesejáveis que precisam ser tratados antes de seu descarte (PASQUINI, 2003).

Por esta razão é necessário que novas técnicas, para detecção de resíduos em leite sejam desenvolvidas e aprimoradas, levando sempre em consideração à eficácia do método, a rapidez, a sensibilidade, o baixo custo da análise e o atendimento à química ecologicamente correta.

A espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) é bastante utilizada como técnica de controle de qualidade de produtos alimentícios, pois demanda de pequenas ou nulas ações de tratamento das amostras, além de permitir o diagnóstico e a determinação de inúmeros parâmetros e efetuar práticas velozes e ecologicamente limpas (PASQUINI, 2003). Para utilização desta técnica é imprescindível o uso da quimiometria, que utiliza de procedimentos da matemática e da estatística para efetuar planejamentos e fazer seleções eficientes em medidas/experimentos. Também é possível extrair o maior número de informações de fenômenos da química que estão contidos nos espectros de NIR (PEREIRA et al., 2014).

Por isto, nos últimos anos, muitos estudos têm sido realizados para avaliar o uso de espectroscopia de infravermelho próximo associado com quimiometria para a detecção de resíduos de medicamentos ou fraudes em amostras de leite bovino. Porém, existem poucos trabalhos na literatura focados em métodos para a detecção de resíduos de medicamentos da classe avermectina em leite bovino por meio desta técnica. Deste modo, neste trabalho objetivou-se à elaboração e desenvolvimento de modelos utilizando a técnica NIR associada ao PLS para quantificação de abamectina e doramectina em amostras de leite. Além disto, esta pesquisa objetivou a elaboração de modelos para a classificação de leites dopados com Abamectina e Doramectina por meio de aprendizado de máquina pela utilização de Máquina de Vetor de Suporte (SVM).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

O presente trabalho teve como objetivo principal desenvolver modelos de calibração multivariada fundamentada na Espectroscopia de Infravermelho Próximo (NIR) associada à Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS) para a detecção e quantificação de adulteração em leite bovino por medicamentos veterinários da classe das avermectinas. Além disto, esta pesquisa propõe uma metodologia para classificação de leites dopados com Abamectina e Doramectina por meio do algoritmo Máquina de Vetor de Suporte (SVM).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar padrões analíticos a partir dos medicamentos antiparasitas abamectina e doramectina e dopar leite cru livre de resíduos de medicamentos;
- Analisar e obter dados espectroscópicos via Infravermelho Próximo NIR para amostras de leite sem e com adulteração de medicamentos veterinários;
- Construir modelos quimiométricos fundamentados em Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS), correlacionando doses de abamectina e doramectina em matrizes lácteas;
- Validar os modelos de calibração multivariada construídos;
- Construir modelos quimiométricos baseados em aprendizado com suporte de máquina (SVM) para classificação de leite em duas categorias: leite com resíduos de abamectina e leite com resíduos de doramectina;
- Validar os modelos de classificação de matrizes de leites adulteradas com medicamentos da classe da avermectina.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 LEITE BOVINO

O leite bovino é considerado um fluido biológico composto por proteínas, gorduras, carboidratos, sais minerais e vitaminas que conferem nutrientes e proteção imunológica para a saúde humana. Além de apresentar diversos nutrientes, o leite oferece elementos anticarcinogênicos como o ácido linoléico conjugado, esfingomiéline, ácido butírico, β -caroteno e vitaminas A e D, os quais estão presentes em sua composição (GONZÁLEZ; WALTER DÜRR; FONTANELI, 2001; MÜLLER, 2002; YANG et al., 2015).

A produção do leite é oriunda da secreção mamária da vaca onde o hormônio lactogênio estimula as células mioepiteliais presentes na mama e transforma os constituintes do sangue em componentes lácteos. Desta forma, os componentes presentes no leite são sintetizados por distintas reações que ocorrem através dos alvéolos da glândula mamária (NUNES, 2008; TRONCO, 2008).

As concentrações dos componentes principais do leite variam conforme a raça do animal, a estação do ano, o clima da região e o tipo de mantimento oferecido ao rebanho (MONTEIRO, 2015). Na Tabela 1, está exposta à composição centesimal média do leite bovino.

Tabela 1- Composição centesimal média do Leite.

Componente	Composição (%)
Umidade	87,3
Lactose	4,8
Lipídios	3,9
Proteínas	3,3
Minerais	0,7

Fonte: Adaptado de DIAS; ANTES, (2014)

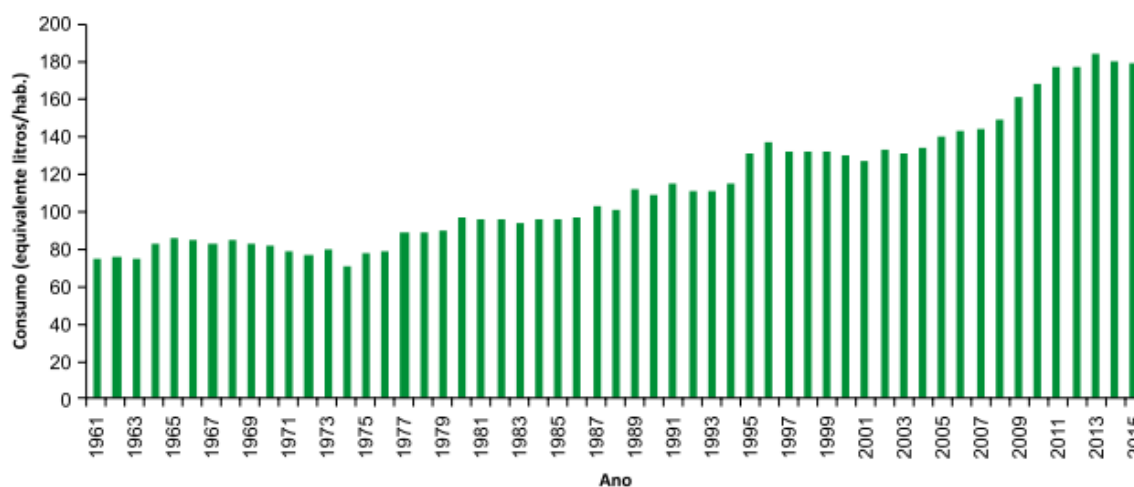
A água é componente presente em maior quantidade no leite (Tabela 1), seu volume é controlado pela lactose, que para equilibrar a pressão osmótica na

glândula mamária captura a água do sangue para o leite. Desta forma, quaisquer modificações nos constituintes sanguíneos podem levar a variações na composição do leite (GONZALEZ; SILVA; CORREA, 2015).

As proteínas presentes no leite são as caseínas, soroproteínas, proteínas associadas à membrana do glóbulo de gordura, lactoferrina e enzimas. Estes tipos de proteína fornecem micronutrientes, aminoácidos e componentes que são essenciais para a saúde humana (SGARBIERI, 2005). Já a gordura contida no leite apresenta-se como glóbulos que possuem um núcleo composto especialmente de triacilgliceróis contornado por uma membrana lipoprotéica (COSTA; JIMÉNEZ-FLORES; GIGANTE, 2009). Por isto, grande parte das características físicas apresentadas nos produtos lácteos, como estrutura e cor, são atribuídas aos glóbulos de gordura e às caseínas (BRITO et al., 2009).

A vasta composição química do leite e a variedade de nutrientes proporcionada por seu consumo contribuem para a demanda deste produto. Além disso, a alta comercialização deste produto está relacionada com a ampla oferta de produtos lácteos diferenciados, que acabam atraindo o consumidor, e conseqüentemente, obrigam uma elevada produção de leite. Vilela et al (2017) destacam que a demanda por lácteos nos últimos anos tem crescido mais do que o crescimento da população. Na Figura 1, encontram-se os dados do crescimento de consumo de leite a per capita no Brasil nos últimos anos.

Figura 1- Gráfico do consumo per capita de Leite no Brasil.



Fonte: VILELA et al. (2017)

O recorde brasileiro para o consumo de leite por habitante/ano foi registrado em 2013 (Figura 1), com uma média de 179 litros habitante/ano. Após isso, o consumo teve um decaimento causado pela inflação e redução da renda dos brasileiros. O IBGE prevê que até 2020 o consumo tenha um crescimento de 0,74% ao ano (VILELA et al., 2017).

3.2 RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS EM LEITE

O uso de medicamentos veterinários é comumente utilizado na prevenção e tratamento de doenças bovinas. Estes medicamentos são compostos que envolvem uma variedade de classes químicas com diferentes ações terapêuticas como antimicrobiana, antibiótica, antiparasitária, inseticida, fungicida e sedativa (SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006; STOLKER; BRINKMAN, 2005).

A utilização destes medicamentos em animais bovinos pode acarretar em resíduos na matriz do leite, isto porque a produção do leite é realizada diretamente pela região mamária da vaca que acaba capturando os componentes sanguíneos e transformando-os em componentes do leite através de diversas reações químicas. Desta maneira, os resíduos de medicamentos que estiverem presentes na corrente sanguínea do animal podem ser transferidos para a matriz do leite (PACHECO-SILVA; SOUZA; CALDAS, 2014).

Os resíduos de medicamentos são encontrados com maior frequência por terem sido utilizados para tratamentos de doenças como mastite, infecções cervical e uterina, enfermidades, parasitoses, entre outras doenças. O tratamento pode ocorrer de forma oral, por injeção parenteral e intravenosa ou infusão no aparelho genital. Entre os medicamentos mais comuns e utilizados estão os antiparasitas, entre eles ivermectina, abamectina, doramectina, imizol e febendazol (DA SILVA JÚNIOR, 2004).

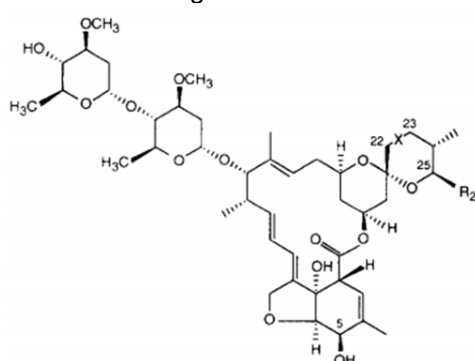
Os resíduos destes medicamentos também podem ser encontrados por introdução voluntária fraudulenta. Esta forma é menos provável, porém, este fato pode ser passível de ocorrência, devido aos fraudadores que desejam aumentar a durabilidade do leite (TRONCO, 2008).

3.3 MEDICAMENTOS ANTIPARASITAS

As parasitoses são as doenças causadas por parasitas que atacam o organismo do animal. Estas doenças são responsáveis pela causa de alterações digestórias, anemia e possíveis tristezas parasitárias bovinas. Geralmente essas doenças acabam afetando a produtividade do leite e causando prejuízos aos produtores (MELLO et al., 2017; SILVA, 2015). Desta forma, buscam-se tratamentos que possam reverter o quadro de saúde do animal que foi afetado. Para isto, os tratamentos mais indicados fazem uso de medicamentos específicos da classe das avermectinas (TEIXEIRA, 2015).

As avermectinas são medicamentos antiparasitários que fazem parte dos compostos lactonas macrocíclicas (LMs) e são oriundas da fermentação do fungo actomiceto *Streptomyces avermitilis*. A estrutura das avermectinas (Figura 2) é composta por oito componentes: A1a, A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a e B2b, os quais se diferenciam conforme algumas características em suas estruturas: os compostos A apresentam um grupo metoxi ligado ao carbono 5. Já os compostos B apresentam um grupo hidroxila. Os compostos do tipo 1 apresentam dupla ligação entre os carbonos 22 e 23 enquanto que os do tipo 2 possuem ligações simples. Já os da série “a” possui um grupo sec-butil ligado ao carbono 25 e os da série “b” um radical isopropil. Entre os principais medicamentos desta classe estão ivermectina, abamectina e doramectina (DANAHER et al., 2006; SHOOP; MROZIK; FISHER, 1995).

Figura 2- Estrutura geral da Avermectinas.



Ivermectina: X = -CH₂CH₂- R₂₅ = CH(CH₃)CH₂CH₃ e CH(CH₃)₂
 Abamectina: X = -CH=CH- R₂₅ = CH(CH₃)CH₂CH₃ e CH(CH₃)₂
 Doramectina: X = -CH=CH- R₂₅ = Ciclohexil

Fonte: Adaptado de SHOOP; MROZIK; FISHER, (1995).

Esta classe de medicamento possui ampla atividade em doses pequenas, sendo empregada em baixas doses na cura de infecções geradas por endo e ectoparasitas em várias espécies animais. Sua aplicação ocorre por via subcutânea e, devido sua alta lipossolubilidade ocorre a deposição no local da aplicação, prolongando seu tempo de retenção no organismo. As concentrações destes medicamentos nos líquidos orgânicos podem manter-se por extensos períodos e se acumular no leite, o que pode ocasionar a ingestão pelos consumidores (ANVISA, 2009).

3.4 EFEITOS DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS NO LEITE

A presença de resíduos de medicamentos no leite pode desencadear diversos problemas, tanto para a industrialização quanto para a saúde humana. Para o setor industrial a presença destes resíduos provoca inibição de bactérias utilizadas na produção de fermentados, ocasionando a deficiência da fermentação ou a inexistência da mesma (SILVA et al., 2013).

Para a saúde humana os principais prejuízos estão associados com a probabilidade de desenvolvimento de reações alérgicas ou tóxicas nos consumidores do produto. Outro risco causado ao consumidor é a decorrência de infecções secundárias por microrganismos resistentes (PAIVA E BRITO; LANGE, 2005).

Devido a todos estes fatores, no Brasil há normas que estabelecem os Limites Máximos de Resíduos (LMR) em leite. Na Tabela 2, estão pautadas algumas avermectinas com os LMRs aceitos pelo Brasil tendo como referência o *Codex Alimentarius*, programa conjugado da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e Organização Mundial da Saúde (OMS). Este programa estabelece normas internacionais na área de alimentos, abrangendo padrões, diretrizes e guias sobre Boas Práticas e Avaliação de Segurança e Eficácia (ANVISA, 2016).

Tabela 2- LMR's de Avermectinas.

