

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA E BIOQUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE E**  
**DERIVADOS**

**Déborah Demarque Martins da Silva**

**UTILIZAÇÃO DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO MÉDIO E**  
**PRÓXIMO PARA DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS**  
**ANTIPARASITÁRIOS EM LEITE CRU**

**Juiz de Fora**  
**2022**

**Déborah Demarque Martins da Silva**

**UTILIZAÇÃO DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO MÉDIO E  
PRÓXIMO PARA DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS  
ANTIPARASITÁRIOS EM LEITE CRU**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Orientador: Dr. Virgílio de Carvalho dos Anjos

Juiz de Fora  
2022

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

Demarque Martins da Silva, Déborah.

Utilização de espectroscopia no infravermelho médio e próximo para detecção de resíduos de medicamentos antiparasitários em leite cru / Déborah Demarque Martins da Silva. -- 2022.

86 p.

Orientador: Virgílio de Carvalho dos Anjos

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, 2022.

1. Infravermelho. 2. Avermectinas. 3. Leite Cru. 4. Análise dos componentes principais.. I. de Carvalho dos Anjos, Virgílio , orient. II. Título.

**Déborah Demarque Martins da Silva**

**Utilização de espectroscopia no infravermelho médio e próximo para detecção de resíduos de medicamentos antiparasitários em leite cru**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados. Área de concentração: Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Aprovada em 07 de outubro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

**Prof. Dr. Virgílio de Carvalho dos Anjos** - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

**Profa. Dra. Carla Christine Lange**

Embrapa Gado de Leite

**Prof. Dr. Luís Roberto Batista**

Universidade Federal de Lavras

**Prof. Dr. Thierry Ribeiro Tomich**

Juiz de Fora, 19/10/2022.



Documento assinado eletronicamente por **Virgilio de Carvalho dos Anjos, Professor(a)**, em 19/10/2022, às 11:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **LUIS ROBERTO BATISTA, Usuário Externo**, em 20/10/2022, às 13:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thierry Ribeiro Tomich, Usuário Externo**, em 20/10/2022, às 13:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carla Christine Lange, Usuário Externo**, em 20/10/2022, às 16:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf ([www2.ufjf.br/SEI](http://www2.ufjf.br/SEI)) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1003169** e o código CRC **D643B90E**.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

## **AGRADECIMENTO**

Agradeço primeiramente a Deus, que guiou meus caminhos nesta jornada, por toda força, determinação, resiliência e amadurecimento que foi necessário para a realização desse trabalho. Por me fazer acreditar que eu irei florescer onde Ele me plantar, mesmo que isso signifique estar distante das pessoas que eu amo.

Agradeço a minha família, em especial, meu parceiro de vida Everton, por ter aceitado partilhar comigo esta empreitada, por deixar nossa casa e cidade e sonhar os meus sonhos. A minha mãe, Maria das Graças, todo meu amor e carinho por ter me ajudado com meu filho para que eu pudesse me dedicar ao mestrado. Ao meu filho Miguel, luz da minha vida, minha força diária e melhor parte de mim, por tanto amor.

Aos meus amigos de longa data e as novas amizades feitas em Juiz de Fora, por torcerem a cada etapa conquistada.

Ao meu grande amigo e eterno mestre, Leandro Luiz, bem como sua esposa Rafaela, por todo apoio, incentivo e ensinamentos. Por ter me convidado a participar, ainda como aluna de iniciação científica, do II Workshop da Pós-Graduação de Física da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) no ano de 2013 e me apresentar a cidade, pois naquele dia eu decidi que queria viver este momento. Minha eterna gratidão.

Agradeço ao Grupo de Espectroscopia e Engenharia de Materiais (GE2M) da UFJF, onde pude desenvolver meu projeto. Agradeço também ao meu orientador, professor Virgílio de Carvalho dos Anjos, pela oportunidade e confiança durante todo o mestrado. A UFJF e a todos os professores do Programa do Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados (parceria EPAMIG/ILCT, EMBRAPA e UFJF), pela oportunidade de realização do curso. Em especial, a EMBRAPA Gado de leite, pela aquisição das amostras e a UFJF, pelo incentivo à pesquisa e fomento financeiro.

Agradeço aos professores/pesquisadores membros da banca examinadora, por sua disponibilidade e contribuições positivas para este trabalho.

E a todos que, de alguma forma, fizeram parte da minha formação e tornaram possível a realização deste projeto, muito obrigada.

## RESUMO

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO/OMS), o leite e seus derivados são os alimentos mais consumidos no mundo, sendo fonte de gorduras, proteínas, vitaminas e energia que são de extrema importância para o bom funcionamento do organismo humano. Este estudo foca na detecção e sensibilidade de resíduos de medicamentos antiparasitários em leite cru através da Espectroscopia no Infravermelho Médio e Próximo com Transformada de Fourier (FT-MIR e FT-NIR). Para tal foram consideradas amostras de leite cru, medicamento antiparasitário puro e amostras simulando a contaminação com antiparasitários. As amostras simuladas foram feitas adicionando os medicamentos veterinários antiparasitários nas amostras de leite cru nas seguintes concentrações: abamectina 10 µg/L, doramectina 15 µg/L, ivermectina 10 µg/L e eprinomectina 20 µg/L. Para analisar a sensibilidade da técnica foi utilizada concentrações acima e abaixo dos limites máximos de resíduo (LMR). A ferramenta estatística usada para discriminar as amostras foi a Análise de Componentes Principais (PCA). Os resultados mostraram que é possível discriminar diferentes concentrações de antiparasitários diluídos em leite cru. A metodologia provou ser rápida, sensível e precisa dentro do que é previsto pela legislação vigente.

Palavras-chaves: Infravermelho. Leite cru. Avermectinas. Análise de Componentes Principais.

## **ABSTRACT**

According to the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO/WHO), milk and its derivatives are the most consumed foods in the world, being a source of fats, proteins, vitamins and energy that are extremely important for proper functioning of the human organism. This study focuses on the detection and sensitivity of antiparasitic drug residues in raw milk through Fourier Transform Middle and Near Infrared Spectroscopy (FT-MIR and FT-NIR). For this, samples of raw milk, pure antiparasitic medicine and samples simulating contamination with antiparasitics were considered. The simulated samples were made by adding antiparasitic veterinary drugs to the raw milk samples at the following concentrations: abamectin 10  $\mu\text{g/L}$ , doramectin 15  $\mu\text{g/L}$ , ivermectin 10  $\mu\text{g/L}$  and eprinomectin 20  $\mu\text{g/L}$ . To analyze the sensitivity of the technique, concentrations above and below the maximum residue limits (MRL) were used. The statistical tool used to discriminate the samples was Principal Component Analysis (PCA). The results showed that it is possible to discriminate different concentrations of antiparasitics diluted in raw milk. The methodology proved to be fast, sensitive and accurate within what is provided for by current legislation.

Keywords: Infrared. Raw milk. Avermectins. Principal Component Analysis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química das lactonas macrocíclicas.....	28
Figura 2 – Estrutura química das avermectinas.....	30
Figura 3 – Mecanismo de ação das avermectinas.....	31
Figura 4 – Espectro eletromagnético.....	36
Figura 5 – Representação dos diferentes tipos de vibrações moleculares.....	38
Figura 6 – Representação esquemática da ATR.....	41
Figura 7 – Representação da simulação de contaminação da amostra.....	46
Figura 8 – Analisador Multi Propósito FT–NIR da Bruker.....	47
Figura 9 – Analisador Vertex 70 FT–MIR da Bruker.....	48
Figura 10 – Espectro por FT–MIR referente ao medicamento antiparasitário abamectina pura.....	50
Figura 11 – Espectro por FT–NIR referente ao medicamento antiparasitário abamectina pura.....	51
Figura 12 – Espectro por FT–MIR referente ao leite cru (controle), abamectina no LMR e abaixo da concentração permitida.....	51
Figura 13 – Espectro por FT–MIR referente ao leite cru (controle), abamectina no LMR e abaixo da concentração permitida ampliado (a).....	52
Figura 13 – Espectro por FT–MIR referente ao leite cru (controle), abamectina no LMR e abaixo da concentração permitida ampliado (b).....	53
Figura 14 – Espectro por FT–NIR referente ao leite cru (controle), abamectina no LMR e abaixo da concentração permitida.....	54
Figura 15 – Espectro por FT–NIR referente ao leite cru (controle), abamectina no LMR e abaixo da concentração permitida ampliado.....	54

Figura 16 – Espectro por FT–MIR referente ao medicamento antiparasitário doramectina pura.....	55
Figura 17 – Espectro por FT–NIR referente ao medicamento antiparasitário doramectina pura.....	56
Figura 18 – Espectro por FT–MIR referente ao leite cru (controle), doramectina no LMR e acima da concentração permitida.....	57
Figura 19 – Espectro por FT–MIR referente ao leite cru (controle), doramectina no LMR e acima da concentração permitida ampliado.....	57
Figura 20 – Espectro por FT–NIR referente ao leite cru (controle), doramectina no LMR e acima da concentração permitida.....	58
Figura 21 – Espectro por FT–NIR referente ao leite cru (controle), doramectina no LMR e acima da concentração permitida ampliado.....	59
Figura 22 – Espectro por FT–MIR referente ao leite cru (controle), doramectina no LMR e abaixo da concentração permitida.....	60
Figura 23 – Espectro por FT–MIR referente ao leite cru (controle), doramectina no LMR e abaixo da concentração permitida ampliado.....	60
Figura 24 – Espectro por FT–NIR referente ao leite cru (controle), doramectina no LMR e abaixo da concentração permitida ampliado (a).....	61
Figura 24 – Espectro por FT–NIR referente ao leite cru (controle), doramectina no LMR e abaixo da concentração permitida ampliado (b).....	62
Figura 25 – Espectro por FT–MIR referente ao medicamento antiparasitário ivermectina pura.....	63
Figura 26 – Espectro por FT–NIR referente ao medicamento antiparasitário ivermectina pura.....	64
Figura 27 – Espectro por FT–MIR referente ao leite cru (controle), ivermectina no LMR e abaixo da concentração permitida.....	64

Figura 28 – Espectro por FT–MIR referente ao leite cru (controle), ivermectina no LMR e abaixo da concentração permitida ampliado (a).....	65
Figura 28 – Espectro por FT–MIR referente ao leite cru (controle), ivermectina no LMR e abaixo da concentração permitida ampliado (b).....	66
Figura 29 – Espectro por FT–NIR referente ao leite cru (controle), ivermectina no LMR e abaixo da concentração permitida.....	67
Figura 30 – Espectro por FT–NIR referente ao leite cru (controle), ivermectina no LMR e abaixo da concentração permitida ampliada.....	68
Figura 31 – Espectro por FT–MIR referente ao medicamento antiparasitário eprinomectina pura.....	69
Figura 32 – Espectro por FT–NIR referente ao medicamento antiparasitário eprinomectina pura.....	70
Figura 33 – Espectro por FT–MIR referente ao leite cru (controle), eprinomectina no LMR e abaixo da concentração permitida.....	71
Figura 34 – Espectro por FT–MIR referente ao leite cru (controle), eprinomectina no LMR e abaixo da concentração permitida ampliado (a).....	71
Figura 34 – Espectro por FT–MIR referente ao leite cru (controle), eprinomectina no LMR e abaixo da concentração permitida ampliado (b).....	72
Figura 35 – Espectro por FT–NIR referente ao leite cru (controle), eprinomectina no LMR e abaixo da concentração permitida.....	73
Figura 36 – Espectro por FT–NIR referente ao leite cru (controle), eprinomectina no LMR e abaixo da concentração permitida ampliado.....	74
Figura 37 – Análise dos componentes principais referente ao leite cru (controle), abamectina pura, no LMR e abaixo da concentração permitida.....	75
Figura 38 – Análise dos componentes principais referente ao leite cru (controle), doramectina pura, no LMR, acima e abaixo da concentração permitida.....	76

Figura 39 – Análise dos componentes principais referente ao leite cru (controle), ivermectina pura, no LMR e abaixo da concentração permitida.....77

Figura 40 – Análise dos componentes principais referente ao leite cru (controle), eprinomectina pura, no LMR e abaixo da concentração permitida.....78

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classes de medicamentos e valores obtidos na indústria farmacêutica.....	25
Tabela 2 – Limites máximos de resíduos e escopo do PNCRC para drogas antiparasitárias no leite.....	32
Tabela 3 – Percentual de violação do LMR ou da presença de resíduos de substâncias em amostras de leite testadas no PNCRC entre os anos de 2010 a 2021.....	33
Tabela 4 – Resultado de análises em leite UHT e em pó.....	34
Tabela 5 – Regiões do infravermelho.....	38
Tabela 6 – Valores médios das análises físico-químicas das amostras de leite cru.....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA	Abamectina
AGR	Agrotóxico
AINE	Anti-inflamatório Não Esteroidal
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATM	Antimicrobiano
ATP	Antiparasitário
ATR	<i>Attenuated total Reflection</i> (reflexão total atenuada)
BPMV	Boas Práticas de Uso de Medicamentos Veterinários
c	Velocidade na luz no vácuo e no ar
C	Carbono
CG	Cromatografia Gasosa
CCS	Contagem de Células Somáticas
cm	Centímetro
cm <sup>-1</sup>	Número de onda
cm <sup>-3</sup>	Centímetro cúbico
°C	Graus Celsius
CPP	Contagem Padrão em Placas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DORA	Doramectina
E	Energia
EPRI	Eprinomectina

FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> (Organização para a Alimentação e Agricultura)
FAO/OMS	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
FT	Transformada de Fourier
FT-MIR	Infravermelho Médio por Transformada de Fourier
FT-NIR	Infravermelho Próximo por Transformada de Fourier
FTMIR–ATR	Infravermelho Médio por Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada
g	Gramas
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
H	Hidrogênio
h	Constante de Planck
°H	Graus Hortvet
IN	Instrução Normativa
IVER	Ivermectina
Kg	Quilograma
L	Litro
LEM	Laboratório de Espectroscopia de Materiais
LMR	Limites máximos de resíduos
LPP	Laboratório de Produtos e Processos
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MERCOSUL	Mercado Comum do Sul
mg	Miligrama

MIR	<i>Mid Infrared</i> (infravermelho médio)
mL	Mililitro
MTX	Micotoxina
<i>m/z</i>	Massa/Carga
m <sup>2</sup>	Metro quadrado
N	Nitrogênio
NIR	<i>Near Infrared</i> (infravermelho próximo)
nm	Nanômetro
O	Oxigênio
OMS	Organização Mundial da Saúde
P	Fósforo
PAMVet	Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
ppb	Parte por bilhão
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> (Análise de Componentes Principais)
pH	potencial Hidrogeniônico
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
PNMQL	Programa Nacional de Melhoria de Qualidade do Leite
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
R\$	Real (moeda)
s	Segundo

u.a	Unidades Arbitrárias
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UHT	<i>Ultra High Temperature</i> (temperatura ultra–alta)
US\$	Dólar (moeda)
$\nu$	Frequência
$\lambda$	Comprimento de Onda
$\mu\text{g}$	Micrograma

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	21
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	21
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	21
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	22
<b>3.1 Leite: composição e aspectos legais da qualidade</b> .....	22
<b>3.2 Medicamentos de uso veterinário</b> .....	23
3.2.1 Medicamentos antiparasitários.....	26
3.2.1.1 Avermectinas.....	28
<b>3.3 Programas oficiais de controle de resíduos de medicamentos de uso veterinário</b> .....	31
<b>3.4 Métodos utilizados para detecção de resíduos no leite</b> .....	34
<b>3.5 Espectroscopia</b> .....	35
3.5.1 Espectroscopia no infravermelho.....	37
3.5.2 Espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier.....	39
3.5.2.1 Espectroscopia no Infravermelho Próximo.....	39
3.5.2.2 Espectroscopia no Infravermelho Médio.....	40
<b>3.6 Quimiometria</b> .....	42
3.6.1 Análise dos componentes principais.....	43
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	45
<b>4.1 Amostras</b> .....	45
<b>4.2 Análises físico-químicas das amostras</b> .....	45
<b>4.3 Simulação da contaminação das amostras</b> .....	45

<b>4.4 Análise usando o método FT–NIR e FT–MIR.....</b>	<b>47</b>
<b>4.5 Análise estatística dos dados.....</b>	<b>48</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>5.1. Análises físico–químicas do leite cru refrigerado.....</b>	<b>49</b>
<b>5.2 Análises espectroscópicas por FT–MIR e FT–NIR.....</b>	<b>49</b>
5.2.1 Abamectina.....	49
5.2.2 Doramectina.....	55
5.2.3 Ivermectina.....	62
5.2.4 Eprinomectina.....	69
<b>5.3 Análises de componentes principais.....</b>	<b>75</b>
5.3.1 Abamectina.....	75
5.3.2 Doramectina.....	76
5.3.3 Ivermectina.....	77
5.3.4 Eprinomectina.....	77
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>81</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), aprovado pelo Decreto nº 9.013, de 29 de setembro de 2017, entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas.

De acordo com a definição do *Codex Alimentarius* FAO/OMS, adotada na Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999, um resíduo é uma fração da droga, como também seus metabólitos, identificados como produtos que permanecem no alimento.

No leite e em seus derivados pode haver resíduos de medicamentos veterinários (antimicrobianos, antiparasitários, entre outros) utilizados nos animais em lactação, como também, resíduos de outros produtos como detergentes, pesticidas e metais pesados. Sendo assim, é um produto com grande suscetibilidade à contaminação, inclusive intencionalmente, de forma fraudulenta, que é o caso das substâncias usadas para conservar e neutralizar acidez.

O uso indiscriminado de medicamentos antiparasitários pode gerar o desenvolvimento de resistência parasitária, reduzindo assim sua eficácia e desta forma causar elevadas perdas econômicas na produção leiteira, bem como seus resíduos no leite podem provocar efeitos nocivos à saúde em humanos. Entre estes, pode-se citar reações alérgicas, anemias, problemas no fígado, no rim, no aparelho reprodutivo, efeitos carcinogênicos e teratogênicos.

A partir da Resolução nº 53, de 02 de outubro de 2012, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o Brasil passou a seguir os Limites Máximos de Resíduos (LMR) estabelecidos pelo Mercado Comum do Sul (MERCOSUL). Sendo que a Instrução Normativa nº 51 e a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC - nº 328, ambas de 19 de dezembro de 2019, constituem os documentos mais atuais para tais informações.

Segundo Luiz, Bell e Anjos (2020) a fiscalização da qualidade do leite em laticínios com certificação federal é realizada em laboratórios credenciados ao Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC). As técnicas laboratoriais mais comuns são as de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia Gasosa (CG), ambas empregadas para a confirmação e quantificação dos resíduos contaminantes. Devido à complexa preparação de amostras, necessidade de pessoal especializado e longo tempo de análise, estas metodologias não são empregadas durante a fase de triagem do leite.

A detecção da presença de resíduos de medicamentos é realizada durante a triagem, sendo feita principalmente por kits de testes qualitativos, porém, somente para o grupo dos antimicrobianos, não incluindo assim outras classes de medicamentos como é o caso dos antiparasitários. Esta metodologia apresenta a incidência de falsos positivos, limitação de detecção de grupos de medicamentos e dificuldades de sistematização. A dissonância entre os resultados obtidos pelos testes de triagem e os testes de confirmação pode acarretar prejuízos financeiros e jurídicos para os laticínios.

As técnicas de espectroscopia óptica aliadas a análises estatísticas multivariadas fornecem resultados rápidos e precisos, capazes de detectar as baixas concentrações de resíduos no leite. As principais técnicas utilizadas como ferramentas analíticas são: a espectroscopia de Infravermelho Próximo por Transformada de Fourier (FT-NIR) e a espectroscopia de Infravermelho Médio por Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada (FT-MIR-ATR). Entre as análises estatísticas multivariadas uma das mais utilizadas é a Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis* - PCA).

O leite é um sistema complexo que deve ser estudado por uma estatística de multiparâmetros ou multivariada. A PCA utiliza um conjunto de vetores base para os dados espectrais e outro conjunto para os dados de concentração buscando estabelecer uma relação linear entre eles.

