

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE E DERIVADOS**  
**MESTRADO PROFISSIONAL EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE LEITE E**  
**DERIVADOS**

NAYARA LIZANDRA LEAL

**COMPARAÇÃO ENTRE TESTES ECOTESTE E FT-NIR PARA DETECÇÃO DE**  
**RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANO VETERINÁRIO DE CARÊNCIA ZERO EM**  
**LEITE GENUÍNO**

Juiz de Fora  
2017

**NAYARA LIZANDRA LEAL**

**COMPARAÇÃO ENTRE TESTES ECOTESTE E FT-NIR PARA DETECÇÃO DE  
RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANO VETERINÁRIO DE CARÊNCIA ZERO EM  
LEITE GENUÍNO**

Dissertação submetida ao Programa de Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados.

**Orientadora: Dra. Maria José Valenzuela Bell**

**Juiz de Fora**

**2017**

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Leal, Nayara Lizandra.

Comparação entre testes Ecoteste e FT-NIR para detecção de resíduos de antimicrobiano veterinário de carência zero em leite genuíno / Nayara Lizandra Leal. -- 2017.

61 f. : il.

Orientadora: Maria José Valenzuela Bell

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, 2017.

1. Leite. 2. Traços de antibióticos. 3. Testes. I. Bell, Maria José Valenzuela, orient. II. Título.

**COMPARAÇÃO ENTRE TESTES “ECOTESTE” E FT-NIR PARA  
DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANO  
VETERINÁRIO DE CARÊNCIA ZERO EM LEITE GENUÍNO**

**Nayara Lizandra Leal**

**ORIENTADOR (A): Maria José Valenzuela Bell**

Dissertação de Mestrado submetida ao Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Aprovada em 30/06/2017.

  
Roney Alves da Rocha

  
Virgílio De Carvalho Dos Santos

  
Maria José Valenzuela Bell

## **DEDICATÓRIA**

A todos que amo, e as pessoas que queiram o bem do próximo!

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a DEUS pelo dom da vida e que nunca me deixou desistir;

A toda minha família, em especial meus pais e irmãos que sempre estiveram ao meu lado, me dando apoio, e depositaram fé em mim;

Aos meus sobrinhos, e ao Marcos pelos momentos de alegria;

A minha orientadora Maria José Valenzuela Bell por ter acreditado em mim, e pelas orientações e ensinamentos que foram além da área acadêmica;

Ao Leandro Luiz, pelos ensinamentos, pela amizade, carinho e paciência durante a prática desenvolvida no laboratório, e fora dele também, com certeza foram momentos incríveis que com isso nunca poderei esquecer da nossas lutas e batalhas, porém conseguimos chegar ao nosso objetivo, e com certeza ficou uma amizade que levarei por toda vida;

As empresas para quais presto serviços, que foram bastante compreensivas neste período de estudos;

Aos profissionais da Embrapa Gado de leite de Juiz de Fora - MG, e ao Instituto de Laticínios Cândido Tostes por todo apoio e oportunidade de estudo;

Ao professor Virgílio de Carvalho dos Anjos pela co-orientação e também por participar da banca examinadora;

Ao professor Roney por participar da banca examinadora;

A todos os meus professores da UFJF, e ao Mestrado pela oportunidade de estudo.

Aos meus amigos e colegas pelo carinho, apoio e amizade; nunca me esquecerei de vocês, em especial uma amiga muito querida que amo muito, que também me apoiou neste trabalho;

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

**MUITO OBRIGADA!!!**

## **RESUMO**

### **COMPARAÇÃO ENTRE TESTES ECOTESTE E FT-NIR PARA DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANO VETERINÁRIO DE CARÊNCIA ZERO EM LEITE GENUÍNO**

O objetivo é verificar a presença de traços de antibiótico Terramicina e CEF50, este último de carência zero, em amostras de leite cru por meio das seguintes análises: teste de imunológico e Espectroscopia no Infravermelho Próximo com Transformada de Fourier FT-NIR com tratamento de dados que é a Análise de Componentes Principais (PCA). As análises foram realizadas nos Laboratórios de Produtos e Processos (LPP) e de Espectroscopia de Materiais (LEM), ambos do Departamento de Física da Universidade Federal de Juiz de Fora – MG. Foram coletadas amostras diretamente de vacas oriundas da fazenda Coronel Pacheco (MG) Embrapa Gado de Leite houve diferença nos resultados das amostras de traços de antibióticos, a amostra sem carência resultou positivo para teste de infravermelho e negativo para análise do imunoteste. Com isso não se pode afirmar se o resíduo encontrado no eco teste apresenta problemas para o consumo do leite e produção de seus derivados, pois este tipo de teste é qualitativo, com diagnóstico positivo ou negativo. Já o infravermelho, por sua vez, tem uma maior sensibilidade, podendo detectar os traços de antibiótico.

Palavras-chave: Leite, traços de antibióticos, testes.

## **ABSTRACT**

The objective of the present work is to verify the presence of traces of the antibiotics Terramycin and CEF50 (no withdrawal period) in raw milk samples through following analyzes: immunoassay and Fourier Transform Near Infrared Spectroscopy ( FT-NIR) coupled to Principal Component Analysis (PCA). The analyzes were carried out at the Laboratories of Products and Processes (LPP) and Materials Spectroscopy (LEM), both of the Department of Physics of the Federal University of Juiz de Fora – MG. Samples were collected directly from cows from Coronel Pacheco (MG) Embrapa Milk Cattle farm, there was a difference in the results of the samples of antibiotic traces, the sample without deficiency was positive for infrared test and negative for immunotest analysis. Consequently, according to the eco-test it is not possible to say if the tested milk presents problems for the consumption of milk and the production of its derivatives, since this type of test is qualitative, with positive or negative diagnosis. Infrared, on the other hand, has a greater sensitivity, being able to detect the traces of antibiotic.

Key words: Milk, traces of antibiotics, tests.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.</b> .....	<b>09</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>10</b>
2.1 Objetivo Geral.....	10
2.2 Objetivo Específico.....	10
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA.</b> .....	<b>11</b>
3.1 Características do leite e o problema dos traços de antibióticos.....	11
3.2 Relação do leite com Antibióticos. ....	16
3.3 Antibióticos, traços no leite e controle. ....	17
3.4 Kits de método rápido para detecção de antibiótico no leite .....	21
3.5 O Método imunológico.....	21
3.5.1 Especificações do Teste.....	21
3.5.2 Análise de Componentes Principais (PCA) .....	22
3.6 Método Infra Vermelho Próximo. ....	27
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
4.1 Medidas no Laboratório de Produtos e Processos. ....	33
4.1.1 Densidade .....	34
4.1.2 Medida de pH.....	35
4.1.3 Alizarol (Método Morris). ....	36
4.1.4 Crioscopia .....	38
4.1.5 Acidez (Dornic). ....	40
4.2 Medidas no LEM. ....	41
4.3 Análise por Infravermelho.....	43
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.</b> .....	<b>45</b>
5.1 Resultados da análise físico-químico do leite cru oriundo da Fazenda Embrapa Gado de Leite	46
5.2 Resultados da análise físico-química do leite cru coletado na fazenda Córrego d'Areia.	49
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>55</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>56</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A segurança e a qualidade alimentar têm sido cada mais visadas pela população mundial, especialmente com relação a perigos químicos e microbiológicos presentes nos alimentos. Os microrganismos patogênicos são os agentes mais relacionados a enfermidades veiculadas por alimentos, no entanto, a presença de resíduos de substâncias químicas também é muito comum em todo o mundo. Em se tratando de leite, os antibióticos são resíduos químicos detectados com bastante frequência em todos os países. A presença de resíduos de antibióticos no leite pode causar vários efeitos indesejáveis, como hipersensibilidade, seleção de cepas bacterianas resistentes, no ambiente e no consumidor, desequilíbrio da flora intestinal e possível choque anafilático em indivíduos alérgicos a essas substâncias, além de efeito outros efeitos indesejáveis. Além disso, pequenas quantidades de antibióticos determinam resistência crônica de microrganismos presentes no trato intestinal humano. É exigido, no Brasil, pela Instrução Normativa IN62 a pesquisa periódica de resíduos de antibióticos em leite, que não devem conter traços que sejam prejudiciais ao consumo e a produção. Foram aprovados e são autorizados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, no Brasil vários kits analíticos de detecção de resíduos de antibióticos para o controle da presença dessas substâncias em leite, utilizando diferentes princípios de detecção e ação.

Considerando os traços de antibióticos em leite que podem influenciar negativamente na saúde pública e na indústria. Nesse contexto, o presente estudo se propôs a contribuir com a geração de conhecimentos na área a detectar traços dessas substâncias na produção leiteira no Brasil, com antibióticos comuns comercializados com mais frequência em 2 métodos de detecção com imuno teste e espectroscopia no infravermelho, avaliando assim a precisão de cada um.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Realizar uma análise em leite cru visando detectar a presença de traços de antibiótico de Terramicina e CEF 50, este último de carência zero.

### **2.2 Objetivo Específico**

Verificar a presença de traços de antibióticos Terramicina e CEF50, este último de carência zero, em amostras de leite cru por meio das seguintes análises: teste de imunensaio e Espectroscopia no Infravermelho Próximo com Transformada de Fourier FT-NIR com os dados avaliados por meio da Análise de Componentes Principais (PCA).

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Características do leite e o problema dos traços de antibióticos

A produção mundial de leite deverá aumentar 1,4%, para 831 milhões de toneladas em 2017, com a produção devendo expandir na Ásia e nas Américas, estagnar na Europa e África e diminuir na Oceania, de acordo com um relatório da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO). No Brasil a produção de leite vem se tornando crescente a cada ano, apresentando um crescimento médio de 3,9% entre 2016 e 2017, taxa anual esta superior ao crescimento médio mundial de 1,4%.

O Brasil possui um potencial produtivo real na produção de lácteos, com possibilidade de expansão das exportações, no entanto ainda não é um grande exportador. Entre 2004 e 2008, o resultado positivo do comércio de lácteos aponta ganho em competitividade da pecuária de leite brasileira e das empresas deste setor. Entretanto, há restrições impostas ao comércio dos produtos brasileiros pelas exigências do mercado internacional quanto à qualidade e segurança alimentar. Em meio às barreiras do comércio internacional, as técnicas e sanitárias ganham destaque, cada vez mais utilizadas como instrumento balizador ao comércio de produtos lácteos. (MEZZADRI 2014).

A cadeia produtiva do leite deve desenvolver ações para abrir novos mercados, como, por exemplo, alcançar os padrões internacionais de qualidade e cumprir as exigências dos países importadores (Pereira *et al.*, 2009). A presença de antibióticos em leite têm se tornado um desafio dentre as barreiras sanitárias impostas para a exportação dos produtos lácteos. No leite, esses tipos de traços de antibióticos representam prejuízos tanto para a exportação quanto para a indústria e, principalmente, para a saúde do consumidor. Na indústria, a presença de traços de antibióticos gera prejuízos para a produção de alguns produtos, como leites fermentados e queijos, com isso as culturas lácteas utilizadas para a fabricação desses derivados são sensíveis a determinados níveis de antibióticos, o que ocasiona perdas econômicas consideráveis para a indústria processadora (BRITO, 2005). Com a pasteurização, o tratamento térmico tem pouco efeito sobre a concentração de traços de antimicrobiano no leite e não deve ser considerado como fator de controle desse problema (Santos e Fonseca, 2007), com isso os traços podem ser prejudiciais à saúde humana, podendo ocorrer reações alérgicas ou tóxicas em indivíduos que

ingerirem esse leite (Brito, 2005). Porém os antibióticos são considerados atualmente os principais responsáveis por tais reações, podendo até mesmo desencadear choque anafilático em indivíduos especificamente sensíveis (COSTA, 1996). As tetraciclina (oxitetracilina e tetraciclina) são antimicrobianos bacteriostáticos que atuam inibindo a síntese da proteína microbiana, sendo ativas tanto contra bactérias Gram negativo quanto Gram positivo. A síntese proteica é inibida pela ligação ao ribossomo 30s das bactérias, que impedem o acesso do RNAt aminoacil ao receptor do complexo RNA ribossomo. Fonseca, Santos e Pereira citados por Brito, 2005) ressaltam que a matéria-prima devem apresentar nas seguintes características:

- Ter qualidade em seus aspectos físico-químicos:
- Sabor e odor agradável;
- Ausência de agentes patogênicos;
- Reduzida carga microbiana;
- Baixa contagem de células somáticas;
- Ausência de agentes contaminantes (antimicrobianos, pesticidas, adição de água, sujidades).