Grupo de Antiparasitários	Substância Ativa	LMR (µg/L)	Referência
Avermectinas	Abamectina	5	Codex
	Doramectina	15	Codex
	Ivermectina	10	Codex

Fonte: adaptado de ANVISA, (2009).

O LMR trata da concentração máxima de resíduos de medicamentos veterinários utilizados em tratamentos de bovinos que podem estar presentes nos alimentos. Estes limites são calculados em relação aos perigos que cada medicamento pode ter à saúde humana (ANVISA, 2009).

3.5 MÉTODOS PARA A DETECÇÃO DE RESÍDUOS NO LEITE

Há diversos métodos que são indicados para a detecção e quantificação de resíduos de medicamentos no leite. Entre os principais encontram-se os métodos microbiológicos, métodos cromatográficos e o método de eletroforese capilar (PACHECO-SILVA; SOUZA; CALDAS, 2014).

Os métodos microbiológicos se baseiam na inibição do crescimento de microrganismos no meio de cultivo, onde os medicamentos podem estar presentes. Para a execução destes testes são empregadas culturas bacterianas que são sensíveis aos medicamentos que estão inseridos no meio. Estes métodos possuem baixo custo, são simples de serem implementados e podem ser facilmente executados, porém, apresentam menor sensibilidade e se baseiam em limites máximos de resíduos (BENETTI; ABRAHÃO; NICKEL, 2011; PACHECO-SILVA; SOUZA; CALDAS, 2014).

Já os métodos cromatográficos têm sido utilizados frequentemente para análise destes resíduos, sendo empregados tanto pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) quanto pela técnica de Cromatografia em Camada Delgada (CCD). No método CLAE geralmente utilizam-se colunas de separação de fase reversa e os detectores utilizados são o detector ultravioleta-visível (UV/VIS),

Fluorescência e a Espectrometria de massas. Sendo que esta última apresenta alta sensibilidade e elevada eficiência (DENOBILO; NASCIMENTO, 2004).

Para a técnica de CCD, Husain et al. (2004) realizaram experimentos utilizando troca iônica inorgânica, com fases móveis orgânica, aquosa e mistura aquosa/orgânica e obtiveram bons resultados em relação a detecção de resíduos de medicamentos veterinários em leite. Desta forma, observou-se que esta metodologia leva curto tempo para sua realização e os analitos separados podem ser recuperados. Apesar disso, a identificação e quantificação desses analitos não é por método direto e esta técnica é pouco sensível (HUSAIN; GHOULOPOUR; SEPAHRIAN, 2004).

A eletroforese capilar é outra técnica de separação que se baseia na migração de espécies carregadas eletricamente. Esta técnica vem sendo muito estudada na aplicação da detecção de adulteração de leite nos últimos anos e tem apresentado vantagens como alta eficiência, rapidez na execução da análise e baixo consumo de amostra e solventes. Seu principal problema é a baixa sensibilidade devido à limitação na injeção da amostra (QUEIROZ; JARDIM, 2001).

Diversos autores têm desenvolvido pesquisas para detecção de medicamentos em leite, no entanto, são necessárias melhorias para obtenção de metodologias rápidas, simples, eficazes e acessíveis. E em busca de técnicas que contornam as desvantagens acima citadas, a Espectroscopia no Infravermelho Próximo NIR, tem sido utilizada com maior frequência nos últimos anos para desenvolvimento de modelos que detectem resíduos e alguns tipos de fraudes específicas no leite (SHENG et al., 2018).

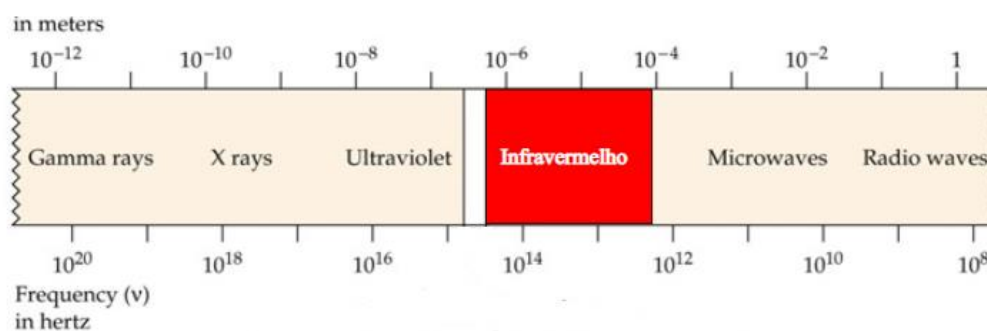
3.6 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR)

A espectroscopia de infravermelho tem como fundamento o estudo da interação da matéria com a radiação eletromagnética. Esse método não é invasivo e se baseia na análise vibracional da molécula ocasionado pela excitação gerada por um feixe de radiação da região do infravermelho (ANJOS, 2016).

A Figura 3 indica a localização da região do infravermelho no espectro eletromagnético, que está situada entre as regiões do visível e micro-ondas. Esta

região compreende a radiação com números de onda no intervalo de 12500 a 10 cm^{-1} e pode ser subdividida nas seguintes técnicas: Infravermelho Próximo (do inglês *Near Infrared* - NIR), Médio (MIR) e Distante (FIR) (ARAUJO, 2007).

Figura 3- Representação esquemática do espectro eletromagnético.



Fonte: HALLIDAY; RESNICK; WALKER, (2009).

Na Tabela 3, encontram-se os intervalos de comprimento de onda para cada região do infravermelho.

Tabela 3- Limites da Região do Infravermelho.

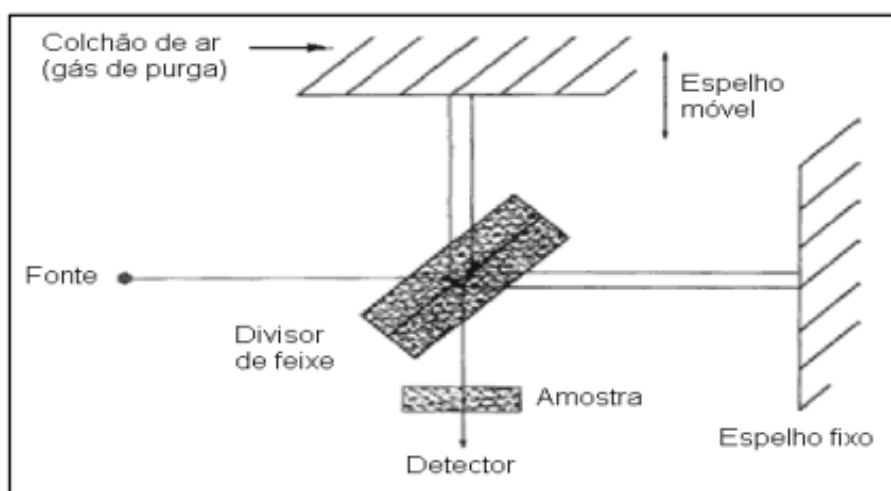
Região	Intervalo de número de onda (cm^{-1})	Região de comprimento de onda (nm)	Região de frequência (Hz)
Próximo (NIR)	12800 – 4000	780 – 2500	$3,8 \times 10^{14}$ – $1,2 \times 10^{14}$
Médio (MIR)	4000 – 200	2500 – 5000	$1,2 \times 10^{14}$ – $6,0 \times 10^{12}$
Distante (FIR)	200 – 10	5000 – 100000	$6,0 \times 10^{12}$ – $3,0 \times 10^{11}$

Fonte: Adaptado de ARAUJO, (2007).

O infravermelho próximo NIR compreende a região de 12800 a 4000 cm^{-1} (Tabela 3) e esta técnica apresenta muitas vantagens. As análises realizadas por infravermelho próximo não geram subprodutos tóxicos, o preparo da amostra é simples, apresentam alta penetração de radiação e não são técnicas destrutivas. (BAHRI et al., 2018). Por estas razões o emprego da espectroscopia de infravermelho próximo tem grande aplicação em diversas áreas (FERRARESI et al., 2012).

Para aplicação deste método é necessário prover-se de um equipamento especial para esta técnica, o espectrofotômetro ou espectrômetro. Neste equipamento já está implementado a operação matemática conhecida como Transformada de Fourier (FT) para computar espectros obtidos a partir de um interferograma. Desta forma, um espectrômetro possui três componentes básicos: o interferômetro de Michelson, a fonte e o detector. O interferômetro de Michelson é composto de um divisor de feixes, um espelho fixo e um espelho móvel. Através de uma fonte gera-se uma radiação que passa por meio do divisor de feixes, que conduz metade do feixe para um espelho móvel, e a outra metade para um espelho fixo. Estes dois feixes são refletidos nos dois espelhos e recombinados de forma construtiva ou destrutiva novamente no *beam splitter*. O feixe resultante incide através da amostra e prossegue até o detector. A figura 4 demonstra um esquema do interferômetro de Michelson (HAACK, 2013).

Figura 4- Esquematização de espectrofotômetro de infravermelho.



Fonte: PAVIA et al. (2010)

Esta técnica é muito empregada no setor alimentício e atualmente é considerada uma das técnicas mais eficazes para o controle da qualidade de alimentos. Entre as diferentes aplicações nesta área, destacam-se a utilização para determinação de teor de umidade, lipídios, proteínas, sólidos solúveis, além da investigação da autenticidade do produto e possíveis adulterações dos mesmos (MORGENTER et al., 2015).

Botelhos et al (2015) utilizaram a técnica de espectroscopia no infravermelho próximo associada a quimiometria para desenvolvimento de modelos para a detecção de fraudes com água, amido, citrato de sódio, formaldeído e açúcar em leite bovino. Além destes, outros autores tem utilizado esta técnica para a detecção de resíduos de antibióticos como as tetraciclinas em leite de vaca, demonstrando que sua utilização é eficiente e contribui de forma positiva neste setor (ARAUJO, 2007; BOTELHO et al., 2015).

3.7 QUIMIOMETRIA

A quimiometria é definida como a área da química que faz uso de métodos matemáticos, estatísticos e de lógica formal para eleger ou delinear procedimentos ótimos de medidas e experimentos; e extrair o maior número de informações químicas ressaltantes. Esta área é destinada designadamente à análise de dados químicos com natureza multivariada (FERREIRA et al., 1999a).

No Brasil, esta área de estudo começou a ser utilizada há mais de 30 anos, mas apenas se firmou quando o computador começou a fazer parte dos laboratórios de química. Recentemente, muita ênfase tem sido dada a esta área, na qual se podem medir diversas variáveis respectivamente ao se analisar uma amostra qualquer (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2006; TEIXEIRA, 2017).

Para realização das análises por métodos quimiométricos existem variadas ferramentas que podem ser aplicadas, tais como: Análise em Componentes Principais (do inglês *Principal Component Analysis* - PCA), Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (do inglês *Partial Least Squares* - PLS), Máquina de Vetor de Suporte (do inglês *Support Vector Machine* - SVM), Análise de Agrupamento Hierárquico (do inglês *Hierarchical Cluster Analysis*-HCA), dentre outras (NASCIMENTO et al., 2010).

As aplicações da quimiometria podem ser divididas em três principais áreas, sendo elas, planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões e calibração multivariada (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2006).

Além disso, a quimiometria convive em harmonia com diversas técnicas analíticas, entre elas a espectroscopia de infravermelho próximo ou infravermelho

médio. Desta maneira, a Quimiometria torna-se um instrumento de grande valor para extrair as informações contidas nos espectros permitindo a identificação e a quantificação de diversos parâmetros de diferentes matrizes (DE SOUZA et al., 2013; MARA et al., 2015; SIVAKESAVA; IRUDAYARAJ, 2002).

3.7.1 Classificação de Matrizes por Aprendizado de Máquina (AM)

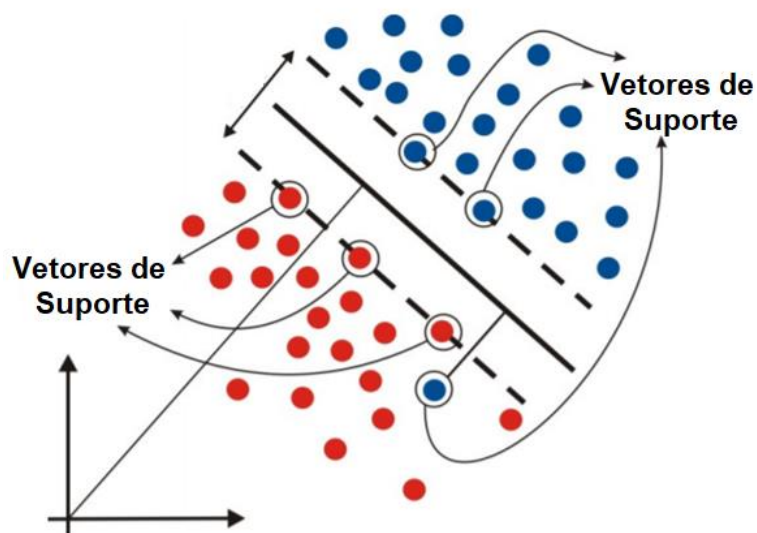
Na década de 1990, um novo tipo de algoritmo de aprendizado de máquina foi desenvolvido, com base nos resultados da teoria estatística do aprendizado: Máquina de Vetor de Suporte (do inglês *Support Vector Machine* - SVM).

O SVM é caracterizado por inicialmente mapear os pontos de entrada em um espaço de recursos e posteriormente descobrir um hiperplano de separação que maximiza a margem entre duas classes neste espaço. A maximização desta margem é um problema de Programação Quadrática (QP) e pode ser solucionado a partir de seu duplo problema, introduzindo multiplicadores Lagrangianos. Sem qualquer conhecimento do mapeamento, SVM encontra o hiperplano ideal utilizando as funções do produto pontual apresentando o espaço chamado *kernel*s. A solução do melhor hiperplano, que separa os grupos, pode ser escrita como uma combinação de alguns pontos de entrada que são chamados vetores de suporte (do inglês *Support Vectors* - SVs) (LIN; WANG, 2002; SCHLKOP; SMOLA, 2001).