A assinatura espectral de cada molécula é única, portanto, a composição de um banco de dados de assinaturas e a determinação da sensibilidade qualitativa de cada uma dessas técnicas permite fornecer dados para o desenvolvimento de futuras ferramentas de controle de qualidade do leite e seus derivados.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver métodos quantitativos e qualitativos para análise de resíduos de medicamentos antiparasitários bovinos em leite cru utilizando a Espectroscopia no Infravermelho Médio e Próximo por Transformada de Fourier.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Analisar amostras de leite cru oriundos de vacas leiteiras (controle), ou seja, que não estavam fazendo uso de medicamentos veterinários.
- ✓ Preparar amostras simulando a contaminação com os medicamentos veterinários antiparasitários mais utilizados em vacas leiteiras.
- ✓ Identificar os adulterantes abamectina, doramectina, ivermectina e eprinomectina em amostras de leite cru por meio de Espectroscopia no Infravermelho Médio e Próximo por Transformada de Fourier.
- ✓ Avaliar a sensibilidade de detecção da técnica citada simulando a contaminação da concentração do princípio ativo dos medicamentos veterinários dentro, acima e abaixo dos percentuais permitidos pela legislação.
- ✓ Aplicar o método quimiométrico de análise dos componentes principais (PCA) aos espectros obtidos.

### **3. REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1 Leite: composição e aspectos legais da qualidade**

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO/OMS), o leite e seus derivados são os alimentos mais consumidos no mundo, sendo fonte de gorduras, proteínas, vitaminas e energia que são de extrema importância para o bom funcionamento do organismo humano (TRONCO, 2010; FAO, 2017).

Do ponto de vista físico-químico, o leite apresenta pH próximo à neutralidade (6,50 a 6,70) e é composto basicamente por cerca de 87,3% de água, 4,8% de lactose, 3,9% de gordura, 3,3% de proteínas e 0,7 % de vitaminas e sais minerais. A composição do leite influencia diretamente na determinação de sua qualidade, os fatores mais relevantes que afetam sua composição são: a genética (principalmente entre raças), o ambiente, a idade do animal, a fase do estágio da lactação, o manejo de ordenha, a sanidade e a nutrição (WALSTRA, 2006; CRUZ, 2016).

A qualidade dos alimentos de origem animal vem sendo amplamente debatida, pois a segurança dos alimentos é um assunto de interesse mundial. Dessa forma, diversos programas foram desenvolvidos para garantir que os alimentos cheguem em quantidade, qualidade e seguros para a população. Dentre os requisitos de inocuidade, destaca-se o controle de remanescentes residuais e contaminantes. O Brasil, sendo um dos mais importantes parceiros comerciais no setor de alimentos, necessita acompanhar as medidas de prevenção e controle, repensando na integridade da cadeia alimentar e como esta pode ser controlada (BRASIL, 1999; McEVOY, 2002).

Desse modo, o leite tem sido considerado um dos alimentos mais completos em todas as fases de desenvolvimento do ser humano, o qual tem sido consumido em todas as fases da vida. Com isso, a qualidade do leite é conceituada por parâmetros bem definidos, tais como composição química, características físico-químicas e até mesmo a higiene (AMARAL, 2021).

Nessa perspectiva a qualidade do leite é influenciada, sobretudo pelo estado sanitário do rebanho, além do manejo desses animais, a higiene e manutenção dos equipamentos de ordenha, presença de microrganismos, resíduos de drogas e odores distintamente estranhos. Sendo assim, do ponto de vista da qualidade higiênica do leite, o mesmo deve ser de característica limpo, fresco, agradável e seguro (AMARAL, 2021).

Os contaminantes e resíduos químicos podem ser incorporados ao leite e produtos lácteos, de forma intencional ou não, em todas as etapas da cadeia produtiva. Sendo assim, é extremamente importante assegurar a autenticidade e o monitoramento da qualidade do leite (PEREIRA *et al.*, 2020).

Com o objetivo de melhorar a qualidade do leite e derivados produzidos no Brasil, na década de 90, foi elaborado o Programa Nacional de Melhoria de Qualidade do Leite (PNMQL) em uma parceria estabelecida entre o MAPA, representantes da academia, de órgãos de pesquisa e de associações de classe que representavam as indústrias. O PNMQL culminou na aprovação da Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002 que representou um passo importante para a regulamentação da produção de leite no Brasil. Desde então, foram muitas as alterações ao longo dos anos, até a aprovação das Instruções Normativas nº 76 e 77, em 30 de novembro de 2018 (BRASIL, 2018a;b).

Um leite de qualidade necessariamente deve apresentar características sensoriais específicas, baixa contagem de bactérias totais e de células somáticas, ausência de microrganismos patogênicos e resíduos químicos contaminantes, incluindo resíduos de drogas veterinárias. Assim, os parâmetros considerados padrão, utilizados para esta avaliação do leite cru refrigerado, de acordo com a IN 76 e IN 77 são: contagem de células somáticas (CCS) inferior a 500.000 células/mL, contagem padrão em placas (CPP) inferior a 300.000 UFC/mL, índice crioscópico (entre  $-0,555$  e  $-0,530$  °H), ausência de resíduos de produtos de uso veterinário e contaminantes acima dos limites máximos previstos, além de ausência de substâncias estranhas à sua composição, tais como agentes inibidores do crescimento microbiano, neutralizantes da acidez e reconstituintes da densidade ou do índice crioscópico. Caso contrário, o leite encontra-se impróprio para o consumo (BRASIL, 2017; BRASIL, 2018a;b; EMBRAPA, 2019).

### **3.2 Medicamentos de uso veterinário**

A produção de alimentos de origem animal tem tido cada vez mais demandas, assim como seu valor tem se elevado cada dia mais. O Brasil é considerado um dos maiores fornecedores de alimentos de origem animal, com isso deve-se garantir a qualidade como um todo, visando não só o aumento da produtividade, que é uma das metas na produção agropecuária nacional, mas ofertar um alimento seguro para o consumo (COSTA; NETTO, 2012).

Desse modo, a criação intensiva de animais, principalmente os bovinos para a produção de leite tem sido cada vez mais eficiente, o qual tem-se utilizado áreas menores, sendo assim, conseqüentemente a aglomeração de animais tornou-se uma problemática, sobretudo, em relação a ocorrência de infecções, como por exemplo ectoparasitoses, além de verminoses, o qual tem implicado na utilização de medicamentos veterinários para que a produção fosse eficiente, adequada e de qualidade (COSTA; NETTO, 2012).

Medicamentos de uso veterinário são utilizados na prevenção, controle e tratamento de doenças nos animais, tais como mastite e doenças parasitárias. Sendo assim, a presença de resíduos no leite, como os de antimicrobianos, de antiparasitários e de anti-inflamatórios, podem causar danos na produção animal e na saúde do consumidor. A causa da contaminação está associada a não observação do período de carência descrito na bula do medicamento, com envio do leite com resíduos para o processamento; à mistura de leite contaminado ao não contaminado; à falta de anotação dos tratamentos realizados e a não identificação de vacas tratadas; ao uso indevido de produtos ou sem a orientação de um profissional médico veterinário durante a lactação, entre outros (VANSCHAIK; LOTEM; SCHUKKEN, 2002; LUIZ, 2019a).

Os medicamentos são compostos que remetem uma diversidade de classes químicas com ações terapêuticas variadas e específicas, o qual está incluso os  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos e tetraciclina como a principal classe de antimicrobianos e as avermectinas, piretróides e organofosforados como a principal classe de antiparasitários. Diante disso, a utilização desses medicamentos pode deixar resíduos em alimentos como, leite, carne, ovos, de modo que, os níveis não podem ultrapassar o LMR (NETTO *et al.*, 2006, SILVA; SOUZA; CALDAS, 2014).

Logo, estes fármacos são vistos como principais insumos de maior faturamento da indústria farmacêutica veterinária, todavia, a utilização desses medicamentos tem interferido na qualidade do produto, e até mesmo no prazo esperado pela indústria agropecuária (COSTA; NETTO, 2012). A tabela 1 a seguir demonstra principalmente os valores obtidos na indústria farmacêutica veterinária segundo a classe de medicamentos.

Tabela 1 – Classes de medicamentos e valores obtidos na indústria farmacêutica.

<b>Classe de medicamentos</b>	<b>Valores (R\$)</b>
Antimicrobianos	633.417.717,00
Antiparasitários	960.983.211,00
Biológicos	825.734.942,00
Outros	404.547.819,00

Fonte: Adaptado de COSTA; NETTO (2012).

O LMR é a concentração máxima de resíduos encontrados em um alimento de origem animal, o que se resulta da utilização de um medicamento veterinário, que por sua vez possui recomendação para ser permitido de forma legal, ou até mesmo reconhecido de forma aceitável em alimentos. Dessa forma, estes respectivos limites são estabelecidos para assegurar a utilização de produtos, além de limitar a exposição e proteger a saúde dos consumidores de alimentos provenientes de animais tratados (SPISSO; NÓBREGA; MARQUES, 2009).

Nesse contexto, a presença de resíduos em um alimento acima do LMR estabelecido compreende que o produto não foi usado de acordo com as boas práticas de uso de medicamentos veterinários (BPMV), além da utilização de um produto que não seja autorizado (SILVA; SOUZA; CALDAS, 2014).

Medicamentos veterinários presentes nos alimentos como o leite, quando exposto a seres humanos podem causar diversos efeitos, o qual se inclui reações alérgicas em pessoas hipersensíveis, e até mesmo câncer. A exposição a antimicrobianos e antiparasitários pode ocasionar o desenvolvimento de microrganismos resistentes, dificultando a ação terapêutica nas pessoas que consomem alimentos provenientes desses animais tratados (LUIZ *et al.*, 2008, SILVA; SOUZA; CALDAS, 2014). Tais resíduos sofrem pouca ou quase nenhuma influência de tratamentos térmicos, como a pasteurização e a ultra pasteurização ou o cozimento para fabricação de doce de leite ou requeijão, por exemplo. Além disso, causam prejuízos à indústria, pois inibem o desenvolvimento das bactérias lácticas do fermento, inibindo ou aumentando o tempo de coagulação do leite, comprometendo o rendimento devido a problemas tecnológicos de leites fermentados e queijos, podendo, ainda, conferir sabor amargo aos queijos (ROCA *et al.*, 2011; CERQUEIRA, 2020).

### 3.2.1 Medicamentos antiparasitários

Os antiparasitários são medicamentos responsáveis por controlar infecções causadas por parasitas, tais infecções geralmente são mistas, pois há diferentes gêneros ou espécies de parasitas que podem infectar o corpo do animal, apresentando o maior índice de transmissão via pasto. O parasitismo pode causar o retardo do desenvolvimento de animais e a diminuição da produção leiteira, além de anemia, distúrbios gastrointestinais, tristeza parasitária bovina e altos custos para a prevenção e tratamento, podendo levar o animal a óbito. (ALMEIDA *et al.*, 2020).

O parasitismo causado por nematódeos gastrintestinais é responsável por grandes perdas econômicas nos rebanhos, principalmente em países tropicais e subtropicais, tendo em vista que, estas condições climáticas favorecem o seu desenvolvimento. Já o controle de helmintos baseia-se no emprego de drogas anti-helmínticas. Embora sejam utilizados em várias espécies domésticas, o mercado predominante é o de ruminantes bovinos, o qual são gastos milhões anualmente, tentando reduzir os efeitos causados pelo parasitismo (RODRIGUES *et al.*, 2020).

Atualmente, o controle de endoparasitas e ectoparasitas em bovinos vem se tornando cada vez mais difícil devido à resistência apresentada dos nematódeos, possivelmente, decorrentes da utilização incorreta e indiscriminada dos medicamentos utilizados no tratamento dos animais. Desta forma, é necessário seu controle para a preservação da saúde animal, incluindo o conhecimento da epidemiologia das parasitoses, o conhecimento prático do manejo zootécnico e tratamentos estratégicos, visando principalmente à descontaminação das pastagens e a busca do equilíbrio parasito/hospedeiro, bem como, a viabilidade econômica da produção e o controle de seus resíduos no leite (GRISI *et al.*, 2014; ALMEIDA *et al.*, 2020; RODRIGUES *et al.*, 2020).

Grisi *et al.* (2014), estimaram um prejuízo na bovinocultura brasileira da ordem de US\$ 13,96 bilhões de dólares, dentre eles, US\$ 7.107,17 por nematódeos gastrintestinais; US\$ 3.236,65 por carrapatos; US\$ 2.558,32 por mosca dos chifres; US\$ 383,48 por bernes, US\$ 336,26 por bicheiras e US\$ 335,46 por mosca dos estábulos.

As lactonas macrocíclicas apresentam em seu perfil convencional na formulação o propileno glicol e glicero-formol na proporção (60:40), removendo assim os principais nematódeos gastrintestinais e pulmonares de bovinos, apresentando uma sobrevida plasmática

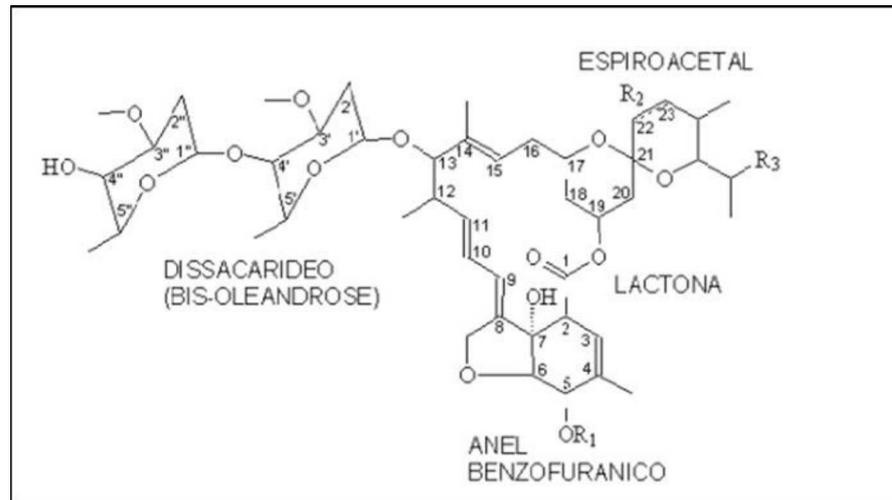
ativa permitindo a proteção a re-infecções por no mínimo duas semanas após o tratamento. (GRISI *et al.*, 2014; SILVA; SOUZA; CALDAS, 2014).

Houve uma forte busca na pesquisa e desenvolvimento das lactonas macrocíclicas, denominadas de longa ação, por parte da indústria farmacêutica veterinária brasileira, que proporcionam uma biodisponibilidade efetiva para a remoção e prevenção à re-infestação por vermes gastrintestinais e pulmonares por um período entre seis a nove semanas. Destas pesquisas foram desenvolvidas avermectinas com concentrações superiores as convencionais, bem como a associação entre dois princípios ativos. As formulações de longa ação com aplicação por via subcutânea tiveram grande aceitação e isto culminou no registro junto ao MAPA de mais de 20 marcas distintas, com um faturamento estimado em 500 milhões de reais em 2013 (GRISI *et al.*, 2014; SILVA; SOUZA; CALDAS, 2014).

As lactonas macrocíclicas demonstram excelente atividade contra uma ampla variedade de nematódeos, mas também contra alguns artrópodes parasitas e, em consequência, são denominadas endectocidas. São efetivas contra estágios adultos e larvários de nematelmintos gastrintestinais e vermes pulmonares de ruminantes. No Brasil, bovinos criados em pasto, estão mais susceptíveis à infecção por larvas de nematódeos gastrintestinais, particularmente dos gêneros *Cooperia*, *Haemonchus*, *Ostertagia*, *Strongyloides*, *Trichostrongylus* e *Oesophagostomum*. Os medicamentos específicos da classe das avermectinas são os mais indicados para o tratamento do animal (TEIXEIRA, 2015; ALMEIDA *et al.*, 2020).

Segundo Shoop, Mrozik e Fisher (1995) as avermectinas apresentam uma complexa estrutura química, correspondentes a derivados dissacarídeos de lactonas cíclicas de 16 membros, com estrutura semelhante à dos antimicrobianos macrolídeos. Possuem um grupamento éster (lactona), um espiroacetal e um anel benzofurânico (Figura 1).

Figura 1 – Estrutura química das lactonas macrocíclicas.



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

As lactonas macrocíclicas apresentam massa molecular elevada e são altamente lipofílicas, após serem administradas, são armazenadas no tecido adiposo, sendo liberadas, metabolizadas e excretadas lentamente. Esta afinidade pela gordura explica sua permanência no corpo e o longo período de proteção contra vermes pulmonares e de estômago em bovinos. Podem ocorrer variações individuais neste período de proteção devido às diferenças na distribuição, na metabolização e na excreção dos medicamentos. O tempo de meia-vida longo destes compostos determina a quantidade de resíduos presentes no leite e conseqüentemente, os períodos de carência obrigatórios após o tratamento (MONTEIRO, 2017).

### 3.2.1.1 Avermectinas

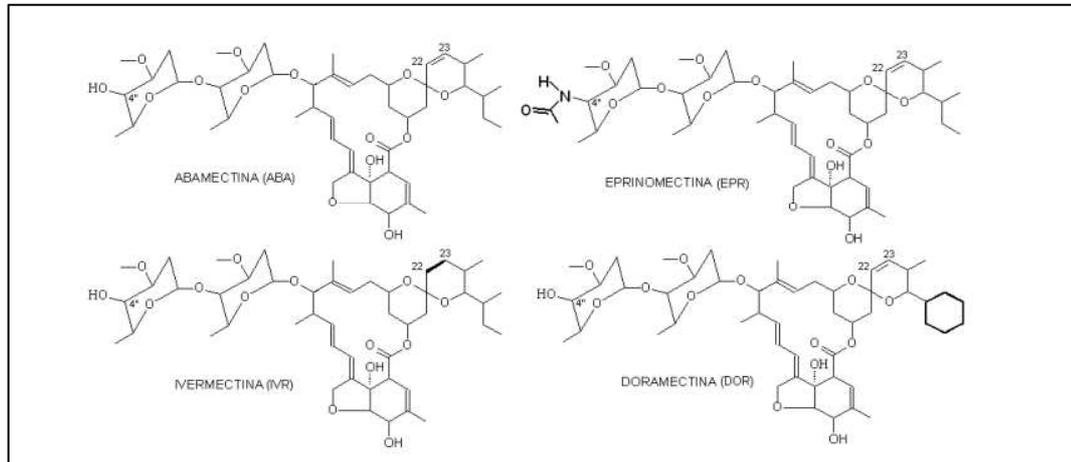
As avermectinas (ivermectina, abamectina, doramectina e selamectina) são produtos da fermentação do actinomiceto *Streptomyces avermitilis* e as milbemicinas do *Streptomyces cyanogriseus* (milbemicina e moxidectina) pertencentes ao grupo das lactonas macrocíclicas. Contudo, as avermectinas são consideradas a principal classe dos medicamentos veterinários antiparasitários utilizados na pecuária e foram descobertas em 1975 pelo pesquisador Satoshi Omura no Instituto Kitasato. Esta descoberta deu-se partir de microrganismos presentes em amostra de solo em uma cidade do Japão. Desse modo, a descoberta desse composto ocasionou em um amplo impacto na indústria de alimentos de origem animal, visto que, demonstravam alta eficiência parasiticida em combate a artrópodes e nematódeos, que por sua vez tem sido utilizada em várias espécies de animais, sobretudo no setor agropecuário para o tratamento de patologias parasitárias, além do setor agrícola. Com exceção da selamectina,

que é utilizada em cães e gatos, as demais são utilizadas em bovinos (SOUZA, 2015; MOREIRA, 2016; RODRIGUES, 2017).

Ainda segundo Moreira (2016), o *Streptomyces avermitilis* produz oito tipos de avermectinas naturais denominadas: A1a, A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a e B2b. Sendo assim, as avermectinas que compõe a composto A possuem um radical metil ligado ao carbono 5, visto que, o composto B possui um hidrogênio ligado a este respectivo carbono. No que se refere às subclassificações, os compostos relacionados ao subgrupo 1 contém entre o carbono 22 e 23 uma dupla ligação, o qual o subgrupo 2 possui uma respectiva ligação simples com o grupo hidroxila ligado ao carbono 23. O subgrupo “a” e “b” se diferem pelo radical ligado respectivamente ao carbono 25, onde “a” possui um grupo sec-butil, e “b” contém um grupo isopropil ligado a este carbono (SHOOP; MROZIK; FISHER, 1995; MOREIRA, 2016).

