



DETECÇÃO RÁPIDA DE CIPROFLOXACINA EM LEITE BOVINO USANDO ESPECTROSCOPIA FTIR E RANDOM FOREST

ROMICY DERMONDES SOUZA; ISABELA SILVA COSTA; ROSANGELA SILVEIRA BARBOSA; SÉRGIO AUGUSTO DE ALBUQUERQUE FERNANDES

RESUMO

Resíduos de antibióticos no leite, como a ciprofloxacina, representam riscos à saúde pública e à segurança alimentar, podendo induzir resistência bacteriana e reações alérgicas. Métodos convencionais de detecção, como cromatográficos ou imunoenzimáticos, são eficazes, mas custosos, lentos ou dependentes de preparo complexo. Nesse cenário, a espectroscopia FTIR aliada ao aprendizado de máquina surge como alternativa promissora por ser rápida, não destrutiva e de baixo custo. O objetivo desse trabalho foi desenvolver um modelo capaz de classificar amostras de leite com resíduos de ciprofloxacina acima ou abaixo do Limite Máximo de Resíduos (LMR) de 100 ppb, estabelecido pela ANVISA. Foram analisadas 605 amostras de leite bovino fortificadas com ciprofloxacina (0–250 ppb). Os espectros FTIR foram obtidos na faixa de 1000–3000 cm^{-1} e pré-processados por normalização e escalonamento. Variáveis relevantes foram selecionadas pelos algoritmos Boruta e LASSO. O modelo RF foi otimizado e avaliado por sensibilidade, especificidade, precisão, F1-score, acurácia balanceada e Kappa de Cohen. O modelo RF alcançou desempenho perfeito (1,000 em todas as métricas), discriminando com total eficácia amostras acima e abaixo do LMR. Vinte números de onda foram selecionados, incluindo bandas associadas a grupos funcionais da ciprofloxacina, mesmo na matriz complexa do leite. A abordagem superou métodos comerciais em custo, tempo e simplicidade operacional. A integração entre FTIR e Random Forest mostrou-se altamente eficaz para classificação de resíduos de ciprofloxacina no leite, com potencial para aplicação industrial. Apesar dos excelentes resultados, estudos futuros devem validar o modelo para outros antibióticos e matrizes lácteas, ampliando sua utilidade no controle de qualidade.

Palavras-chave: Antibióticos; Limite máximo de resíduo; Análise multivariada.

1 INTRODUÇÃO

A detecção e a quantificação de resíduos de antibióticos no leite têm ganhado cada vez mais importância nos últimos anos uma vez que esses resíduos representam risco tanto para a segurança do alimento quanto para a saúde pública. Na produção bovina, os antibióticos são amplamente utilizados para tratar e prevenir doenças como a mastite. Porém, muitas vezes restam resíduos dessas substâncias no leite produzido. Dentre esses antibióticos encontra-se a ciprofloxacina, pertencente ao grupo das fluoroquinolonas (Lubna et al., 2023; Nazarov; Popovich; Mashyanova, 2022). Embora seja eficaz contra infecções bacterianas, sua permanência no leite acima dos limites permitidos pode causar sérios problemas, como o aumento da resistência bacteriana e reações adversas em pessoas alérgicas ou sensíveis. Para

resolver esse problema, várias técnicas analíticas já foram desenvolvidas para detectar esses resíduos no leite. Entre elas, destacam-se métodos cromatográficos, testes imunoenzimáticos e técnicas espectroscópicas. Apesar de eficazes, essas abordagens costumam ser caras, demoradas ou exigem preparação complexa das amostras, o que dificulta sua aplicação em grande escala (Joubrane et al., 2022; Rahman et al., 2025; Rame HAU et al., 2025).