Com intuito de facilitar a explicação deste método, Kanda *et al* (2013) utilizaram o seguinte exemplo ilustrativo: uma pessoa com olhos vendados necessita classificar balinhas em duas classes de cores, vermelhas ou azuis. Deste modo, se assume que cada classe apresenta atributos distintos, como sabor, aroma e consistência, estes atributos representam o vetor X_j . Inicialmente, é realizado o processo com um saco de balinhas como grupo de teste de SVM. Então as balinhas são depositadas sobre a mesa (o plano) e repartidas em grupos conforme seus atributos. Algumas balinhas permanecem na fronteira entre as duas cores e então são classificadas como Vetores de Suporte. Por conseguinte, é possível traçar uma linha equidistante entre as SVs, minimizando os erros de separação. Sendo assim, o resultado final é a separação das balinhas em duas classes, que foram separadas utilizando-se outros atributos e não as cores. Posteriormente, as balinhas de

treinamento são retiradas da mesa e as coordenadas pré-definidas são utilizadas para a classificação de novas balinhas.

Figura 5- SVM aplicada no exemplo das balinhas vermelhas e azuis.



Fonte: Adaptado de KANDA et al., (2013).

3.7.2 Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

A regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) é um método de calibração multivariada no qual duas matrizes, uma representando os sinais do equipamento (X) e outra representando as variáveis dependentes (Y), são correlacionadas para serem feitas as prescrições de modelos e a sua calibração (FERRÃO et al., 2004; ZIDAN et al., 2018).

Esta metodologia não requer uma informação correta de todos os elementos contidos nas amostras, podendo executar a análise de amostras mesmo na presença de interferentes, desde que estes também estejam presentes por ocasião da elaboração do modelo (CENTNER et al., 1996).

Este método de calibração multivariada é realizado através das seguintes etapas: preparação do conjunto de calibração (obtenção do conjunto de amostras), registro do sinal analítico (métodos que registrem as informações desejadas), pré-tratamento dos dados (minimização de contribuições indesejadas dos sinais),

construção do modelo (escolha do modelo com melhor relação entre o sinal instrumental e a propriedade estudada) e validação do modelo (análise quantitativa dos resultados do emprego do modelo em novas amostras) (NUNES, 2008).

A vantagem referente ao uso deste método é que ele disponibiliza calibrações vigorosas e desta forma pode ser aplicado em amostras complexas. Além disso, apresenta equações de modelo complexas devido à decomposição das matrizes geradas (NUNES, 2008; OLIVEIRA, 2006).

3.7.3 Pré-tratamento de Dados

Antes da efetivação da análise quimiométrica é necessário que os dados espectrais sejam pré-tratados, para que desta forma, todas as variações indesejadas sejam removidas ou reduzidas diminuindo suas influências no resultado final da análise. Para isto, existem duas formas de tratamento: a transformação que é aplicada sobre as amostras e o pré-processamento que é aplicado sobre as variáveis (BAHRI et al., 2018).

Entre os principais tipos de técnicas de transformação encontram-se o alisamento pelo método de Savitsky-Golay, as derivadas, a correção multiplicativa de espalhamento (MSC), a padronização normal de sinal (SNV) e a normalização. Já para o pré-processamento destaca-se a centragem dos dados na média. Para obtenção de um bom resultado é importante que vários destes métodos sejam testados, para garantir o emprego do pré-tratamento mais apropriado (FERREIRA, 2015).

3.7.3.1 Alisamento de Savitsky-Golay

Neste método, para o alisamento dos dados da amostra utiliza-se uma média ponderada, onde os pesos são obtidos através de um ajuste polinomial. Inicialmente é determinada a procedência do sinal, em seguida determina-se a largura do intervalo e o ponto central do intervalo, assim ocorre a remoção do ponto central do conjunto de pontos do intervalo, e então, há a adequação de um polinômio de grau

variável aos pontos remanescentes, esse polinômio é então utilizado para estimar o valor do ponto removido (FERREIRA, 2015).

3.7.3.2 Derivadas

As derivadas, comumente, são utilizadas para reduzir os problemas de deslocamento e inclinação da linha de base. Estes deslocamentos são causados por problemas instrumentais ou de amostragem e devem ser contidos para não influenciar no resultado final da análise. Em casos de deslocamento da linha base utiliza-se a aplicação da primeira derivada que pode ser calculada através da diferença entre dois valores consecutivos de absorbância, quando os intervalos de comprimento de onda são constantes (FERREIRA, 2015).

Já em casos de inclinação da linha base à medida que decresce o comprimento de onda, deve-se utilizar a segunda derivada, ou seja, encontrar a derivada da segunda derivada (FERREIRA, 2015).

3.7.3.3 Correção multiplicativa de espalhamento (MSC)

Este procedimento de transformação tem como finalidade corrigir os efeitos de espalhamentos causados por fenômenos físicos, como sensibilidade do detector, mudanças no caminho óptico, mudanças de temperatura, entre outros. Uma das vantagens desta técnica é a correção tanto de efeitos aditivos como de efeitos multiplicativos. Na execução desta técnica é aplicada uma transformação linear em cada espectro, onde os parâmetros de deslocamento corrigem os efeitos aditivos, e os parâmetros de escalonamento, os multiplicativos, fazendo com que os espectros combinem com o espectro médio do conjunto (BRERETON et al., 2017).

3.7.3.4 Padronização normal de sinal (SNV)

A SNV é muito semelhante à MSC, e desta forma tem como objetivo corrigir as interferências de espalhamento e as variações dos sinais observados nos espectros. Assim como a MSC, SNV pode ser utilizada para diminuir os efeitos

aditivos e multiplicativos. Sua execução corresponde a autoescalar cada linha da matriz original de dados para a obtenção de um espectro ideal. Este tipo de correção de linha de base e diminuição de tendência são sobrepostos para diversos tipos de dados espectrais (BRERETON et al., 2017).

3.7.3.5 Centragem dos dados na média

Este pré-processamento consiste em calcular a média das intensidades em cada comprimento de onda e subtrair cada intensidade do respectivo valor médio. Esta técnica é aconselhada para uso em dados espectroscópicos, pois acaba diminuindo o efeito de deslocamento da linha de base. Já a aplicação de outros pré-processamentos não é aconselhada para espectros, pois enfatiza a parte inicial do espectro e acaba gerando maior deslocamento da linha base (FERREIRA, 2015).

3.8 VALIDAÇÃO

Após a construção dos modelos é necessário sua validação, para ter certeza que os modelos gerados não serão super ajustados ou que não terão boa capacidade de previsão. Para isto, alguns fatores devem ser analisados, entre eles a detecção de amostras anômalas, a escolha do número de variáveis latentes e as figuras de mérito (FERREIRA, 2015).

3.8.1 Validação Cruzada e Validação Externa

A validação externa é um método de reamostragem que divide os dados disponíveis em duas subclasses, uma utilizada para a construção do modelo e a outra para julgamento do modelo. Neste tipo de validação, uma parte dos elementos é deixada de fora e o modelo é calibrado sem estes valores. Então, o modelo é usado para prever os dados excluídos e os resíduos equivalentes são computados. Esta tática é adequada para pequenos conjuntos de dados (BRERETON et al., 2018; KIRALJ; FERREIRA, 2009).

Na validação cruzada uma ou mais amostras são removidas do conjunto de calibração, desenvolve-se um modelo com as amostras remanescentes e realiza-se a previsão para estas amostras. Em seguida são introduzidas outra vez no conjunto de dados e outras amostras são retiradas. Este procedimento é reproduzido até que todas as amostras do conjunto de calibração sejam examinadas (FERREIRA et al., 1999a; KIRALJ; FERREIRA, 2009).

3.8.2 Amostras Anômalas

As amostras anômalas correspondem às amostras que possuem perfil diferente das demais do conjunto analisado. A presença destas amostras prejudica a qualidade e o desempenho do modelo obtido. Desta forma, torna-se importante a detecção e eliminação de amostras anômalas no conjunto de dados. Uma das principais formas de detecção destes outliers é a análise de T^2 de *Hotelling* (FERREIRA et al., 1999a; FERREIRA, 2015).

3.8.3 Escolha das Variáveis

A escolha das Variáveis Latentes (VL) se faz necessária para a certificação da validade do modelo de regressão. A seleção de poucas variáveis implica em um subajuste dos modelos. Já a utilização de um número elevado de variáveis conduz a um superajuste do modelo. Desta forma, se faz necessário à utilização de uma validação interna ou de uma validação externa para seleccionar o número de variáveis latentes (BAHRI et al., 2018; BRERETON et al., 2018).

Por meio da validação externa ou interna é possível determinar os parâmetros: erro padrão de calibração (RMSEC), erro padrão de predição externa (RMSEP) e erro padrão de predição interna cruzada (RMSECV). E então, construindo um gráfico destes parâmetros versus o número de variáveis latentes é possível determinar o número ótimo de variáveis latentes a serem empregadas (FERREIRA, 2015; MARA et al., 2015).

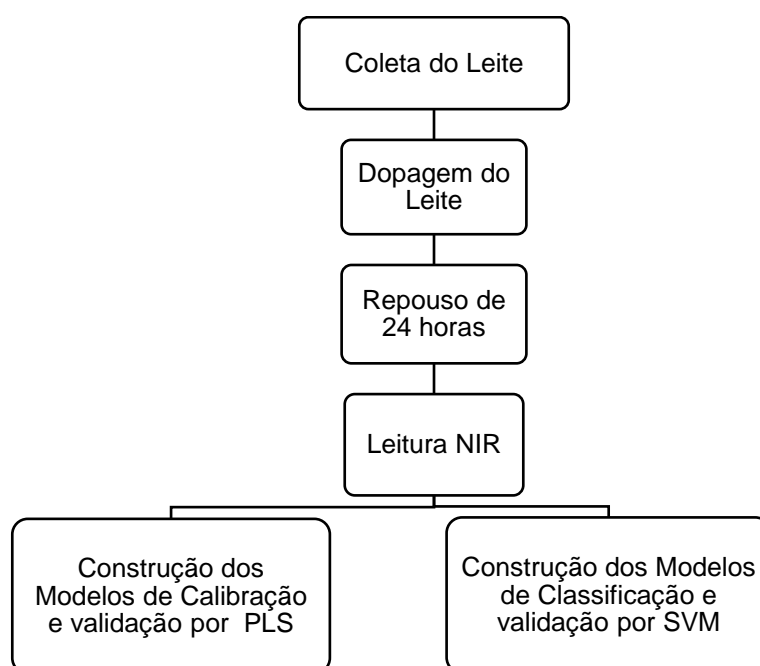
Além destes parâmetros, outros podem ser analisados para a avaliação da robustez e capacidade de previsão dos modelos. Entre eles o coeficiente de

correlação (R^2) e a Razão da Performance do Desvio (RPD) (KIRALJ; FERREIRA, 2009).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste trabalho foram realizadas as etapas representadas no fluxograma da Figura 6.

Figura 6 - Fluxograma do processo de análise de amostras de leite dopado com doramectina e abamectina.



Fonte: Autoria Própria, (2019).

4.1 COLETA DO LEITE

As amostras de leite de vaca cru utilizadas para o desenvolvimento do trabalho foram adquiridas em uma propriedade rural situada no município de Irati, Santa Catarina. Após a coleta, cerca de 2 litros de leite foram depositados em frascos higienizados e transportados em caixa térmica com gelo até o laboratório de alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), câmpus Pato Branco.

Após a coleta, as amostras foram armazenadas sobre refrigeração até o momento da análise. A escolha da propriedade para coleta da amostra aconteceu

devido o plantel de vacas leiteiras da propriedade ser isento dos tipos de medicamentos analisados nesta pesquisa.

4.2 DOPAGEM DAS AMOSTRAS

O leite cru adquirido foi submetido ao preparo inicial, onde foram acrescentadas diferentes concentrações dos medicamentos da classe avermectina, visando adulterações em sua matriz. Para obter diferentes concentrações, inicialmente foram preparadas duas soluções estoque. Uma das soluções estoque foi gerada a partir do medicamento Doramectina 1% da marca Dorax e a outra a partir da Abamectina 1% da marca Calbos. Ambas as soluções estoques produzidas apresentavam concentração final de 10 mg L^{-1} e foram compostas mediante a adição dos medicamentos em 50 mL de leite cru. As dopagens foram realizadas de maneiras independentes, ou seja, houve uma dopagem com Doramectina em uma matriz de leite cru, bem como também foi realizada outra dopagem com Abamectina em outra matriz láctea.

Por meio das soluções estoque, foram preparadas 126 amostras, sendo 63 amostras dopadas com Abamectina e 63 amostras dopadas com Doramectina. As diferentes concentrações foram obtidas por meio de diluições da solução estoque em 10 mL de leite cru. Tanto o conjunto de dados das amostras dopadas com Abamectina como o conjunto das amostras dopadas com Doramectina apresentaram concentrações que variaram de $0,025$ a $3,000 \text{ mg L}^{-1}$. A composição de cada amostra analisada encontra-se exposta na Tabela 4. A faixa de concentração empregada foi definida levando em consideração os LMR's.

Tabela 4- Composição das amostras dopadas com Abamectina e Doramectina.

Amostra	Abamectina (mg L^{-1})	Amostra	Doramectina (mg L^{-1})
1	0,025	64	0,025
2	0,050	65	0,050
3	0,100	66	0,100
4	0,150	67	0,150
5	0,200	68	0,200
6	0,250	69	0,250

7	0,300	70	0,300
8	0,350	71	0,350
9	0,400	72	0,400
10	0,450	73	0,450
11	0,500	74	0,500
12	0,550	75	0,550
13	0,600	76	0,600
14	0,650	77	0,650
15	0,700	78	0,700
16	0,750	79	0,750
17	0,800	80	0,800
18	0,850	81	0,850
19	0,900	82	0,900
20	0,950	83	0,950
21	1,000	84	1,000
22	1,025	85	1,025
23	1,050	86	1,050
24	1,100	87	1,100
25	1,150	88	1,150
26	1,200	89	1,200
27	1,250	90	1,250
28	1,300	91	1,300
29	1,350	92	1,350
30	1,400	93	1,400
31	1,450	94	1,450
32	1,500	95	1,500
33	1,550	96	1,550
34	1,600	97	1,600
35	1,650	98	1,650
36	1,700	99	1,700
37	1,750	100	1,750
38	1,800	101	1,800
39	1,850	102	1,850
40	1,900	103	1,900
41	1,950	104	1,950
42	2,000	105	2,000
43	2,025	106	2,025
44	2,050	107	2,050

45	2,100	108	2,100
46	2,150	109	2,150
47	2,200	110	2,200
48	2,250	111	2,250
49	2,300	112	2,300
50	2,350	113	2,350
51	2,400	114	2,400
52	2,450	115	2,450
53	2,500	116	2,500
54	2,550	117	2,550
55	2,600	118	2,600
56	2,650	119	2,650
57	2,700	120	2,700
58	2,750	121	2,750
59	2,800	122	2,800
60	2,850	123	2,850
61	2,900	124	2,900
62	2,950	125	2,950
63	3,000	126	3,000

Fonte: Autoria própria, (2019).