Os compostos da série B se destacam por possuir uma potente atividade anti-helmíntica, inseticida e acaricida. A partir da abamectina, também conhecida como avermectina B1a, e com as pesquisas para o desenvolvimento de novos produtos com atividades semelhantes, obteve-se outras formas de avermectinas: a ivermectina (dihidroavermectin B1) por meio de modificações por hidrogenação dos carbonos C-22 e C-23; a doramectina, obtida por biossíntese mutacional (fermentação) do *Streptomyces avermitilis* bkd, caracterizada pela presença de um ciclohexano na ligação C-25, na presença do ácido ciclohexanocarboxílico. Já a eprinomectina, é obtida pela adição do grupamento acetilamino no C-4, sendo mais hidrofílica e apresentando rápida eliminação por vias excretoras, ao contrário de outras avermectinas, podendo ser usada em vacas em lactação devido ao seu baixo nível de eliminação no leite (Figura 2) (SHOOP; MROZIK; FISHER, 1995; SHOOP *et al.*, 1996; MUSHTAQ *et al.*, 1996; CROPP *et al.*, 2000; PÉREZ-COGOLLO, 2018).

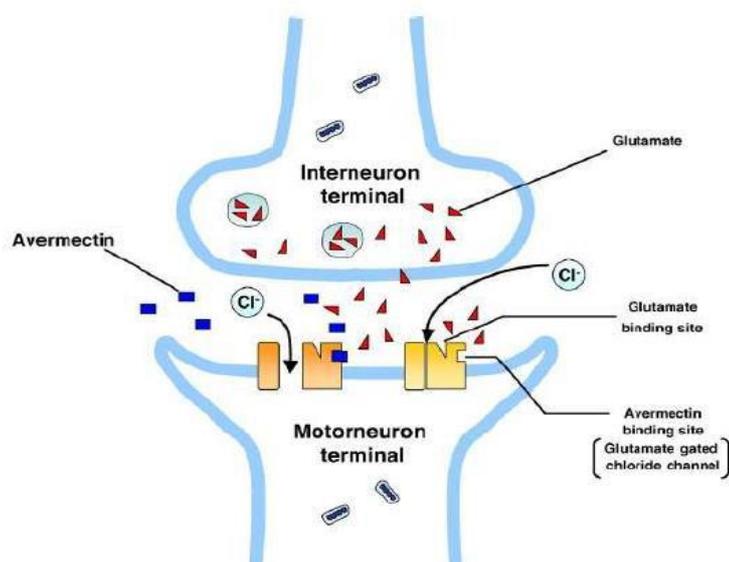
Figura 2 – Estrutura química das avermectinas.



Fonte: Adaptado de SHOOP *et al.* (1996).

Seu mecanismo de ação (Figura 3) consiste em atuar na neurotransmissão do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) nos nematódeos, bloqueando o estímulo interneuronal de neurônios motores excitatórios e, assim, ocasionando paralisia flácida. Isto é obtido pelo estímulo à liberação do GABA pelas terminações nervosas, esta exacerbação da ligação do GABA resulta em maior fluxo de íons cloreto na célula, hiperpolarizando a mesma. Outra forma de ação dá-se pelos canais de cloro glutamato-mediados, encontrados apenas em invertebrados. As lactonas macrocíclicas (avermectinas) atuam como agonista desses receptores abrindo os canais de cloro glutamato-mediados de forma lenta e irreversível, causando paralisia rápida dos movimentos e do bombeamento faríngeo, deixando os parasitas incapacitados de se mover ou se alimentar (MONTEIRO, 2017).

Figura 3 – Mecanismo de ação das avermectinas



Fonte: Adaptado de SOUZA (2015).

As avermectinas apresentam como característica baixa solubilidade em água, entretanto, são solúveis em solventes orgânicos como, por exemplo, clorofórmio, cloreto de metileno, acetato de etila, acetona, álcoois, tolueno, ciclohexano, dimetilformamida, dimetilssulfóxido e tetrahydrofurano. Em sua forma sólida se apresenta como pó branco, o qual é volátil e demonstram sensibilidade moderada a temperatura, além de serem estáveis em condições ácidas com pH 4,0 ~ 4,6, visto que, em determinadas combinações de pH, temperatura, além do tempo de exposição, as avermectinas sofrem hidrólise na subestrutura dissacarídea, especificamente no C-13 (MOREIRA, 2016).

### 3.3 Programas oficiais de controle de resíduos de medicamentos de uso veterinário

Em 1999, o MAPA aprovou o PNCRC em produtos de origem animal, que tem como função o controle e a vigilância, buscando conhecer e evitar violações nos LMR de produtos autorizados, como também o uso de compostos químicos proibidos (BRASIL, 1999).

Anualmente, o MAPA publica um plano de amostragem com os analitos a serem monitorados com seus limites pré-estabelecidos. Podem ser realizadas coletas de leite cru, leite fluido para consumo direto e leite em pó. Com exceção das amostras de leite cru, que são coletadas nas propriedades rurais garantindo uma única procedência, as demais são coletadas nos estabelecimentos sob Serviço de Inspeção Federal (BRASIL, 2019c).

O PNCRC pesquisa a presença de resíduos de antiparasitários no leite, devido ao seu uso frequente na medicina veterinária para o controle de endo e ectoparasitoses. Tais medicamentos são monitorados e, com exceção da eprinomectina, que não requer período de carência para o consumo de leite, o tratamento com esta classe de compostos não pode ser realizado em vacas lactantes ou nos últimos dois meses de gestação. Os medicamentos antiparasitários contendo ivermectina e abamectina representam um percentual grande em relação às demais avermectinas com registros comerciais ativos (BELOTI, 2015; RIBEIRO *et al.*, 2020).

De modo geral, os antiparasitários citados possuem concentração em torno de 1% a 3,5%, sendo a injeção subcutânea a via de aplicação mais comum. Devido sua alta lipossolubilidade ocorre a deposição no local da aplicação, prolongando seu tempo de retenção no organismo, podendo ser excretada pelo leite. Os resíduos de abamectina, doramectina, ivermectina e eprinomectina no leite não podem ultrapassar 10 µg/L; 15 µg/L; 10 µg/L e 20 µg/L, respectivamente (Tabela 2) (SINDAN, 2018; BRASIL, 2019d).

Tabela 2 – Limites máximos de resíduos e escopo do PNCRC para drogas antiparasitárias no leite

<b>Avermectinas</b>	<b>LMR µg/L no leite</b>
Abamectina	10 µg/L
Doramectina	15 µg/L
Ivermectina	10 µg/L
Eprinomectina	20 µg/L

Fonte: BRASIL (2019d).

As análises incluem diversas drogas veterinárias, além de praguicidas, contaminantes inorgânicos e micotoxinas, ou seja, prevê o monitoramento sistemático de resíduos químicos que podem interferir na saúde pública. A tabela 3 representa as substâncias pesquisadas entre os anos de 2010 e 2021 em que foram constatadas violações e as respectivas porcentagens de amostras violadas (BRASIL, 2019d; 2021).

Tabela 3 – Percentual de violação do LMR ou da presença de resíduos de substâncias em amostras de leite testadas no PNCRC entre os anos de 2010 a 2021.

<b>Substância</b>	<b>Número de amostras analisadas/número de amostras violadas</b>	<b>Percentual de amostras violadas</b>
Abamectina (ATP)	2066/06	0,29%
Albendazol (ATP)	1256/06	0,48%
Aflatoxina M1(MTX)	883/01	0,11%
Cefoperazona (ATM)	2840/07	0,24%
Ceftiofur (ATM)	3444/06	0,17%
Cloranfenicol (ATM)	2551/06	0,23%
Clorpirifos (AGR)	384/02	0,52%
Cloxaciclina (ATM)	3444/08	0,23%
Diclofenaco (AINE)	68/02	2,94%
Doramectina (ATP)	520/06	1,15%
Espiramicina (ATM)	3364/10	0,29%
Fipronil (AGR)	127/01	0,78%
Florfenicol (ATM)	3011/10	0,33%
Ivermectina (ATP)	2365/11	0,46%
Meloxicam (AINE)	62/01	1,61%
Oxitetraciclina (ATM)	3598/06	0,16%
Tilmicosina (ATM)	3364/07	0,20%

AGR – Agrotóxico; AINE – Anti-inflamatório; ATM – Antimicrobiano; ATP – Antiparasitário; MTX – Micotoxina

Fonte: Adaptado de BRASIL (2019d; 2021).

Percebe-se que, dentre as substâncias pesquisadas, a classe dos antimicrobianos é a que apresenta a maior quantidade de representantes, sendo amplamente utilizados na prevenção, controle e tratamento de doenças dos animais (VANSCHAIK; LOTEM; SCHUKKEN, 2002; LUIZ, 2019a). Embora seja contraindicada em bovinos produtores de leite, a ivermectina é extensivamente usada para tratamento de ectoparasitas e tem sido encontrada em amostras de leite (SILVA; SOUZA; CALDAS, 2014).

Com o objetivo de complementar as ações do MAPA, em 2001 foi instituído pela ANVISA o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) e em 2002, por meio da RDC nº 253, de 16 de setembro de 2003, o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em alimentos de origem animal (PAMVet), ambos para analisar os alimentos (BRASIL, 2003).

O PAMVet foi desenvolvido pela ANVISA com o objetivo de controlar e fiscalizar resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, tendo duas bases de monitoramento: uma relacionada a resíduos em alimentos e outra na resistência bacteriana. Por ser o alimento

de origem animal com grande importância na alimentação e o mais consumido pela população brasileira, o leite foi escolhido como a primeira matriz, porém, a meta é avaliar, gradualmente, resíduos de medicamentos veterinários em todos os alimentos de origem animal (BRASIL, 2018c).

A tabela 4 representa os resultados das análises de triagem e confirmação, feitas no período de 2006–2007, para antimicrobianos e antiparasitários em leite processado em temperatura ultra–alta (*ultra high temperature* – UHT) e em pó.

Tabela 4 – Resultado de análises em leite UHT e em pó.

Substância	Leite UHT	Leite em pó
	Número de amostras analisadas/número de amostras violadas/Percentual	Número de amostras analisadas/número de amostras violadas/Percentual
B–lactâmicos (ATM)	467/03 (0,64%)	140/03 (2,14%)
Tetraciclina (ATM)	467/08 (1,71%)	139/22 (15,8%)
Cloranfenicol (ATM)	464/19 (4,09%)	139/43 (30,94%)
Neomicina (ATM)	460/12 (2,61%)	139/06 (4,32%)
Estreptomicina		
Diidroestreptomicina (ATM)	464/17 (3,66%)	139/05 (3,60%)
Abamectina (ATP)	465/13 (2,80%)	138/10 (7,25%)
Doramectina (ATP)	465/19 (4,09%)	138/38 (27,5%)
Ivermectina (ATP)	465/192 (41,3%)	138/72 (52,2%)

ATM – Antimicrobiano; ATP – Antiparasitário

Fonte: Adaptado de BRASIL (2018c).

De acordo com o relatório, todas as amostras do antimicrobiano Cloranfenicol apresentaram–se acima do limite máximo de resíduos permitido. Já o antiparasitário Doramectina apresentou uma amostra em leite UHT e oito amostras de leite em pó acima limite máximo permitido (ANVISA, 2009).

### 3.4 Métodos utilizados para detecção de resíduos no leite

Atualmente, a detecção de resíduos de medicamentos no leite utiliza como método oficial a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), sendo esta uma técnica internacionalmente aceita. A mesma possui grande sensibilidade, eficiência e rapidez, entretanto é uma técnica que requer custo elevado de reagentes e pessoal treinado. Contudo, há diversos métodos alternativos para detecção e quantificação de resíduos de medicamentos no leite, entre os principais métodos encontram–se a eletroforese capilar, espectroscopia de

massa, ensaio imunoenzimático, espectroscopia no infravermelho e outros (SOUZA *et al.*, 2018).

A eletroforese capilar é uma técnica baseada na separação das bandas de proteínas e peptídeos em um gel de poliacrilamida, ou seja, na migração de espécies carregadas eletricamente. Já espectrometria de massa é uma técnica analítica que usa a proporção de massa em relação à carga ( $m/z$ ) para identificar compostos em uma amostra, podendo ainda ser acoplada à cromatografia de líquida de alta eficiência. Os métodos imunológicos utilizam enzimas para identificar e quantificar os possíveis contaminantes existentes no leite. Outro método é a espectroscopia no infravermelho, que tem sido amplamente utilizado em pesquisas para o desenvolvimento e detecção de componentes químicos de leite e derivados (SHENG *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2018).

### **3.5 Espectroscopia**

Quando a luz solar é espalhada por gotas de água na atmosfera ocorre à formação de um arco-íris. Um fenômeno semelhante acontece quando a luz branca é passada através de um prisma, resultando na separação de seus vários constituintes de cores diferentes. Esse experimento de separação dos componentes da luz foi realizado no ano de 1666 por Sir Isaac Newton (1642-1727), sendo o século XVII, um período de intensa investigação sobre os fenômenos ópticos (BARBOSA, 2013).

Essa radiação colorida que foi vista no experimento com o prisma e o arco-íris corresponde a uma pequena fração de um espectro que é muito mais amplo, que é o espectro eletromagnético. Esse espectro é o intervalo de todas as frequências da radiação eletromagnética existente e se estende desde as ondas de baixa frequência, como as ondas de rádio, até as de alta frequência, como as da radiação gama (Figura 4) (BARBOSA, 2013; PAVIA *et al.*, 2015; LUIZ, 2019).

Figura 4 – Espectro eletromagnético.



Fonte: PAVIA (2015).

A Figura 4 mostra também que a energia ( $E$ ) é diretamente proporcional à frequência  $\nu$ , e inversamente proporcional o comprimento de onda. Esta relação foi estudada e desenvolvida por Max Karl Ludwig Planck (1858-1947) e matematicamente é descrita pela equação abaixo.

$$E = h\nu$$

Onde  $h$  = constante de Planck =  $6,62607015 \cdot 10^{-34}$  m<sup>2</sup>.kg/s.

O comprimento de onda ( $\lambda$ ) é inversamente proporcional à frequência  $\nu$  por meio da relação:

$$\nu = c/\lambda,$$

onde  $c$  = a velocidade da luz no vácuo e no ar. A equação de Planck também pode ser escrita da seguinte forma:

$$E = \frac{hc}{\lambda}.$$

Desta forma, quanto menor o comprimento de onda de uma radiação, maior a energia associada a ela (BARBOSA, 2013; LUIZ, 2019b).

A radiação eletromagnética pode ser dividida em: ionizante (ultravioleta, raios X e raios gama), que tem energia suficiente para romper as ligações atômicas; e não ionizante (rádio, micro-ondas, infravermelho, ultravioleta e visível), que são capazes de vibrar e rotacionar as moléculas, porém, não tem energia suficiente para romper as ligações atômicas, ou seja, não são capazes de arrancar um elétron causando ionização (LUIZ, 2019).

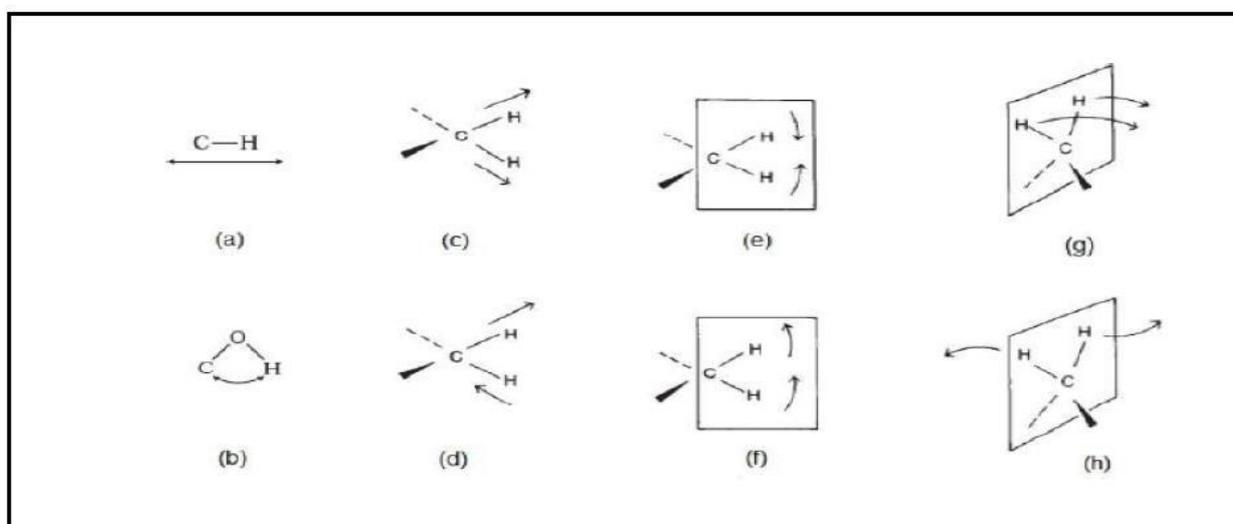
Sendo assim, a espectroscopia dedica-se ao estudo da interação da radiação eletromagnética com a matéria, focando nos níveis energéticos de átomos ou moléculas e dá origem a uma série de técnicas baseadas na absorção, emissão e nos processos de espalhamento. Estas técnicas oferecem a possibilidade de obter informações sobre a estrutura molecular, níveis de energia, ligações químicas, identificação e quantificação de elementos químicos e moléculas. Trata-se de um método não invasivo e não destrutivo de amostras. Normalmente as transições eletrônicas estão situadas na região do ultravioleta ou visível, as vibracionais na região do infravermelho e as rotacionais na região de micro-ondas (SALA, 2008).

### **3.5.1 Espectroscopia no infravermelho**

Todas as moléculas são constituídas de uma determinada quantidade de energia distribuída ao longo de toda a sua estrutura, as quais estão em constante movimento, seja de estiramento, contração das ligações e movimentações constantes dos átomos para frente e para trás, dentre outras vibrações. Isso explica o fato de algumas moléculas orgânicas absorverem determinados comprimentos de onda da radiação infravermelha, mas outras, não. Portanto, quando se incide uma radiação eletromagnética sobre uma molécula, haverá absorção de energia quando a frequência de radiação for correspondente à frequência de vibração (Mc MURRY, 2012).

Para que uma molécula absorva radiação na região do infravermelho, é preciso que haja alteração no momento dipolo da molécula durante o seu movimento de rotação ou translação. De acordo com a natureza das moléculas, podem acontecer diversos tipos de vibração, como: (a) estiramento, (b) dobramento, (c) vibração de estiramento simétrico, (d) vibração de estiramento assimétrico, (e) vibração de deformação tipo tesoura, (f) vibração de deformação tipo oscilação, rotação, (g) vibração de deformação tipo balanço, (h) vibração de deformação tipo torção. Tais vibrações são representadas na figura abaixo (Figura 5).

Figura 5 – Representação dos diferentes tipos de vibrações moleculares



Fonte: VIANA (2018).

Ou seja, quando uma radiação eletromagnética entra em contato com uma molécula, a absorção irá envolver a transição de um nível de energia menor para um mais elevado, o efeito que ela causará dependerá de sua energia, e esta é diretamente proporcional à frequência. Tratando-se do infravermelho, a energia envolvida será capaz de causar alterações somente nos modos vibracionais e rotacionais da mesma, pois como possuem comprimento de onda maior, apresentam energia menor (SALA, 2008).

Cada ligação apresenta sua própria frequência de vibração, fazendo com que cada molécula tenha uma identidade única, mesmo que as frequências absorvidas sejam muito parecidas, desta forma a espectroscopia no infravermelho serve para comparar se substâncias são idênticas ou não, como também fornecem informações estruturais da molécula. As absorções de cada tipo de ligação são encontradas apenas em certas regiões do infravermelho vibracional, como demonstrado na Tabela 5 (SALA, 2008; PEREIRA *et al.* (2020).

Tabela 5 – Regiões do infravermelho.

Regiões	Número de onda correspondente
Infravermelho Próximo	14290 $\text{cm}^{-1}$ – 4000 $\text{cm}^{-1}$
Infravermelho Médio	4000 $\text{cm}^{-1}$ – 400 $\text{cm}^{-1}$
Infravermelho Distante	400 $\text{cm}^{-1}$ – 4 $\text{cm}^{-1}$

Fonte: Adaptado de PEREIRA *et al.* (2020)

### 3.5.2 Espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier

O espectrofotômetro no infravermelho é o instrumento utilizado para obter o espectro de absorção no infravermelho de um composto, podendo apresentar dois tipos: instrumento dispersivo e o por Transformada de Fourier (FT). Apesar dos dois produzirem espectros bem semelhantes para um determinado composto, espectros de infravermelho com FT produzem o espectro mais rapidamente e com maior sensibilidade (PAVIA *et al.*, 2015).