Neste sentido, Lavinias e Nabuco (1992) citados por Costa 1996 ressaltam que se trata de um “direito inquestionável de todo cidadão a uma alimentação de qualidade e em quantidade suficiente em todas as fases de sua vida”. (p. 67).

De acordo com Oliveira, Fonseca e Germano (1999), em relação à saúde pública a vaca é um animal considerado como fonte inestimável de nutrientes à alimentação do ser humano devido ao fornecimento do leite, um excelente alimento pelo seu valor nutritivo, como por exemplo: carboidratos, proteínas, gordura, vitaminas e água.

O leite e seus derivados, como o queijo e o iogurte, são componentes importantes e indispensáveis para uma dieta equilibrada e nutritiva, se destacando, assim, na nutrição humana, por ser um alimentos essenciais, especialmente aos recém-nascidos, no caso de estes serem privados do leite materno por algum motivo. Devido a isto se encontra entre os produtos mais

importantes da agropecuária brasileira, além de desempenhar um papel relevante na alimentação e na geração de empregos e renda para a população.

O leite é considerado o mais perfeito alimento da natureza, apresentando uma composição rica em proteínas, vitaminas, gordura, carboidratos, sais minerais, e, principalmente, cálcio, componentes estes, essenciais aos seres humanos. É produzido na glândula mamária da vaca durante a fase de lactação a partir de elementos que passam do sangue para as células especializadas da glândula. No entanto, conforme Oliveira; Fonseca e Germano (1999) o leite sofre alterações em sua composição devido a uma série de fatores, entre eles:

- Variações climáticas;
- Estágio de lactação;
- Raça;
- Alimentação;
- Resíduos de antimicrobiano.
- Idade;
- Infecções do úbere (glândulas mamárias);

Durante o processo de produção de leite podem passar algumas sujidades que afeta a qualidade do leite e também medicamentos ou drogas veterinárias que foram administrados às vacas para o controle de alguma doença. De acordo com Rebhum (2000), a contaminação do leite de consumo por antimicrobianos se origina do tratamento de vacas em lactação, quando esta apresenta: mastite, mamite ou qualquer outra doença infecciosa. Portanto, sempre que for preciso medicar ou administrar uma droga à vaca leiteira, deve-se estar alerta ao período de carência para que não haja a possibilidade de aparecimento de traços de antibióticos no leite no leite (BRITO, 2000).

A contaminação no leite se deve, principalmente, às conseqüências do tratamento contra infecções. As infecções existentes e persistência dos resíduos de antimicrobianos no leite dependem de uma série de variáveis, e dentre elas destacam-se:

- Tipo e quantidade do antimicrobiótico usado;
- Via de administração;
- Quantidade da produção de leite no momento do tratamento;
- Estado de saúde do animal;
- Tipo de substância usada na formulação do antibiótico e solubilidade.

Segundo esses autores, os produtos apropriados para tratamento se diferem quanto à formulação do antimicrobiano. Na lactação são logo liberados por serem sais solúveis, ou seja, de ação rápida. E, para tratamento no período seco são geralmente sais insolúveis, ou seja, de ação longa, para permitir a contínua liberação do antimicrobiano por várias semanas. Estudos à base de testes quantitativos determinam o tempo em que o antimicrobiano está sendo excretado e, conseqüentemente, o período em que o leite não deve ser enviado para consumo humano (OLIVEIRA,1999). Com isso, acredita-se que para maior segurança no consumo de leite de boa qualidade, é necessária a efetiva fiscalização sanitária, evitando seu consumo quando da contaminação por resíduos de antimicrobiano (OLIVEIRA,1999).

Nesse sentido, de acordo com Brito (2006), trata-se de um problema de saúde pública que merece consideração especial, pois os efeitos tóxicos de traços de antibióticos no leite à saúde humana favorece o desenvolvimento de formas de resistência de microrganismos patogênicos.

Devido a esse motivo, essa ocorrência tem sido preocupação constante de órgãos governamentais sanitários e a grande maioria dos criadores de gado leiteiro (BRITO, 2006). Assim, o monitoramento frequente de medicamentos, seus derivados metabólicos e o controle de traços de antibiótico no leite é de grande importância à indústria de produtos lácteos e conseqüentemente o consumidor. Este último incapaz, na maioria das vezes, de perceber se o leite consumido contém antibiótico, é suscetível a diversas enfermidades (BRITO, 2006). Neste sentido, a produção intensiva de leite de alta qualidade sem traços de antibióticos reveste-se de extrema importância para os produtores, tendo em vista os prejuízos e as penalidades decorrentes da rejeição do leite contaminado com valores acima dos níveis de tolerância. Com o intuito de evitar tais transtornos se faz necessário a utilização recursos apropriados

comercialmente disponíveis para a detecção de resíduos de antimicrobianos no leite individual (BRITO, 2006). Deste modo, acredita-se que, considerando a elevada prevalência de mastites e outras enfermidades que acometem o gado leiteiro e o conseqüente no uso de antibióticos em vacas torna-se necessária assegurar a produção de leite isenta de traços desses antimicrobianos administrados (BRITO, 2006).

A tabela 1 mostra os principais medicamentos veterinários utilizados com seus respectivos Limites Máximos de Resíduos (LMR), em  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , permitidos pela legislação europeia (União Europeia) e os limites de detecção de alguns testes utilizados para detecção de cada antibiótico no leite.

<b>BETA LACTÂMICOS</b>	<b>ECO TESTE Mg/L</b>	<b>TWIN SENSOR Mg/L</b>	<b>CHARM Mg/L</b>	<b>BETASTA R Mg/L</b>	<b>SNAP Mg/L</b>
<b>Penicilina</b>	4	3-4	2-3	2-4	2-5
<b>Ampicilina</b>	4	3-4	3-4	2-3	6
<b>Amoxicilina</b>	4	3-4	3-5	2-3	8
<b>Oxacilina</b>	8	12-18	10-30	5-10	60
<b>Cloxacilina</b>	8	6-8	10-20	5-10	50
<b>Dicloxacilina</b>	8	6-8	10-20	5-10	40
<b>Nafcilina</b>	30	30-50	não detecta	8-20	130
<b>Cefquinoma</b>	20	20-30	15-25	<20	40
<b>Cefacetil</b>	100	30-40	20-40	não detecta	20
<b>Cefalonium</b>	20	3-5	10-20	7-15	-
<b>Cefazolina</b>	50	18-22	20-40	40-60	30
<b>Cefoperazona</b>	50	3-4	1-3	5-8	12
<b>Ceftiofur</b>	100	10-15	40-70	75-150	8
<b>Cefapirina</b>	50	6-8	15-25	5-10	14
<b>Tetraciclina</b>	60	80-100	10-30	50	40
<b>Oxitetraciclina</b>	70	60-80	50-100	25-50	25
<b>Doxiciclina</b>	40	25-50	não detecta	não detecta	não detecta
<b>Clortetraciclina</b>	40	62-75	50-100	25-50	60

Fonte: Anvisa 2009

**Tabela 1:** Limites máximos de resíduos de antibióticos (LMR), em  $\text{Ng}/\text{Kg}$ , permitidos pela legislação europeia (união europeia) e os limites de detecção de alguns testes/métodos analíticos.

### 3.2 Relação do leite com Antibióticos

O leite produzido e consumido no Brasil nem sempre tem uma qualidade adequada e desejada, e isso tem um papel fundamental no incentivo à produção leiteira, pois gera discussões e necessidades de se desenvolver novas políticas para tal (Nero et al., 2005). Produzir leite de alta qualidade deve ser a prioridade para estabelecer um mercado forte para o mesmo e seus derivados, tendo em vista a qualidade dos produtos lácteos depender da qualidade do leite cru Santos e *et al*, 2011. A contaminação microbiana do leite *in natura* pode ocorrer por vias por vias exógenas, com destaque para superfície exterior do úbere e dos tetos, os utensílios e equipamentos de ordenha, as mãos do ordenhador, e as condições de armazenamento do leite, ou por vias endógenas, decorrentes de infecções de animais, incluindo os processos inflamatórios da glândula mamária (Santos e Fonseca, 2007). A qualidade do leite depende de vários fatores como, por exemplo: higiene do ordenhador, limpeza do local, utensílios e equipamentos que entram em contato com o produto; uma vez que as condições de produção, estocagem e transporte do leite, além dos cuidados na administração de medicamentos ou drogas veterinárias, podem influenciar diretamente a qualidade higiênica Denobile et al 2004. Uma atenção maior por parte das autoridades, indústrias, profissionais envolvidos, produtores e consumidores de modo geral está sendo dada atualmente devido a questão da "qualidade e segurança" dos alimentos.

Quanto maior a concentração de sólidos no leite, maior será o rendimento dos derivados lácteos. A composição média do leite consiste em 87,4% de água e 12,6% de sólidos totais, sendo 3,9% de gordura, 3,2% de proteína, 4,6% de lactose e 0,90% de minerais e outros sólidos Ringner, 2008. Leite com alta contagem de células somáticas (CCS) afeta negativamente a produção de leite em pó, manteiga e leite UHT, reduzindo a vida de prateleira, e produzindo sabores indesejáveis. À medida que aumenta CCS do rebanho, maior é a probabilidade de serem encontrados traços de antibiótico no leite Spinosa, 2002. O leite produzido, a partir de elementos que passam do sangue para as células especializadas da glândula mamária, em situações específicas pode conter traços de antibiótico ou drogas de uso veterinário. São utilizados medicamentos veterinários para a profilaxia e tratamento do rebanho leiteiro e devem ser prescritos por profissionais competentes. Caso não sejam respeitadas as indicações do receituário e o período de carência, poderá ocorrer a presença de resíduos no leite (Brito, 1999). São utilizados antibióticos para tratamento de mastite e outras infecções em vacas leiteiras Brito *et al* 2000, a presença de resíduo de antimicrobiano no leite interfere no processamento de

muitos produtos lácteos, como queijo e outros produtos fermentados, podendo ocorrer vários problemas de saúde aos consumidores.

### **3.3 Antibióticos, traços no leite e controle**

Os antimicrobianos são substâncias químicas usadas no combate de microrganismos. Podem ser inespecíficos, aqueles que atuam sobre os microrganismos em geral, patogênicos ou não. Os agentes específicos são aqueles que atuam sobre os microrganismos responsáveis pelas doenças infecciosas que acometem os animais; sendo representado pelos quimioterápicos e antimicrobianos. Os quimioterápicos são agentes químicos sintéticos, exibindo as mesmas atividades de um antimicrobiano (Spinosa, 2002).