Após as adulterações, as amostras foram deixadas em repouso por 24 horas sobre refrigeração. Esta etapa de repouso é fundamental para que o medicamento se incorpore na matriz do leite. Em seguida, as amostras seguiram para etapa das análises dos espectros NIR.

4.3 AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS DE NIR

A obtenção dos espectros das amostras de leite cru sem e com adulteração ocorreu através do espectrômetro de infravermelho próximo com transformada de Fourier (FT-NIR), equipamento da marca Bruker, modelo MPA. As medidas foram realizadas em triplicata, utilizando-se de um acessório *cupeta* de quartzo em fluxo. Na tabela 5, estão expostos os parâmetros utilizados na aquisição dos espectros de NIR.

Tabela 5 - Parâmetros utilizados na aquisição dos espectros de NIR.

Região espectral	4.000 a 12.000 cm^{-1}
Resolução espectral	16 cm^{-1}
Varredura	32
Volume de amostra	3 mL

Fonte: Autoria própria, 2019.

Nesta etapa, todas as amostras dopadas e a amostra do branco (livre de adulterações) foram analisadas diretamente, sem nenhum pré-tratamento, inserindo-se cerca de 3 mL de amostra na cubeta de fluxo do equipamento. Todos os espectros foram obtidos em triplicata, sendo assim, por meio desta análise foram obtidos 189 espectros de amostras adulteradas com Abamectina, 189 espectros de amostras adulteradas com Doramectina e 3 espectros de amostra de leite cru sem adulteração.

4.4 REGRESSÃO POR MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS

4.4.1 Pré-tratamento dos Dados

Primeiramente realizou-se a média das triplicatas dos espectros para cada amostra através do *software* ChemoStat. Nos espectros das amostras de leite obtidos, foram aplicadas diferentes transformações e pré-processamentos: correção multiplicativa de espalhamento (MCS); alisamento de Savitsky-Golay com primeira derivada, polinômio de primeira ordem e janela de 15 pontos; primeira derivada; normalização; padronização normal de sinal (SNV) e centragem dos dados na média, todos realizados através do *software* ChemoStat. Os tratamentos selecionados foram aqueles que apresentaram melhores modelos de calibração e validação, segundo suas figuras de mérito.

4.4.2 Desenvolvimento dos Modelos de Calibração

Inicialmente realizou-se a seleção das regiões dos espectros que possuíam informações mais relevantes para produção dos modelos de calibração, que foi concretizada por meio da técnica de Análise de Componentes Principais (PCA) através do *software* Pirouette. No desenvolvimento dos modelos, 2/3 das amostras foram utilizados para construção e 1/3 foi utilizado na validação dos mesmos. A seleção do conjunto de amostras de calibração e validação foi realizada por meio do algoritmo de Kennard-Stone através do *software* ChemoStat. O algoritmo inicialmente define as duas amostras que apresentam maior distância entre si, empregando a distância euclidiana. Para escolher novas amostras para o conjunto, o algoritmo seleciona a amostra mais distante daquelas que foram selecionadas previamente. Este processo é reproduzido até que o número ideal de amostras seja alcançado (KENNARD; STONE, 1969). O número de variáveis latentes foi selecionado por meio do método de validação cruzada e a remoção de *outliers* através do teste T^2 de *Hotelling*.

Posterior às seleções de dados e a aplicação dos tratamentos, realizou-se a construção dos modelos de calibração. As análises de PLS foram desenvolvidas por intermédio do *software* ChemoStat e os gráficos apresentados ao longo deste trabalho foram desenvolvidos por meio do *software* OriginPro8.0.

4.4.3 Validação dos Modelos

A validação dos modelos foi realizada por dois métodos:

- a. Validação externa por grupo teste (*test set*). Para execução deste teste, 1/3 das amostras foi separada do conjunto total e foi utilizada para validação.
- b. Validação interna Cruzada (*cross validation*). Na execução deste teste uma ou duas amostras foram retiradas do conjunto de calibração, desenvolveu-se um modelo com as amostras remanescentes e realizou-se a previsão para estas amostras. Em seguida, estas amostras foram introduzidas outra vez no conjunto de dados e outras amostras foram retiradas.

Assim como a construção dos modelos, a validação foi realizada por meio do *software* ChemoStat.

4.5 CLASSIFICAÇÃO POR MÁQUINA DE VETOR DE SUPORTE

4.5.1 Calibração do Modelo de Classificação

Para o modelo de classificação foram utilizados separadamente os dois conjuntos de dados espectrais das amostras dopadas com Abamectina e Doramectina. Na construção do modelo de classificação, aplicou-se o método de Máquina de Vetor de Suporte através do *software Weka*. A coleta do conjunto de dados foi realizada como citado no item 4.3. Após aquisição dos dados, foi realizada a seleção do atributo a ser utilizado na construção do modelo, neste caso o atributo utilizado para separação das duas classes foi à intensidade da absorção nos diferentes números de onda e sua seleção foi realizada através de algoritmo genético. Posterior à seleção dos atributos, realizou-se a análise de SVM, que por meio dos atributos selecionados classificou as amostras em duas categorias (leite dopado com Abamectina e leite dopado do Doramectina) por meio de seu hiperplano.

4.5.2 Validação do Modelo de Classificação

Para a validação do modelo construído, foram utilizados os seguintes testes:

1. Validação cruzada 10%, na qual o conjunto de amostras foi separado em 10 partes iguais. Essa porcentagem de amostra foi comparada com o restante das amostras utilizadas como teste. Posteriormente, estas amostras retornaram para o conjunto de aprendizagem e novos 10% das amostras foram retiradas e testadas. Este procedimento foi realizado sucessivamente até que todas as amostras foram testadas.
2. Por meio de divisão percentual, 70% das amostras foram utilizadas como conjunto de calibração e 30% como conjunto de validação.

4.5.3 Figuras de Mérito (FOM)

Para avaliar a qualidade do modelo construído analisou-se as seguintes figuras de mérito: coeficiente de correlação, índice kappa, sensibilidade ou taxa positiva (TP%), precisão, acurácia e área sob a curva (curva ROC).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 VALORES DE REFERÊNCIA

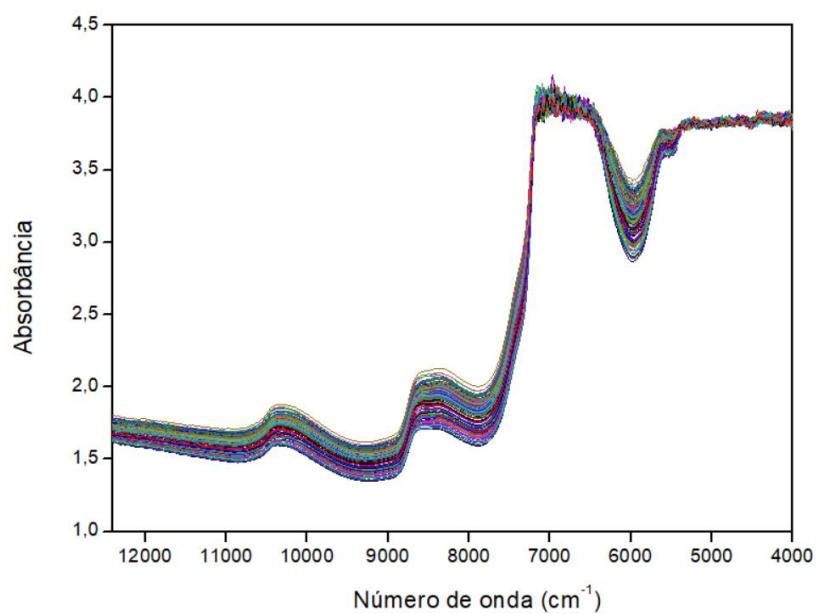
Na construção dos modelos de calibração multivariada e para detecção dos medicamentos abamectina e doramectina foram pré-definidas algumas concentrações que seriam utilizadas na dopagem das amostras de leite. Estas concentrações foram decididas analisando-se os valores de LMR's e tendo como foco ressaltar a sensibilidade da técnica, deste modo trabalhou-se com valores em mg L^{-1} . Os valores de referência utilizados neste trabalho encontram-se expostos na Tabela no item 4.2.

É importante ressaltar que para melhorar a sensibilidade e robustez dos modelos construídos seria importante realizar uma análise de referência que avaliasse as concentrações reais após a dopagem das amostras, como exemplo, Cromatografia, e mais especificamente análise CLAE. Porém, neste trabalho não foi realizada nenhuma análise de referência. As concentrações utilizadas nesta pesquisa foram nominais expressas em mg L^{-1} .

5.2 ESPECTROS DE NIR

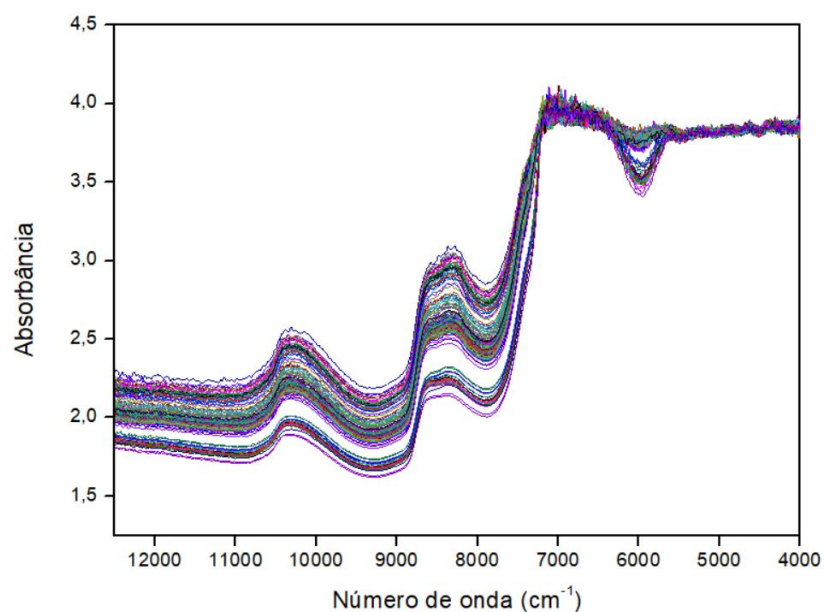
Os espectros das amostras adulteradas com abamectina e doramectina foram obtidos conforme descrito no item 4.3 e podem ser visualizados nas Figuras 7 e 8.

Figura 7- Espectro de NIR das amostras de leite adulteradas com Abamectina.



Fonte: Aatoria Própria, (2019).

Figura 8- Espectro de NIR das amostras de leite adulteradas com Doramectina.



Fonte: Aatoria Própria, (2019).

É possível observar que todas as amostras apresentam o mesmo perfil espectral (Figuras 7 e 8), mas com diferentes intensidades. As principais faixas observadas nos espectros analisados estão na faixa de 6900-6844 cm⁻¹, onde é

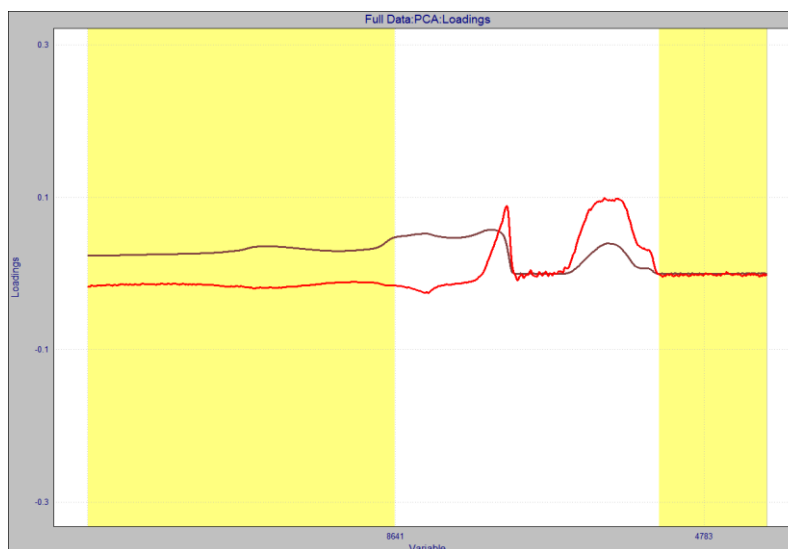
possível observar bandas de absorção correspondentes à água, mais especificamente ao primeiro sobretom do estiramento O-H. Outra banda equivalente à absorção da água é observada na faixa de 5200-5100 cm^{-1} , banda característica da combinação das bandas O-H e H-O-H, provenientes da vibração de segundo sobretom (FERREIRA, 2013; STUART, 2004; WU et al., 2008). A presença destas bandas nos espectros do leite são características, devido à água ser o componente em maior quantidade na composição deste produto. Além destas, observa-se bandas na faixa de 8000-9000 cm^{-1} características de 2ª *overtones* C-H e 7000-6000 cm^{-1} correspondentes a primeiras combinações de *overtones* C-H. Ambas as faixas apresentadas são características da composição do leite que apresenta diversas ligações CH (BRUKER, 2013; STUART, 2004).

Analisando estes espectros, é nítido que os mesmos apresentam bandas semelhantes, mas com intensidades diferentes. Por apresentarem os mesmos picos independentemente das condições das amostras e devido à técnica de NIR demonstrar apenas *overtones* e combinações, se faz necessário à utilização e aplicação de técnicas quimiométricas que possam extrair informações químicas importantes destes espectros, para conseqüentemente identificar e quantificar as possíveis adulterações presentes nas matrizes dessas amostras (SOUZA et al, 2013).