O espectrofotômetro no infravermelho por FT apresenta como princípio de funcionamento o interferômetro de Michelson, no qual consiste de dois espelhos planos, um fixo e outro móvel, posicionados perpendicularmente, um em relação ao outro. Um divisor de feixes permite que 50% da radiação seja transmitida para o espelho móvel e 50% seja refletida para o espelho fixo, de modo que os dois raios retornem ao divisor de feixes, se recombinando. A interferência é resultado dessa recombinação. Uma parte desta radiação volta para a fonte de radiação e o raio que migra em direção à amostra e depois para o detector é denominado radiação transmitida. O interferograma é obtido como construções ou interferência destrutiva a partir da radiação monocromática de comprimento de onda  $\lambda$ , considerando a diferença do caminho óptico  $\delta$ , a partir da movimentação do espelho móvel (BARBOSA, 2013).

Posteriormente, os espectros são obtidos no computador, em programa específico que auxiliam assim na manipulação dos espectros. O uso deste equipamento oferece como vantagem, a diminuição da intensidade dos ruídos devido a maior potência de radiação que atinge o detector. Sendo assim, é possível obter espectros mais rápidos com elevado poder de resolução (VIANA, 2018).

#### 3.5.2.1 Espectroscopia no Infravermelho Próximo

O infravermelho próximo (*near infrared* – NIR) é a denominação dada a região do espectro eletromagnético que possui comprimentos de onda maiores que a região do espectro visível (LIMA, BAKKER, 2011). A espectroscopia no infravermelho próximo usa a região infravermelha do espectro eletromagnético no número de onda entre  $14290\text{ cm}^{-1}$  –  $4000\text{ cm}^{-1}$  (750 nm – 2500 nm). Os espectros podem ser gravados em modos de reflexão, transmissão ou de interação, fornecendo informações químicas e físicas complexas. Uma das principais vantagens dessa técnica é o fato de não necessitar de preparação da amostra, não sofrer interferência da água presente nos alimentos, fazendo com que possam ser realizadas análises

de produtos com alta umidade, não necessitar de reagentes e o tempo de análise pode ser de apenas alguns segundos (COSTA, 2000; PEREIRA *et al.*, 2020).

A espectroscopia de infravermelho próximo possui baixa energia e a sua interação com a matéria produz apenas transições e excitação dentro do mesmo estado fundamental de vibração. As bandas de absorção mais proeminentes que ocorrem na região do NIR estão relacionadas com as alterações do momento dipolar de uma molécula (bandas de combinação, *overtones*) (COSTA, 2000).

O modo de reflectância permite uma relação entre a intensidade da luz refletida pela amostra e a refletida por uma superfície refletora de fundo ou de referência. O NIR pode penetrar até uma profundidade substancial no interior da amostra, onde pode ser absorvida pelas combinações de vibrações e ressonâncias parciais das substâncias em análise presentes na amostra. A radiação não absorvida é refletida pela amostra para o detector (COSTA, 2000).

### 3.5.2.2 Espectroscopia no Infravermelho Médio

A Espectroscopia no Infravermelho Médio (*mid infrared* – MIR) tem sido amplamente utilizada em análises de leite e derivados, por apresentar grandes vantagens em relação a outras técnicas analíticas, fornecendo informações de frequências e absorção de diversas determinações em uma única amostra sem a necessidade de tratamento prévio, rapidez, e não destruindo a mesma (REID *et al.*, 2005; BORIN *et al.*, 2006).

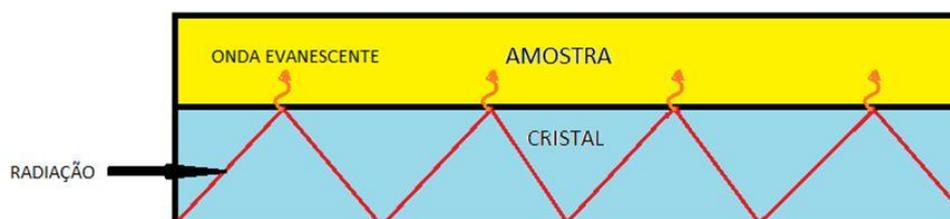
A região denominada infravermelho médio apresenta número de ondas entre  $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $400\text{ cm}^{-1}$  (ou  $2500\text{ nm}$  –  $25000\text{ nm}$ ), sendo a mais utilizada para a caracterização de compostos orgânicos, ao invés de linhas apresenta bandas de absorção, pois cada mudança de nível está associada a transições rotacionais (BARBOSA, 2013; PEREIRA *et al.*, 2020).

Uma amostra é capaz de refletir uma radiação incidente das maneiras: especular, difusa, interna e total atenuada – *Attenuated total reflection* (ATR). A reflexão do tipo ATR é uma técnica não destrutiva que permite obter espectros no infravermelho de amostras nos estados líquidos, sólidos insolúveis, filmes, adesivos, pós, pastas, entre outros (SKOOG, 2017; PEREIRA *et al.*, 2020).

Esta técnica tem por princípio o fato de que quando um feixe de radiação passa do cristal de ATR para a amostra, onde há diferença de índices de refração, ocorre uma reflexão. A radiação penetrante na amostra é conhecida como onda evanescente, esquematizada na

Figura 6. A fração do feixe que é refletida aumenta de acordo com o aumento do ângulo de incidência, até o ponto que se atinge determinado ângulo crítico ( $\alpha$ ), ocorrendo neste ponto a reflexão completa da radiação incidente (SILVERSTEIN, 2012).

Figura 6 – Representação esquemática da ATR.



Fonte: LUIZ (2019a)

No processo de reflexão ocorre a atenuação do feixe em comprimentos de onda correspondentes as bandas de absorção. A profundidade de penetração da radiação incidente pode variar de uma fração até vários comprimentos de onda, fator dependente do comprimento de onda da radiação incidente, dos índices de refração dos dois materiais e do ângulo do feixe incidente em relação à interface (LARKIN, 2017).

Dentre as vantagens da espectroscopia de ATR, a principal é a possibilidade de se obter espectros de materiais que absorvem fortemente na região do infravermelho de maneira rápida, uma vez que a radiação penetra apenas alguns micrômetros na amostra (SKOOG, 2017).

A análise espectroscópica é baseada na energia vibracional dos átomos de uma molécula e o espectro gerado é registrado por meio de um feixe de luz infravermelho. A intensidade de cada pico corresponde à frequência de vibração presente na amostra, permitindo determinar grupos funcionais (FERRÃO *et al.*, 2007; PAVIA *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2020).

O espectro de um grupo funcional representa uma impressão digital única, pois cada molécula tem seu espectro característico, sendo os picos correspondentes às frequências de vibrações entre os átomos, e a sua altura corresponde à quantidade de uma amostra (quantitativa), configurando assim um método preciso tanto para identificação de diferentes tipos de amostras (qualitativa) quanto para confirmação de uma possível falsificação (MORGANO *et al.*, 2005; LUO *et al.*, 2006; CASSOLI *et al.*, 2011).

### 3.6 Quimiometria

A quimiometria é uma área de aplicação de métodos estatísticos e matemáticos com o intuito de resolver problemas de origem química. Com o desenvolvimento crescente das técnicas instrumentais, tornam-se necessários tratamentos de dados mais complexos do ponto de vista matemático e estatístico, a fim de relacionar os sinais obtidos com os resultados desejados (FERREIRA *et al.*, 1999).

A quimiometria, no sentido estrito, começou formalmente na primeira metade da década de 70, mas só se firmou definitivamente quando o computador – por si só ou como componente de instrumentos de medição – invadiu o laboratório químico. No sentido amplo, há quem argumente que a combinação de química com estatística começou muito antes, com os trabalhos do químico cervejeiro que se denominava *Student*, o do famoso teste t. Apesar da política de informática conservadora adotada pelo governo brasileiro na época, a invasão dos computadores não demorou a alcançar os laboratórios nacionais (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2006, p. 1).

Nessas técnicas instrumentais, geralmente, são obtidas informações de uma grande quantidade de sinais (curvas, picos) que podem ser tratados para uma possível quantificação das várias espécies presentes, por isso, muita ênfase tem sido dada aos sistemas multivariados, nos quais se podem medir muitas variáveis simultaneamente, ao se analisar uma amostra qualquer. A conversão da resposta instrumental no dado químico de interesse nesses sistemas requer a utilização de técnicas de estatística multivariada (FERREIRA *et al.*, 1999).

“As ferramentas quimiométricas são veículos que podem auxiliar os químicos a se moverem mais eficientemente na direção do maior conhecimento”. Isto nos leva a uma definição formal de quimiometria: "... uma disciplina química que emprega métodos matemáticos e estatísticos para planejar ou selecionar experimentos de forma otimizada e para fornecer o máximo de informação química com a análise dos dados obtidos" (KOWALSKI, SEASHOLTZ, 1991, p.1).

De acordo com Ferreira et al. (1999) a quimiometria envolve diferentes métodos, como: otimização de experimentos; de validação de metodologias analíticas; planejamento de experiências; ajuste de curva; processamento de sinal; análise de fatores e calibração multivariada. A análise de dados multivariados conta com diversas técnicas. Dentre elas, pode-se citar a análise dos componentes principais (PCA).

### 3.6.1 Análise dos componentes principais

A análise em componentes principais é uma técnica de análise multivariada introduzida pelo estatístico Karl Pearson em 1901 e uma descrição de métodos computacionais foi desenvolvida mais tarde por Hotelling em 1933 com a finalidade de analisar as estruturas de correlação. É uma técnica que transforma linearmente um conjunto original de variáveis, inicialmente correlacionadas entre si, num conjunto substancialmente menor de variáveis não correlacionadas que contém a maior parte da informação do conjunto original: os componentes principais (HONGYU *et al.*, 2016).

O principal objetivo da PCA é a redução do número de componentes, de forma a explicar a variabilidade dos dados, aumentando a interpretabilidade. Esta redução é obtida uma vez que as variáveis originais estão correlacionadas, ao passo que as componentes principais são não correlacionadas. Estas novas variáveis (componentes principais) são uma combinação linear das variáveis originais, com uma ordem decrescente de importância (JOHNSON; WICHERN, 1998; HONGYU *et al.*, 2016).

Segundo Luiz (2019a), para a obtenção da mesma:

Faz-se uma rotação no eixo do conjunto de variáveis, de modo que uma de suas componentes tenha a mesma direção de maior variabilidade, e a segunda componente (ortogonal à primeira) tenha a segunda maior variabilidade, e assim por diante. Assim, com a rotação passamos a ter um novo sistema de coordenadas aonde seus eixos principais têm as mesmas direções de máxima variabilidade. A PCA é a projeção desses componentes principais, onde reduz-se o conjunto de variáveis nos dados em variáveis menores. A importância de um componente principal é expressa em termos de variância, Aonde a primeira componente principal (PC1) explica a maioria da variância envolvida nos dados, o segundo componente (PC2) a segunda maior variância, e assim por diante (LUIZ, 2019, p. 53).

De acordo com Souza e Poppi (2012), a análise de componentes principais (PCA) é uma das metodologias mais relevantes na quimiometria, visto que, a mesma é à base de vários métodos de reconhecimento de padrões, além de classificação e calibração multivariada. Desse modo, a PCA é usada com principal objetivo de visualizar estruturas dos dados, de modo que, permita encontrar similaridades entre as amostras, assim como, detectar amostras anômalas e detectar a dimensionalidade do conjunto de dados.

Tendo em vista a problemática citada, há a necessidade de novas pesquisas para avaliar a utilização de metodologias analíticas quantitativas e qualitativas por meio de Espectroscopia no Infravermelho Médio e Próximo por Transformada de Fourier (FTIR) para análise de resíduos de medicamentos antiparasitários bovinos em leite cru, de maneira rápida e precisa dentro dos parâmetros pré-estabelecidos pela legislação vigente.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

As análises físico-químicas do leite, bem como as de espectroscopia FT-NIR e FT-MIR foram realizadas no Laboratório de Produtos e Processos (LPP) e no Laboratório de Espectroscopia de Materiais (LEM), localizados no Departamento de Física da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.

### **4.1 Amostras**

Foram utilizadas amostras de leite cru provenientes de vacas controle, ou seja, livres de medicamentos veterinários, coletadas no mês de outubro e novembro de 2021 denominadas: amostra controle-1 e amostra controle-2. Estas foram obtidas no Campo Experimental da Embrapa Gado de Leite, localizado no município de Coronel Pacheco, Minas Gerais. Após a ordenha, as amostras de leite cru foram armazenadas e mantidas refrigeradas a 4,0 °C até serem analisadas. Posteriormente a análise físico-química foi realizada e em seguida foi realizada a simulação da contaminação com os medicamentos veterinários (leite cru contaminado).

### **4.2 Análises físico-químicas das amostras**

Todas as amostras foram submetidas a análises físico-químicas com a finalidade de verificar sua conformidade com os padrões estabelecidos pela legislação vigente (FAO, 2017; BRASIL, 2018a).

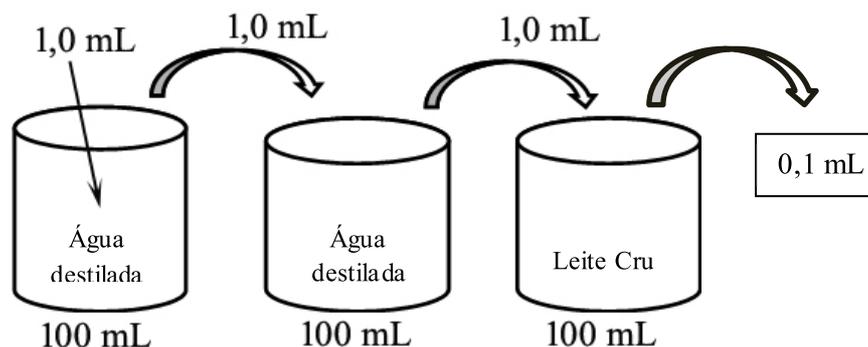
Nesta etapa, em cada amostra foram verificados: crioscopia, pH, acidez titulável, gordura, proteína, lactose e sólidos totais. Cada medida foi feita em triplicata. Para determinar o ponto de fusão das amostras de leite utilizou-se o crioscópico eletrônico digital MK 540 Flex da ITR, a acidez titulada foi obtida pelo método de solução Dornic, para a medida de pH utilizou-se o pHmetro de bancada AT355. Já as medidas de gordura, proteína, lactose e sólidos foram realizadas no Lactoscope da Delta Instruments. Todas as soluções e indicadores utilizados foram adquiridos na Macalé LTDA.

### **4.3 Simulação da contaminação das amostras**

Para fins de detecção de resíduos de medicamentos veterinários em leite utilizaram-se amostras de leite cru (controle), medicamento antiparasitário puro e amostras de leite cru contaminadas com os medicamentos antiparasitários. Tanto o leite cru, quanto o medicamento antiparasitário puro foram analisados isoladamente. Após, cada medicamento

utilizado foi primeiramente diluído em água destilada, e posteriormente, parte desta diluição foi adicionada em 100 mL de leite cru, a fim de alcançar a concentração desejada do princípio ativo no leite. Desta forma, a figura 7 representa a dissolução usada neste trabalho (LUIZ, 2019a).

Figura 7 – Representação da simulação de contaminação da amostra.



Fonte: Adaptado de Luiz (2019a)

Deve-se considerar que nos antiparasitários abamectina, ivermectina e doramectina para cada 100 mL do medicamento há 1 g de princípio ativo, e na eprinomectina para cada 100 mL do medicamento há 2 g do princípio ativo, visto que os mesmos apresentam também em sua composição excipientes. Considerando também que a densidade da água é  $1 \text{ g/cm}^3$  temos que 1 litro (L) de água é equivalente a 1 Kg, logo  $1 \text{ g} = 10^{-3} \text{ Kg}$ . Têm-se como resultado na diluição acima  $10 \times 10^{-6} \times 10^{-3} = 10^{-9}$ , este último sendo equivalente a 10 ppb. Então seguindo este raciocínio, em 0,1 mL do princípio ativo temos 10 ppb, 0,15 mL do princípio ativo temos 15 ppb em 0,2 mL do princípio ativo temos 20 ppb. Lembrando que 10 ppb são equivalentes a  $10 \text{ } \mu\text{g/L}$  para a abamectina, 15 ppb são equivalentes a  $15 \text{ } \mu\text{g/L}$  para doramectina, 10 ppb são equivalentes a  $10 \text{ } \mu\text{g/L}$  para ivermectina e 20 ppb são equivalentes a  $20 \text{ } \mu\text{g/L}$  para eprinomectina (LUIZ, 2018; BRASIL, 2019d).

Para a simulação do leite contaminado com doramectina, cada amostra foi preparada adicionando-se a medicação no leite, por meio de uma micropipeta LabMate, as seguintes proporções: 15 ppb, 20 ppb, 30 ppb, 40 ppb e 50 ppb, respectivamente, ou seja, o LMR exigido pela legislação, bem como o aumento das concentrações do princípio ativo. Posteriormente foi seguido o mesmo passo de simulação de contaminação das amostras, contudo, desta vez, diminuindo a concentração do princípio ativo para que desta forma fosse

avaliada a sensibilidade de detecção da técnica utilizada. Sendo assim, para tal foram utilizadas as seguintes proporções: 08 ppb, 06 ppb, 04 ppb e 02 ppb.

Em seguida, simulou-se a contaminação do leite cru com outros medicamentos, contudo no LMR respectivo de cada um e em concentrações abaixo do LMR.

#### 4.4 Análise usando o método FT-NIR e FT-MIR

Para o método FT-NIR as análises qualitativas das amostras foram realizadas com o Analisador Multi Propósito FT-NIR da Bruker (Figura 8), operando no modo de refletância na faixa de 14.000 a 4.000  $\text{cm}^{-1}$  de números de onda. As amostras foram colocadas em cubetas e em seguida cada análise foi realizada em triplicata com 32 varreduras (scans) para amostras simuladas e controle. Já para o método FT-MIR as análises qualitativas das amostras foram realizadas no Analisador Vertex 70 da Bruker (Figura 9), operando no modo de absorbância na faixa de 4.000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  de número de onda. Para tal, foi utilizada uma micropipeta LabMate, com a finalidade de pipetar 1 gota da amostra para ser colocada na lente do equipamento. Em seguida cada análise foi realizada em triplicata com 32 varreduras (scans) para amostras simuladas e controle. Tais métodos foram utilizados tanto para as amostras de leite cru (controle), medicamento antiparasitário puro e amostras de leite cru contaminadas com os medicamentos antiparasitários. O software OPUS® versão 6.5 foi utilizado para a aquisição de dados.

Figura 8 – Analisador Multi Propósito FT-NIR da Bruker



Fonte: LUIZ (2019).

Figura 9 – Analisador Vertex 70 FT–MIR da Bruker



Fonte: CARDOSO (2016).

#### **4.5 Análise estatística dos dados**

Os espectros foram feitos e analisados com o software OriginPro® 2021 versão estudante. Já as análises de componentes principais foram conduzidas pelo software The Unscrambler® versão 9.2.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Análises físico-químicas do leite cru refrigerado

A Tabela 6 mostra os resultados obtidos para as análises físico-químicas, comparando os valores encontrados para as amostras de leite cru, com os valores de referência adotados pela legislação vigente BRASIL (2018a).

Tabela 6 – Valores médios das análises físico-químicas das amostras de leite cru.