Os antibióticos são substâncias químicas produzidas pelo metabolismo de determinadas bactérias, fungos e actinomicetos. Podem impedir temporária ou definitivamente as funções vitais de outros microrganismos, em soluções diluídas, determinando efeitos bacteriostáticos e bactericidas Brasil, 1999. Medicamentos veterinários estão sendo usados em larga escala na prática da agricultura moderna e administrados como aditivos alimentares ou através da água potável, a fim de evitar o surto de doenças. A utilização de antimicrobianos em animais sempre acompanhou o desenvolvimento da prática médica e veterinária. Na década de 50, descobriu-se seu uso como aditivo alimentar objetivando promover o crescimento dos animais com melhor eficiência produtiva. As classes de antimicrobianos mais comumente utilizados em animais de produção são os  $\beta$ - lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), as tetraciclinas (oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina), os aminoglicosídeos (estreptomicina, neomicina e gentamicina) os macrolídeos (eritromicina) e as sulfonamidas (sulfametazina) (Mitchell et al., 1998). O uso incorreto de antibiótico na medicina veterinária pode originar traços nos alimentos, podendo ter efeitos tóxicos diretos sobre os consumidores, ou podem ainda causar problemas indiretamente pela indução de cepas de bactérias resistentes. Outra implicação importante relacionada à presença de resíduos refere-se à ocorrência de problemas tecnológicos nas indústrias de alimentos, especialmente naquelas que utilizam bactérias ácido-láticas. De acordo com Brito 2005, o principal problema que normalmente ocorre é a inibição das culturas lácteas utilizadas na produção de iogurtes, queijos e outros produtos fermentados, dificultando a produção dos

mesmos ou alterando sua qualidade. A formação de odores desagradáveis na manteiga e no creme é outra problemática a ser citada. Rapini et al. (2004), ao avaliarem o perfil de sensibilidade antimicrobiana de 45 cepas de *Staphylococcus* spp isoladas de dez amostras de queijo tipo coalho comercializado nas praias nordestinas, encontraram elevado percentual de resistência: 100% para penicilina; 91% para tetraciclina; 75,5% para vancomicina; 71,1% para gentamicina; 66,7% para oxacilina; 60% para eritromicina; 48,9% para cefalotina e 26,7% para sulfazotrin. Os autores destacaram a necessidade de medidas de controle no uso indiscriminado de antimicrobianos. As principais razões que justificam a preocupação com a presença de resíduos de antimicrobianos no leite são: 1) alguns nitrofuranos e sulfametazina desenvolvem tumores malignos em animais de laboratório, existindo potencial para causar o mesmo efeito no homem. O cloranfenicol pode afetar a medula óssea e causar anemia aplástica em indivíduos susceptíveis; 2) alguns consumidores apresentam reação alérgica à penicilina, mesmo em pequenas quantidades; 3) os traços de antibiótico poderiam selecionar uma resistência de bactérias do ambiente e/ou presentes nos animais, prejudicando futuros tratamentos; 4) pequenas concentrações de antimicrobianos podem inibir as espécies de bactérias usadas nos produtos lácteos fermentados. A atividade dos antimicrobianos não é, geralmente, afetada pela pasteurização. Portanto, é importante tomar alguns cuidados quando da administração de antimicrobianos às vacas em lactação para evitar que o leite com resíduos não seja comercializado Brito 1997. Devido aos riscos relacionados à saúde pública, associados à presença de resíduos no leite, é recomendado o monitoramento frequente de resíduos de medicamentos e de seus derivados metabólicos no leite, adotando-se, como referência, os limites estabelecidos pelas agências internacionais. Historicamente, a principal referência mundial para esse assunto é o *Codex Alimentarius* 2001 (FAO/WHO) que fornece subsídios técnicos, serve de referência para vários países do mundo e estabelece que o limite máximo de resíduo de antimicrobiano para o leite é um décimo daquele encontrado em produtos cárneos, pois o leite é alimento essencial para crianças e recém-nascidos Fonseca, 2005. Com o intuito de avaliar e prevenir esses riscos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) implantou no Brasil, em 2003, o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em alimentos de origem animal (PAMvet), programa este que visa controlar resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos. Por ser muito consumido pela população, o leite foi o primeiro alimento a ser pesquisado.

Foram definidos, também, os seguintes princípios ativos a serem pesquisados: tetraciclina, beta-lactâmicos, sulfas, abamectina, doramectina e ivermectina (MARTIM, 2011).

Testes para sua detecção foram desenvolvidos, após a observação dos efeitos adversos ocasionados pelo problema de resíduos de antimicrobianos no leite. Um grupo de testes disponíveis comercialmente é baseado na inibição do crescimento bacteriano. As bactérias utilizadas apresentam alta sensibilidade à penicilina G e sensibilidade para outros antimicrobianos. Todavia, o período para obtenção do resultado pode variar de duas a 24 horas, dependendo do teste e da espécie de microrganismo utilizado. Existem outros testes rápidos que apresentam alta sensibilidade e especificidade; contudo, são designados para grupos específicos de substâncias. Existe um problema adicional, no caso do Brasil, pois como existem diversos tipos de tratamentos liberados para doenças de bovinos leiteiros, principalmente mastite, isto implica em aumentar o número de testes a ser empregado pelas indústrias, o que contribui com aumento do custo, principalmente quando se considera a necessidade de uso de rotina Brito, 2005. É de fundamental importância monitorar a qualidade do produto, bem como implantar programas de fiscalização da qualidade do leite recebido, no que se refere à presença de resíduos de antimicrobianos nas indústrias de laticínios para evitar perdas econômicas e danos à saúde do consumidor Denobile e Nascimento, 2004.

O envio de leite para posto de refrigeração ou estabelecimento industrial não é permitido quando oriundo de animais que estejam sendo submetidos a tratamento com drogas e medicamentos de uso veterinário em geral, passíveis de eliminação pelo leite. Devido a este fato, estes animais devem ser afastados da produção pelo período recomendado pelo fabricante, de forma a assegurar que os resíduos da droga não sejam superiores aos níveis fixados em normas específicas Brasil, 2002.

A Instrução Normativa nº 42, publicada em 1999 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA,1999), estabelece os padrões legais para cada grupo de antimicrobiano no Brasil. O Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal (PNCRB,2008), instituído pelo (MAPA,1999), tem o objetivo de sistematizar os meios de controle da contaminação desses produtos por resíduos de compostos usados na agropecuária, bem como de poluentes ambientais. Os limites legais estabelecidos referem-se aos valores internacionais que garantem a segurança do leite para o consumidor (Brasil, 1999). Os métodos analíticos utilizados no PNCR são adotados em função da disponibilidade de métodos validados, principalmente, aqueles recomendados pelo Comitê do *Codex Alimentarius* sobre Resíduos de Drogas Veterinárias nos Alimentos (CCRVDF).

Métodos de triagem são incluídos inicialmente, não devendo exigir investimentos em instrumentos laboratoriais complexos, nem em reagentes ou na capacitação de pessoal a elevados custos. Devem ser eficazes e economicamente viáveis. Estes métodos de triagem podem ser definidos como métodos de análises qualitativos, de um remanescente residual de uma substância em concentração igual ou inferior ao LMR.

Um resultado suspeito indica que pode ter sido superado o LMR e deverá ser analisada novamente através de métodos confirmatórios, fornecendo fundamento para ação regulatória (BRASIL, 1999).

### **3.4 Kits de método rápido para detecção de antibiótico no leite**

Grande parte dos testes disponíveis comercialmente no mercado é qualitativo, sendo, portanto, classificados como testes de triagem. Os testes de triagem podem ser classificados como aqueles que permitem com precisão, indicar se uma substância está ou não em concentrações acima do limite de segurança (SANTOS, 2011). Existem diversos métodos de detecção desses resíduos de antimicrobianos disponíveis para serem utilizados pelas indústrias de laticínios, pois a legislação determina que essa pesquisa seja feita no leite antes de o mesmo ser beneficiado. Dentre esses métodos, os de inibição microbiana são amplamente utilizados por sua praticidade e facilidade de manipulação. No entanto, os mesmos não devem ser utilizados como pesquisa rápida, pois demandam cerca de duas a vinte e quatro horas para que seu resultado possa ser observado (SANTOS, 2011).

### **3.5 O Método imunológico**

#### **3.5.1 Especificações do Teste**

É baseado no princípio lateral *flow* competitivo. O extrato passa por uma zona reagente, que contém anticorpos específicos conjugados com ouro-coloidal para beta lactâmicos e tetraciclinas. Quando os antimicrobianos beta lactâmicos e tetraciclinas estão presentes na amostra, eles são capturados pelo complexo anticorpo-ouro coloidal. Na zona seguinte, chamada zona teste (zona teste para beta lactâmicos e zona teste para tetraciclinas), são capturados pela membrana quaisquer anticorpos-ouro coloidal livres que não reagiram com os antimicrobianos beta lactâmicos e tetraciclinas, permitindo que se concentrem e formem linhas visíveis na região teste para beta lactâmicos e na região teste para tetraciclinas. Se o nível de beta lactâmicos e tetraciclinas na amostra a ser testada estiver abaixo do seu cut-off, um número maior de complexos anticorpo ouro coloidal serão capturados formando uma linha de coloração visível na região teste do beta lactâmico e na região teste tetraciclina. As linhas T para beta lactâmicos e para tetraciclinas não serão visíveis se os beta lactâmicos e as tetraciclinas presentes estiverem na concentração igual ou maior do que o cut-off, o que significa um

resultado reagente. As linhas de testes coloridas visíveis indicam um resultado não reagente e a linha C colorida mostra que o resultado é válido.

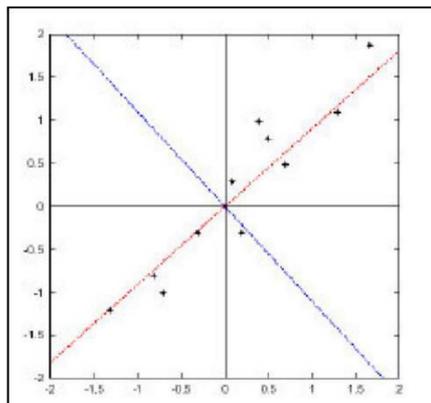
### 3.5.2 Análise de Componentes Principais (PCA)

Uma técnica da estatística multivariada que consiste em transformar um conjunto de variáveis originais em outro conjunto de variáveis de mesma dimensão é a análise de componentes principais. Estes componentes apresentam importantes propriedades, cada componente principal é uma combinação linear de todas as variáveis originais, são independentes entre si e estimados com o propósito de, em ordem de estimação, reter o máximo de informação, em termos da variação total contida nos dados. Associa-se à ideia de redução de massa de dados, com menor perda possível da informação, a análise de componentes principais. Procura-se redistribuir a variação observada nos eixos originais de maneira que se obtenha um conjunto de eixos ortogonais não correlacionados. Existe a possibilidade de se utilizar esta técnica para geração de índices e agrupamento de indivíduos. Na análise os indivíduos são agrupados de acordo com sua variação, ou seja, são agrupados segundo suas variâncias, ou ainda, segundo seu comportamento dentro da população, representado pela variação do conjunto de características que define o indivíduo. A técnica agrupa os indivíduos de uma população segundo a variação de suas características. De acordo com REGAZZI (2000), as técnicas de análise multivariada podem ser também utilizadas para resolver outros tipos de problemas em diversas áreas do conhecimento, apesar de terem sido desenvolvidas para resolver problemas específicos, principalmente de Biologia e Psicologia. A técnica mais conhecida é a análise de componentes principais, no entanto é importante ter uma visão global de todas, ou quase todas, as técnicas da estatística multivariada para que possam ser resolvidos a maioria dos problemas práticos.

A Análise de Componentes Principais (PCA) é um método no qual sua finalidade básica é a análise dos dados usados visando sua redução, escolha das formas mais representativas de dados a partir de combinações lineares das variáveis originais e eliminação de sobreposições. É também chamado de Transformada *Hotelling*, em homenagem a Kari Karhunen, Michel Loève [1907-1979] e Harold Hotelling, ou ainda, Transformada Discreta de *Karhunen-Loève* (KLT). Ela transforma variáveis discretas e coeficientes descorrelacionados. Foi derivada por *Hotelling* e denominada por ele como Método dos componentes principais. Dentre os métodos estatísticos

de múltiplas variáveis a Análise de Componentes Principais (PCA) é considerado mais simples. A PCA é considerada a transformação linear ótima, dentre as transformadas de imagens, sendo muito utilizada pela comunidade de reconhecimento de padrões.

Através da análise de componentes principais (PCA) pode-se identificar a relação entre características extraídas de dados. É bastante útil quando os vetores de características têm muitas dimensões, quando uma representação gráfica não é possível, mas também pode ser útil em dimensões menores, como mostra a Figura 1. A componente principal é o arranjo que melhor representa a distribuição dos dados (linha vermelha na Figura 1) e a componente secundária é perpendicular a componente principal (linha azul na Figura 1).



**Figura 1** - Linha vermelha mostra a distribuição principal dos dados e a linha azul mostra a componente secundária.

Para calcular as componentes principais deve-se seguir os seguintes passos:

- Obter os dados ou as  $M$  amostras de vetores de dimensão  $n$ ;
- Calcular a média ou o vetor médio destes dados;
- Subtrair a média de todos os itens de dados;
- Calcular a matriz de covariância usando todas as subtrações. Ela é o resultado da média do produto de cada subtração por ela mesma e terá dimensão  $n \times n$ ;
- Calcular os auto valores e auto vetores da matriz de covariância.
- Arranjar os a matriz da Transformada de *Hotelling* (cujas linhas são formadas a partir dos auto vetores da matriz de covariância arranjados de modo que a primeira linha, o elemento  $(0,0)$ , seja o auto vetor correspondente ao maior auto valor, e assim sucessivamente até que a última linha corresponda ao menor autovalor.

O auto vetor com o maior auto valor associado corresponde à componente principal do conjunto de dados usado. Isso significa que esse é o relacionamento mais significativo entre as dimensões dos dados. Na Figura 1 podemos ver este ponto ilustrado.

Podem então ser usadas as componentes principais conforme a maneira que se deseja. Seja para visualização apenas, para reconhecimento das principais características de medidas a serem usadas ou para aquisição de imagens de objetos 2D de acordo com o melhor posicionamento da câmera.