Um dos métodos mais promissores para essa finalidade é a espectroscopia no infravermelho (FTIR), uma técnica rápida, não destrutiva e que dispensa o uso de reagentes específicos (Kurrey et al., 2019; Cunha et al 2020). Quando aliada a algoritmos de aprendizado de máquina, torna-se possível identificar e quantificar compostos químicos mesmo em matrizes complexas como o leite. O aprendizado de máquina tem se mostrado uma ferramenta valiosa na análise de contaminantes em alimentos. Métodos supervisionados, random forest, consegue capturar relações complexas entre os dados espectrais e as concentrações dos compostos que queremos medir. Além disso, técnicas de seleção de variáveis, como Boruta e Lasso, ajudam a identificar as partes mais relevantes do espectro, aumentando a precisão e a confiabilidade dos modelos preditivos (Du et al., 2023; Enders et al., 2021; Enyoh; Wang, 2024).

Com base no exposto, esse trabalho propõe o desenvolvimento de um modelo capaz de classificar amostras acima e abaixo do limite máximo de resíduos (LMR) utilizando dados da espectroscopia FTIR e random forest.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de leite foram coletadas na Estação Experimental Terras Baixas da Embrapa Clima Temperado, localizada no município de Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil (31° 49' 27" S e 52° 26' 35" W). Para os experimentos, foram selecionadas vacas da raça Jersey em lactação, clinicamente saudáveis, sem histórico de mastite ou outras enfermidades, e sem registro de tratamento com antibióticos nos 30 dias anteriores à coleta. O procedimento de coleta seguiu protocolos padronizados de higiene e antissepsia. Os três primeiros jatos de leite de cada teto foram descartados para eliminação de possíveis contaminantes do canal do teto, sendo as amostras colocadas em frascos estéreis. Imediatamente após a coleta, as amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável, mantendo a temperatura controlada entre 0°C e 10°C, sendo o transporte até o Laboratório de Análise do Leite (LabLeite) feito em um período máximo de 24 horas após a coleta, mantendo-se rigorosamente a cadeia de frio durante todo o trajeto. As amostras foram armazenadas em temperaturas entre 0°C e 10°C até o momento da realização das análises.

O processo de fortificação das amostras foi realizado utilizando padrão analítico de ciprofloxacina, sendo estabelecidos 11 níveis distintos de concentração: 0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225 e 250 ppb. Para assegurar a robustez estatística do estudo, cada nível de concentração foi representado por 55 amostras individuais, totalizando 605 amostras de leite fortificado para análise.

As análises espectroscópicas foram conduzidas em espectrômetro LactoScope FTIR, Fourier Transform Infrared (Delta Instruments) operando na região do infravermelho médio. Os espectros foram obtidos na faixa espectral de 1000 a 3000 cm^{-1} , com resolução espectral de 4 cm^{-1} .

Antes da seleção as variáveis, os dados foram pré-processados por normalização centrada na média e escalonamento min-max. Após o processamento, o algoritmo Boruta foi aplicado utilizando os seguintes hiperparâmetros: 1000 árvores, até 100 iterações e percentil de referência de 90%. As variáveis foram classificadas como rejeitadas, indecisas e confirmadas. As variáveis confirmadas foram submetidas a refinamento pelo LASSO com alfa fixo em 1. Para os métodos de classificação, as amostras foram divididas e classificadas em “Acima do LMR”, com amostras que continha concentrações de ciprofloxacina com valores iguais ou

acima de 100 ppb e “Abaixo do LMR”, com amostras com valores abaixo de 100 ppb. O valor de corte de 100 ppb representa LMR definida pela Instrução Normativa no 162, de 1 de julho de 2022 da ANVISA (ANVISA, 2022). O modelo Random Forest (RF) utilizado para a classificação da amostra foi otimizados, com os seguintes hiperparâmetros: $n_{tree} = 500$, $nodesize = 1$ e $mtry = 5$. A seleção da combinação de hiperparâmetros foi realizada de acordo com a métrica de acurácia balanceada. Todas as análises foram conduzidas na linguagem R (versão 4.4.3), utilizando os pacotes *boruta* para seleção de variáveis, *randomForest* para modelagem e *readr* para leitura dos dados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra os espectros de FTIR para a ciprofloxacina em água e em diferentes concentrações na matriz de leite. Foram identificadas bandas atribuídas a grupos funcionais característicos da ciprofloxacina. A vibração de ligação C-F foi observada em 1018 cm^{-1} na amostra pura (KURREY et al., 2019). O estiramento C-N (amina) ou C-O (álcool/éter) foi detectado em 1115 cm^{-1} também na amostra pura (Yousefi et al., 2024). Ambas as bandas não foram selecionadas pelo algoritmo Boruta para a amostra em matriz de leite, possivelmente devido à sobreposição com componentes da matriz. O estiramento C-F foi identificado em 1200 cm^{-1} tanto na amostra pura quanto na matriz de leite, indicando que esta é uma banda robusta para identificação da ciprofloxacina mesmo em amostras complexas (Jadam et al., 2021).