5.3 SELEÇÃO DAS FAIXAS ESPECTRAIS

Visando melhorar a sensibilidade do método de quantificação por PLS foi realizada a exclusão de faixas espectrais com poucas variações de dados e com sinais de ruídos. Conseqüentemente houve a seleção das regiões que continham informações importantes para o desenvolvimento dos modelos. Este processo foi realizado por meio da técnica PCA a partir do gráfico de *loading* e de resíduos espectrais, no qual houve a seleção do menor número de fatores que apresentaram a maior porcentagem de variabilidade nos dados. Na Figura 7 estão demonstradas as faixas espectrais excluídas (faixas amarelas) do conjunto de amostras de leite cru adulteradas com abamectina e doramectina utilizadas para desenvolvimento dos modelos.

Figura 9- Gráfico de *loading* para o conjunto de dados espectrais de abamectina e doramectina para o desenvolvimento dos modelos de regressão, onde as regiões amarelas correspondem às faixas excluídas do conjunto de dados.



Fonte: Autoria Própria, (2019).

As faixas espectrais excluídas da aplicação no desenvolvimento dos modelos encontram-se descritas na Tabela 6.

Tabela 6- Faixas espectrais excluídas do desenvolvimento dos modelos.

Amostra	Parâmetro	Faixas Utilizadas (cm ⁻¹)
Leite Cru	Abamectina	8648,0 a 5347,2
Leite Cru	Doramectina	8648,0 a 5347,2

Fonte: Autoria própria, 2019.

5.4 DESENVOLVIMENTO DOS MODELOS PLS

O desenvolvimento dos modelos de quantificação foi realizado por meio do *software ChemoStat* através da aplicação do método PLS. Os dados espectrais foram organizados em uma matriz e correlacionados a um vetor que registra a concentração equivalente a cada espectro. Para minimização de erros e melhoria da

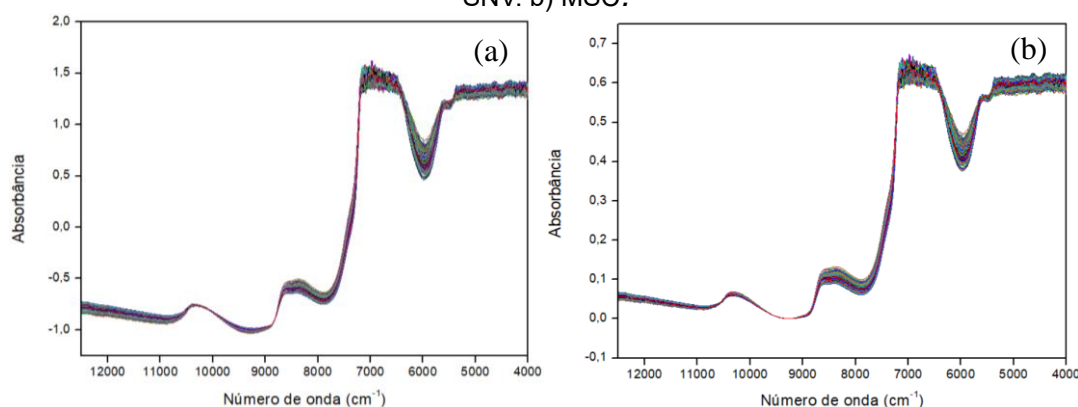
elaboração dos modelos, foram empregados pré-tratamentos, seleção de faixas espectrais, remoção de *outliers* e escolha do número ideal de variáveis latentes (VL).

5.4.1 Abamectina

5.4.1.1 Pré-Tratamento e remoção de *outliers*

Como pré-tratamento nos espectros das amostras de leite com abamectina foram utilizados: normalização (By range 1-0); *meancenter* (MC); Correção Multiplicativa de Espalhamento (MSC); Alisamento de Savitsky-Golay (SG) com primeira derivada, polinômio de primeira ordem e janela de 11 pontos; primeira derivada (1D) e Padronização Normal de Sinal (SNV). Os tratamentos que apresentaram os melhores modelos foram normalização (By range 1-0), *meancenter*, SNV e MSC. A figura 10 representa o espectro de leite na presença de abamectina, após a aplicação do tratamento By Range + SNV e MSC, tratamentos que apresentaram os melhores resultados.

Figura 10- Espectro de NIR das amostras de leite adulteradas com Abamectina com: a) By Range + SNV. b) MSC.

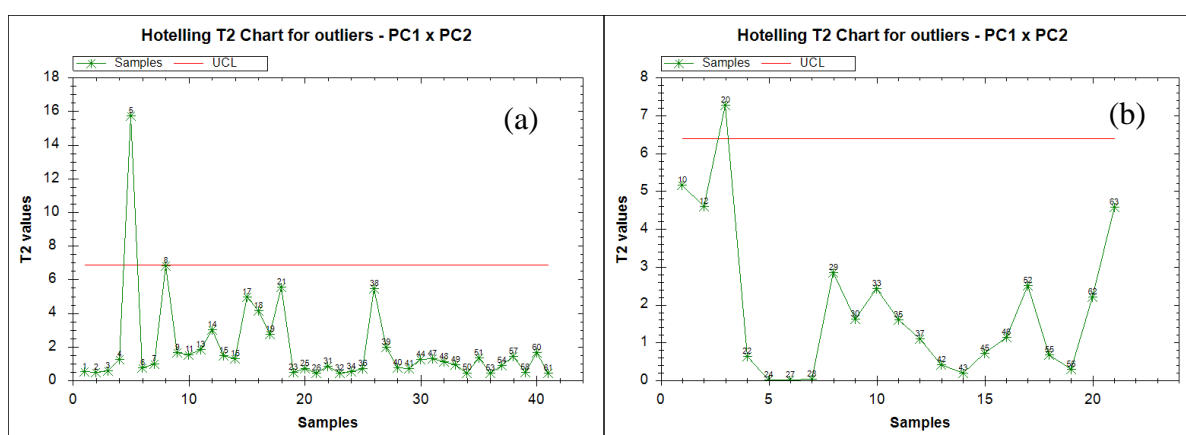


Fonte: Autoria própria, 2019.

Com intuito de melhorar a sensibilidade dos modelos a serem desenvolvidos, foram retiradas algumas amostras anômalas (*outliers*), que apresentavam características distintas do conjunto de dados. Duas amostras (5 e 8) apresentaram-se como *outliers* das demais amostras do conjunto para a calibração e uma amostra

(20) para a validação, conforme a Figura 11. Ambas as amostras consideradas anômalas foram removidas do conjunto de dados.

Figura 11- Gráfico de *outliers* conjunto Abamectina: a) Calibração; b) Validação.

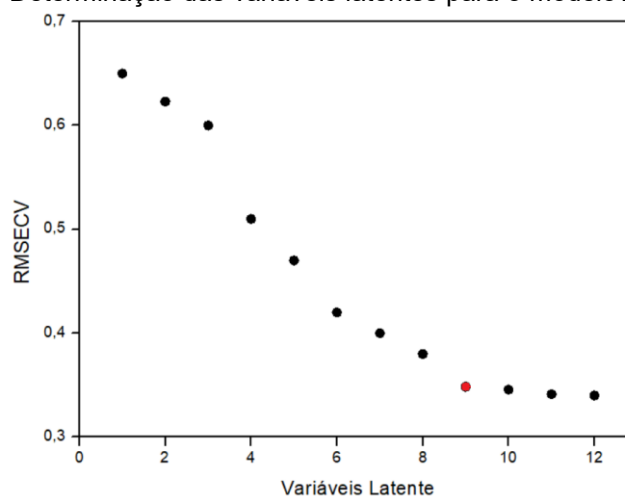


Fonte: Autoria própria, 2019.

5.4.1.2 Escolha das Variáveis Latentes (VL)

Como citado anteriormente, a escolha de variáveis latentes é um passo fundamental para que os modelos gerados não sofram subajuste ou superajuste. Sendo assim, o número de VL foi definido através da validação cruzada. Neste procedimento avaliou-se a relação RMSECV que apresentou a melhor dimensionalidade no modelo de regressão. Desta forma, o número de VL ideal para a modelagem das amostras adulteradas com abamectina foi 9, conforme figura 12.

Figura 12- Determinação das variáveis latentes para o modelo Abamectina.



Fonte: Autoria Própria, 2019.

5.4.1.3 Modelos de calibração e validação

Através da aplicação da técnica PLS, o software utilizado relacionou as concentrações de referência com os espectros obtidos pelo equipamento e após aplicação dos tratamentos estatísticos foram gerados cinco modelos de calibração para a detecção de abamectina, seus resultados estão apresentados na Tabela 7. Analisando os resultados, é possível avaliar que ambos os modelos apresentaram R^2 superior a 0,97. Além disso, os valores de RMSEC obtidos para cada modelo foram baixos, demonstrando erros de calibração pequenos.

Tabela 7- Modelos de calibração para quantificação de Abamectina em Leite.

	MC	SNV	MSC	MC + SG (1D)	BY R + SNV
R²	0,9906	0,9890	0,9994	0,9896	0,9998
RMSEC	0,0297	0,0321	0,0233	0,0309	0,0044
VL	9	9	9	9	9

R^2 - Coeficiente de Correlação, RMSEC - Raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração, VL- Variáveis Latentes.

Fonte: Autoria própria, 2019.

De modo geral, todos os modelos apresentaram resultados de calibração aceitáveis, no entanto, neste estudo consideraram-se os melhores modelos àqueles

que apresentaram baixos valores de RMSEC e altos valores de R^2 . Desta maneira, os parâmetros dos dois melhores modelos para quantificação de Abamectina em leite cru estão expostos na Tabela 8.

Tabela 8- Resultados calibração e validação para modelos da Abamectina em Leite.

	MSC	BY R + SNV
R^2 (CAL)	0,9994	0,9998
RMSEC	0,0075	0,0044
R^2 (test set)	0,3161	0,3239
RMSEP	0,2200	0,2175
RMSECV	0,3484	0,3484
RMSECV/ RMSEP	1,5836	1,6018
VL	9	9

R^2 - Coeficiente de Correlação, CAL- Calibração, RMSEC, RMSEP e RMSECV - Raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração, de previsão e de validação cruzada, VL- Variáveis Latentes.

RER E RPD?

Fonte: Autoria própria, 2019.

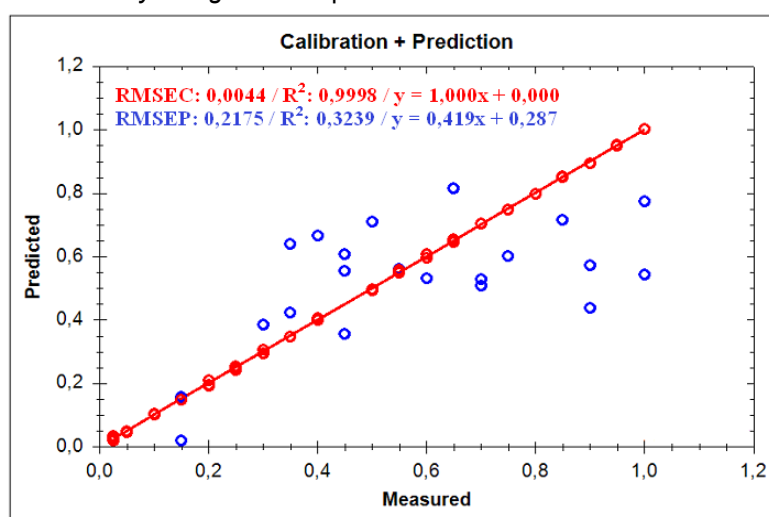
O modelo obtido a partir do processamento By Range (1-0) + SNV apresentou os melhores resultados tanto para calibração quanto para a validação. Na calibração o valor de R^2 obtido foi de 0,9998 e RMSEC 0,0044, resultados considerados satisfatórios, pois valores de R^2 superiores a 0,83 indicam boa robustez na calibração e valores baixos de RMSEC indicam erros pequenos no conjunto de calibração (ELFADL; REINBRECHTA; CLAUPEIN, 2010). Apesar de apresentar resultados satisfatórios na calibração, este modelo apresentou baixo coeficiente de correlação para seu modelo de validação, pois o R^2 obtido foi igual a 0,3239, valor muito baixo, o que demonstra baixa robustez de predição. Além disso, para apresentar boa robustez os modelos devem apresentar valores de RMSECV/RMSEP inferiores a 1,20 e o modelo construído apresentou valor igual a 1,6018. Em consequência disto, este modelo não apresenta boa capacidade de predição de amostras desconhecidas e seu aperfeiçoamento se torna necessário (COÛTEAUX et al., 2005; LU et al., 2014).

A aplicação do tratamento MSC apresentou resultados inferiores ao tratamento By Range + SNV, mas melhores que os apresentados pelos demais pré-

tratamentos utilizados. Para este tratamento, obteve-se R^2 : 0,9994 para calibração e RMSEC: 0,2142 resultados relativamente adequados para este tipo de modelagem. Entretanto, a validação foi totalmente insatisfatória, pois o R^2 foi igual a 0,3161 e RMSEC/RMSEP 1,5836.

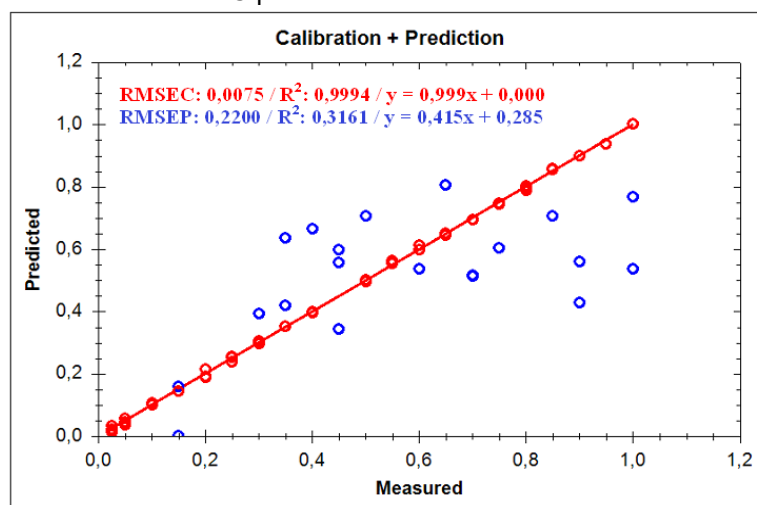
As Figuras 13 e 14 apresentam os gráficos de regressão do tratamento *By Range* + SNV e MSC, que demonstram a relação entre os valores preditos e os valores reais para a quantificação de Abamectina no leite cru.