### Matriz de Covariância

Se tratando de estatística, existem variadas análises que podem ser feitas sobre um conjunto de dados, como o desvio padrão, a variância e a média aritmética. Os dois primeiros medem o quão afastados estão os dados em relação à média (a variância é igual ao desvio padrão ao quadrado).

No entanto, todas essas medidas consideram separadamente cada tipo de dados. Por sua vez, a covariância sempre é medida entre duas dimensões (o cálculo da covariância entre uma dimensão e ela mesma resulta na variância). A fórmula da covariância para dados de dimensão 2 ( $X$  e  $Y$ ) é:

$$cov(X, Y) = \frac{\sum_{i=1}^n [(X_i - \bar{X}) \cdot (Y_i - \bar{Y})]}{n}$$

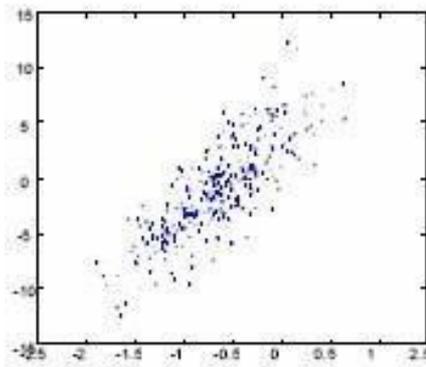
Na fórmula supracitada,  $X$  e  $Y$  são listas de dados, onde  $X$  é a primeira e  $Y$  é a segunda dimensão. Os elementos que se encontram com uma barra sobre eles,  $\bar{X}$  e  $\bar{Y}$ , são as médias das listas.  $X_i$  e  $Y_i$  são cada um dos elementos das listas nas duas direções  $X$  e  $Y$ , na  $i$ -ésima posição. A variável  $n$  representa o número de itens de dados obtidos. Quando se tem os dados representando uma amostra (que inicia no índice 0), usa-se  $n-1$  no denominador e no somatório. Quando se tem os mesmos representando o conjunto total da “população”, utiliza-se simplesmente  $n$  no denominador. Caso os dados tenham mais de duas dimensões, será necessário ter a covariância entre cada par de dimensões. Partindo dessa ideia, há o surgimento

da matriz de covariância. Caso sejam utilizadas três dimensões (x, y e z), a matriz de covariância terá o formato seguinte:

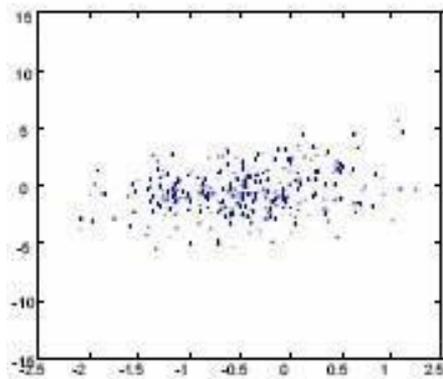
$$matrix\_cov = \begin{pmatrix} cov(x, x) & cov(x, y) & cov(x, z) \\ cov(y, x) & cov(y, y) & cov(y, z) \\ cov(z, x) & cov(z, y) & cov(z, z) \end{pmatrix}$$

A diagonal principal da matriz contém as variâncias e as demais posições a correlação entre as direções. Essa matriz é simétrica e real, de modo que é sempre possível encontrar um conjunto de autovetores ortonormais (Anton e Rorres, 2004).

A PCA promove uma transformação linear nos dados de modo que os resultantes desta transformação tenham suas componentes mais relevantes nas primeiras dimensões, em eixos denominados principais. As figuras abaixo demonstram um conjunto bidimensional e o mesmo conjunto após a aplicação da PCA.



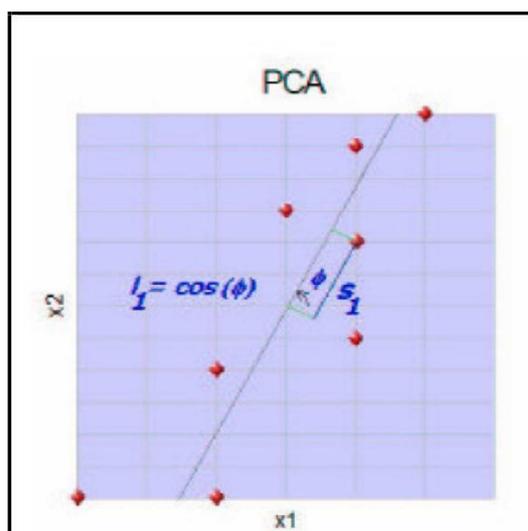
**Figura 2** - Conjunto de dados



**Figura 3** - Conjunto de dados após a PCA.

A matriz de transformação utilizada para o cálculo da PCA consiste em uma matriz cujas colunas são os autovetores da matriz de covariância estimada dos dados.

A interpretação geométrica dos valores *ORDGLQJ* e *VFRUH* para a observação “1”, num gráfico a duas dimensões com duas variáveis  $x_1$  e  $x_2$  é fornecida pela figura abaixo. A reta que representa um componente principal indica a direção de maior variabilidade das amostras. Os *VFRUHV* são as projeções das amostras na direção dos componentes principais e os *ORDGLQJV* são os ângulos entre cada componente principal e cada variável.



**Figura 4**- Representação geométrica do componente principal que indica a direção de maior variabilidade das amostras

Análise dos Componentes Principais (PCA) é um método estatístico linear que encontra os autovalores e autovetores da matriz de covariância dos dados e, com esse resultado, pode-se realizar a redução dimensional dos dados e analisar os padrões principais de variabilidade presentes. A PCA é um método exploratório devido ao fato de auxiliar na elaboração de hipóteses gerais a partir dos dados coletados, contrastando com estudos direcionados nos quais hipóteses prévias são testadas. É capaz, também, de separar a informação importante da redundante e aleatória.

Utiliza-se a PCA ainda em algoritmos de compressão de imagens. Sua característica básica é a redução do espaço necessário para a representação da imagem, já que promove uma compactação da energia. Empregando-se a PCA a visualização de diversas variáveis em um determinado conjunto de dados torna-se mais rápida, objetiva, produtiva e eficiente.

### **3.6 Método Infra Vermelho Próximo**

No ano de 1800, William Herschel, um músico e astrônomo de sucesso, redigiu dois artigos descrevendo o comportamento do espectro da radiação solar em relação aos efeitos de temperatura. Valeu-se de um prisma de vidro para dispersar a luz solar e mediu a temperatura em cada uma das cores, observando que à medida que se aproximava do vermelho a temperatura aumentava e, tirando medidas de temperatura após o vermelho, onde não havia luz visível, encontrou valores ainda maiores, demonstrando a existência de componentes da luz que não eram visíveis aos olhos humanos. Então essa radiação foi denominada de infravermelha (LOURES, 2013).

Em torno de 1905, o físico William Weber Coblentz, observou que dois compostos químicos diferentes não apresentavam espectros iguais e identificou certos padrões no espectro, possibilitando assim o uso da radiação infravermelha para obter informações estruturais dos compostos, onde então surgiu a espectroscopia como uma nova ferramenta química (OLIVEIRA, 2011).

A espectroscopia é baseada na interação das ondas eletromagnéticas em um determinado comprimento de onda com os constituintes da amostra, o que gera um espectro como resultado gráfico (resposta do equipamento vs. comprimento de onda). Integra o estudo da interação da

radiação eletromagnética com a matéria, cujo principal objetivo é determinar os níveis de energia e transições de espécies moleculares e atômicas (OLIVEIRA, 2011). A maioria esmagadora dos compostos, orgânicos ou inorgânicos, que possuam ligações covalentes, absorvem várias frequências da radiação eletromagnética na região do infravermelho do espectro eletromagnético. Região essa que envolve comprimentos de onda entre aqueles associados à luz visível e os associados a micro-ondas (MENDHAM et al., 2002).

Não obstante sua descoberta ter sido feita há mais de um século, a espectroscopia no infravermelho próximo (*Near Infrared Spectroscopy-NIRS*) é bastante recente, com cerca de 50 artigos escritos sobre o assunto até 1970. Isto se deve à difícil compreensão dos espectros gerados nesta região (de 700 a 2500 nm), que apresentam vários picos fracos e sobrepostos de sobretons e bandas de combinação. No fim dos anos 70, o surgimento da quimiometria, ciência que aplica métodos estatísticos em dados químicos, permitiu que a complexidade espectral na região do infravermelho próximo (Near Infrared-NIR) fosse melhor compreendida e utilizada. Desde então, a técnica começou a ser aceita e passou a ser uma alternativa como método de medição.

Destacam-se dentre as vantagens do método: preservação, rapidez nas determinações (é analisada uma amostra a cada minuto) e preparação mínima da amostra, o uso de reagentes químicos é dispensado na fase de previsão e aplicação em vasta gama de materiais (pode ser analisada qualquer molécula que contenha ligações NH, CH, OH ou SH). Estes atributos fazem do método uma alternativa rápida, acessível e não poluente e não gera resíduos. Entretanto, vale ressaltar que a qualidade dos resultados obtidos por essa técnica depende de métodos de referência aceitáveis e apropriados, por meio dos quais o equipamento NIR é calibrado.

Essa técnica passou a ser aplicada em diversos campos da pesquisa e da indústria, tais como, farmacêutica, cosmética e de polímeros, na indústria alimentícia, de combustíveis e petrolíferas, bem como em análises clínicas e ambientais. No entanto, na área agrícola foi que a técnica encontrou maior aplicação, e seu intensivo uso principalmente na área de agricultura de precisão permitiu o lançamento da tecnologia e seu maior desenvolvimento no mercado. A necessidade progressiva por insumos e produtos de alta qualidade obtidos nos diversos setores produtivos e industriais, coloca em evidência a necessidade do controle de qualidade nos processos de produção (LOURES, 2013).

Com o desenvolvimento da microeletrônica e a popularização dos microcomputadores, em meados dos anos 80, houve um avanço significativo nas análises instrumentais, o que favoreceu a aquisição de um grande número de dados relacionados a uma mesma amostra.

Contudo, a modelagem desses dados tornou-se mais complexa e só pode ser solucionada com a aplicação de técnicas quimiométricas, as quais foram fundamentais para a utilização da espectroscopia como ferramenta de análise em aplicações qualitativas e quantitativas na química analítica contemporânea (OLIVEIRA, 2011).

A experiência no tratamento adequado dos dados gerados por NIRS tem sido demonstrado no Brasil com muitos grupos em atividade no país todo, empregando ou desenvolvendo metodologias quimiométricas e calibrações aptas para utilização em pesquisas e análises de rotina. Um exemplo disto tem sido observado na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, que conta até o presente momento com 26 equipamentos NIR espalhados por todo o Brasil em vários Centros de Pesquisa, os quais estão ligados a uma rede denominada “Rede NIR”, as quais se unem para aprimorar seus conhecimentos nas áreas de espectroscopia e quimiometria com o intuito de criar modelos de calibração robustos, confiáveis e multivariáveis para diferentes parâmetros químicos e diferentes matrizes, como por exemplo solos, grãos e forrageiras (ALBUQUERQUE 2004).

Após o advento da Transformada de Fourier, a espectroscopia no infravermelho apresentou grande avanço como técnica de análise quantitativa para produtos industrializados e controle de alimentos e medicamentos, o que fez com que o método ficasse mais rápido e robusto. Existe, portanto, um extenso campo de aplicações utilizando as técnicas de espectroscopia no infravermelho em conjunto com métodos de calibração multivariada, com diversos propósitos. O aperfeiçoamento crescente nos últimos anos revela o contínuo interesse por métodos analíticos rápidos, não destrutivos e não invasivos e que não gerem subprodutos deletérios ou tóxicos (OLIVEIRA, 2011). O instrumento que obtém o espectro de absorção no infravermelho é chamado de espectrômetro de infravermelho ou, simplesmente, espectrofotômetro. Há dois tipos de espectrômetros de infravermelho mais utilizados nos laboratórios de análise: instrumentos dispersivos e de Transformada de Fourier. Apesar de ambos produzirem espectros praticamente idênticos para qualquer composto e oferecerem espectros em uma faixa comum de  $4000$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ , os espectrômetros de infravermelho de transformada de Fourier oferecem uma melhor relação sinal/ruído para uma dada resolução, uma exatidão de valores de frequência muito melhor, rapidez e melhores condições para a manipulação de dados (PAVIA et al., 2012).