As bandas referentes à deformação C-H ou estiramento simétrico de carboxilato (COO^-) foram observadas em 1408 cm^{-1} na amostra pura, enquanto na matriz de leite apareceram com desdobramento em 1416 e 1396 cm^{-1} (Jadam et al., 2021). Esta diferença também foi observada na região de carbonila (C=O). Na amostra pura, foram identificadas três bandas em 1639 , 1655 e 1693 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento C=O (Al Ameri; Mohamed, 2025). Na matriz de leite, estas bandas apresentaram deslocamento para números de onda mais altos (1701 , 1728 e 1747 cm^{-1}), sugerindo alterações no ambiente químico das carbonilas.

Bandas de estiramento C=O características de anidridos (1825 e 1798 cm^{-1}) foram selecionadas pelo Boruta apenas na matriz de leite (Shadique et al. 2020), sugerindo possíveis modificações químicas ou interações específicas da ciprofloxacina neste meio. De modo similar, bandas atribuídas ao estiramento O=C=O (2353 , 2341 , 2345 , 2291 e 2403 cm^{-1}) foram detectadas exclusivamente na matriz de leite (Du, 2024). Esse efeito também foi causado pelo efeito de matriz. O leite é uma matriz biológica complexa, contendo proteínas, gorduras e açúcares, que podem interagir com a ciprofloxacina e obscurecer seus sinais característicos no infravermelho (Choma; Komaniecka, 2005; Zade et al., 2023; Yan et al., 2008). Na região de alta frequência, o estiramento C-H alifático foi identificado tanto na amostra pura (2843 e 2955 cm^{-1}) quanto na matriz de leite (2916 , 2935 , 2893 e 2839 cm^{-1}) (Allamandola et al., 1992; Howell et al., 1999). O algoritmo Boruta também selecionou bandas em 2083 , 2071 e 2064 cm^{-1} , que, embora com atribuição funcional pouco clara, demonstraram alto poder discriminativo. Estas bandas podem corresponder a bandas combinadas ou harmônicos, característicos da ciprofloxacina na matriz de leite. Resumidamente, todas os números de onda selecionadas pelo boruta foram: 1200 , 1416 , 1396 , 1701 , 1728 , 1747 , 1825 , 1798 , 2083 , 2071 , 2064 , 2353 , 2341 ,

2345, 2291, 2403, 2916, 2935, 2893, 2839 cm^{-1} . Estas variáveis foram utilizadas na criação do modelo RF para classificação.