Figura 13- Relação entre os valores reais e os valores preditos obtidos pelos modelos com o tratamento *By Range* + SNV para os teores de Abamectina em Leite.



Fonte: Autoria própria, 2019.

Figura 14- Relação entre os valores reais e os valores preditos obtidos pelos modelos com o tratamento MSC para os teores de Abamectina em Leite.



Fonte: Autoria própria, 2019.

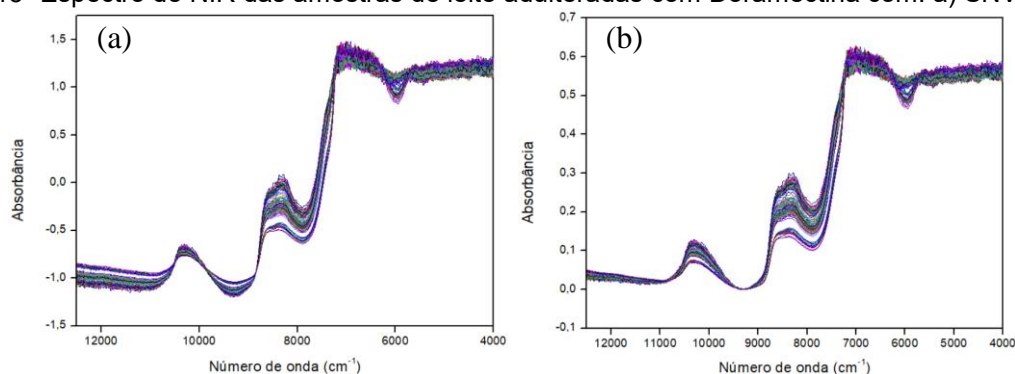
Avaliando os gráficos de regressão observa-se que em ambos os tratamentos, o conjunto de calibração apresentou ótima relação entre os valores preditos e os valores reais, e, portanto, as amostras encontram-se sobre a curva de regressão. Porém, a correlação entre os valores preditos (quantificados pela técnica NIR) e reais (concentrações aplicadas na matriz do leite) do conjunto de validação não foi satisfatório, e desta forma, a maioria das amostras estão dispersas entorno da curva de regressão, correspondendo a erros mais elevados na predição das amostras.

5.4.2 Doramectina

5.4.2.1 Pré-Tratamento e remoção de *outliers*

Para definição de modelos com boa robustez e boa sensibilidade foram aplicados os seguintes tratamentos estatísticos: Correção multiplicativa de espalhamento (MSC); Alisamento de Savitsky-Golay (SG) com primeira derivada, polinômio de primeira ordem e janela de 13 pontos; normalização (By range 1-0); primeira deriva (1D) com janela de 13 pontos; Padronização normal de sinal (SNV) e *meancenter* (MC). Os melhores resultados foram observados com a aplicação dos tratamentos de SNV e MSC. A figura 15 demonstra o espectro de leite com resíduos de Doramectina com aplicação do tratamento SNV e MSC, os quais apresentaram os melhores resultados.

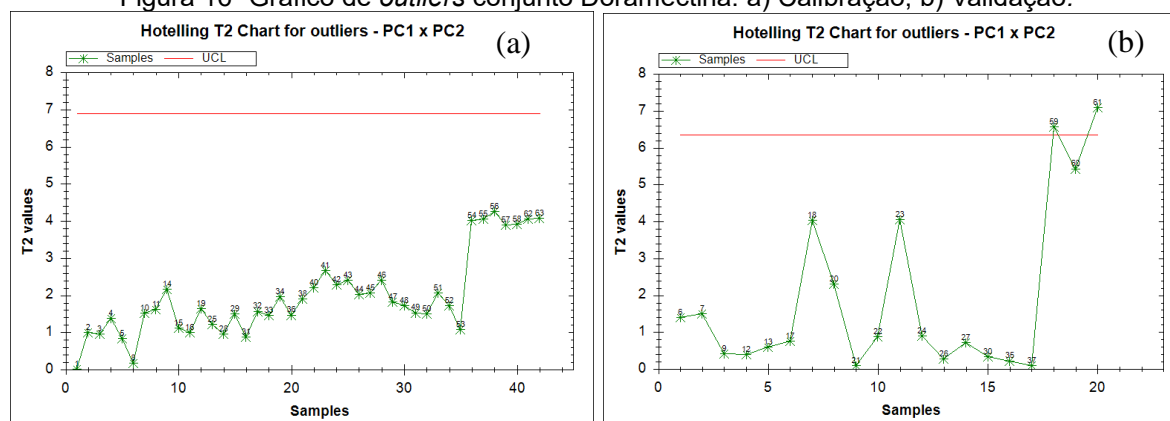
Figura 15- Espectro de NIR das amostras de leite adulteradas com Doramectina com: a) SNV b)MSC.



Fonte: Autoria própria, 2019.

O procedimento de remoção de amostras que apresentavam perfis distintos das demais amostras do conjunto de dados foi realizado através do teste de T^2 de *Hotelling*. Por conseguinte, foram retiradas 2 amostras (59 e 61) do conjunto de validação, pois como visto na Figura 16, essas amostras apresentaram características diferentes das demais amostras do conjunto, sendo assim, consideradas como *outliers*. Nenhuma das amostras do conjunto de calibração apresentou comportamento anômalo, não sendo necessárias remoções. A eliminação das *outliers* possibilitou o impedimento dos modelos serem afetados e prejudicados, conseqüentemente houve o aumento na sensibilidade da técnica.

Figura 16- Gráfico de *outliers* conjunto Doramectina: a) Calibração; b) Validação.

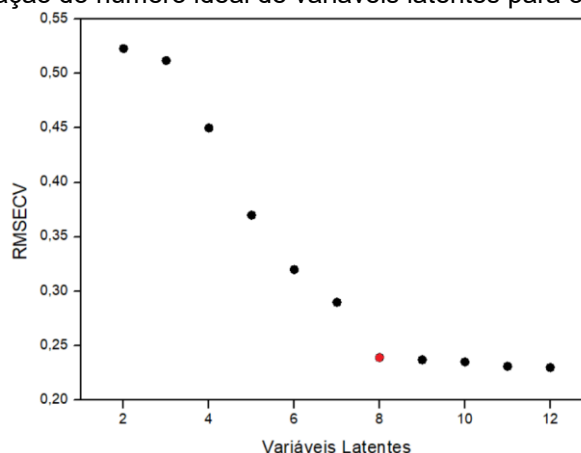


Fonte: Autoria própria, 2019.

5.4.2.2 Escolha das variáveis latentes

Para a modelagem por PLS dos dados espectrais das amostras de leite adulteradas com Doramectina realizou-se a escolha das VL por meio da validação cruzada. Deste modo, analisou-se a relação RMSECV com o melhor desempenho e definiu-se que o número ideal de VL para o desenvolvimento dos modelos (Figura 17).

Figura 17- Determinação do número ideal de variáveis latentes para o modelo Doramectina.



Fonte: Autoria própria, 2019.

5.4.2.3 Modelos de calibração e validação

A partir da seleção da faixa espectral, remoção de *outliers* e seleção do conjunto de construção, foram utilizadas 42 amostras para a calibração dos modelos e 19 para sua validação. Para desenvolver os modelos, os dados espectrais foram relacionados aos valores das concentrações por meio de uma matriz. Na qual, cada linha correspondia a uma amostra e, as colunas condiziam às suas absorvâncias em todos os números de onda para cada uma das amostras (FERREIRA, 2013).

Desta forma, cinco modelos foram obtidos para quantificação de Doramectina em leite cru. Ao analisar os resultados na Tabela 9 é possível observar que os valores de R^2 para ambos os modelos foram maiores que 0,97. E ambos apresentaram bons resultados para RMSEC (valores baixos), evidenciando resultados satisfatórios quanto à calibração dos modelos.

Tabela 9- Modelos de calibração para quantificação de Doramectina em Leite.

	MC + SNV	SNV	MSC	MC + SG(1D)	MC + 1D
R²	0,9799	0,9964	0,9972	0,9896	0,9957
RMSEC	0,0431	0,0182	0,0163	0,0309	0,0197
VL	8	8	8	8	8

R^2 - Coeficiente de Correlação, RMSEC - Raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração, VL- Variáveis Latentes.

Fonte: Autoria própria, (2019).

Neste trabalho, os melhores modelos foram considerados aqueles que apresentaram os maiores valores de R^2 e os menores valores de RMSEC. Desta forma, os dois modelos escolhidos para as amostras adulteradas com Doramectina encontram-se expostos na Tabela 10.

Tabela 10- Resultados calibração e validação para modelos da Doramectina em Leite.

	SNV	MSC
R² (CAL)	0,9964	0,9972
RMSEC	0,0182	0,0163
R² (VAL)	0,5212	0,5216
RMSEP	0,1926	0,1924
RMSECV	0,2365	0,2392
RMSECV/ RMSEP	1,2279	1,2432
VL	8	8

R²- Coeficiente de Correlação, CAL- Calibração e VAL- Validação, RMSEC, RMSEP e RMSECV - Raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração, de previsão e de validação cruzada, VL- Variáveis Latentes.

Fonte: Aatoria Própria, (2019).

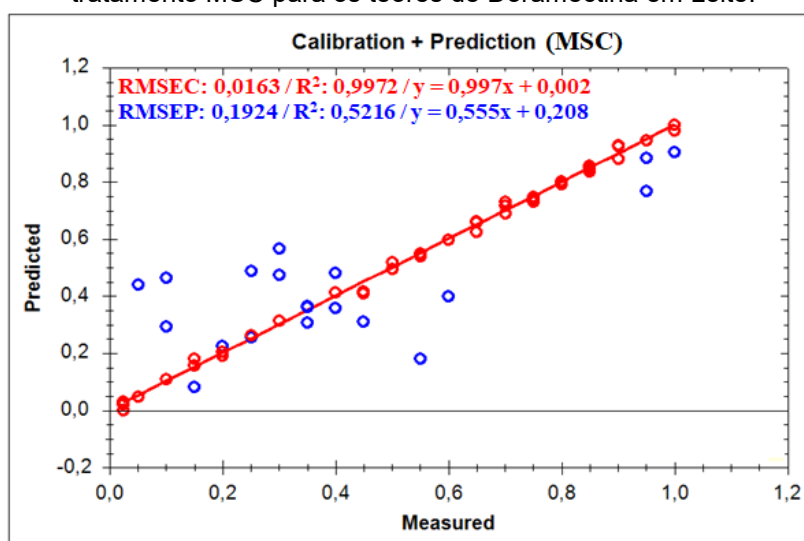
Para a quantificação do teor de Doramectina na matriz de leite o melhor modelo foi obtido através da aplicação do tratamento MSC. A MSC é um dos métodos mais aplicados na correção do conjunto de dados NIR, devido a auxiliar na remoção de flutuações da linha base e imperfeições, tornando a utilização apenas das informações químicas contidas no conjunto de dados (DE SOUZA et al., 2013; SOUZA; POPPI, 2012). Este modelo apresentou coeficiente de correlação de calibração igual a 0,9972. Além disso, este modelo apresentou baixo valor de RMSEC, evidenciando uma boa robustez na calibração do modelo. Este modelo apresentou o melhor resultado tanto na calibração como na validação, apresentando RMSEP de 0,1924 e REMSECV 0,2392, porém, o R^2 de validação foi igual a 0,5216. Este coeficiente de correlação não é satisfatório, pois baixos valores de R^2 podem influenciar significativamente na previsão de amostras desconhecidas e demonstram que a validação do modelo não apresentou boa robustez. A razão RMSECV/RMSEP

para este modelo foi igual a 1,2432, valor pouco satisfatório, pois modelos robustos devem apresentar resultados inferiores a 1,20 (ALVES et al., 2012; LU et al., 2014).

O modelo obtido a partir do tratamento SNV apresentou resultados inferiores ao tratamento citado anteriormente, porém, seus resultados foram mais satisfatórios que os resultados obtidos com os demais tratamentos apresentados (Tabela 10). Para este modelo obteve-se bons resultados de calibração, os quais foram R^2 : 0,9964 e REMSEC:0,0182. Porém, os resultados de validação foram insatisfatórios, pois o coeficiente de correlação apresentou baixo valor, R^2 : 0,5212 e RMSECV/REMSEP foi igual a 1,2279.

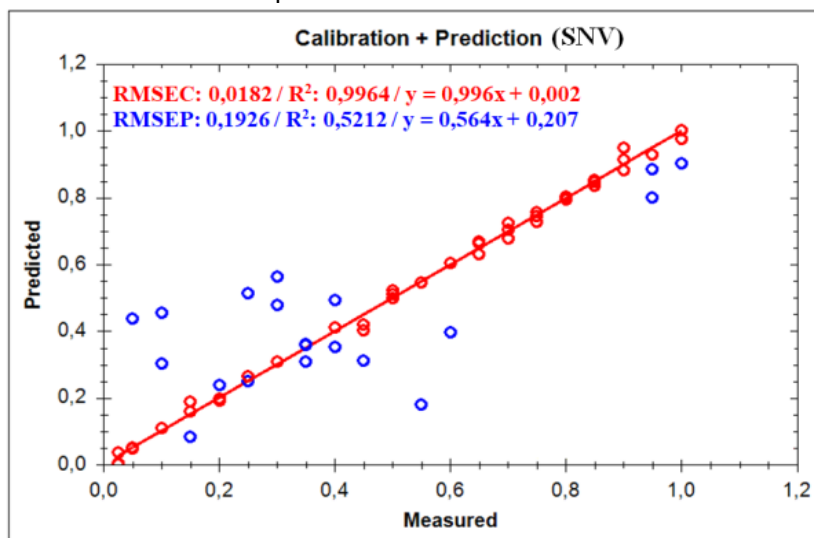
As Figuras 18 e 19 apresentam os gráficos de regressão do tratamento MSC e SNV, que evidenciam a relação entre os valores preditos e os valores observados para a quantificação de Doramectina no leite cru.