Uma técnica analítica muito comum usada em diversas áreas do conhecimento é a espectroscopia no infravermelho (IR). William Norris 1987 detectou primeiramente a região espectral do infravermelho em 1800. Ela se situa na faixa de números de onda em torno de

13.000  $\text{cm}^{-1}$  a 10  $\text{cm}^{-1}$  do espectro eletromagnético. De acordo com a ISO 20473 o IR pode ser subdividido em: IR Próximo (13.000 - 3.300  $\text{cm}^{-1}$ ), IR Médio (3.300 - 200  $\text{cm}^{-1}$ ), IR Distante (200 - 10  $\text{cm}^{-1}$ ). A radiação infravermelha, ao incidir sobre uma molécula, excita os modos rotacionais e vibracionais da mesma. A absorção do IR ocorre quando a frequência da radiação, multiplicada pela constante de Planck,  $\square = h\nu$ , tem o mesmo valor da diferença de energia entre dois estados roto-vibracionais, ou seja, o processo envolve uma ressonância entre a diferença de níveis de energia da molécula e a radiação eletromagnética. Neste trabalho, a técnica utilizada foi a espectroscopia no infravermelho próximo (NIR- *Near Infrared Spectroscopy*). A NIR tem sido adotada e bem aceita nas indústrias em processos de monitoramento e controle de qualidade de produtos [Arantes 2011 *apud* Luiz 2015].

Um astrônomo chamado W Herschel, no ano de 1800, demonstrou pioneiramente a existência de radiação infravermelha. Posteriormente, em 1882, W Abney e ER Festing tiraram fotos dos Espectros de absorção em 53 compostos e apresentaram correlações entre as bandas de absorção e a presença de alguns grupos químicos nas moléculas estudadas. Aproximadamente em 1890, WH Julius investigou o espectro de 20 moléculas orgânicas usando a linha do Sódio. Os movimentos vibratórios de moléculas induzem absorção na região infravermelha. Estas Bandas de absorção tem sido utilizadas para análises quantitativas e qualitativas de inúmeras Moléculas, e a identificação e atribuição dessas bandas para informações específicas sobre o produto investigado movimentos rotacionais de moléculas podem ser excitados pela radiação infravermelha, dando origem a bandas rotacionais, geralmente superpostos às bandas de vibração. Eles podem ser observados com espectrômetros de alta resolução e para moléculas gasosas que exibem bandas estreitas (DUFOUR,2009).

No que diz respeito aos componentes alimentares, tais como triacilglicerídeos e proteínas, a cadeia de ácidos graxos é responsável principalmente pela absorção observada entre 3000 e 2800  $\text{cm}^{-1}$ , enquanto o C-NH é o principal responsável para a absorção entre 1700 e 1500  $\text{cm}^{-1}$ . A maioria das bandas de absorção está na região MIR, mas não na região NIR, foram identificadas e atribuídas a grupos químicos. A ligação de éster de triacilgliceróis C-O (1175  $\text{cm}^{-1}$ ), grupo C=O (1750  $\text{cm}^{-1}$ ) e cadeia acil C-H (3000-2800  $\text{cm}^{-1}$ ) são comumente utilizados para determinar gorduras. O processo pelo qual se estabelece a relação matemática entre os valores fornecidos por um instrumento ou sistema de medição e aqueles conhecidos pela medida material objeto de estabilidade é a calibração. A expressão matemática relacionada a respostas analíticas ou sinais para concentrações é conhecida como a equação de calibração (Unemera *et al.* 1980; Casal and Mantsch, 1984; Mendelsohn and Mantsch, 1986). A maior

parte das técnicas analíticas usa uma linha reta para calibração (calibração univariada). Entretanto, um modelo de calibração linear só pode ser útil para fins de quantificação se o sinal analítico depender exclusivamente da concentração do analito específico para o qual o modelo foi desenvolvido. Essa dependência exclusiva é a exceção na análise de amostras complexas por técnicas espectroscópicas, como espectroscopias de infravermelho e infravermelho próximo (NIR). São utilizadas medições espectroscópicas para estabelecer uma relação linear entre uma absorvância (ou seja, o logaritmo inverso da transmissão) ou aparente absorvância concentração via um lei Beer-Lambert (Dufour,2009 ). Os modelos de calibração para essas técnicas são geralmente construídos por regressão de mínimos quadrados (LSR) da absorvância (ou aparente absorvância) para um conjunto de padrões contra as suas concentrações.

A espectroscopia infravermelha é uma técnica que permite detectar vibrações dos átomos de uma molécula (e também seus harmônicos) quando a amostra absorve a energia no espectro infravermelho. Quando há ressonância entre a energia dos modos de vibração e a energia infravermelha incidente ocorrem os picos de absorção correspondes à frequência de vibração de uma parte da molécula (Stuart, 1997). Na região IR, várias vibrações moleculares fundamentais, incluindo as de C-H, O-H, N- H, C O e outros grupos funcionais podem ser detectados (Weyer, 1985; Murray e Williams, 2001).

Quando um alimento é irradiado com luz NIR, por exemplo, ele absorve a luz com frequências que combinam as vibrações características de grupos funcionais específicos, enquanto que a luz de outras frequências será transmitida ou refletida (Foley et al., 1998). Desse modo, os componentes bioquímicos de um alimento determinam a quantidade e frequência da luz absorvida e a quantidade de reflexão ou transmissão. A luz pode ser utilizada para inferir a composição química desse alimento (André e Lawler, 2003).

Existem muitas bandas de absorção que surgem de vários grupos funcionais bioquímicos na região MIR (4000-400  $\text{cm}^{-1}$ ), como os presentes na água, proteínas, polissacarídeos, ácidos nucleicos e lipídios. Os picos de absorção proeminentes ao redor 3400  $\text{cm}^{-1}$  são principalmente de água. A absorção atinge cerca de 2960, 2929 e 1740  $\text{cm}^{-1}$  são de ácidos graxos (Zeroual et al., 1994). Picos cerca de 1650 e 1550  $\text{cm}^{-1}$  são das vibrações de proteínas ou peptídeos (amida I ou II). Acredita-se que os picos entre 1200 e 900  $\text{cm}^{-1}$  correspondam vibrações de estiramento do fosfato e as vibrações de frações polissacarídicas (Schmitte Flemming, 1998; Lin et al. , 2005).

Tanto a espectroscopia MIR como a NIR podem ser implementadas como medições não destrutivas e não invasivas, requerem mínima ou nenhuma preparação de amostra, e somente

precisam de alguns segundos para a coleta dos espectros. Uma vantagem importante do NIR sobre o MIR é que a luz NIR que pode penetrar muito mais em uma amostra do que a radiação MIR. Desta forma, o NIR permite o uso longos comprimentos na aquisição espectral de amostras em vários materiais usados como embalagens: materiais plásticos, filmes, vidros e outros materiais que sejam transparentes para a luz NIR. Além disso, o uso da espectroscopia NIR com fibra ótica permite, através das sondas ópticas, que sejam coletados espectros completos de alimentos sem haver contato. Em contraste, embora MIR ofereça melhor especificidade, a luz de radiação do MIR tem uma de penetração muito curta (geralmente alguns micrômetros) e não pode penetrar através de plásticos, vidro e outros materiais.

Apesar de a espectroscopia NIR ter maior profundidade de penetração, não vem sem limitações,(LIM 2009). A maior parte dos instrumentos NIR oferece seletividade limitada e não pode ser utilizada para medição precisa para componentes alimentares com conteúdo inferior a 1%. Além do mais, os métodos NIR requerem calibração de dados utilizando valores de referência coletados por métodos tradicionais, métodos químicos e cada componente alimentar precisa de uma calibração separada. Além disso, a análise quimiométrica com técnicas complicadas de processamento de dados matemáticos é muitas vezes considerado como uma "abordagem caixa preta" e é confuso para os usuários que desejam obter conhecimentos aprofundados sobre as técnicas analíticas do NIR. Por outro lado, a técnica NIR é mais acessível em termos de custo. Hampton *et al.* (2002–2003)

#### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

As análises foram realizadas nos Laboratórios de Produtos e Processos (LPP) e de Espectroscopia de Materiais (LEM), ambos do Departamento de Física da Universidade Federal de Juiz de Fora - MG, foi coletada 1 amostra diretamente de vacas oriundas da fazenda Coronel Pacheco (MG) Embrapa Gado de Leite. O leite foi dividido em 2 amostras com a quantidade de 50 ml cada uma, uma amostra ficou leite cru, a outra contaminada por Terramicina®. Na fazenda Córrego da Areia localizada no município de Formiga (MG), para coleta na fazenda, primeiro coletou-se o 500 ml leite cru de uma determinada vaca logo após o mesmo foi refrigerado em uma temperatura de até 10 °C e depois o mesmo animal aplicou-se o antibiótico de carência zero, LA solução injetável *Zoetis* e CEF50 com isso foi aguardado um período de 24 horas para primeira coleta 500 ml de leite e depois mais 24 horas para segunda coleta também 500 ml de leite do mesmo animal, todas as amostras foram refrigeradas desde a coleta, até o recebimento das mesmas para os laboratórios da UFJF LEM e LPP, que foi no mesmo dia da última, as análises foram coletadas seguindo e baseado na realidade com que os produtores e laticínios trabalham no dia a dia, bem característico os dias de hoje, pois o objetivo do antibiótico carência zero é tratar o animal lactante doente para que fique sadio e o produtor de leite logo no outro dia fornecer o leite sem traços de antibiótico para o beneficiamento do laticínio sem problema algum para ambos.

Para análise rápida de detecção de antimicrobiano foi utilizado o teste imunológico cuja a marca é do fabricante Eco Teste.

##### 4.1 Medidas no Laboratório de Produtos e Processos

As medidas realizadas no LPP são para caracterizar a qualidade físico-química das amostras de leite utilizadas. Este laboratório está equipado com os equipamentos que atendam a IN62. Para determinar o ponto de congelamento das amostras de leites utilizou-se o crioscópio eletrônico digital MK 540 Flex da ITR. A densidade foi obtida por meio do termo lactodensímetro Q 15° C da HG Brasil. A acidez titulável foi obtida com uso da solução Dornic e o alizarol pelo Método Morris, para a medida de pH utilizou-se o Phmetro Todas as soluções

e indicadores utilizados foram da Macalé LTDA produtos para Laticínio e as medidas foram feitas replicatas para cada amostra.

#### 4.1.1 Densidade

Um litro de leite à temperatura de 15° C, deverá conter o peso de 1,028 a 1,034 g.

Materiais:

1. Proveta graduada de 250 ml;
2. Termolactodensímetro - calibrado a 15°C segundo Gerber - escala 1,025/1,040 – 380 mm - enchimento ecológico.

Técnica:

- ✓ Foi realizada a transferência de cerca de 250 ml do leite para proveta, a temperatura de 15° C;
- ✓ Cuidadosamente, foi introduzido o termolactodensímetro girando-o até estabilizar;
- ✓ Depois de sua estabilização, foram anotados os resultados da temperatura (T) e densidade (Dt) lidas.



Fonte: Autor.

**Figura 5:** Medida de densidade do leite com o termolactodensímetro Q 15 °C da HG Brasil disponível no LPP.

#### 4.1.2 Medida de pH

Aferiu-se o pH da amostra, pois esta é uma propriedade com muitas aplicações tecnológicas, como por exemplo o grau de fermentação de produtos.

Materiais:

1. pHmetro de bancada AT 355 Microprocessado;
2. Béqueres de 100 ml;
3. Solução tampão pH 4;
4. Solução tampão pH 7.

Técnica:

✓ Foram seguidas as instruções do fabricante na calibração, operação e manutenção do pHmetro;

- ✓ Procedeu-se à calibração do pHmetro com as soluções tampão pH 4 e 7 na temperatura em que foram executadas as leituras;
- ✓ Foi transferido aproximadamente 50 ml de amostras em um béquer de 100 ml;
- ✓ Inseriu-se eletrodo na amostra a 25 °C para realizar a medição do pH;



Fonte: Autor.

**Figura 6:** Medidor de pH de bancada disponível no LPP.

#### **4.1.3 Alizarol (Método Morris)**

A solução de alizarol é a mistura de álcool e alizarina, sendo este último, um indicador de pH. Neste teste, assim como prova do álcool, o álcool presente na formulação do alizarol avalia a estabilidade das micelas de caseína. Já a alizarina estima o pH da amostra, através do desenvolvimento da cor, o leite testado nos fornece a segurança se o mesmo poderá ou não ser pasteurizado (aquecido), pois o leite ácido tende a “talhar” quando submetido ao calor. Quanto maior a graduação alcoólica da solução de alizarol mais rigoroso o teste e a seleção.