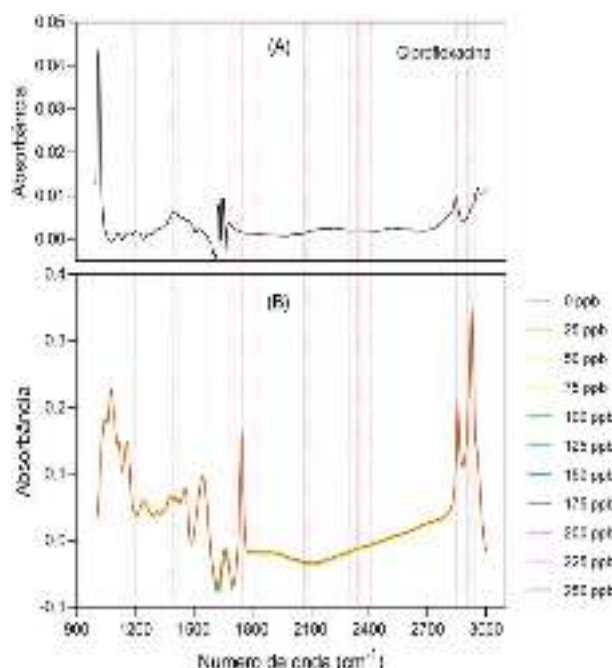


Figura 1. Espectros de absorção de ciprofloxacina em água (A) e no leite em diferentes concentrações (B). Linhas pontilhadas vermelhas indicam os números de onda selecionados e utilizados para análises posteriores.

As métricas obtidas para os modelos indicam que os modelos RF apresentou desempenho perfeito (Tabela 1), alcançando valores máximos (1,000) em todas as métricas avaliadas. Este resultado indica discriminação perfeita entre as amostras acima e abaixo do LMR, sugerindo que ambos os modelos foram capazes de capturar eficientemente os padrões dos dados. O desempenho do modelo apresentou resultados superiores a estudos anteriores que utilizaram aprendizados de máquina combinada com resultados de sensor eletroquímico (Aliev et al., 2023) e imunossensor óptico (Zhou et al., 2024) que apresentaram resultados superiores a 95%, mas não valores perfeitos. Bion e colaboradores (2015) validaram o kit comercial Delvotest® T para detecção de 27 antibióticos em leite cru e em pó, demonstrando que o método é capaz de detectar a maioria dos compostos nos dentro do LMR. Outros estudos comparativos mostram que o Twinsensor BT020 apresenta maior sensibilidade, seguida pelo Delvotest T e Eclipse 50, com variações em taxas de positivas dependendo do antibiótico e do contexto clínico, como mastite (Climova et al., 2024). O Delvotest Fast BT demonstrou capacidade de detecção de 2,1 ppb para Penicilina G e 95 ppb para tetraciclina, sem ocorrência de falsos positivos ou negativos em estudos de robustez (Jagesar; Kerkhof, 2022).

Atualmente os kits comerciais para detecção de antibióticos em leite possuem custo unitário significativo, tornando o processo caro para triagens rotineiras. Apesar de mais rápidos que os métodos cromatográficos, ainda exigem tempo de preparo, como aquecimento ou diluição, o que pode limitar a agilidade das análises. Além disso, geralmente precisam de refrigeração e têm vida útil limitada (Abedi-Firoozjah et al., 2024; Hemeda et al., 2022; Wu et al., 2019). O método desenvolvido, RF combinado a dados de FTIR apresentam grande vantagem em comparação aos métodos comerciais, isso porque o FTIR é um método não destrutivo, rápido e possível de ser automatizador, tornando possível a detecção de resíduos de ciprofloxacina em grande escala ou em linhas de produção (Freitas et al., 2021; Julmohammad et al., 2024). Sua combinação com métodos de aprendizado de máquina aumentam a rapidez e

eficiência na detecção de resíduos de antibióticos (Saji et al., 2024), e além disso, contribui para significativa redução de custo, uma vez que elimina o uso de reagentes ou métodos específicos para preparo de amostras (Freitas et al., 2021; DU, 2024). Em contraste ao RF, a análise discriminante linear (ADL) apresentou o menor desempenho entre todos os modelos avaliados. A sensibilidade de 0,6576 e especificidade de 0,8678 sugerem capacidade discriminativa menor que os demais modelos, particularmente na identificação de amostras positivas. O valor do Kappa de Cohen de 0,4575 indica concordância moderada, segundo a classificação de Landis e Koch (1977), que classifica o Kappa de Cohen entre 0,4 e 0,6 como moderada para métodos de classificação.