Figura 18- Relação entre os valores observados e os valores preditos obtidos pelos modelos com o tratamento MSC para os teores de Doramectina em Leite.



Fonte: Autoria Própria, (2019).

Figura 19- Relação entre os valores observados e os valores preditos obtidos pelos modelos com o tratamento SNV para os teores de Doramectina em Leite.



Fonte: Autoria própria, 2019.

A partir dos gráficos de regressão por PLS (Figuras 18 e 19), é possível observar que em ambos os modelos construídos o conjunto de amostras da calibração encontra-se distribuído próximo da curva, entretanto o conjunto da validação apresenta-se espalhado e grande parte das amostras encontra-se distante da curva de regressão. Esse fato é consequência do aumento dos erros de predição e resultado insatisfatório do coeficiente de correlação.

5.4.3 Hipóteses

Ambos os resultados obtidos com os tratamentos aplicados para os dois medicamentos foram satisfatórios na calibração, demonstrando que aplicação de pré-tratamentos melhoram a qualidade dos modelos. Entretanto, falharam no processo de validação, apresentando valores baixos de R^2 . As principais hipóteses levantadas para a justificação destes resultados são:

1. Não realizar uma análise de referência como CLAE pode ter influenciado no resultado de predição, isto porque, o método PLS utiliza diretamente as concentrações presentes em cada amostra para correlacionar com os dados espectrais, e desta forma, realiza a regressão (FERREIRA et al., 1999). Sendo assim, é necessário que os valores alimentados no *software* sejam os

mais próximos dos reais, para que esta regressão ocorra de forma linear. Como a adulteração das amostras foi realizada através de diluições realizadas manualmente, alguns erros de execução podem ser ocasionados, os quais podem ter influenciado a concentração final da amostra, sendo desta forma necessária a realização de uma análise de Cromatografia para a identificação da concentração real presente em cada amostra.

2. Os pré-tratamentos testados ajudaram a melhorar significativamente os modelos, porém não foram suficientes para a obtenção de bons resultados. Sendo assim, novos tratamentos devem ser testados.
3. Luz (2003) indica que baixos valores de R^2 em modelos de regressão são atribuídos principalmente a conjunto de dados que apresentam pouca variação nos valores reais usados na construção. Desta forma, esta é outra hipótese levantada para a obtenção de baixos valores de R^2 na validação dos modelos deste trabalho, pois analisando as concentrações utilizadas e expostas na Tabela 4 observa-se que há pouca variabilidade entre as concentrações das amostras utilizadas.

Por meio dessas três hipóteses levantadas, propõe-se que a construção de novos modelos para detecção e quantificação de medicamento da classe avermectina em amostras de leite cru, seja utilizado um conjunto de amostras com concentrações que apresentem mais variabilidade entre si e representem o maior número de intervalo de concentrações que podem ser encontradas em matrizes de leite, tornando o conjunto de amostras o mais real possível. Além disso, sugere-se a realização de análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) após a adulteração das amostras, para se determinar as concentrações dos medicamentos nas amostras lácteas. E para finalizar, novos tratamentos devem ser testados no conjunto de calibração e validação.

5.5 CLASSIFICAÇÃO POR MÁQUINA DE VETOR DE SUPORTE

A aplicação da técnica SVM resultou em um modelo de classificação com a capacidade de categorizar amostras em duas classes: matrizes de leite contaminadas com Abamectina e matrizes de leite contaminadas com Doramectina.

A partir dos resultados das figuras de mérito da calibração, da validação cruzada (*cross validation*) e validação externa (*test set*) foi possível avaliar a qualidade do modelo obtido. Estes resultados estão expostos na tabela 11.

O modelo obtido apresentou excelentes coeficientes de correlação tanto na calibração quanto nos testes de validação, ambos apresentaram valores superiores a 0,96. Estes resultados demonstram que o modelo apresenta uma boa robustez.

Além disso, quanto a FOM kappa a calibração apresentou o resultado de 0,9470, a *cross validation* 0,9243 e o *test set* 0,9298. Este índice equivale à porcentagem corrigida de acerto entre o diagnóstico verdadeiro das classes e o acerto do classificador. Desta forma, como os valores encontrados são superiores a 0, demonstram que o classificador está realizando quantidades relativas de acerto (KANDA et al., 2013).

Tabela 11- Resultados do modelo de classificação SVM para Avermectinas em Leite.

	Calibração	Cross Validation	Test set
Coefficiente de Correlação (R^2)	0,9734	0,9621	0,9649
Acurácia (%)	97,34	96,21	96,49
Índice Kappa	0,9470	0,9243	0,9298
TP Abamectina	1,00	1,00	1,00
TP Doramectina	0,948	0,926	0,930
Precisão Abamectina	0,934	0,949	0,928
Precisão Doramectina	1,00	1,00	1,00
Área abaixo da curva (ROC)	0,963	0,962	0,965

Fonte: Autoria própria, (2019).

Ambas as classes apresentaram bons resultado para a TP. A classe abamectina apresentou TP igual a 1 para calibração e para os testes de validação. Já a Doramectina apresentou TP igual a 0,948 para calibração, 0,926 para *cross validation* e 0,930 para *test set*. TP corresponde à proporção de amostras que são classificadas como uma determinada classe, entre todas as amostras que pertencem realmente a esta classe (KANDA et al., 2013). Desta forma, percebe-se

que em ambas as classes as amostras obtiveram reconhecimento dentro de sua categoria.

A calibração e os testes de validação apresentaram resultados satisfatórios em relação à FOM precisão, valores superiores a 0,930. Assim sendo, o modelo construído proporciona resultados consistentes em consecutivas tentativas e repetições, apresentando elevada reprodutibilidade (KANDA et al., 2013).

Os resultados obtidos em relação à área sob a curva ROC foram satisfatórios, pois para calibração obteve-se o valor de 0,963, para *cross validation* 0,962 e *test set* 0,965. Esta figura de mérito corresponde a uma medida do desempenho do modelo desenvolvido, valores inferiores a 0,5 demonstram um teste incapaz de discriminar amostras de leite com presença de doramectina e amostras de leite com presença de abamectina. Os resultados que obtém valores acima de 0,7 são considerados satisfatórios (MARTINEZ; LOUZADA-NETO; PEREIRA, 2003). Desta maneira, observou-se que o modelo de classificação gerado categorizou as duas classes de medicamentos, Doramectina e Abamectina de forma adequada, pois ambos os resultados apresentaram área abaixo da curva (curva ROC) superiores a 0,9.

Por meio de todos os resultados apresentados nota-se que a aplicação deste método pode ser utilizada para a classificação de matrizes de leite que contenham Abamectina e Doramectina. Sendo assim, a utilização deste método pode ser de grande valor para indústrias que visam detectar a presença de medicamentos veterinários da classe da ivermectina em leite.

Com a aplicação dos dois métodos propostos, duas abordagens foram apresentadas: a quantificação dos resíduos dos medicamentos Avermectinas por meio do PLS e a classificação destes por meio do SVM. O primeiro método apresentou resultados satisfatórios nos modelos de calibração, entretanto insatisfatórios em modelos de validação, demonstrando a necessidade de alguns aperfeiçoamentos desta técnica para a quantificação de Avermectinas em matrizes de leite. O segundo método utilizado para classificação das matrizes de leites contaminadas com medicamentos da classe avermectina, apresentou resultados satisfatórios tanto na calibração quanto na validação, demonstrando o potencial desta técnica para classificar a presença de medicamentos veterinários em leite.

Os baixos valores para os coeficientes de determinação para os modelos de validação obtidos no PLS, como citado anteriormente, podem estar relacionados com a falta de uma análise de referência, já que esta técnica utiliza a correlação das concentrações com as intensidades das absorbâncias em cada comprimento de onda do NIR para realizar a quantificação. E desta forma, seria necessário sua adaptação para posteriormente realizar a aplicação desta técnica em indústrias de laticínios.

Já a técnica por máquina de vetor de suporte (SVM) utiliza apenas o perfil de absorção do infravermelho próximo para classificar os medicamentos presentes no leite, e conseqüentemente seus resultados não são afetados pelas concentrações. Sendo assim, o algoritmo SVM poderia ser utilizado para classificar amostras de leites com a presença de medicamentos veterinários e este tipo de metodologia utilizando espectroscopia de infravermelho e algoritmos de aprendizado de máquina poderia ser implementado em indústrias de laticínios.

CONCLUSÕES

O desenvolvimento de modelos de calibração por PLS a partir da técnica NIR para quantificação de resíduos de Abamectina e Doramectina em amostras de Leite Cru foi concretizado. Ambos os modelos construídos apresentaram resultados satisfatórios quanto à etapa de calibração, os quais apresentaram valores de R^2 relativamente elevados e valores de RMSEC baixos. Porém, os resultados de validação apresentaram baixos valores de R^2 , demonstrando a necessidade do aperfeiçoamento deste método.

A aplicação do método SVM para classificação de amostras adulteradas com Abamectina e Doramectina apresentou resultados satisfatórios. Todas as figuras de mérito apresentaram excelentes valores tanto para modelo de calibração quanto para modelo de validação. Este modelo construído foi capaz de classificar as amostras em duas classes, leite na presença de abamectina e leite na presença de doramectina.

Deste modo, apesar de não apresentar bons resultados quanto à validação dos modelos PLS, este trabalho propôs dois métodos alternativos para a quantificação e classificação de resíduos de medicamentos da classe das avermectinas, Abamectina e a Doramectina, em matrizes de leite cru. Além disso, ressalta-se que as principais vantagens dos métodos propostos são a facilidade e rapidez na execução da análise e a possibilidade da indústria utilizar esses métodos a partir de dados espectrais, pois existe a possibilidade de identificação do tipo de contaminante que está presente no leite através de SVM e posteriormente, quantificá-lo por meio do modelo PLS.

Por fim, recomenda-se que em trabalhos futuros, novos conjuntos de amostras sejam analisados e que sejam construídos novos modelos de PLS utilizando um conjunto de dados com mais variações nas concentrações. E para a construção destes modelos, seja realizada inicialmente uma análise de referência do tipo cromatográfico (CLAE) para constatar as reais concentrações presentes em cada amostra.

REFERÊNCIAS

ALVES, A. et al. A common near infrared-based partial least squares regression model for the prediction of wood density of *Pinus pinaster* and *Larix × eurolepis*. **Wood Science and Technology**, v. 46, n. 1–3, p. 157–175, 2012.

ANJOS, O. Desenvolvimento de metodologias de análise rápidas em alimentos por espectroscopia de infravermelho (NIR, FTIR, RAMAN). In: III CICLO DE CONFERÊNCIAS CONSELHO TÉCNICO-CIENTÍFICO 2016, Lisboa. **Anais...** Lisboa

ANVISA. **Programa de análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal**. Brasília - DF. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/395364/PAMVet-Monitoramento+de+Resíduos+em+Leite+Exposto+ao+Consumo+-+Relatório+2006-2007/4777c371-e5b5-42e0-9c3f-43670009a802>>. Acesso em: 2 out. 2018.

ANVISA. **Codex Alimentarius**. Brasília-DF. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/Em16/8/2016>. Acesso em: 22 nov. 2019.

ARAUJO, T. P. **Emprego de espectroscopia no infravermelho e métodos quimiométricos para a análise direta de tetraciclina em leite bovino**. 2007. 96f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

BAHRI, A. et al. Application of visible and near-infrared spectroscopy for evaluation of ewes milk with different feeds. **Animal Production Science**, p. 10, 2018.

BARROS NETO, B. De; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1401–1406, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000600042&lng=pt&nrm=iso&tIng=pt>. Acesso em: 25 set. 2018.

BENETTI, T. M.; ABRAHÃO, W. M.; NICKEL, R. Análise comparativa entre os ensaios imunoenzimáticos e microbiológicos para detecção de resíduos de antibióticos em leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 381, p. 41–45, 2011. Disponível em: <<https://www.revistadoilct.com.br/rlct/article/viewFile/174/358>>. Acesso em: 24 set. 2018.

BOTELHO, B. G. et al. Development and analytical validation of a screening method for simultaneous detection of five adulterants in raw milk using mid-infrared spectroscopy and PLS-DA. **Food Chemistry**, v. 181, n. 1, p. 31–37, 2015.

BRERETON, R. G. et al. Chemometrics in analytical chemistry — part I: history, experimental design and data analysis tools. **Analytical and Bioanalytical**

Chemistry, v. 409, n. 1, p. 5891–5899, 2017.

BRERETON, R. G. et al. Chemometrics in analytical chemistry — part II : modeling , validation , and applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 1, p. 6691–6704, 2018.

BRITO, M. A. et al. **Composição**. 2009. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_128_21720039243.html>. Acesso em: 31 out. 2018.

BRUKER. **Aplicações de Espectroscopia de infravermelho médio e próximo**, 2013. Disponível em: <<https://drive.google.com/file/d/1eZPlpdRSfDZgl0PwjJaRss-xvrhZeQYK/view>>. Acesso em: 19 nov. 2019.

CENTNER, V. zslav et al. Elimination of Uninformative Variables for Multivariate Calibration. **Analytical Chemistry**, v. 330, n. 2, p. 3851, 1996. Disponível em: <http://www.libpls.net/publication/UVE_1996.pdf>. Acesso em: 27 set. 2018.

COSTA, M. D. R.; JIMÉNEZ-FLORES, R.; GIGANTE, M. L. Propriedades Da Membrana Do Glóbulo De Gordura Do Leite. **Alim. Nutr., Araraquara**, v. 20, n. 3, p. 507–514, 2009. Disponível em: <<http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/viewFile/1159/854>>. Acesso em: 31 out. 2018.

COÛTEAUX, M. M. et al. Determination of water-soluble and total extractable polyphenolics in biomass, necromass and decomposing plant material using near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, n. 4, p. 795–799, 2005.

DA SILVA JÚNIOR, L. S. **Tetraciclinas em medicamentos veterinários e produtos lácteos**. 2004. 96f. Tese (Dotourado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/256322/1/SilvaJunior_LuizSevero_da_D.pdf>. Acesso em: 27 set. 2018.