Materiais:

1. Solução de alizarol a 72 °GL;
2. Tubos de ensaio;
3. Pipeta graduada, capacidade de 2 ml;
4. Suporte para tubos de ensaio.

Técnica:

- ✓ Foi transferido para um tubo de ensaio partes iguais (2 ml) de leite e solução de alizarol a 72 °GL e misturados cuidadosamente;
- ✓ Agitou-se e observou-se o aspecto.

Resultado:

- Leite normal: coloração rósea - salmão e sem grumos (o leite resiste ao processo de pasteurização).
- Leite ácido: coloração amarela (leite que possivelmente não irá resistir ao processo de pasteurização ou aquecimento).
- Leite alcalino ou suspeita com água: coloração arroxeadada ou violeta (pode ser um indicativo da presença de água, leite originário de vacas com mamite ou leite adicionado de redutores como hidróxido de sódio).



Fonte: Autor.

**Figura 7:** Teste de acidez das amostras de leites via teste de Alizarol.

#### 4.1.4 Crioscopia

A crioscopia do leite corresponde à medição do ponto de congelamento ou da depressão do ponto de congelamento do leite em relação ao da água. A composição normal do leite gera um valor aproximado de  $-0,531^{\circ}\text{H}$  ( $-0,512^{\circ}\text{C}$ ) a  $-0,550^{\circ}\text{H}$  ( $-0,531^{\circ}\text{C}$ ), para o ponto crioscópico. A incidência de fraude de leite por adição de água afeta diretamente sua composição ocasionando perda do valor nutricional, queda de rendimento e inúmeros fatores relacionados à matéria prima de baixa qualidade. A determinação do ponto de congelamento com consequente avaliação da qualidade do leite é a metodologia usual e oficial para monitoramento desta qualidade e detecção de fraude por aguagem.

### Materiais:

1. Crioscópio MK 540 Flex II ITR\Tex Tech eletrônico, ligado à rede elétrica estabilizada, composto de banho de refrigeração controlado por termostato, sonda termostática com circuito associado e leitor. O agitador para amostra tem ter uma amplitude de vibração lateral e aproximadamente, 1,5 mm;

2. Tubo de ensaio.

### Calibração:

- ✓ O crioscópio foi ligado, acrescentou-se a solução anti congelante e deixou-se que a temperatura diminui-se;
- ✓ A primeira solução de -0,000 H foi calibrada com 2,5 ml;
- ✓ A segunda solução de 0,621 H foi calibrada com 2,5 ml;
- ✓ A solução padrão de 0,530 H foi conferida com 2,5 ml.

### Técnica:

- ✓ Foi adicionado 2,5 ml de leite no tubo de ensaio, colocado no crioscópio e aguardou-se a leitura automática.



Fonte: Autor.

**Figura 8:** Crioscópio MK 540 Flex instalado no LPP.

#### **4.1.5 Acidez (Dornic)**

O teste de acidez pelo método Dornic visa à determinação quantitativa da acidez do leite, com utilização do reagente de Dornic com indicador fenolftaleína.

Materiais:

1. Pipeta graduada capacidade de 10 ml;
2. Becker 50 ml;
3. Acedímetro de Dornic;
4. Solução Dornic;
5. Fenolftaleína 1%.

Técnica:

- ✓ Foi transferido para o Becker 10 ml de leite com auxílio da pipeta graduada;
- ✓ Adicionadas 3 a 5 gotas da fenolftaleína;
  - ✓ Foi realizada a titulação com a solução Dornic até a viragem, esta é reconhecida pela alteração da cor branca para róseo claro, em seguida foi interpretado o resultado.



**Figura 9:** Acidímetro Dornic.

#### 4.2 Medidas no LEM

Após análise no LPP, iniciou-se no LEM onde foram feitas as medidas de gordura, proteína, lactose e sólidos da amostra de leite são realizadas no LEM através do Lactoscópio Delta Instrument:

Materiais:

1. Lactoscópio Delta Instrument;
2. Becker 50 ml.

Calibração:

- ✓ Primeiramente, ligou-se o Lactoscópio (na parte detrás do equipamento) e a impressora do mesmo. Caso ela não fosse ligada, o equipamento não iniciaria as medidas;
- ✓ Abriu-se o equipamento, verificou-se os 4 *leds* piscando e os níveis dos líquidos. Foi aguardado um período de 30 minutos para iniciar as medidas;
- ✓ Foi dado um *auto clean* no aparelho antes de iniciar as medidas. Para seleccionar o tipo de leite foi em SETUP 4 e usado as setas (MILK\_A = leite processado UHT saco, MILK\_B = Leite Genuíno).

Técnica:

- ✓ Levantou-se as agulhas do equipamento cuidadosamente e colocou-se o Becker com a amostra de leite. Clicou-se em ANALYSE para iniciar as medidas;
- ✓ O resultado foi dado por meio de uma impressora acoplada ao lactoscope.



Fonte: Autor.

**Figura 10:** Lactoscope instalado no LEM e utilizado para medida de gordura, proteína e lactose.

### 4.3 Análise por Infravermelho

Para análise qualitativa das amostras utilizou-se o equipamento de Espectroscopia no Infravermelho Próximo FT-NIR MPA (*Multi Purpose Analyser*) da *Bruker* gerenciado pelo *software OPUS<sup>TM</sup>*. Foram realizadas três repetições no modo refletância com 32 *scans* por repetição. A análise dos espectros foi feita no *software OriginPro 8<sup>TM</sup>* (LUIZ *et al* 2016). Este treinamento foi para captação de aprendizado para manusear o equipamento de Espectroscopia no Infravermelho Próximo Analisador FT-NIR Multi Propósito MPA da *Bruker* utilizando o *software OPUS*.

Para realizar a análise do leite contaminado foi utilizado o equipamento de Infravermelho acima citado, uma cubeta de borossilicato com 8 mm de caminho óptico e uma micropiteta Uniscience 0,5-10 µL. Esta, foi utilizada para a contaminação do leite cru com o antimicrobiano terramicina.

As medidas no FT-NIR foram feitas no modo reflectância, devido a opacidade do leite. As análises foram realizadas na faixa de de 3700 a 13500  $\text{cm}^{-1}$ . Cada análise foi realizada em triplicata com 32 *scans* por amostra. Antes de iniciar as medidas foi realizado um “branco”, ou seja, um background no equipamento. Em seguida, colocou-se uma quantidade amostra de leite na cubeta e foi levada ao compartimento referente ao modo reflectância do MPA. Então, utilizou-se o *software OPUS* para iniciar a aquisição de dados. Este procedimento foi repetido por mais 2 vezes com a amostra de leite cru (controle), 3 vezes leite cru adicionado de antibiótico e 3 vezes leite cru com a vaca utilizando o medicamento de carência zero. Para simular a contaminação, utilizou-se a pipeta e o leite genuíno (controle), então adicionou uma determinada quantidade do medicamento terramicina equivalente a 1ppm.



Fonte: Autor.

**Figura 11:** Espectrômetro FT-NIR instalado no LEM.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

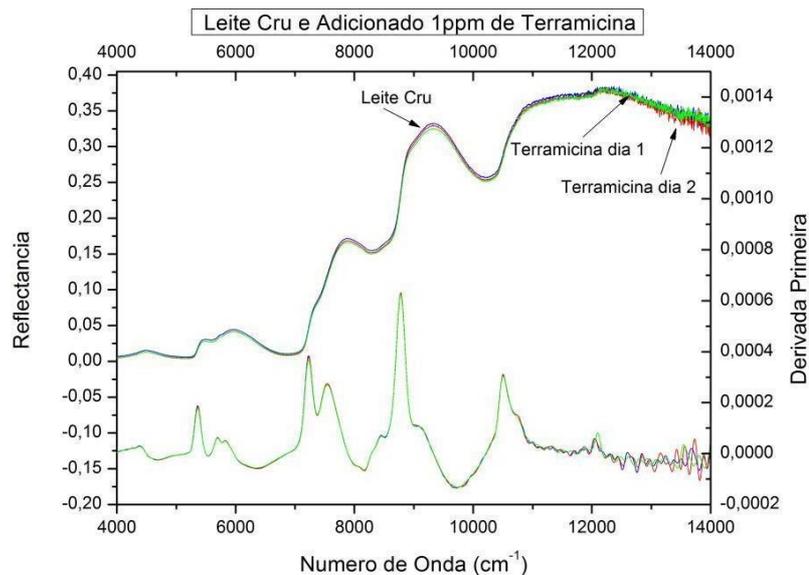
Visando avaliar o aspecto sensorial, o analista analisa odor, cor e aspecto como viscosidade, gosto doce, gosto salgado amargo ou ácido e atribui a condição de conformidade se todos os aspectos estiverem em condições normais e característicos de leite. Para os atributos: gordura total, acidez titulada, densidade relativa, índice crioscópico e extrato seco total as análises realizadas determinam o teor de cada um destes itens presente no leite. O leite analisado deve respeitar faixas de concentrações, definidos por legislação **IN62 \2011**, para ser considerado conforme/aprovado.

Análise da qualidade do leite cru quadro 2, mostra os resultados obtidos para análise preliminar feita nas 3 amostras de leite cru a fim de verificar se os mesmos estavam dentro dos limites esperados. As figuras a seguir referem-se aos espectros de Leite, antibiótico e Leite mais o antibiótico obtidos por FT-NIR. A análise direta através dos espectros não é muito eficiente, então se fez necessário o uso da derivada primeira para que o espectro se tornasse mais distintivo. Os eixos: horizontal inferior e vertical à esquerda se referem ao espectro de reflectância, já os eixos horizontal superior e vertical à direita se referem à derivada primeira.

### 5.1 Resultados da análise físico-químico do leite cru oriundo da Fazenda Embrapa Gado de Leite

Análises	Resultados	Valores de Referência (In 62)
<b>Crioscopia</b>	-0,544 °H	<b>- 0,530 °H a -0,550 °H</b> <b>(equivalentes a -0,512 °C e a -0,531 °C)</b>
<b>Acidez em g de ácido láctico/100 mL</b>	0,17	<b>0,14 a 0,18</b>
<b>Ph</b>	6,70	<b>6,6 a 6,9</b>
<b>Densidade g/mL</b>	1,030	<b>1,028 a 1,034</b>
<b>Alizarol 72 % (v\ v)</b>	Estável	<b>Estável</b>
<b>Gordura (g\ 100g)</b>	4,04	<b>Mínimo 3</b>
<b>Proteína (g\ 100 g)</b>	3,23%	<b>Mínimo 2,9%</b>
<b>Lactose</b>	4,59%	-
<b>Extrato seco total</b>	11,89%	-

**Quadro 2:** Resultados das análises do leite cru obtidos no LPP e LEM e seus respectivos valores de referência, IN62\2011

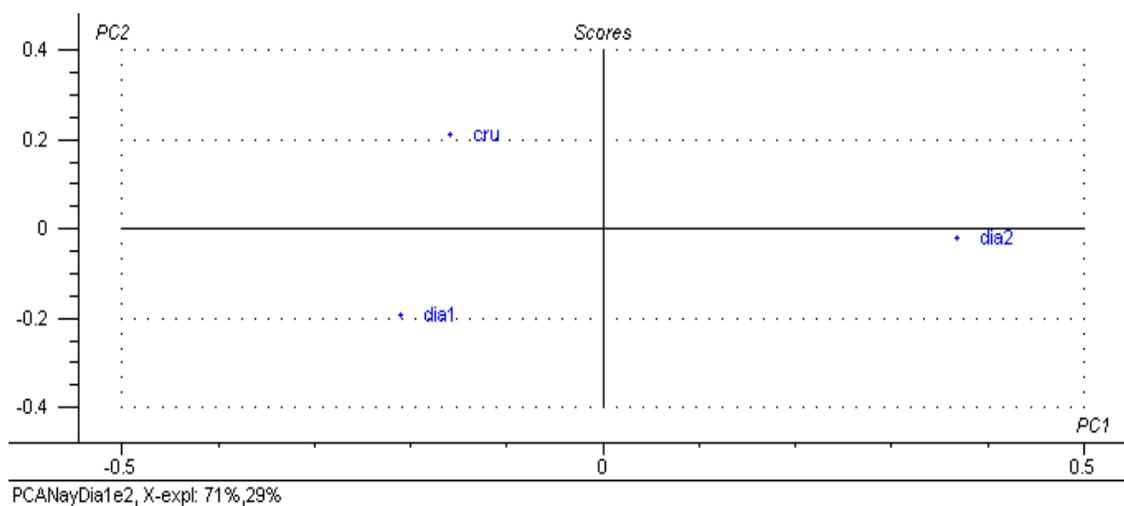


**Figura 12:** Espectros de reflectância (FT-NIR) para as amostras de leite cru, e leite contaminado por terramicina em dias distintos.