Tabela 1. Avaliação do desempenho dos modelos na classificação de amostras de leite acima/abaixo do LMR

Métrica	Modelo	
	discriminante linear	RF
Sensibilidade	0,6576	1,000
Especificidade	0,8678	1,000
Precisão	0,7160	1,000
F1-score	0,6856	1,000
Acurácia balanceada	0,7627	1,000
Kappa de Cohen	0,4575	1,000

4 CONCLUSÃO

O estudo demonstrou que a combinação de espectroscopia FTIR com o algoritmo Random Forest é uma abordagem eficaz, rápida e de baixo custo para classificar amostras de leite com resíduos de ciprofloxacina acima ou abaixo do limite regulamentar. A metodologia proposta supera limitações de técnicas convencionais, oferecendo potencial para aplicação em larga escala na indústria láctea. Futuros estudos poderão expandir o modelo para outros antibióticos e validar sua robustez em diferentes matrizes e condições operacionais. Além disso, validações robustas com amostras reais de leite são necessárias para garantir a segurança do método desenvolvido.

REFERÊNCIAS

ABEDI-FIROOZJAH, R. et al. State-of-the-art nanosensors and kits for the detection of antibiotic residues in milk and dairy products. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 328, p. 103164, 2024.

AL AMERI, A. A. H.; MOHAMED, M. B. M.. Dissolution methods to discriminate in vitro dissolution of poor water soluble weak base drug using three strategies: Acid modification, solvent evaporation and gastroretentive: Ciprofloxacin HCl case. **Journal of Research in Pharmacy**, v. 29, n. 1, p. 230–241, 2025.

ALIEV, T. A. et al. Electrochemical Sensor to Detect Antibiotics in Milk Based on Machine Learning Algorithms. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 15, n. 44, p. 52010–52020, 2023.

ANVISA. Instrução Normativa nº 162, de 1º de julho de 2022. Estabelece a ingestão diária aceitável (IDA), a dose de referência aguda (DRfA) e os limites máximos de resíduos (LMR)

para insumos farmacêuticos ativos (IFA) de medicamentos veterinários em alimentos de Brasília, DF, Brasil, 2022. p. 146.

BION, C.; BECK HENZELIN, A.; QU, Y.; PIZZOCRI, G.; BOLZONI, G. BUFFOLI, E. Analysis of 27 antibiotic residues in raw cow's milk and milk-based products – validation of Delvotest® T. **Food Additives & Contaminants: Part A**, p. 1–6, 2015.

CLIMOVA, N.; NEJESCHLEBOVÁ, H.; HASONOVÁ, L.; HANUŠ, O.; ČÍTEK, J.; REINDL, K.; JANOUŠEK HONESOVÁ, S.; VORLOVÁ, L.; SAMKOVÁ, E. The presence of antibiotic residues in raw milk samples obtained after the withdrawal period and other quality parameters in relation to selected factors. **Food Control**, v. 161, p. 110374, 2024.

DE FREITAS, A. G. M.; DE MAGALHÃES, B. E. A.; MINHO, L. A. C.; LEÃO, D. J.; SANTOS, L. S.; FERNANDES, S. A. A. FTIR spectroscopy with chemometrics for determination of tylosin residues in milk. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 101, n. 5, p. 1854–1860, 2021.

DU, L. New insights into raw milk adulterated with milk powder identification: ATR-FTIR spectroscopic fingerprints combined with machine learning and feature selection approaches. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 133, p. 106443, 2024.

HEMEDA, S. M.; SAYED, R. H.; HASSAN, H.; A.E., S.; ABOUL-ELLA, H.; SOLIMAN, R.

Development of Colloid Gold-Based Lateral Flow Immunochromatographic Kits for Screening and Rapid Detection of Beta-Lactams Antibiotic Residues in Dairy Milk. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v. 10, n. 7, 2022.

JADAM, M. L.; SYED MOHAMAD, S. A.; ZAKI, H. M.; JUBRI, Z.; SARIJO, S. H.. Antibacterial activity and physicochemical characterization of calcium-aluminium-ciprofloxacin-layered double hydroxide. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 62, p. 102314, 2021.

JAGESAR, D. C.; KERKHOF, J. Validation of Delvotest® Fast BT for Detection of β -Lactams and Tetracyclines in Raw Cow's Milk: Performance Tested Method SM 102104. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 106, n. 1, p. 88–98, 2022.