DANAHER, M. et al. Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices. **Journal of Chromatography B**, v. 844, p. 175–203, 2006. Disponível em: <https://ac.els-cdn.com/S1570023206006313/1-s2.0-S1570023206006313-main.pdf?_tid=0823b34f-7295-41d1-8653-2f1bdecce215&acdnat=1538510717_c4952975aac42d2de66f8dbc32e1098e>. Acesso em: 2 out. 2018.

DE SOUZA, A. M. et al. Experimento didático de quimiometria para calibração multivariada na determinação de paracetamol em comprimidos comerciais utilizando espectroscopia no infravermelho próximo: Um tutorial, parte II. **Quim. Nova**, v. 36, n. 7, p. 1057–1065, 2013. Disponível em: <http://quimicanova.s bq.org.br/imagebank/pdf/Vol36No7_1057_21-ED12862.pdf>.

Acesso em: 25 set. 2018.

DENOBILO, M.; NASCIMENTO, E. de souza. Validação de método para determinação de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, p. 209–217, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v40n2/10.pdf>>. Acesso em: 24 set. 2018.

DIAS, J. A.; ANTES, F. G. Qualidade físico-química, higiênico-sanitária e composicional do leite cru. **Embrapa**, Porto Velho-RO, 2014. p. 21.

ELFADL, E.; REINBRECHTA, C.; CLAUPEIN, W. Development of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) calibration model for estimation of oil content in a worldwide safflower germplasm collection. **International Journal of Plant Production**, v. 4, n. 4, p. 259–270, 2010. Disponível em: <www.ijpp.info>. Acesso em: 24 nov. 2019.

FERRÃO, M. F. et al. Determinação simultânea dos teores de cinza e proteína em farinha de trigo empregando NIR-PLS e DRIFT-PLS. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 3, p. 333–340, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612004000300005&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>

FERRARESI, T. M. et al. Espectroscopia de infravermelho na determinação da textura do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, n. 1, p. 1769–1777, 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbcs/v36n1/10.pdf>>. Acesso em: 25 set. 2018.

FERREIRA, D. S. **Aplicação de espectroscopia no infravermelho e análise multivariada para previsão de parâmetros de qualidade em soja e quinoa**. 2013. UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, 2013.

FERREIRA, M. M. C. et al. Chemometrics I: multivariate calibration, a tutorial. **Química Nova**, v. 22, p. 724–731, 1999. a. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40421999000500016&script=sci_arttext>

FERREIRA, M. M. C. et al. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 724–731, 1999. b. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40421999000500016&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 1 ago. 2019.

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

GONZALEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. Da; CORREA, M. N. **Transtornos Metabólicos nos Animais Domésticos**. 2 ed. Pelotas.

GONZÁLEZ, F. H. D.; WALTER DÜRR, J.; FONTANELI, R. S. Transtornos metabólicos que afetam a qualidade do leite. **Uso do Leite para Monitorar a Nutrição e o Metabolismo de Vacas Leiteiras**, v. 44, n. 4, p. 72, 2001. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/lacvet/restrito/pdf/leite_metabolismo.pdf>. Acesso em: 5 set. 2018.

HAACK, M. de S. Análise de materiais por Espectroscopia no Infravermelho dentro do sistema de gestão de qualidade conforme ABNT NBR ISO/IEC 17025. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2013.

HALLIDAY, D.; RESNICK, R.; WALKER, J. **Fundamentos de Física**. 8 ed ed. Rio de Janeiro, 2009.

HUSAIN, S. W.; GHOULIPOUR, V.; SEPAHRAN, H. Chromatographic behaviour of antibiotics on thin layers of an inorganic ion-exchanger. **Acta Chromatographica**, v. 2, n. 14, p. 102–109, 2004. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/a4ff/65c7fc77e40c529c714f1514d0a1e3c934af.pdf>>. Acesso em: 24 set. 2018.

KANDA, P. A. M. et al. Clinician's road map to wavelet EEG as an Alzheimer's disease biomarker. **Clinical EEG and Neuroscience**, v. 45, n. 2, p. 104–112, 2013.

KENNARD, R. W.; STONE, L. A. Computer Aided Design of Experiments. **Technometric**, v. 11, n. 1, p. 137–148, 1969.

KIRALJ, R.; FERREIRA, M. M. C. Basic Validation Procedures for Regression Models in QSAR and QSPR Studies: Theory and Application. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 4, p. 770–787, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbchs/v20n4/v20n4a21.pdf>>. Acesso em: 1 ago. 2019.

LIN, C. F.; WANG, S. De. Fuzzy support vector machines. **IEEE Transactions on Neural Networks**, v. 13, n. 2, p. 464–471, 2002.

LU, Y. et al. Fast and nondestructive determination of protein content in rapeseeds (*Brassica napus* L.) using Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy (FTIR-PAS). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 11, p. 2239–2245, 2014.

LUZ, E. R. Da. **Predição de propriedades de gasolinas usando espectroscopia FTIR e regressão por mínimos quadrados parciais**. 2003. 109f. Dissertação (Mestrado em Química), PUC-Rio, Rio de Janeiro, 2003.

MARA, B. et al. Rapid detection of whey in milk powder samples by spectrophotometric and multivariate calibration. **Food Chemistry**, v. 174, p. 1–7, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.003>>

MARTINEZ, E. Z.; LOUZADA-NETO, F.; PEREIRA, B. de B. A curva ROC para testes diagnósticos. **Analysis of diagnostic tests using ROC curves**, v. 11, n. 1, p. 7–31, 2003. Disponível em:

<https://www.researchgate.net/publication/284295708_A_curva_ROC_para_testes_diaagnosticos>. Acesso em: 19 nov. 2019.

MELLO, L. S. De et al. Causas de morte em vacas leiteiras no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 9, p. 916–920, 2017.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 62**, DE 29 DE DEZEMBRO DE 2011. p. 24.

MONTEIRO, F. K. de C. **Utilização da espectroscopia de infravermelho próximo para quantificação de adição de soro em leite**. 2015. 85f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite e derivados), Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2015. Disponível em:

<<http://www.ufjf.br/mestradoleite/files/2015/05/Dissertação-Final7.pdf>>. Acesso em: 11 out. 2018.

MORGENTER, T. B. et al. Espectroscopia NIR como método não destrutivo para o controle de qualidade na pós-colheita. In: 2015, **Anais...** Disponível em:

<<http://octeventos.com/site/sites/pos-colheita/anais/PDF/PALESTRA05.pdf>>. Acesso em: 25 set. 2018.

MÜLLER, E. E. Qualidade do Leite, células somáticas e prevenção da mastite. In: SIMPÓSIO SOBRE SUSTENTABILIDADE DA PECUÁRIA LEITEIRA NA REGIÃO SUL DO BRASIL 2002, **Anais...** Disponível em:

<<http://www.nupel.uem.br/qualidadeleitem.pdf>>. Acesso em: 5 set. 2018.

MÜLLER, P. M. **Ocorrência de resíduos de avermectinas no leite produzido no estado de Pernambuco**. 2015. 51 f. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2015. Disponível em:

<http://www.pgba.ufrpe.br/sites/www4.pgba.ufrpe.br/files/documentos/dissertacao_pdf.pdf>. Acesso em: 24 out. 2018.

NASCIMENTO, J. A. et al. Análise screening de vinhos empregando um analisador fluxo-batelada, espectroscopia UV-Vis e quimiometria. **Quim. Nova**, v. 33, n. 2, p. 351–357, 2010. Disponível em:

<http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol33No2_351_21-AR09181.pdf>. Acesso em: 25 set. 2018.

NUNES, P. G. A. **Uma nova técnica para seleção de variáveis em calibração multivariada aplicada às espectrometrias UV-VIS E NIR**. 2008. 104f. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008. Disponível em:

<<https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/116060/000805924.pdf;sequencia=1>>

OLIVEIRA, F. C. D. C. **Modelos de calibração multivariada associados à espectroscopia vibracional para análise de misturas diesel - óleos vegetais**. 2006. 120f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade de Brasília, Brasília, 2006. Disponível em: <[http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/3106/1/Flavia C C Oliveira.pdf](http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/3106/1/Flavia%20C%20Oliveira.pdf)>. Acesso em: 27 set. 2018.

OLIVEIRA, M. C. de S. Doenças infecciosas em sistemas intensivos de produção de leite. **Embrapa Pecuária Sudeste**; **50**, São Carlos, SP, 2006b. p. 34. Disponível em: <www.cppse.embrapa.br>. Acesso em: 17 out. 2018.

PACHECO-SILVA, É.; SOUZA, J. R. De; CALDAS, E. D. Resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 111–122, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422014000100020&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 24 set. 2018.

PAIVA E BRITO, M. A. V.; LANGE, C. C. Resíduos de antibióticos no leite. Juiz de Fora, MG, 2005. p. 4. Disponível em: <<https://docs.ufpr.br/~freitasjaf/artigos/antibiotico leite.pdf>>. Acesso em: 23 set. 2018.

PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: Fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 198–219, 2003.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução a Espectroscopia**. 4. ed. ed. São Paulo, SP.

PEREIRA, P. C. de S. et al. A quimiometria nos cursos de graduação em química: proposta do uso da análise multivariada na determinação de pKa. **Quim. Nova**, v. 37, n. 8, p. 1417–1425, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140216>>. Acesso em: 24 nov. 2019.

QUEIROZ, S. C. do N. De; JARDIM, I. C. S. F. Eletroforese Capilar. **Chemkeys - Liberdade para aprender**, p. 1–22, 2001. Disponível em: <<http://www.ufjf.br/baccan/files/2011/05/Artigo-Chemkeys-Eletroforese-Capilar.pdf>>. Acesso em: 24 set. 2018.

RATH, S. et al. AVERMECTINAS NO AGRONEGÓCIO BRASILEIRO: UMA SOLUÇÃO OU UM PROBLEMA? **Veterinária e Zootecnia**, v. 23, n. 1, p. 8–18, 2016.

RUELA, I. C. A. et al. Otimização e validação de método para determinação de resíduos de oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, p. 139–146, 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v25n1/a22v25n1.pdf>>. Acesso em: 24 out. 2018.

SARMAH, A. K.; MEYER, M. T.; BOXALL, A. B. A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. **Chemosphere**, v. 65, n. 5, p. 725–759, 2006.

SCHLKOP, B.; SMOLA, A. J. Learning with Kernels: Support Vector Machines, Regularization, Optimization, and Beyond. **Journal of the American Statistical Association**, v. 462, v. 1 ed, n. 98, p. 644, 2001.

SGARBIERI, V. C. Revisão : Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 1, p. 43–56, 2005.

SHENG, C. et al. Determination of main fruits in adulterated nectars by ATR-FTIR spectroscopy combined with multivariate calibration and variable selection methods. **Food Chemistry**, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.015>>

SHOOP, W. L.; MROZIK, H.; FISHER, M. H. Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. **Veterinary Parasitology**, v. 59, p. 139–156, 1995. Disponível em: <https://ac.els-cdn.com/030440179400743V/1-s2.0-030440179400743V-main.pdf?_tid=51d4b516-fc20-4403-842f-d22ba6b626a8&acdnat=1538510891_f1e357735f1f39d13e3e81da5ae792b7>. Acesso em: 2 out. 2018.

SILVA, B. C. U. **Resíduos de antibióticos e antiparasitários em alimentos de origem animal**. 2015. 39f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia-Bioquímica). Universidade Estadual Paulistas, Araraquara, 2015. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/139181/000863538.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 2 out. 2018.

SILVA, D. P. Da et al. Resíduos de antibiótico em leite: prevalência, danos à saúde e prejuízos na indústria de laticínios. **Evidência**, Joaçaba, v. 13, n. 2, p. 137–152, 2013.

SIVAKESAVA, S.; IRUDAYARAJ, J. Rapid Determination of Tetracycline in Milk by FT-MIR and FT-NIR Spectroscopy. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 3, p. 487–493, 2002. Disponível em: <[https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(02\)74099-X/pdf](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(02)74099-X/pdf)>. Acesso em: 5 jun. 2019.

SOUZA, A. M. De; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: Um tutorial, parte I. **Quim. Nova**, v. 35, n. 1, p. 223–229, 2012. Disponível em: <<http://www.soft82.com/get/download/>>. Acesso em: 19 nov. 2019.

STOLKER, A. A. M.; BRINKMAN, U. A. T. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals - A review. **Journal of Chromatography A**, v. 1067, n. 1–2, p. 15–53, 2005.

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

TEIXEIRA, K. S. S. **Uso da quimiometria na determinação simultânea do teor dos fármacos em comprimido com dose fixa combinada empregado no tratamento de Tuberculose**. 2017. 75f. Tese (Doutorado em Farmácia). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.

TEIXEIRA, L. S. **Métodos para determinação de avermectinas em diferentes matrizes**. 2015. 25f. Monografia (Graduação em Química). Universidade Federal de São João del-Rei, São João Del-Rei, 2015. Disponível em: <https://www.ufsj.edu.br/portal2-repositorio/File/coqui/TCC/Monografia-TCC-Leila_S_Teixeira-20151.pdf>. Acesso em: 2 out. 2018.

TRONCO, V. M. **Manual para Inspeção da Qualidade do Leite**. 3. ed. ed. Santa Maria.

VILELA, D. et al. A evolução do leite no Brasil em cinco décadas 1. **Política agrícola**, v. 1, p. 5–24, 2017.

WU, D. et al. Study on infrared spectroscopy technique for fast measurement of protein content in milk powder based on LS-SVM. **Journal of Food Engineering**, v. 84, n. 1, p. 124–131, 2008.

YANG, R. et al. Synchronous-asynchronous two-dimensional correlation spectroscopy for the discrimination of adulterated milk. **Analytical Methods**, v. 7, p. 4302–4307, 2015. Disponível em: <www.models.kvl.dk>. Acesso em: 5 jun. 2019.

ZIDAN, D. W. et al. Novel spectrophotometric and factor-based multivariate calibration-prediction techniques for determination of two inhibitors of hepatitis C-virus and hepatocellular carcinoma in pure, human urine, and human plasma Dalia. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 18, p. 1386–1425, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.12.052>>