Análise	Valores encontrados Amostra controle-1	Valores encontrados Amostra controle-2	Valores de referência
Crioscopia	- 0,539 °H	- 0,489 °H	(- 0,550 a - 0,530) °H
Acidez Titulável	0.15 g de ácido láctico por 100 mL de leite	0.17 g de ácido láctico por 100 mL de leite	0.14 a 0,18 g de ácido láctico por 100 mL de leite
pH a 15,7 °C	6,74	6,70	(6,60 a 6,80)
Gordura	5,08%	3,31%	≥ 3,00%
Proteína	3,59 %	2,97%	≥ 2,90%
Lactose	4,56%	4,33%	≥ 4,30%
Sólidos	13,23 %	10,64%	≥ 11,40%
Totais			

Fonte: BRASIL (2018a)

Nota-se que a amostra controle-1 encontra-se dentro do padrão aceitável para um leite de ótima qualidade. Já a amostra controle-2 apresentou índice de crioscopia maior ao exigido pela legislação. Contudo, tal fato foi justificado por um problema na linha de canalização que leva o leite para o tanque, na qual uma pequena quantidade de água residual, após sua lavagem, não foi descartada antes da realização da ordenha e, conseqüentemente, acumulou no tanque. Porém, como o procedimento experimental não envolvia a participação do consumo deste leite por humanos e as análises espectroscópicas não foram afetadas nas medidas posteriores, decidiu-se por utilizar essa amostra.

### 5.2 Análises espectroscópicas por FT-MIR e FT-NIR

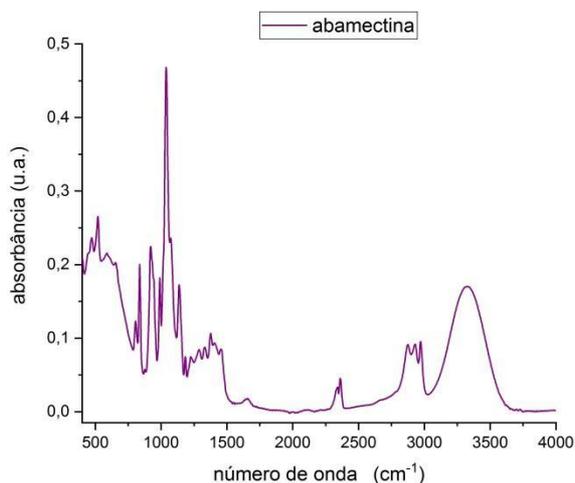
#### 5.2.1 Abamectina

Nesta subseção são apresentados os resultados das análises espectroscópicas por FT-MIR e FT-NIR referentes à amostra de leite cru, medicamento antiparasitário abamectina puro e a simulação da contaminação do leite cru com abamectina.

As figuras 10 e 11 apresentam o resultado obtido pela análise espectroscópica por FT-MIR e FT-NIR, respectivamente, da abamectina pura. Esta análise espectral serviu para acompanhar o comportamento da curva da abamectina e em qual faixa de número de onda

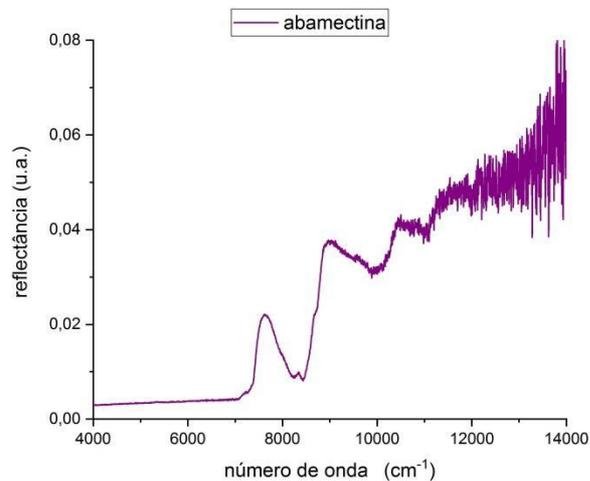
houve variação.

Figura 10 – Espectro por FT–MIR referente ao medicamento antiparasitário abamectina pura.



Na figura 10 o eixo horizontal representa o número de onda dentro da faixa do infravermelho médio, enquanto que o eixo vertical se refere à absorção. Através deste espectro observa-se que o pico mais influente da abamectina pura está na banda de  $1100\text{ cm}^{-1}$  devido à ligação C–O–C de éster, contudo, também apresenta picos de menor intensidade em  $980\text{ cm}^{-1}$  devido à ligação CH=CH<sub>2</sub>;  $1380\text{ cm}^{-1}$  devido à ligação C–OH;  $1456\text{ cm}^{-1}$  devido à ligação C–H;  $2350\text{ cm}^{-1}$  a  $2400\text{ cm}^{-1}$  devido à banda de CO<sub>2</sub>;  $2932\text{ cm}^{-1}$  devido à ligação CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub> a  $2964\text{ cm}^{-1}$  devido à ligação C–H; e  $3482\text{ cm}^{-1}$  devido à ligação O–H (BARBOSA, 2013).

Figura 11 – Espectro por FT–NIR referente ao medicamento antiparasitário abamectina pura.



Na figura 11 o eixo horizontal representa o número de onda dentro da faixa do infravermelho próximo, enquanto que o eixo vertical se refere à reflectância. Através deste espectro, observa-se que as bandas mais influentes da abamectina pura estão nas bandas de  $7750\text{ cm}^{-1}$  e  $9000\text{ cm}^{-1}$ , ambas devido a ligações C–H (BARBOSA, 2013).

As figuras 12 e 13 representam o resultado obtido pela análise espectroscópica por FT–MIR para a simulação do leite contaminado com abamectina, sendo utilizada como referência a amostra de leite cru controle e as seguintes proporções de abamectina: 10 ppb, 08 ppb, 06 ppb, 04 ppb e 02 ppb, respectivamente. Sendo a figura 13 (a) e (b) uma ampliação para fins de visualização.

Figura 12 – Espectro por FT–MIR referente ao leite cru (controle), abamectina no LMR e abaixo da concentração permitida.

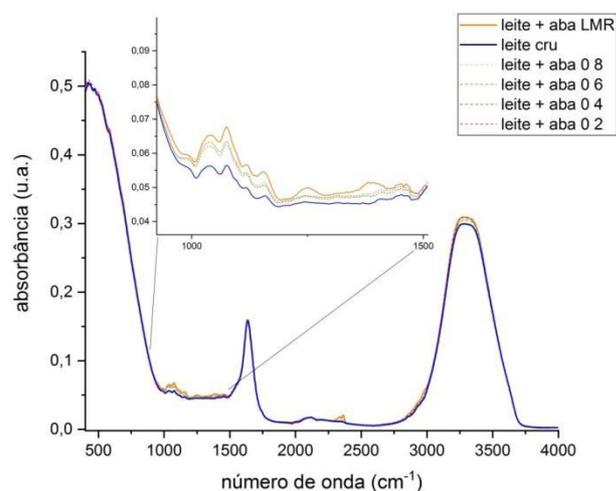
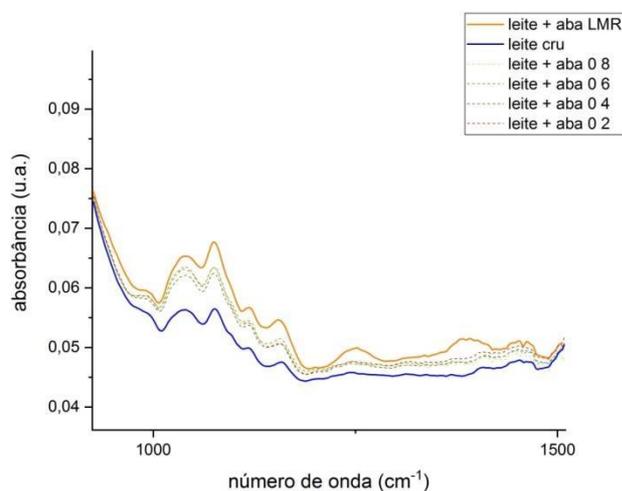


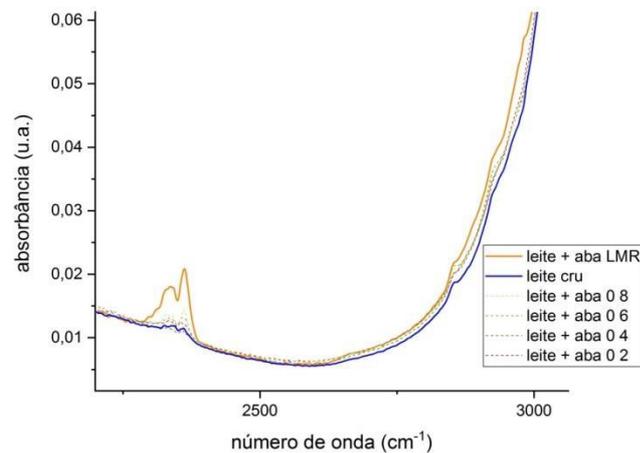
Figura 13 – Espectro por FT–MIR referente ao leite cru (controle), abamectina no LMR e abaixo da concentração permitida ampliada (a)



(a)

Nota-se através da figura 13 (a) uma diminuição de intensidade entre o leite cru e a abamectina, bem como a diminuição entre as concentrações de abamectina. Observa-se que os picos de absorção ocorreram entre as bandas de  $918\text{ cm}^{-1}$  a  $1477\text{ cm}^{-1}$ . Podem ser identificadas absorções em  $918\text{ cm}^{-1}$  devido à ligação C–O–C correspondente à lactose; em  $900\text{ cm}^{-1}$  a  $980\text{ cm}^{-1}$  correspondente a melatonina; entre  $970\text{ cm}^{-1}$  a  $1200\text{ cm}^{-1}$  devido a ligação P–O–C +  $\text{PO}_2$  correspondente aos fosfolipídeos;  $1060\text{ cm}^{-1}$  a  $1100\text{ cm}^{-1}$  devido a ligação O= alongamento P–O, e em  $1230\text{ cm}^{-1}$  a  $1300\text{ cm}^{-1}$  devido grupamento amida III, ambos correspondentes à caseína; em  $1400\text{ cm}^{-1}$  a  $1477\text{ cm}^{-1}$  devido um trecho C–H correspondente aos lipídeos (PEREIRA *et al.*, 2020). É possível observar uma diferenciação entre o espectro da amostra de leite cru e da amostra contaminada com abamectina no LMR, principalmente entre a banda de  $1400\text{ cm}^{-1}$  a  $1477\text{ cm}^{-1}$ , tal trecho é correspondente a ligações C–H correspondente aos lipídeos.

Figura 13 – Espectro por FT–MIR referente ao leite cru (controle), abamectina no LMR e abaixo da concentração permitida ampliada (b).



(b)

Nota-se através da figura 13 (b) uma diminuição de intensidade entre o leite cru e a abamectina, bem como a diminuição entre as concentrações de abamectina. Observa-se que os picos de absorção ocorreram entre as bandas de  $2350\text{ cm}^{-1}$  a  $2400\text{ cm}^{-1}$  correspondente a  $\text{CO}_2$  e em  $2800\text{ cm}^{-1}$  a  $2981\text{ cm}^{-1}$  devido ao estiramento  $\text{C}=\text{O}$  correspondente a gorduras e  $2850\text{ cm}^{-1}$  e  $2925\text{ cm}^{-1}$  correspondente aos triglicerídeos (PEREIRA *et al.*, 2020). É possível observar através deste espectro uma diferenciação entre o espectro da amostra de leite cru e da amostra contaminada com abamectina no LMR, bem como com a diminuição entre concentrações de abamectina entre a banda de  $2350\text{ cm}^{-1}$  a  $2400\text{ cm}^{-1}$ . Já na banda entre  $2850\text{ cm}^{-1}$  e  $2925\text{ cm}^{-1}$  não houve diferença significativa, ou seja, não foi possível visualizar a separação das mesmas. Enquanto na banda de  $2350\text{ cm}^{-1}$  a  $2400\text{ cm}^{-1}$  as concentrações com 06 e 08 ppb mostraram-se presentes entre a amostra de leite cru e o leite cru com abamectina no LMR, as concentrações com 02 e 04 ppb tenderam a ficar muito próximas do leite cru, o que já era esperado, porém, a concentração com 04 ppb não seguiu o padrão das demais. Tal fato pode ter ocorrido pela não homogeneização da mistura, no momento da análise experimental.

As figuras 14 e 15 representam o resultado obtido pela análise espectroscópica por FT-NIR para a simulação do leite contaminado com abamectina, sendo utilizada como referência a amostra de leite cru controle e as seguintes proporções de doramectina: 10 ppb, 08 ppb, 06 ppb, 04 ppb e 02 ppb, respectivamente. Sendo a figura 15 uma ampliação para fins de visualização.

Figura 14 – Espectro por FT-NIR referente ao leite cru (controle), abamectina no LMR e abaixo da concentração permitida.

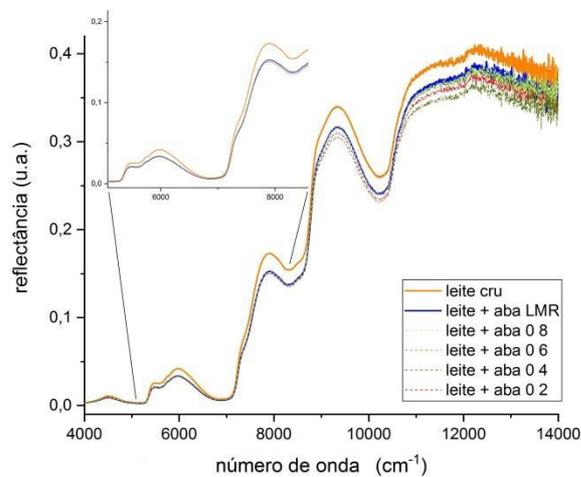
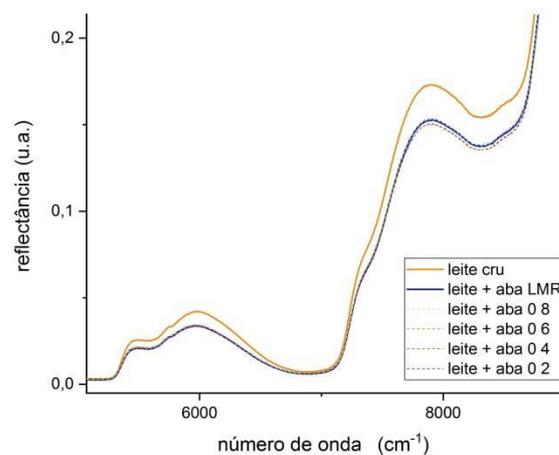


Figura 15 – Espectro por FT-NIR referente ao leite cru (controle), abamectina no LMR e abaixo da concentração permitida ampliada em uma determinada região.



Nota-se através da figura 15 a diminuição de intensidade entre o leite cru e a abamectina, bem como a diminuição entre as concentrações de abamectina. Observa-se que o pico de absorção mais influente ocorreu na banda de  $8000\text{ cm}^{-1}$  devido à ligação C–H correspondente aos lipídeos. Contudo, também apresenta picos de menor intensidade em  $5650\text{ cm}^{-1}$  e  $6000\text{ cm}^{-1}$ ; em  $5650\text{ cm}^{-1}$  correspondente ao 1º tom do trecho C–H em  $5555\text{ cm}^{-1}$  a  $6060\text{ cm}^{-1}$  devido a proteínas do soro do leite, em  $6000\text{ cm}^{-1}$  correspondente a uma ligação C–H e em  $5600\text{ cm}^{-1}$  a  $6150\text{ cm}^{-1}$  correspondente aos lipídeos (PEREIRA *et al.*, 2020).

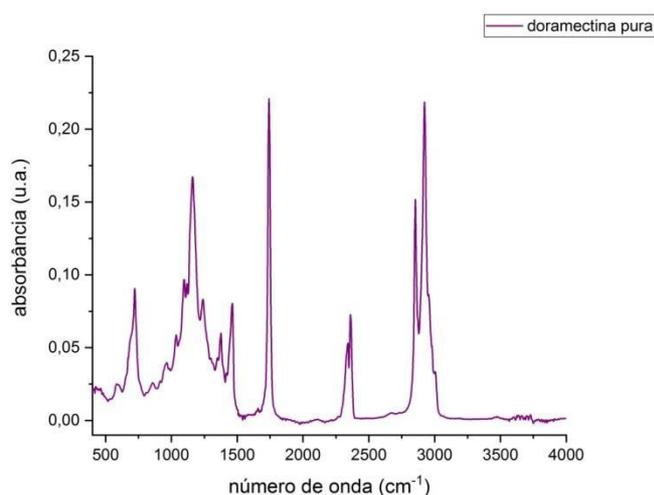
Através dos espectros acima, observa-se que houve diferenciação entre o espectro da amostra de leite cru e da amostra contaminada com abamectina no LMR, bem como com a diminuição entre concentrações de abamectina.

### 5.2.2 Doramectina

Nesta subsecção são apresentados os resultados das análises espectroscópicas por FT–MIR e FT–NIR referentes à amostra de leite cru, medicamento antiparasitário doramectina puro e a simulação da contaminação do leite cru com doramectina.

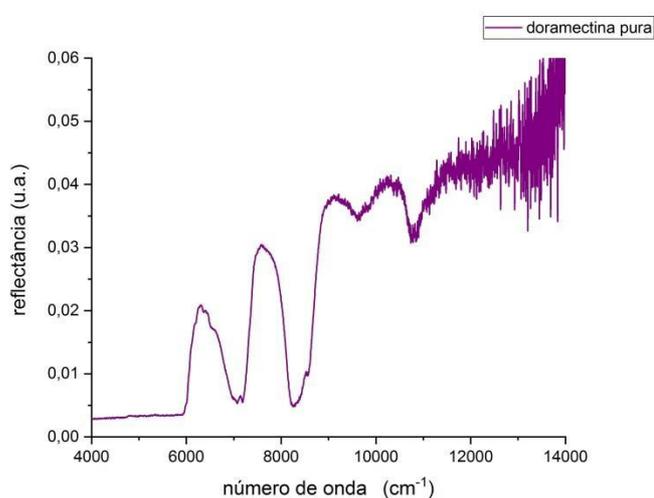
As figuras 16 e 17 apresentam o resultado obtido pela análise espectroscópica por FT–MIR e FT–NIR, respectivamente, da doramectina pura. Esta análise espectral serviu para acompanhar o comportamento da curva da doramectina e em qual faixa de número de onda houve variação.

Figura 16 – Espectro por FT–MIR referente ao medicamento antiparasitário doramectina pura.



Na figura 16 o eixo horizontal representa o número de onda dentro da faixa do infravermelho médio, enquanto que o eixo vertical se refere à absorção. Através deste espectro percebe-se que os picos mais influentes da doramectina pura estão nas bandas de  $1159\text{ cm}^{-1}$  a  $1275\text{ cm}^{-1}$  devido à ligação C–N alifático;  $1465\text{ cm}^{-1}$  devido à ligação C–H;  $1741\text{ cm}^{-1}$  devido à ligação C=O de éster;  $2853\text{ cm}^{-1}$  a  $2959\text{ cm}^{-1}$  devido à ligação  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ . Contudo, também apresenta picos de menor intensidade em  $689\text{ cm}^{-1}$  devido à ligação C–H;  $2350\text{ cm}^{-1}$  a  $2400\text{ cm}^{-1}$  devido a devido à banda de  $\text{CO}_2$  (BARBOSA, 2013).

Figura 17 – Espectro por FT–NIR referente ao medicamento antiparasitário doramectina pura.



Na figura 17 o eixo horizontal representa o número de onda dentro da faixa do infravermelho próximo, enquanto que o eixo vertical se refere à reflectância. Através deste espectro, observa-se que as bandas mais influentes da doramectina pura estão nas bandas de  $6100\text{ cm}^{-1}$ ,  $7750\text{ cm}^{-1}$  e  $9000\text{ cm}^{-1}$ , ambas devido a ligações C–H (BARBOSA, 2013).

As figuras 18 e 19 representam o resultado obtido pela análise espectroscópica por FT–MIR para a simulação do leite contaminado com doramectina, sendo utilizada como referência a amostra de leite cru controle e as seguintes proporções de doramectina: 15 ppb, 20 ppb, 30 ppb, 40 ppb e 50 ppb, respectivamente. Sendo a figura 19 uma ampliação para fins de visualização.

Figura 18 – Espectro por FT–MIR referente ao leite cru (controle), doramectina no LMR e acima da concentração permitida.