A Figura 12 mostra o gráfico de Refletância FT-NIR infravermelho, a PCA, fazendo uma análise de movimento vibracional, o espectro de refletância a princípio não foi capaz de discriminar o leite cru do leite contaminado, a figura 13 mostra o resultado do teste imunológico que deu positivo para terramicina. Já na figura 14, a PCA conseguiu discriminar o leite cru dos leites contaminados por terramicina; dia 1 e dia 2 se encontram em coordenadas diferentes do leite cru; dia 1 está mais próximo do leite cru no gráfico que dia 2; A figura 14 mostra o gráfico *score* da PCA para as amostras de leite cru, e contaminadas com terramicina em 1ppm para o primeiro e segundo dias.



**Figura 13:** análise do teste imunológico, positivo para terramicina



**Figura 14:** PCA referente aos dados obtidos na figura 12.

Para análise do leite cru e leite com antibiótico de carência zero, foi realizada a coleta diretamente na fazenda Córrego d'Areia, em Formiga – Minas Gerais, e transportada até a UFJF, acondicionada em caixa de isopor com gelo mantendo a temperatura de 7 °C. A figura 15 mostra a temperatura de recebimento do leite na UFJF.



**Figura 15:** Temperatura de recepção do leite

Utilizam-se termômetros aferidos e calibrados de acordo com cronogramas do próprio laboratório de controle de qualidade para mensurar a temperatura, e o resultado que se espera é a temperatura estar abaixo de 10 °C na chegada do leite à plataforma de recebimento do laticínio (BRASIL, 2011).

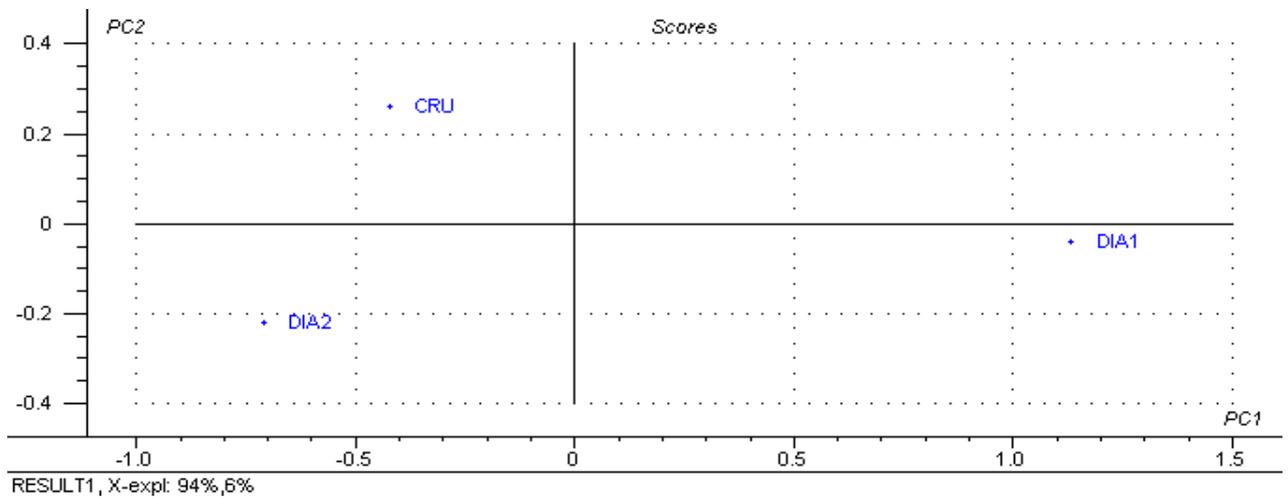
## 5.2 Resultados da análise físico-química do leite cru coletado na fazenda Córrego d'Areia

<b>Análise</b>	<b>Resultado</b>	<b>Valor de Referência (In 62)</b>
<b>Crioscopia</b>	0,545 °H	<b>- 0,530 °H a -0,550 °H (equivalentes a -0,512 °C e a -0,531 °C)</b>
<b>Acidez em g de ácido lático/100 mL</b>	0,19	<b>0,14 a 0,18</b>
<b>Ph</b>	6,59	<b>6,6 a 6,9</b>
<b>Densidade g/mL</b>	1,031	<b>1,028 a 1,034</b>
<b>Alizarol 72 % (v/v)</b>	Estável	<b>Estável</b>
<b>Gordura (g/100 g)</b>	3,4	<b>Mínimo 3</b>
<b>Proteína (g/100 g)</b>	2,9	<b>Mínimo 2,9</b>
<b>Lactose</b>	4,25	-
<b>Extrato seco total</b>	11,4	-

**Quadro 3:** Resultados da análise do leite cru

<b>Leite com antimicrobiano carência 0: 1º dia</b>	<b>Leite com antimicrobiano carência 0: 2º dia</b>	<b>Valor de Referência (In 62)</b>
Acidez: 0,18	Acidez: 0,19	<b>0,14 a 0,18 g de ácido láctico/100 mL</b>
Ph: 6,63	Ph: 6,64	<b>6,6 a 6,9</b>
Densidade: 1,029	Densidade: 1,029	<b>1,028 a 1,034 g/mL</b>
Alizarol: róseos e leves grumos	Alizarol: róseos e leves grumos	<b>Estável</b>
Crioscopia: 0,555 °H	Crioscopia: 0,555 °H	<b>- 0,530 °H a -0,550 °H (equivalentes a -0,512 °C e a -0,531 °C)</b>
Gordura: 3,4	Gordura: 3,4	<b>Mínimo 3 (g/100 g)</b>
Proteína: 2,9	Proteína: 2,9	<b>Mínimo 2,9 (g/100 g)</b>
Lactose: 4,25	Lactose: 4,25	-
Sólidos: 11,4	Sólidos: 11,4	-

**Quadro 4:** Resultado do Leite com antimicrobiano carência 0, 1º e 2º dias

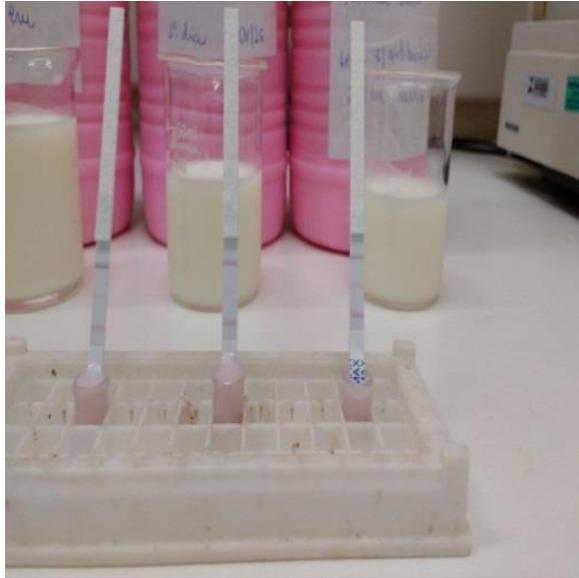


**Figura 16:** Análise dos Componentes Principais das amostras de leite sob antibiótico de carência zero.

A figura 16 mostra o gráfico 2 da PCA que apresenta uma evidente discriminação entre a amostra controle do leite cru e a amostra adicionada de antibiótico carência zero. A amostra analisada no dia 2 possui coordenadas mais próximas às coordenadas da amostra de leite cru (controle), no gráfico de componentes principais pois a concentração de antibiótico é maior nos primeiros dias

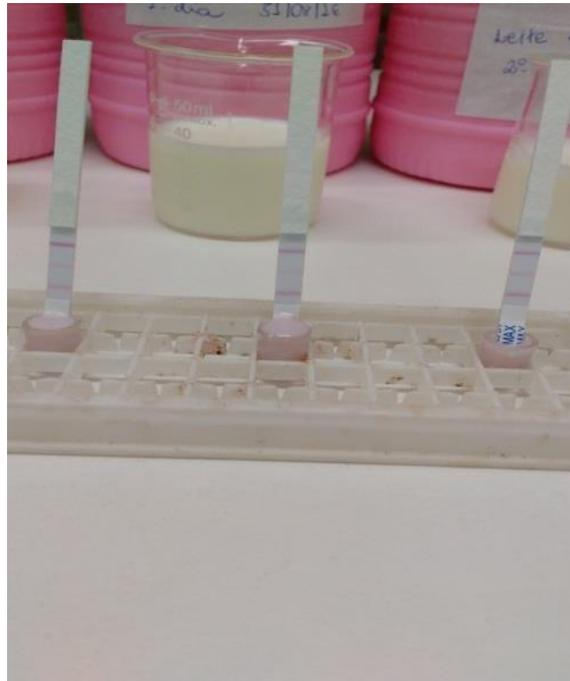
Foram avaliadas amostras de leite provenientes de fabricantes distintos no estudo, com o mesmo interesse. Avaliadas através de método espectroscópico no infravermelho próximo e análise de componentes principais. A partir dos resultados obtidos apontaram como vantagens da análise FT-NIR, a obtenção rápida dos resultados, a necessidade de uma quantidade mínima de amostra na execução das análises, além do fato de que a amostra não precisa ser descartada, pois a análise é não destrutiva e gera o mínimo de resíduos.

A figura 17 mostra a análise do resultado do teste imunológico sem antibiótico.



**Figura 17:** Resultado do teste do Eco teste sem antibiótico.

A figura 18 mostra o resultado do teste imunológico com antibiótico carência 0



**Figura 18:** Resultado do teste do teste imunológico com antibiótico carência 0.

As figuras 17 e 18 mostram a análise qualitativa do teste imunológico que constatou que o leite não possui antibiótico. Os resultados da análise de leite cru e leite com antibiótico carência zero nos dias 1 e 2 foram iguais, com isso pode-se concluir que o método deu um resultado falso-negativo, que na verdade há traços de antibiótico na amostra, mas que pela quantidade o teste não conseguiu identificar.

Com isso a análise quantitativa de contaminantes químicos em alimentos realizada a partir da espectroscopia no infravermelho com calibração multivariada representa uma boa opção para a avaliação de antibiótico em leite cru. Há necessidade de aperfeiçoamento para obtenção de modelos ainda mais robustos, eficientes e com maior capacidade de percepção e, para que, desta forma, tenham aplicabilidade em análises de rotina em fábricas de laticínios, pois se trata de um método alternativo pioneiro para pesquisa de traços de antibiótico em leite. O aperfeiçoamento deste método de infra vermelho sendo uma opção para métodos confirmatórios de pesquisa de antibiótico em leite, pode proporcionar ao setor lácteo, maior agilidade nas análises de leite e fornecer ao consumidor um produto mais confiável e seguro. A

preocupação com a qualidade do leite é evidente tanto no aspecto econômico, quanto no sanitário e social.

## 6. CONCLUSÃO

O presente estudo conseguiu atender seus objetivos através da comparação entre dois testes rápidos, o teste imunológico e o teste de infravermelho, que detectam traços de antibióticos no leite de diferentes formas, para análise com antibiótico de terramicina que é um antibiótico que exige carência e para CEF 50 que é um antibiótico de carência zero.

Houve diferença nos resultados das amostras de traços de antibióticos, a amostra sem carência resultou positivo para teste de infravermelho e negativo para análise do teste imunológico. Com isso não se pode afirmar que os traços de antibiótico encontrados no teste imunológico apresentam problemas para o consumo do leite e produção de seus derivados, pois este tipo de teste é qualitativo com diagnóstico positivo ou negativo. Já o infravermelho, por sua vez, tem uma maior sensibilidade para detecção destes traços.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, Jackson da Silva. **Desenvolvimento de um sensor óptico para a determinação de hidrocarbonetos aromáticos em águas empregando a espectroscopia no infravermelho próximo (NIR)**. 2004. 111f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Pernambuco , Recife, 2004.

André J , Lawler IR ( 2003 ) **Near infrared spectroscopy as a rapid and inexpensive means of dietary analysis for a marine herbivore, dugong (*Dugong dugon* )** . *Marine Ecology Progress Series* , 257 , 259 – 266.