JOUBRANE, K.; JAMMOUL, A.; DAHER, R.; AYOUB, S.; EL JED, M.; HNEINO, M.; EL HAWARI, K.; AL ISKANDARANI, M.; DAHER, Z. Microbiological contamination, antimicrobial residues, and antimicrobial resistance in raw bovine milk in Lebanon. **International Dairy Journal**, v. 134, p. 105455, 2022.

JULMOHAMMAD, N. B.; OSLAN, S. N. H.; MD SUHAINI, I. K.; TAN, E.; AMERAM, N.; SOLOI, S.; MOHD YAAKUB, N. A.; JULMOHAMAD, N.. Detection of adulterant residues in UHT milk products using ATR-FTIR spectroscopy. **International Journal of Food**, v. 1, n. 1, p. 20–31, 2024.

KURREY, R.; MAHILANG, M.; KANTI DEB, M.; NIRMALKAR, J.; SHRIVAS, K.; PERVEZ, S.; KUMAR RAI, M.; RAI, J.. A direct DRS-FTIR probe for rapid detection and quantification of fluoroquinolone antibiotics in poultry egg-yolk. **Food Chemistry**, v. 270, p. 459–466, 2019.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. An application of hierarchical kappa-type statistics in the assessment of majority agreement among multiple observers. **Biometrics**, v. 33, n. 2, p. 363, 1977.

LUBNA et al. Antimicrobial Usage and Detection of Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus*: Methicillin- and Tetracycline-Resistant Strains in Raw Milk of Lactating Dairy Cattle. **Antibiotics**, v. 12, n. 4, p. 673, 2023. ISSN: 2079-6382. DOI: 10.3390/antibiotics12040673. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-6382/12/4/673>.

NAZAROV, M.; POPOVICH, E.; MASHYANOVA, S.. Medical Prevention of Mastitis in Cows Two Months Before Calving in a Sustainable Agriculture. *In*: [s.l.: s.n.]. p. 330–339.

RAHMAN, A.; RINKY, F.; RAHMAN, A.; MOUSUME, S. N.; DAS, R.; SHARMIN, T.; SOHAG, M. H.; BARI, M. L. Risk assessment of antibiotic residues in raw cow's milk in Bangladesh. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 18, n. 2, p. 99–110, 2025.

RAME HAU, E. E. R.; SHARMA, M.; KHANAL, B. K. S.; SLY, P. D.; MIKKELSEN, D.; CLARK, N.; SOARES MAGALHÃES, R. J. S. The Prevalence and Risk Factors Associated with the Presence of Antibiotic Residues in Milk from Peri-Urban Dairy Cattle Farms in Kathmandu, Nepal. **Antibiotics**, v. 14, n. 1, p. 98, 2025.

RIBEIRO DA CUNHA, B.; FONSECA, L. P.; CALADO, C. R. C. Metabolic Fingerprinting with Fourier-Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy: Towards a High-Throughput Screening Assay for Antibiotic Discovery and Mechanism-of-Action Elucidation. **Metabolites**, v. 10, n. 4, p. 145, 2020.

SAJI, R.; GANDHI, K.; SHARMA, R.; BAJAJ, R.; MANN, B.; RAMANI, A.. Detection of flunixin residues in milk using ATR- FTIR spectroscopy coupled with chemometrics. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 18, n. 8, p. 6736–6746, 2024.

WU, Q. et al. A microbiological inhibition method for the rapid, broad-spectrum, and high-throughput screening of 34 antibiotic residues in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 12, p. 10825–10837, 2019.

YOUSEFI, Q.; NEZAMZADEH-EJHIEH, A. A chitosan-based magnetic system for response surface methodology (RSM) optimization of the influencing variables in ciprofloxacin loading/releasing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 283, p. 137717, 2024.

ZHOU, C.; HUANG, C.; ZHANG, H.; YANG, W.; JIANG, F.; CHEN, G.; LIU, S.; CHEN, Y. Machine-learning-driven optical immunosensor based on microspheres-encoded signal transduction for the rapid and multiplexed detection of antibiotics in milk. **Food Chemistry**, v. 437, p. 137740, 2024.