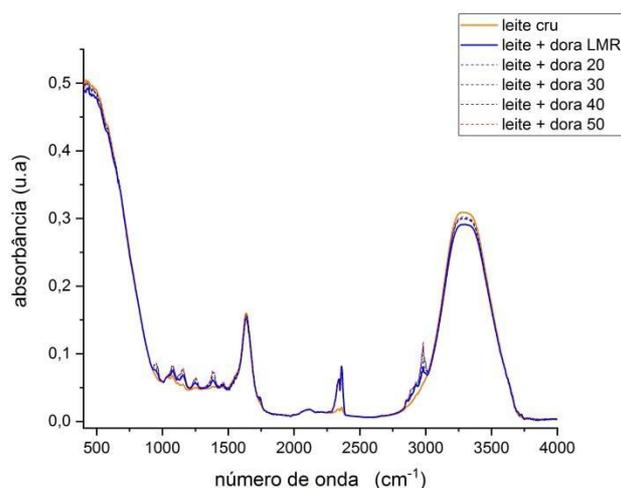
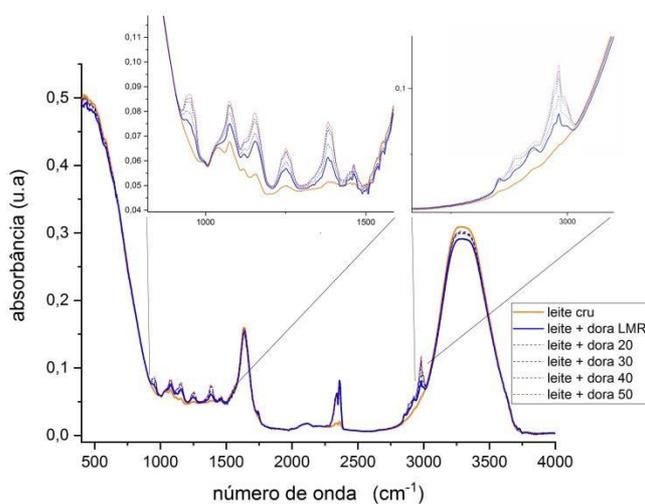


Figura 19 – Espectro por FT–MIR referente ao leite cru (controle), doramectina no LMR e acima da concentração permitida ampliada em duas regiões.



Nota-se através da figura 19 um aumento de intensidade entre o leite cru e a doramectina, bem como o aumento entre as concentrações de doramectina. Observa-se que os picos de absorção ocorreram entre as bandas de 918  $\text{cm}^{-1}$  a 1564  $\text{cm}^{-1}$  e 2800  $\text{cm}^{-1}$  a 2981  $\text{cm}^{-1}$ . Na primeira, podem ser identificadas absorções em 918  $\text{cm}^{-1}$  devido à ligação C–O–C correspondente à lactose; em 900  $\text{cm}^{-1}$  a 980  $\text{cm}^{-1}$  correspondente a melatonina; entre 970  $\text{cm}^{-1}$  a 1200  $\text{cm}^{-1}$  devido à ligação P–O–C + PO<sub>2</sub> correspondente aos fosfolipídeos; 1060  $\text{cm}^{-1}$

a  $1100\text{ cm}^{-1}$  devido a ligação O= alongamento P–O, em  $1230\text{ cm}^{-1}$  a  $1300\text{ cm}^{-1}$  devido grupamento amida III,  $1520\text{ cm}^{-1}$  a  $1560\text{ cm}^{-1}$  devido a flexão N–H e estiramento C–N, ambos correspondentes à caseína; em  $1400\text{ cm}^{-1}$  a  $1477\text{ cm}^{-1}$  devido um trecho C–H correspondente aos lipídeos e em  $1520\text{ cm}^{-1}$  a  $1564\text{ cm}^{-1}$  correspondente a proteínas. A região de  $2350\text{ cm}^{-1}$  a  $2400\text{ cm}^{-1}$  correspondente a  $\text{CO}_2$ . (PEREIRA *et al.*, 2020).

Já na segunda banda podem ser identificados picos de absorções em  $2800\text{ cm}^{-1}$  a  $2981\text{ cm}^{-1}$  devido ao estiramento C=O correspondente a gorduras e  $2850\text{ cm}^{-1}$  e  $2925\text{ cm}^{-1}$  correspondente aos triglicerídeos. De forma geral, pode-se dizer que tais dados apresentam bandas bem definidas para grupos funcionais que fazem parte da composição do leite e corrobora com o que foi compilado por Pereira *et al.* (2020)

As figuras 20 e 21 representam o resultado obtido pela análise espectroscópica por FT–NIR para a simulação do leite contaminado com doramectina, sendo utilizada como referência a amostra de leite cru controle e as seguintes proporções de doramectina: 15 ppb, 20 ppb, 30 ppb, 40 ppb e 50 ppb, respectivamente. Sendo a figura 21 uma ampliação para fins de visualização.

Figura 20 – Espectro por FT–NIR referente ao leite cru (controle), doramectina no LMR e acima da concentração permitida.

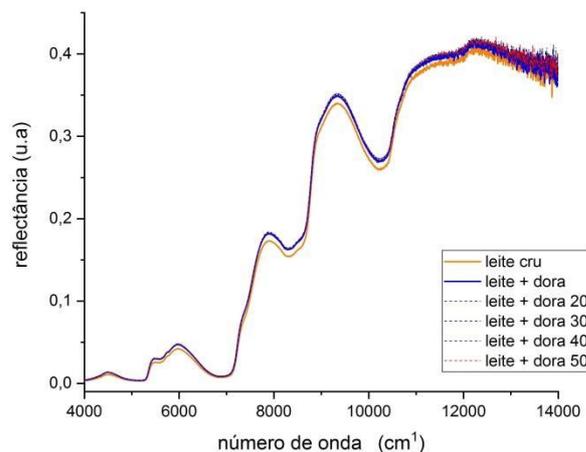
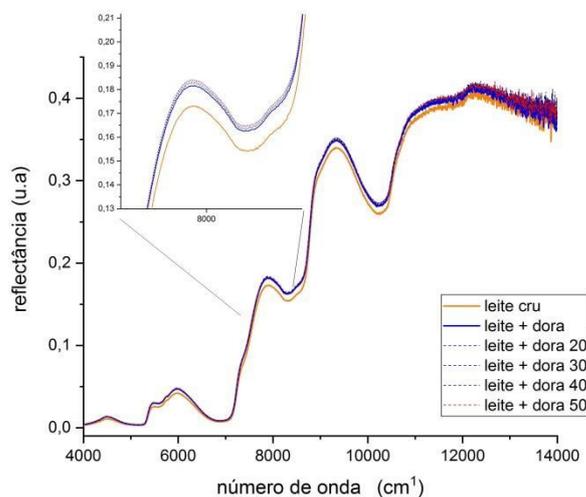


Figura 21 – Espectro por FT–NIR referente ao leite cru (controle), doramectina no LMR e acima da concentração permitida, ampliada em uma determinada região.



Nota-se através da figura 21 um aumento de intensidade entre o leite cru e a doramectina, bem como o aumento entre as concentrações de doramectina. Observa-se que o pico de absorção mais influente ocorreu na banda de 8000 cm<sup>-1</sup> devido à ligação C–H correspondente aos lipídeos. Contudo, também apresenta picos de menor intensidade em 5650 cm<sup>-1</sup> e 6000 cm<sup>-1</sup>; em 5650 cm<sup>-1</sup> correspondente ao 1º tom do trecho C–H em 5555 cm<sup>-1</sup> a 6060 cm<sup>-1</sup> devido a proteínas do soro do leite, em 6000 cm<sup>-1</sup> correspondente a uma ligação C–H em 5600 cm<sup>-1</sup> a 6150 cm<sup>-1</sup> correspondente aos lipídeos (PEREIRA *et al.*, 2020).

As figuras 22 e 23 representam o resultado obtido pela análise espectroscópica por FT–MIR para a simulação do leite contaminado com doramectina, sendo utilizada como referência a amostra de leite cru controle e as seguintes proporções de doramectina: 15 ppb, 8 ppb, 6 ppb, 4 ppb e 2 ppb, respectivamente, ou seja, diminuindo a concentração da doramectina. Sendo a figura 23 uma ampliação para fins de visualização.

Figura 22 – Espectro por FT–MIR referente ao leite cru (controle), doramectina no LMR e abaixo da concentração permitida.

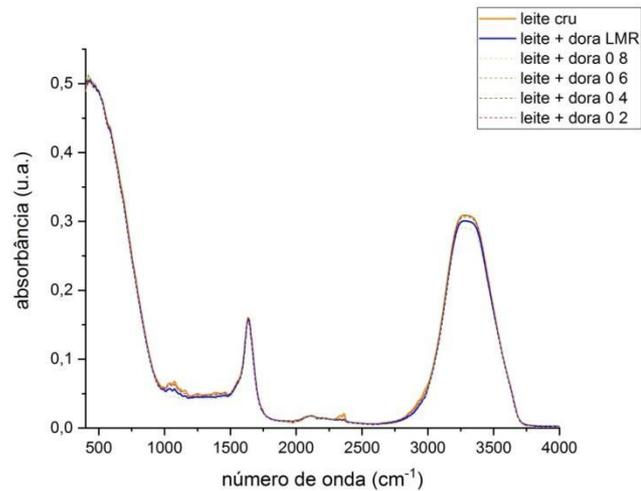
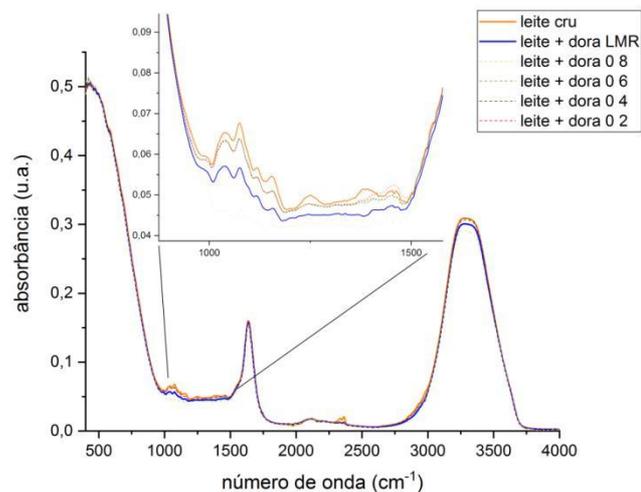


Figura 23 – Espectro por FT–MIR referente ao leite cru (controle), doramectina no LMR e abaixo da concentração permitida, ampliada em uma região.

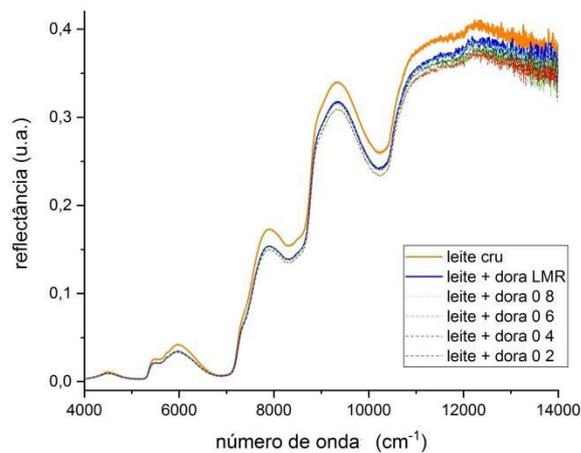


Nota-se através da figura 23 uma diferenciação entre o espectro da amostra de leite cru e da amostra contaminada com doramectina no LMR. Porém, apesar da diminuição entre concentrações de doramectina encontrar-se dentro da faixa esperada, não foi possível diferenciar uma das outras, exceto a concentração com 08 ppb que ficou fora do padrão das demais. Tal fato pode ter ocorrido pela não homogeneização da mistura, no momento da análise experimental. Observa-se que os picos de absorção ocorreram entre as bandas de 1050

$\text{cm}^{-1}$  a  $1450 \text{ cm}^{-1}$ . Entre  $1050 \text{ cm}^{-1}$  a  $1200 \text{ cm}^{-1}$  devido à ligação P–O–C +  $\text{PO}_2$  correspondente aos fosfolipídios;  $1060 \text{ cm}^{-1}$  a  $1100 \text{ cm}^{-1}$  devido à ligação O= alongamento P–O, e em  $1230 \text{ cm}^{-1}$  a  $1300 \text{ cm}^{-1}$  devido grupamento amida III, ambos correspondentes à caseína; em  $1400 \text{ cm}^{-1}$  a  $1450 \text{ cm}^{-1}$  devido um trecho C–H correspondente aos lipídeos. A região de  $2350 \text{ cm}^{-1}$  a  $2400 \text{ cm}^{-1}$  correspondente a  $\text{CO}_2$  (PEREIRA *et al.*, 2020).

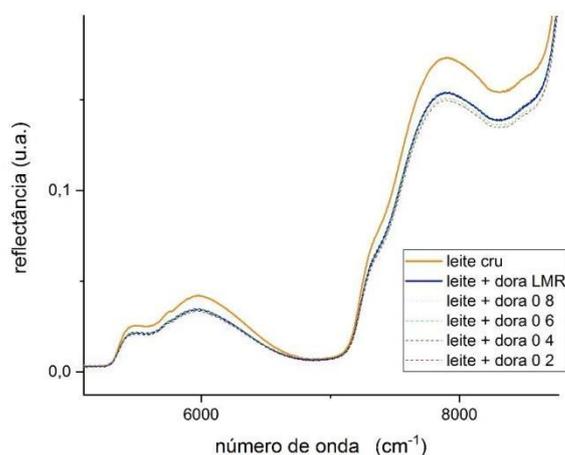
A figura 24 (a) e (b) representa o resultado obtido pela análise espectroscópica por FT–NIR para a simulação do leite contaminado com doramectina, sendo utilizada como referência a amostra de leite cru controle e as seguintes proporções de doramectina: 15 ppb, 08 ppb, 06 ppb, 04 ppb e 02 ppb respectivamente, ou seja, diminuindo a concentração da doramectina. Sendo a figura 24 (b) uma ampliação para fins de visualização.

Figura 24 – Espectro por FT–NIR referente ao leite cru (controle), doramectina no LMR e abaixo da concentração permitida (a)



(a)

Figura 24 – Espectro por FT–NIR referente ao leite cru (controle), doramectina no LMR e abaixo da concentração permitida (b)



(b)

Nota-se que através da figura 24 (a) e (b) a diminuição de intensidade entre o leite cru e a doramectina, bem como a diminuição entre as concentrações de doramectina. Observa-se que o pico de absorção mais influente ocorreu na banda de  $8000\text{ cm}^{-1}$  devido à ligação C–H correspondente aos lipídeos. Contudo, também apresenta picos de menor intensidade em  $5650\text{ cm}^{-1}$  e  $6000\text{ cm}^{-1}$ ; em  $5650\text{ cm}^{-1}$  correspondente ao 1º tom do trecho C–H em  $5555\text{ cm}^{-1}$  a  $6060\text{ cm}^{-1}$  devido a proteínas do soro do leite, em  $6000\text{ cm}^{-1}$  correspondente a uma ligação C–H e em  $5600\text{ cm}^{-1}$  a  $6150\text{ cm}^{-1}$  correspondente aos lipídeos (PEREIRA *et al.*, 2020).

Através dos espectros acima, observa-se que houve diferenciação entre o espectro da amostra de leite cru e da amostra contaminada com doramectina no LMR, bem como com a diminuição entre concentrações de doramectina.

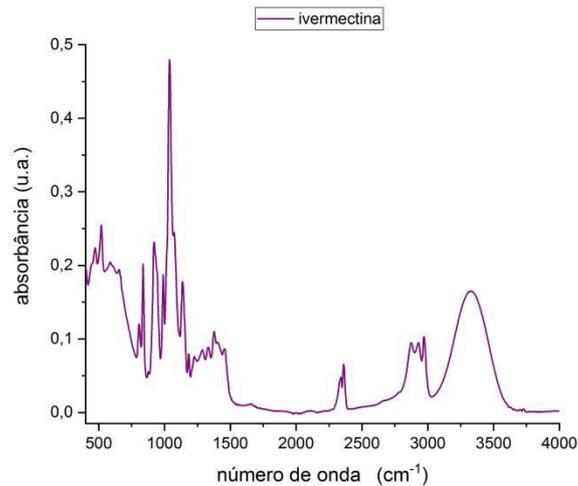
### 5.2.3 Ivermectina

Nesta subseção são apresentados os resultados das análises espectroscópicas por FT–MIR e FT–NIR referentes à amostra de leite cru, medicamento antiparasitário ivermectina puro e a simulação da contaminação do leite cru com ivermectina.

As figuras 25 e 26 apresentam o resultado obtido pela análise espectroscópica por FT–

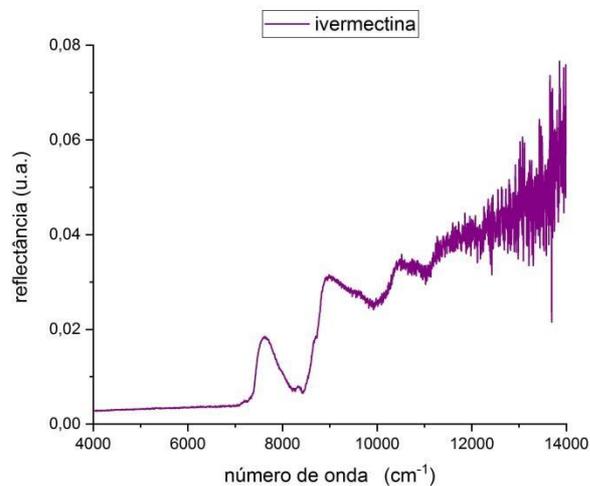
MIR e FT-NIR, respectivamente, da ivermectina pura. Esta análise espectral serviu para acompanhar o comportamento da curva da ivermectina e em qual faixa de número de onda houve variação.

Figura 25 – Espectro por FT-MIR referente ao medicamento antiparasitário ivermectina pura.



Na figura 25 o eixo horizontal representa o número de onda dentro da faixa do infravermelho médio, enquanto que o eixo vertical se refere à absorção. Através deste espectro observa-se que o pico mais influente da ivermectina pura está na banda de  $1186\text{ cm}^{-1}$  devido à ligação C–O–C de éster cíclico (macrocíclico). Contudo, também apresenta picos de menor intensidade em  $690\text{ cm}^{-1}$  devido à ligação C–H;  $980\text{ cm}^{-1}$  devido à ligação CH=CH<sub>2</sub>;  $1100\text{ cm}^{-1}$  devido à ligação C–O–C de éster;  $1380\text{ cm}^{-1}$  devido à ligação C–OH a  $1456\text{ cm}^{-1}$  devido à ligação C–H;  $2350\text{ cm}^{-1}$  a  $2400\text{ cm}^{-1}$  devido à banda de CO<sub>2</sub>;  $2932\text{ cm}^{-1}$  devido à ligação CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub> a  $2964\text{ cm}^{-1}$  devido a ligação C–H; e  $3482\text{ cm}^{-1}$  devido a ligação O–H (BARBOSA, 2013).

Figura 26 – Espectro por FT–NIR referente ao medicamento antiparasitário ivermectina pura.



Na figura 26 o eixo horizontal representa o número de onda dentro da faixa do infravermelho próximo, enquanto que o eixo vertical se refere à reflectância. Através deste espectro observa-se que as bandas mais influentes da ivermectina pura estão nas bandas de  $7750\text{ cm}^{-1}$  e  $9000\text{ cm}^{-1}$ , ambas devido a ligações C–H (BARBOSA, 2013).

As figuras 27 e 28 representam o resultado obtido pela análise espectroscópica por FT–MIR para a simulação do leite contaminado com ivermectina, sendo utilizada como referência a amostra de leite cru controle e as seguintes proporções de ivermectina: 10 ppb, 08 ppb, 06 ppb, 04 ppb e 02 ppb, respectivamente. Sendo a figura 28 (a) e (b) uma ampliação para fins de visualização.

Figura 27 – Espectro por FT–MIR referente ao leite cru (controle), ivermectina no LMR e abaixo da concentração permitida.