Anton , H., Rorres C., **ÈOJHEUD\_/LQHDU\_FRP\_\$SOLFDo}HV**, Bookman, Porto Alegre, 2004.

ANVISA. **Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal**. 2006. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/395364/PAMVET.pdf/4777c371-e5b5-42e0-9c3f-43670009a802>. Acesso em: 11 fev 2017.

Arantes JFM. **Desenvolvimento e validação de métodos para quantificação de ivermectina em medicamentos veterinários** [Dissertação de Mestrado]. São Paulo. Universidade Estadual de Campinas; 2011. p133.

ARAÚJO, Maria Marli Pereira. **Validação de Métodos Imunoenzimáticos para Determinação de Resíduos de Antimicrobianos em Leite**. 2010. 46 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

Byler DM , Farell HM ( 1989 ) **Infrared spectroscopic evidence for calcium ion interaction with carboxylate groups of casein** . *Journal of Dairy Science* , 72 , 1719 – 1723

BRASIL. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. **Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel**. Diário Oficial da União, República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA – Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999, que altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal – PNCR. **Diário Oficial da União**: Brasília,

Distrito Federal, em 22 de dezembro de 1999b. Seção 1, página 13. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 19 de Setembro de 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA Portaria nº 51, de 18 de setembro de 2002, que aprova os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**: Brasília, Distrito Federal, em 20 de setembro de 2002.

BRITO, J.R.F., BRITO, M.A., VEIGA, V.M.O., RIBEIRO, M.T. **A pesquisa sobre mastite bovina na Embrapa gado de leite**. In: PASSOS, L. P.; CARVALHO, M. M.; CAMPOS, O. F. Gado de leite: 20 anos de pesquisa. Juiz de Fora: Embrapa- CNPGL, 1997.

BRITO, M.A.V.P. **Influência das células somáticas na qualidade do leite**. In: MARTINS, C.E.; COSTA, C.N.; BRITO, J.R.F.; YAMAGUCHI, L.C.T.; PIRES, M. de F.A. MINAS LEITE I, 1999, Juiz de Fora. Qualidade e produtividade de rebanhos leiteiros. Anais... Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 1999. p. 41-46

BRITO, M. A. V. P. **Resíduos de antimicrobianos no leite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2005. 20 p. (Embrapa Gado de Leite. Circular Técnica, 60).

BRITO, M.A.V.P., ARCURI, E.F., BRITO, J.R.F. **Testando a qualidade do leite**. In: DURÃES, M.C.; MARTINS, C.E.; DERESZ, F.; BRITO, J.R.F.; FREITAS, A.F.; PORTUGAL, J.A.B.; COSTA, C.N. MINAS LEITE. 2., 2000, Juiz de Fora. Avanços tecnológicos para o aumento da produtividade leiteira. Anais... Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2000. p.83-94.

C.H.L , M.H.H ( 1984 ) **Polymorphic phase behavior of phospholipid membranes studied by infrared spectroscopy** . Biochimica et Biophysica Acta , **779** , 382 – 401 .

Codex Alimentarius. Food labelling complete texts revised in 2001. **Food and agriculture organization – FAO** – of the United Nations World Health organization. Disponível em: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/en/>. Acesso em: 12 ago. 2016.

COSTA, E.O. Resíduos de antibióticos no leite: um risco à saúde do consumidor. **Higiene Alimentar**, v.10, n.44, p. 15-17, 1996.

DENOBILO, M.; NASCIMENTO, E. S.; 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**, vol. 40, n. 2, abr./jun., 2004.

DUFOUR, E. Principles of Infrared Spectroscopy. In: SAM, D. **Infrared Spectroscopy For Food Quality Analysis and Control**. Estados Unidos: Copyright © Elsevier. 2009. p3-25.

Foley WJ , McIlwee AP , Lawler IR , Aragonés L , Woolnough AP , Berding N ( 1998 ) **Ecological applications of near infrared spectroscopy—a tool for rapid, cost effective**

**prediction of the composition of plant and animal tissues and aspects of animal performance** . *Oecologia* , **116** , 293 – 305 .

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V.; PEREIRA, C. C. **Qualidade higiênica do leite:** efeitos sobre a qualidade dos produtos lácteos e estratégias de controle. In: VILELA et al. Sustentabilidade da pecuária de leite no Brasil: qualidade e segurança alimentar. Goiânia. CNPq Serrana Nutrição Animal; Embrapa Gado de Leite, 2001.

FONSECA, L.F.L., **Aspectos relacionados à produção, que influenciam a qualidade do leite.** Higiene Alimentar, São Paulo, v.13, n.62, p.10-16, 2005.

GOMES, D. M.; Resíduos de Antibióticos Promotores de Crescimento em Produtos de Origem Animal. **Monografia (especialização)**, Universidade de Brasília, Centro de Excelência em Turismo, 2004.

Hampton KA , Wutzke JL , Cavinato AG , Mayes DM , Lin M , Rasco BA ( 2002–2003 ) Characterization of optical probe light penetration depth for noninvasive analysis . *Eastern Oregon Science Journal* , **XVIII** , 14 – 18 .

IN62. Instrução Normativa 62\2011 Acesso em:<http://www.apcbrh.com.br/files/IN62.pdf>. IPARDES. Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social. **Caracterização Socioeconômica da Atividade Leiteira do Paraná**, Curitiba, 2009.

LAVINAS, L.; NABUCO, M. R. (1992). **Segurança alimentar: uma nova questão de cidadania.** In: CAVALCANTI, J. E. A.; VIEIRA, W. C. Política agrícola e segurança alimentar. Viçosa: UFV, 1996.

LIM M , Al-Holy M , Chang S-S , Huang Y , Cavinato AG , Kang D-H , Rasco BA ( 2005 ) Detection of *Alicyclobacillus* isolates in Apple juice by Fourier transform infrared spectroscopy . *International Journal of Food Microbiology* , **105** , 369 – 376 .

LIM, M, .*et al.* Infrared (IR) Spectroscopy—Near-Infrared Spectroscopy and Mid-Infrared Spectroscopy In: SAM, D. **Infrared Spectroscopy For Food Quality Analysis and Control.** Estados Unidos: Copyright © Elsevier. 2009. p119-141.

LOURES, M.D.A. **Espectroscopia no Infravermelho Próximo.** Juiz de Fora: 2013. Disponível em: [http://www.ufjf.br/fisicaecidadania/ciencia-uma-construcao-humana/a-ciencia-nas-profissoes/espectroscopia\\_infravermelho/](http://www.ufjf.br/fisicaecidadania/ciencia-uma-construcao-humana/a-ciencia-nas-profissoes/espectroscopia_infravermelho/). Acesso em: 18 mai. 2017.

LUIZ LC, CAMPOS KC, BELL MJV, ROCHA RA, ANJOS VC. **Caracterização de Leite UHT Integral Através de Análises Físico Química e de Componentes principais.** Rev.Bras.Ciencias Farmacêuticas Básica e Aplicada. V.37. Suple.1agos, Araraquara, 2016.

LUIZ, L.C da et al. Análise de Resíduos de Diclofenaco Sódico Veterinário em Leite por Espectroscopia no Infravermelho Próximo. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde** V 18, n 3, p. 219 – 224, mar.2014.

LYRA WS, Silva EC, Araújo MCU, Fragoso WD. Classificação Periódica: Um exemplo didático para ensinar análise de componentes principais. **Química Nova**. 2010; 33(7): 1594-1597.

MAPA, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Instrução Normativa N°42, de Dezembro de 1999. IV do Regulamento Interno da Secretaria, aprovado pela Portaria Ministerial n° 574, de 06 de dezembro de 1998, tendo em vista a determinação do art. 6° da Portaria Ministerial n° 527, de 15 de agosto de 1995 e o disposto no Processo MA 21000.003047/99 - 08 resolve: **Alterar o Plano Nacional do Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal**.

MARTIN, J. G. P.; Resíduos de Antimicrobianos em Leite – Uma Revisão. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, 18(2): 80-87, 2011.

Mendelsohn R , Mantsch HH ( 1986 . , Vol. 2 ( Watts A , Pont JJH , eds). **Amsterdam : Elsevier Sciences Publishers** , pp. 103 – 145 .

MENDHAM, J.; DENNEY, R. C.; BARNES, J. D.; THOMAS, M. J. K. **Vogel: Análise Química Quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002.

MEZZADRI, Fábio. **Análise da Conjuntura Agropecuária**. 2014. SEAB – Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento DERAL - Departamento de Economia Rural Fonte: USDA – Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. Disponível em <http://www.agricultura.pr.gov.br>. Acesso em 13 de Maio de 2016.

MITCHELL, J.M.; GRIFFITHS, M.W.; MCEWEN, S.A. et al. **Resíduos de Antimicrobianos no leite: causas, consequências, regulamentação e testes**. *J. Food Prot.* v.61, n.6, p.742-756, 1998.

Murray I , Williams PC ( 2001 ) Chemical principals of near-infrared technology . In: **Nearinfrared Technology in the Agricultural and Food Industries** , 2nd edn ( Williams PC Norris KH , eds). St. Paul, MN : AACC , pp. 22 – 23 .

OLIVEIRA, C. A. F., FONSECA, L. F. L., GERMANO, P. M. L. Aspectos relacionados à produção, que influenciam a qualidade do leite. **Revista Higiene Alimentar**. São Paulo, v. 13, n. 62, p.10, 1999.

OLIVEIRA, Maria Carolina Pais Pinto. **Espectrofotometria no infravermelho-por metodologia FTIR (Fourier Transform Infrared): Validação da análise do teor de ureia e de outros parâmetros de qualidade do leite**. 2011. 70 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária de Universidade Federal de Minas Gerais, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

PAVIA, Donald L.; LAMPMAN, Gary M.; KRIZ, George S.; VYVYAN, James R. **Introdução à espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2012.

PEREIRA, P.C.; SOARES, C.F.; SILVA, O.M. **Barreiras tarifárias e não- tarifárias às exportações de produtos lácteos do Brasil**. In: BELLINI, J.L. Comércio Internacional de Lácteos. 2. ed. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2009. Cap. 9, p. 132-152.

PNCRB - Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos -, Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2008. 20p.

PROGRAMA de análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal – PAMVet. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, – relatório 2002/2003.46 p. Monitoramento de resíduos em leite exposto ao consumo (1º e 2º anos de atividade), 2005.

RAPINI, L. S; TEIXEIRA, J. P.; MARTINS, N. E. et al. **Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo tipo coalho**. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. v.56, n.1, p.130- 133, 2004.

REBHUM, W. C. **Doenças de Gado Leiteiro**. Rio de Janeiro: Roca, 2000.

REGAZZI, A.J. **Análise multivariada, notas de aula INF 766**, Departamento de Informática da Universidade Federal de Viçosa, v.2, 2000.

RINGNÉR M. What is principal component analysis? *Nature Biotechnology*. 2008; 26 (3): 303-304.

SANTOS, A. F.S.; DUARTE, K. M. R.; POZZI, C.R. Detecção de Resíduos de Antimicrobianos no Leite. **UNOPAR – Cient. Ciênc. Biol. Saúde**, 13(3): 205-12,2011.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. Barueri: Editora Manole, 2007, 314 p.

SPINOSA, H. S. Considerações gerais sobre os antimicrobianos. In: SPINOSA, H. **Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002a, p.379-385.

Schmitt J , Flemming H-C ( 1998 ) FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis . *International Biodeterioration and Biodegradation* , **41** , 1 – 11 .

Stuart B ( 1997 ) **Biological Applications of Infrared Spectroscopy** . Chichester : John Wiley & Sons, Ltd

Unemera JDG , Cameron DG , Mantsch HH ( 1980 ) **A Fourier transform infrared spectroscopic study of the molecular interaction of cholesterol with 1, 2 dipalmitoyl-snglycero- 3-phosphocholine** . *Biochimica et Biophysica Acta* , **602** , 32 – 44.

Weyer LG ( 1985 ).**Near-infrared spectroscopy of organic substances** . *Applied Spectroscopy Reviews* , 21 , 1 – 43 .

Williams P , Norris K ( 1987 ). **Near Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries** . St. Paul, MN : American Association of Cereal Chemists .

Zeroual W , Choisy C , Doglia SM , Bobichon JH , Angiboust JR , Manfait M ( 1994 )  
Monitoring of bacterial growth and structural analysis as probed by FT-IR spectroscopy  
*Biochimica e Biophysica Acta* , 112 , 171 – 178