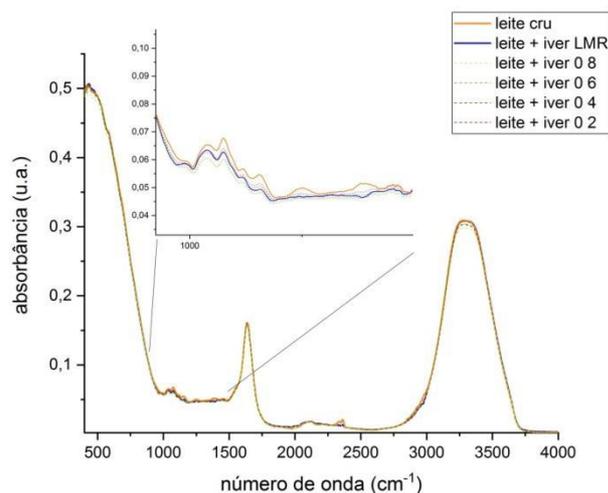
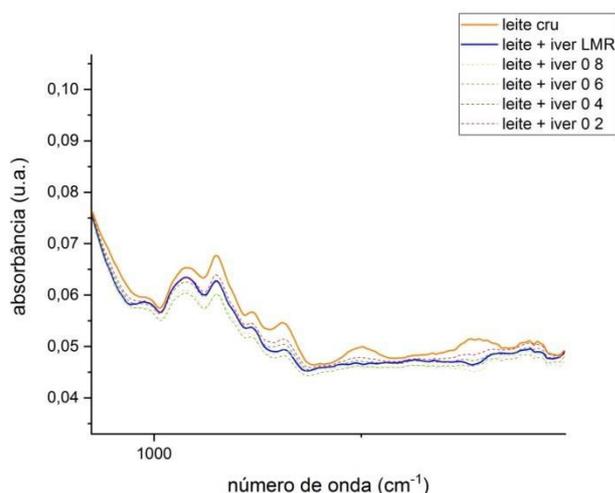


Figura 28 – Espectro por FT–MIR referente ao leite cru (controle), ivermectina no LMR e abaixo da concentração permitida ampliada (a)

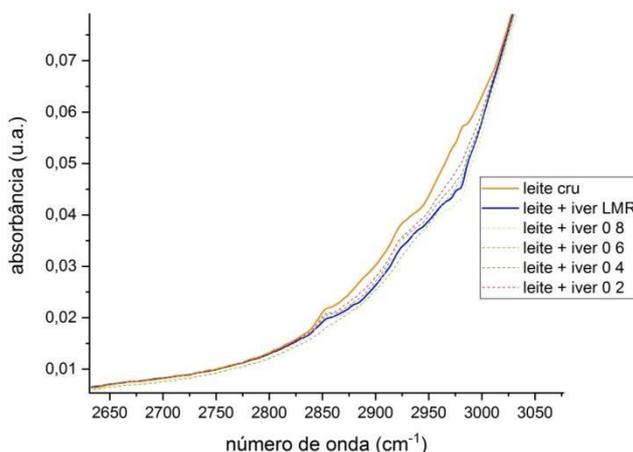


(a)

Nota-se através da figura 28 (a) uma diminuição de intensidade entre o leite cru e a ivermectina, bem como a diminuição entre as concentrações de ivermectina. Observa-se que os picos de absorção ocorreram entre as bandas de  $918\text{ cm}^{-1}$  a  $1477\text{ cm}^{-1}$ . Podem ser identificadas absorções em  $918\text{ cm}^{-1}$  devido à ligação C–O–C correspondente à lactose; em  $900\text{ cm}^{-1}$  a  $980\text{ cm}^{-1}$  correspondente a melatonina; entre  $970\text{ cm}^{-1}$  a  $1200\text{ cm}^{-1}$  devido a ligação P–O–C +  $\text{PO}_2$  correspondente aos fosfolipídeos;  $1060\text{ cm}^{-1}$  a  $1100\text{ cm}^{-1}$  devido a ligação O= alongamento P–O, em  $1230\text{ cm}^{-1}$  a  $1300\text{ cm}^{-1}$  devido grupamento amida III, ambos correspondentes à caseína; e em  $1400\text{ cm}^{-1}$  a  $1477\text{ cm}^{-1}$  devido um trecho C–H correspondente aos lipídeos (PEREIRA *et al.*, 2020).

É possível observar através deste espectro uma diferenciação entre o espectro da amostra de leite cru e da amostra contaminada com ivermectina no LMR, bem como com a diminuição entre concentrações de ivermectina. Contudo, a separação das concentrações não ocorreu da forma esperada, ou seja, entre a amostra de leite cru e leite cru com ivermectina no LMR.

Figura 28 – Espectro por FT–MIR referente ao leite cru (controle), ivermectina no LMR e abaixo da concentração permitida ampliada (b)



(b)

Nota-se através da figura 28 (b) uma diminuição de intensidade entre o leite cru e a ivermectina, bem como a diminuição entre as concentrações de ivermectina. Observa-se que os picos de absorção ocorreram entre as bandas de  $2800\text{ cm}^{-1}$  a  $2981\text{ cm}^{-1}$  devido ao estiramento C=O correspondente a gorduras e  $2850\text{ cm}^{-1}$  e  $2925\text{ cm}^{-1}$  correspondente aos triglicerídeos (PEREIRA *et al.*, 2020).

É possível observar através da figura 28 (a) e (b) uma diferenciação entre o espectro da amostra de leite cru e da amostra contaminada com ivermectina no LMR, bem como com a diminuição entre concentrações de ivermectina. Contudo, enquanto as concentrações com 02 e 04 ppb mostram-se presentes entre a amostra de leite cru e o leite cru com ivermectina no LMR, as concentrações com 06 e 08 ppb tenderam a ficar tão próximas do LMR que a separação destas não ocorreu da forma esperada, ou seja, entre a amostra de leite cru e leite cru com ivermectina no LMR.

Alguns fatores podem ter influenciado para este resultado, tais como: erro experimental, erro na diluição das concentrações e a não homogeneidade da mistura leite mais medicamento. Em todo o experimento há possibilidade de acontecer erros e embora o experimento tenha sido realizado com acuidade, não podemos descartar tal hipótese. Contudo, descarta-se a possibilidade de erro na preparação e diluição das concentrações, pois como

será visto mais adiante, figura 30, as concentrações menores que o LMR ficaram entre as amostras de leite cru e/ou próximas do LMR, mesmo se tratando de um equipamento com uma sensibilidade menor para este tipo de amostra, quando comparado ao FT-MIR (LUIZ, 2020). A hipótese mais provável é que não tenha ocorrido a total homogeneidade da diluição do medicamento adicionado ao leite, de modo que, ao coletar e pipetar determinado volume no cristal ATR pode ser que tenha selecionado concentrações diferentes daquelas supostamente diluídas. Acredita-se que esta última hipótese seja mais provável porque foi retirada uma fração maior do volume total desta diluição para ser analisada no FT-NIR e esta apresentou resultados mais próximos do esperado.

A figura 29 e 30 representa o resultado obtido pela análise espectroscópica por FT-NIR para a simulação do leite contaminado com ivermectina, sendo utilizada como referência a amostra de leite cru controle e as seguintes proporções de ivermectina: 10 ppb, 08 ppb, 06 ppb, 04 ppb e 02 ppb respectivamente, ou seja, diminuindo a concentração da ivermectina. Sendo a figura 30 uma ampliação para fins de visualização.

Figura 29 – Espectro por FT-NIR referente ao leite cru (controle), ivermectina no LMR e abaixo da concentração permitida.

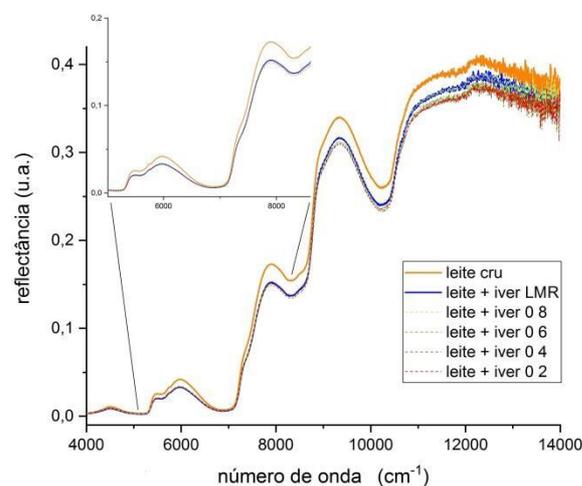
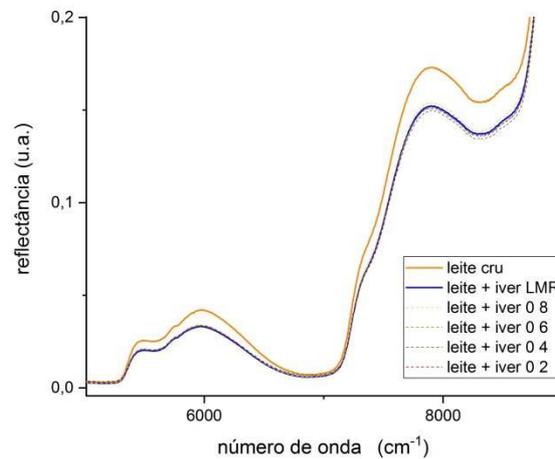


Figura 30 – Espectro por FT–NIR referente ao leite cru (controle), ivermectina no LMR e abaixo da concentração permitida ampliada.



Nota-se através da figura 30 a diminuição de intensidade entre o leite cru e a ivermectina, bem como a diminuição entre as concentrações de ivermectina. Observa-se que o pico de absorção mais influente ocorreu na banda de 8000  $\text{cm}^{-1}$  devido à ligação C–H correspondente aos lipídeos. Contudo, também apresenta picos de menor intensidade em 5650  $\text{cm}^{-1}$  e 6000  $\text{cm}^{-1}$ ; em 5650  $\text{cm}^{-1}$  correspondente ao 1º tom do trecho C–H em 5555  $\text{cm}^{-1}$  a 6060  $\text{cm}^{-1}$  devido a proteínas do soro do leite, em 6000  $\text{cm}^{-1}$  correspondente a uma ligação C–H e em 5600  $\text{cm}^{-1}$  a 6150  $\text{cm}^{-1}$  correspondente aos lipídeos (PEREIRA *et al.*, 2020).

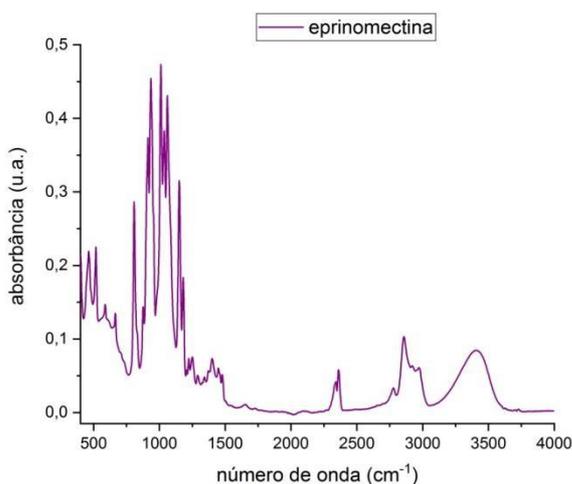
Através dos espectros acima, observa-se que houve diferenciação entre o espectro da amostra de leite cru e da amostra contaminada com ivermectina no LMR, bem como com a diminuição entre concentrações de ivermectina.

### 5.2.4 Eprinomectina

Nesta subsecção são apresentados os resultados das análises espectroscópicas por FT-MIR e FT-NIR referentes à amostra de leite cru, medicamento antiparasitário eprinomectina puro e a simulação da contaminação do leite cru com eprinomectina.

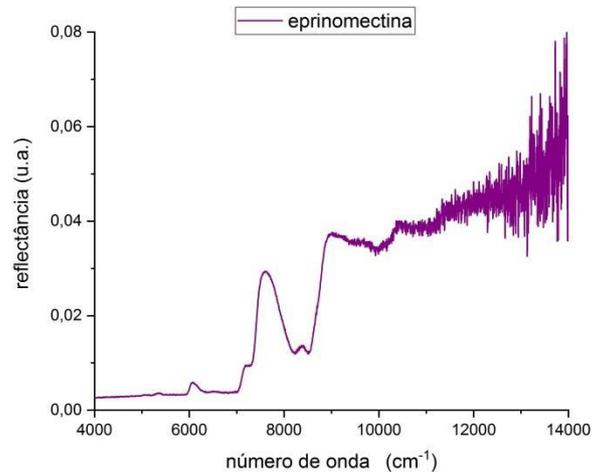
As figuras 31 e 32 apresentam o resultado obtido pela análise espectroscópica por FT-MIR e FT-NIR, respectivamente, da eprinomectina pura. Esta análise espectral serviu para acompanhar o comportamento da curva da eprinomectina e em qual faixa de número de onda havia variação.

Figura 31 – Espectro por FT-MIR referente ao medicamento antiparasitário eprinomectina pura.



Na figura 31 o eixo horizontal representa o número de onda dentro da faixa do infravermelho médio, enquanto que o eixo vertical se refere à absorção. Através deste espectro observa-se que o pico mais influente da eprinomectina pura está na banda de 960  $\text{cm}^{-1}$  e 970  $\text{cm}^{-1}$ , ambas devido à ligação  $\text{CH}=\text{CH}$ ; 1160  $\text{cm}^{-1}$  devido à ligação  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  de éster cíclico (macrocíclico). Contudo, também apresenta picos de menor intensidade em 1163  $\text{cm}^{-1}$  a 1275  $\text{cm}^{-1}$  devido à ligação  $\text{C}-\text{N}$  alifático; 1380  $\text{cm}^{-1}$  devido à ligação  $\text{C}-\text{OH}$  a 1456  $\text{cm}^{-1}$  devido à ligação  $\text{C}-\text{H}$ ; 1660  $\text{cm}^{-1}$  devido à ligação  $\text{C}=\text{O}$  de amidas; 2350  $\text{cm}^{-1}$  a 2400  $\text{cm}^{-1}$  devido à banda de  $\text{CO}_2$ ; 2932  $\text{cm}^{-1}$  devido à ligação  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  a 2964  $\text{cm}^{-1}$  devido a ligação  $\text{C}-\text{H}$ ; e 3451  $\text{cm}^{-1}$  devido a ligação  $\text{O}-\text{H}$  (BARBOSA, 2013).

Figura 32 – Espectro por FT–NIR referente ao medicamento antiparasitário eprinomectina pura.



Na figura 32 o eixo horizontal representa o número de onda dentro da faixa do infravermelho próximo, enquanto que o eixo vertical se refere à reflectância. Através deste espectro observa-se que as bandas mais influentes da eprinomectina pura estão nas bandas de  $6000 \text{ cm}^{-1}$ ,  $7100 \text{ cm}^{-1}$ ,  $7769 \text{ cm}^{-1}$ ,  $8500 \text{ cm}^{-1}$  e  $9000 \text{ cm}^{-1}$ , ambas devido a ligações C–H (BARBOSA, 2013).

As figuras 33 e 34 representam o resultado obtido pela análise espectroscópica por FT–MIR para a simulação do leite contaminado com eprinomectina, sendo utilizada como referência a amostra de leite cru controle e as seguintes proporções de eprinomectina: 20 ppb, 16 ppb, 12 ppb, 08 ppb e 04 ppb, respectivamente. Sendo a figura 34 (a) e (b) uma ampliação para fins de visualização.

Figura 33 – Espectro por FT–MIR referente ao leite cru (controle), eprinomectina no LMR e abaixo da concentração permitida.

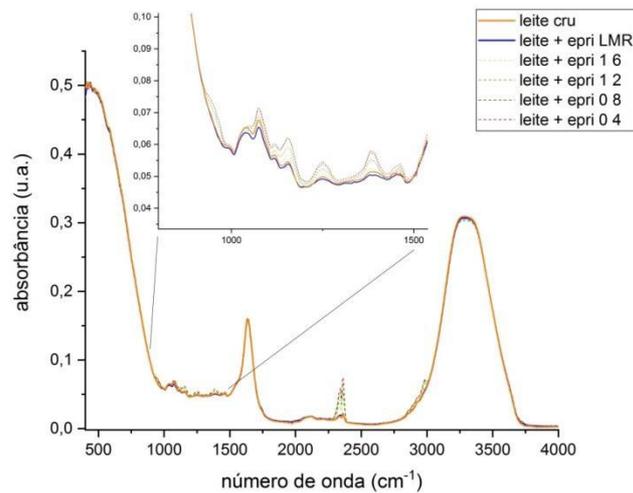
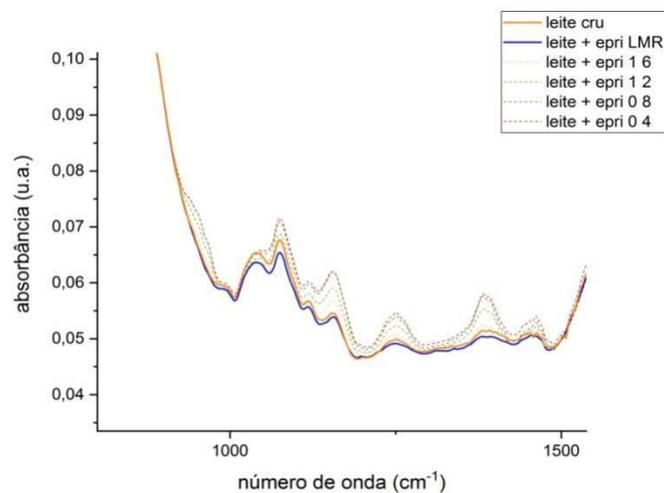


Figura 34 – Espectro por FT–MIR referente ao leite cru (controle), eprinomectina no LMR e abaixo da concentração permitida ampliada (a)

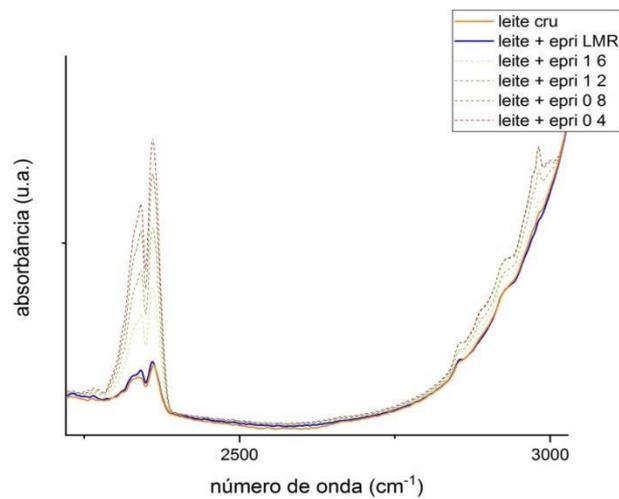


(a)

Nota-se através da figura 34 (a) uma diminuição de intensidade entre o leite cru e o leite adicionado com a eprinomectina no LMR, contudo aumentou a absorbância como a diminuição entre as concentrações de eprinomectina. Observa-se que os picos de absorção ocorreram entre as bandas de  $918\text{ cm}^{-1}$  a  $1477\text{ cm}^{-1}$ . Podem ser identificadas absorções em  $918\text{ cm}^{-1}$  devido à ligação C–O–C correspondente à lactose; em  $900\text{ cm}^{-1}$  a  $980\text{ cm}^{-1}$

correspondente a melatonina; entre  $970\text{ cm}^{-1}$  a  $1200\text{ cm}^{-1}$  devido à ligação P–O–C +  $\text{PO}_2$  correspondente aos fosfolipídeos;  $1060\text{ cm}^{-1}$  a  $1100\text{ cm}^{-1}$  devido à ligação O = alongamento P–O, em  $1230\text{ cm}^{-1}$  a  $1300\text{ cm}^{-1}$  devido grupamento amida III, ambos correspondentes à caseína; e em  $1400\text{ cm}^{-1}$  a  $1477\text{ cm}^{-1}$  devido um trecho C–H correspondente aos lipídeos (PEREIRA *et al.*, 2020).

Figura 34 – Espectro por FT–MIR referente ao leite cru (controle), eprinomectina no LMR e abaixo da concentração permitida ampliada (b)



(b)

Nota-se através da figura 34 (b) uma diminuição de intensidade entre o leite cru e o leite adicionado com a eprinomectina no LMR, contudo aumentou a absorvância como a diminuição entre as concentrações de eprinomectina. Observa-se que os picos de absorção ocorreram entre as bandas de  $2350\text{ cm}^{-1}$  a  $2400\text{ cm}^{-1}$  correspondente ao  $\text{CO}_2$  e em  $2800\text{ cm}^{-1}$  a  $2981\text{ cm}^{-1}$  devido ao estiramento C=O correspondente a gorduras, e  $2850\text{ cm}^{-1}$  e  $2925\text{ cm}^{-1}$  correspondente aos triglicerídeos (PEREIRA *et al.*, 2020).

É possível observar através dos espectros da figura 34 (a) e (b) uma diferenciação entre o espectro da amostra de leite cru e da amostra contaminada com eprinomectina no LMR, mesmo que pouca, pois estas ficaram bem próximas uma da outra; bem como a diminuição entre concentrações de eprinomectina. Contudo, a separação das concentrações não ocorreu da forma esperada, ou seja, entre a amostra de leite cru e o leite cru adicionado com as concentrações de eprinomectina abaixo do LMR. Contudo, descarta-se a possibilidade de

erro na preparação e diluição das concentrações, pois como será visto mais adiante na figura 36, as concentrações menores que o LMR ficou próxima do LMR, mesmo se tratando de um equipamento com uma sensibilidade menor para este tipo de amostra, quando comparado ao FT-MIR (LUIZ, 2020). Sabe-se que a existência do radical acetilamino na estrutura química da eprinomectina faz com que a mesma apresente como característica a alta hidrossolubilidade, em comparação com outras avermectinas que são altamente lipossolúveis. Sabe-se também, que o leite apresenta majoritariamente em sua composição a água (CRUZ, 2016; MOREIRA, 2016). Sendo assim, a hipótese mais provável é que devido a essas características apresentadas, quanto maior for a concentração da eprinomectina, mais solúvel em água ela estará no meio, fazendo com que o espectro da eprinomectina no LMR fique mais próximo ao do leite cru. Conforme a concentração de eprinomectina vai diminuindo a mesma vai perdendo suas características originais, justificando assim, a separação os espectros com as demais concentrações. Tal fato ocorre, em específico, nas bandas entre  $1230\text{ cm}^{-1}$  a  $1300\text{ cm}^{-1}$  devido ao grupamento amida III, correspondente à caseína; e em  $1400\text{ cm}^{-1}$  a  $1477\text{ cm}^{-1}$  devido um trecho C-H correspondente aos lipídeos onde é observado o aumento da absorbância. Contudo, para confirmar esta hipótese seriam necessários estudos complementares.

As figuras 35 e 36 representam o resultado obtido pela análise espectroscópica por FT-NIR para a simulação do leite contaminado com eprinomectina, sendo utilizada como referência a amostra de leite cru controle e as seguintes proporções de ivermectina: 20 ppb, 16 ppb, 12 ppb, 08 ppb e 02 ppb, respectivamente. Sendo a figura 36 uma ampliação para fins de visualização.

Figura 35 – Espectro por FT-NIR referente ao leite cru (controle), eprinomectina no LMR e abaixo da concentração permitida.

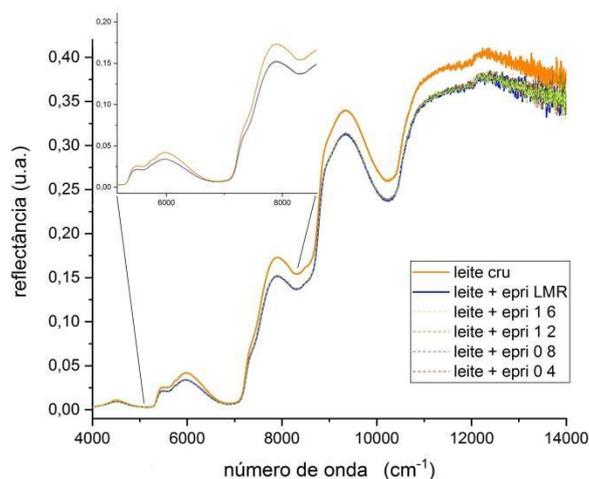
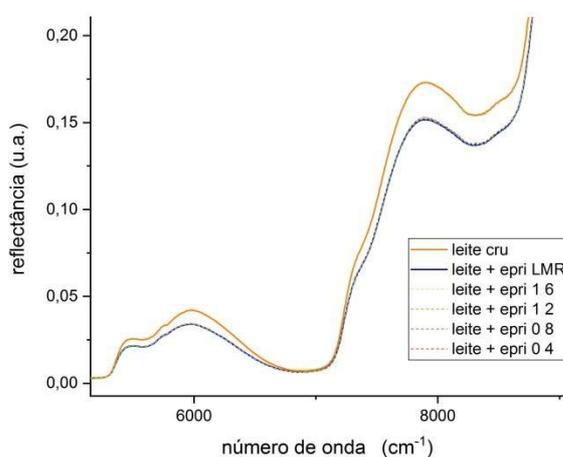


Figura 36 – Espectro por FT–NIR referente ao leite cru (controle), eprinomectina no LMR e abaixo da concentração permitida ampliada.



Nota-se através da figura 36 a diminuição de intensidade entre o leite cru e a eprinomectina, bem como a diminuição entre as concentrações de eprinomectina. Percebe-se que o pico de absorção mais influente ocorreu nas bandas de  $5650\text{ cm}^{-1}$ ,  $6000\text{ cm}^{-1}$  e  $8000\text{ cm}^{-1}$ . Podem ser identificadas absorções em  $5650\text{ cm}^{-1}$  correspondente ao 1º tom do trecho C–H em  $5555\text{ cm}^{-1}$  a  $6060\text{ cm}^{-1}$  devido a proteínas do soro do leite, em  $6000\text{ cm}^{-1}$  correspondente a uma ligação C–H e em  $5600\text{ cm}^{-1}$  a  $6150\text{ cm}^{-1}$  ambas correspondentes aos lipídeos, bem como em  $8000\text{ cm}^{-1}$ , também correspondente a uma ligação C–H de lipídeos (PEREIRA *et al.*, 2020).

Através das figuras 35 e 36 observa-se que não houve diferenciação entre o espectro da amostra de leite cru e da amostra contaminada com eprinomectina no LMR, bem como com a diminuição entre concentrações de eprinomectina.

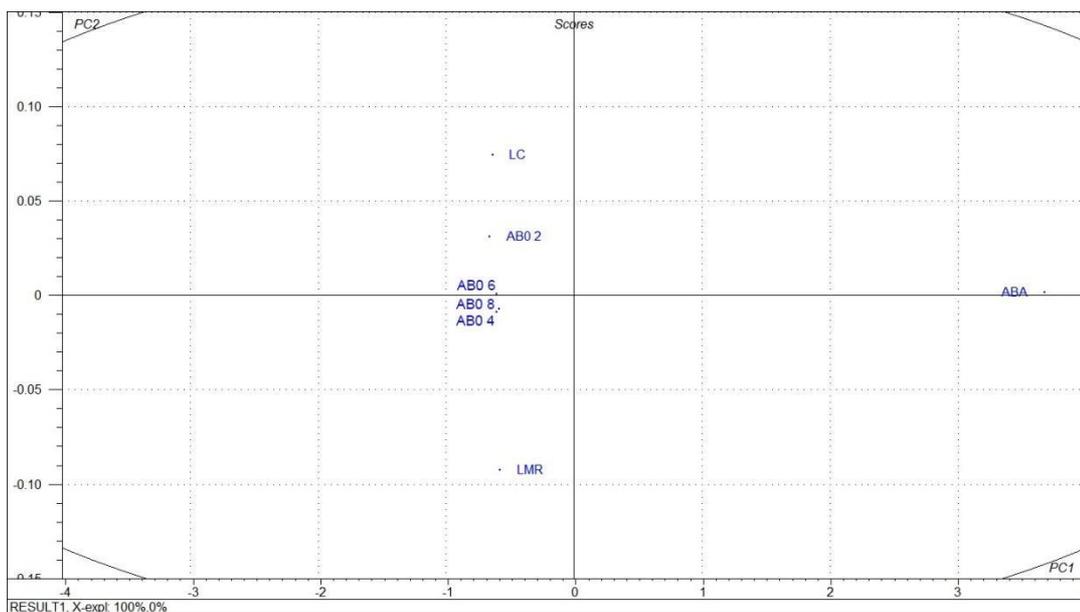
### 5.3 Análises de componentes principais

Nesta subsecção são apresentados todos os gráficos dos *scores* das análises dos componentes principais referentes à amostra de leite cru (controle), medicamentos antiparasitários puros e a simulação da contaminação do leite cru com os medicamentos antiparasitários. Posteriormente serão apresentados os resultados dos mesmos.

#### 5.3.1 Abamectina

Observa-se na figura 37, a análise dos componentes principais referente aos espectros da amostra de leite cru (controle), abamectina pura e as seguintes proporções de abamectina: LMR, 08 ppb, 06 ppb, 04 ppb e 02 ppb, respectivamente, ou seja, diminuindo a concentração da abamectina.

Figura 37 – Análise dos componentes principais referente ao leite cru (controle), abamectina pura, no LMR e abaixo da concentração permitida.

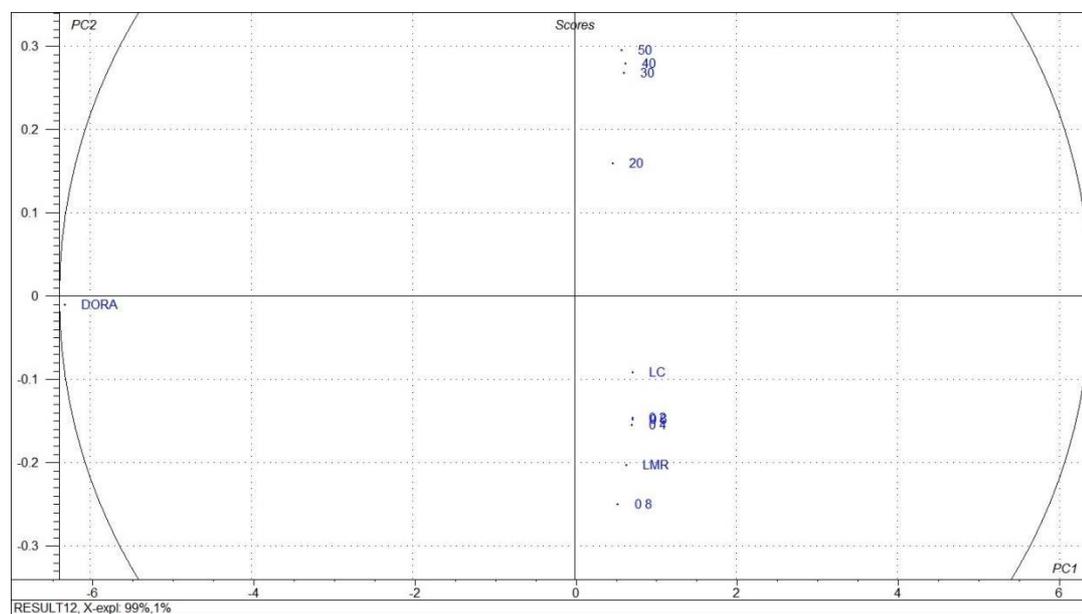


Esta análise permitiu discriminar dois componentes principais, onde o conjunto de dados experimentais permitiu a construção de um gráfico de *scores* (Figura 37). Verificou-se que as componentes PC1 e PC2 descreveram 100% da variação total dos dados. A primeira componente principal (PC1) descreveu 100% da variação total e a segunda componente principal (PC2) 0%.

### 5.3.2 Doramectina

Observa-se na figura 38, a análise dos componentes principais referente aos espectros da amostra de leite cru controle, doramectina pura e as seguintes proporções de doramectina: 50 ppb, 40 ppb, 30 ppb, 20 ppb, LMR, 08 ppb, 06 ppb, 04 ppb e 02 ppb, respectivamente, ou seja, com aumento e diminuição da concentração da doramectina.

Figura 38 – Análise dos componentes principais referente ao leite cru (controle), doramectina pura, no LMR, acima e abaixo da concentração permitida.

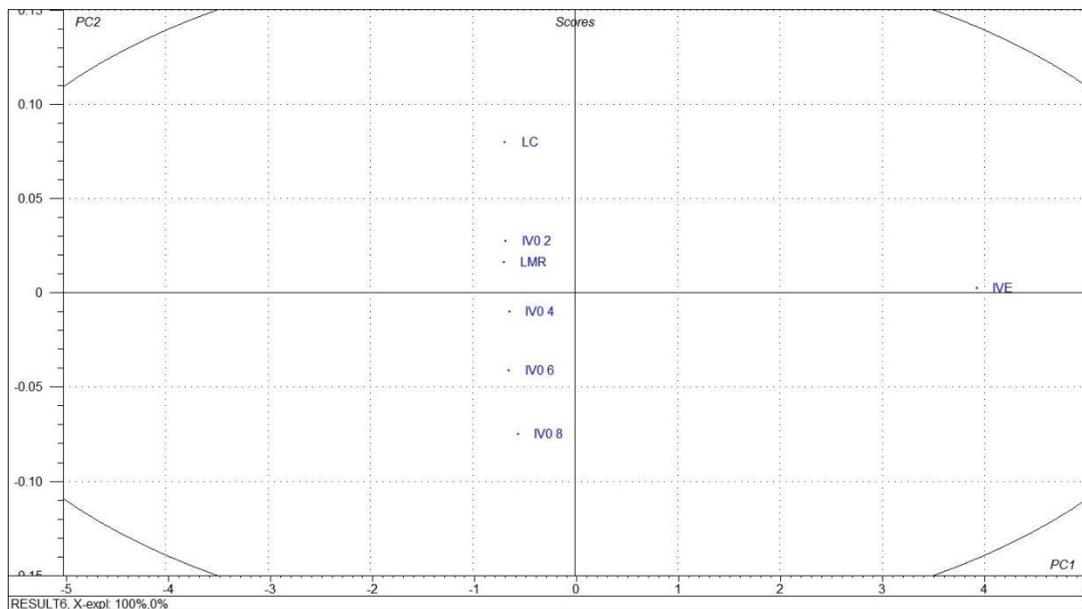


Esta análise permitiu discriminar dois componentes principais, onde o conjunto de dados experimentais permitiu a construção de um gráfico de scores (Figura 38). Verificou-se que as componentes PC1 e PC2 descreveram 100% da variação total dos dados. A primeira componente principal (PC1) descreveu 99% da variação total e a segunda componente principal (PC2) 1%.

### 5.3.3 Ivermectina

Observa-se na figura 39, a análise dos componentes principais referente aos espectros da amostra de leite cru controle, ivermectina pura e as seguintes proporções de ivermectina: LMR, 08 ppb, 06 ppb, 04 ppb e 02 ppb, respectivamente, ou seja, diminuindo a concentração da ivermectina.

Figura 39 – Análise dos componentes principais referente ao leite cru (controle), ivermectina pura, no LMR e abaixo da concentração permitida.

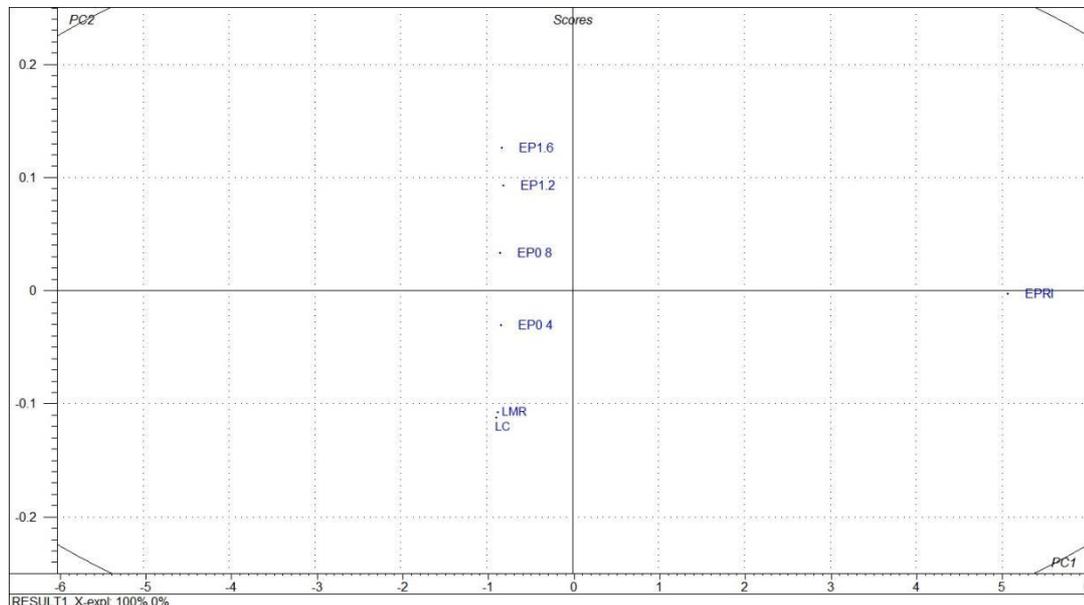


Esta análise permitiu discriminar dois componentes principais, onde o conjunto de dados experimentais permitiu a construção de um gráfico de *scores* (Figura 39). Verificou-se que as componentes PC1 e PC2 descreveram 100% da variação total dos dados. A primeira componente principal (PC1) descreveu 100% da variação total e a segunda componente principal (PC2) 0%.

### 5.3.4 Eprinomectina

Observa-se na figura 40, a análise dos componentes principais referente aos espectros da amostra de leite cru controle, eprinomectina pura e as seguintes proporções de eprinomectina: LMR, 1,6 ppb, 1,2 ppb, 08 ppb e 04 ppb, respectivamente, ou seja, diminuindo a concentração da eprinomectina.

Figura 40 – Análise dos componentes principais referente ao leite cru (controle), eprinomectina pura, no LMR e abaixo da concentração permitida.



Esta análise permitiu discriminar dois componentes principais, onde o conjunto de dados experimentais permitiu a construção de um gráfico de *scores* (Figura 40). Verificou-se que as componentes PC1 e PC2 descreveram 100% da variação total dos dados. A primeira componente principal (PC1) descreveu 100% da variação total e a segunda componente principal (PC2) 0%.

O resultado apresentado pela análise dos componentes principais confirma o que já foi visualizado e concluído por meio da análise dos espectros de absorvância apresentados anteriormente. Através dos gráficos de *scores* na PCA observa-se, que as amostras de leite cru, medicamento antiparasitário puro, bem como as diferentes concentrações dos medicamentos antiparasitários foram discriminadas formando um *cluster* para as amostras de leite juntamente com as amostras que simulam a contaminação do leite cru (ver figura 37, 39 e 40). Na figura 38 dois *clusters* foram formados, o primeiro apresentado no segundo quadrante (superior à direita) representa as amostras de leite contaminadas com medicamento doramectina em concentrações acima do LMR, já o segundo, localizado no terceiro quadrante (inferior à direita) representa as amostras de leite cru, amostras de leite contaminadas no LMR e abaixo dele. Observe que a PCA discriminou as amostras com maiores concentrações daquelas com menores concentrações. As amostras que representam os medicamentos puros (ABA, DORA, IVER e EPRI) não indicam *outliers* (valores isolados), pois elas fazem parte da população de interesse. Em uma primeira análise, as

componentes principais PC1 e PC2, representam a matriz principal da amostra e concentração, respectivamente. De forma geral, a PC1 discriminou a matriz láctea e a matriz dos medicamentos, enquanto que a PC2 discriminou as diferentes concentrações das amostras que simulam a contaminação do leite cru com os medicamentos utilizados neste estudo. É possível observar as diferentes distâncias e posições das amostras e isto está relacionado ao fato de que as concentrações dos medicamentos são diferentes.

## 6. CONCLUSÃO

Resíduos de medicamentos antiparasitários podem ser encontrados no leite e em seus derivados. Desta forma, é extremamente importante assegurar a autenticidade e o monitoramento da qualidade do leite. Assim como nos antimicrobianos, há a necessidade de monitorar os resíduos dos medicamentos antiparasitários com métodos analíticos eficientes, visto estes que são amplamente utilizados e violações são encontradas no PNCRC. Contudo, não há disponível, até o presente momento, kits de detecção ou outra metodologia que seja usada na triagem do leite de maneira rápida e eficaz para esta classe distinta.

Através deste estudo conclui-se que as metodologias baseadas na espectroscopia de infravermelho médio e próximo por Transformada de Fourier para análise de resíduos de medicamentos antiparasitários provam ser métodos analíticos potencialmente favoráveis e com alta sensibilidade para este tipo de análise, além de serem técnicas não destrutivas, que não necessitam de tratamento prévio e fornecem resultados rápidos.

Conclui-se também que a espectroscopia de infravermelho médio é mais significativa para a análise de compostos orgânicos, principalmente em pesquisas com leite, e que a potencialidade da espectroscopia de infravermelho é aumentada pelo seu uso associado à quimiometria, como foi demonstrado pela análise dos componentes principais.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. C. D. F.; CHAGAS, J. D. R.; ÁVILA, L. M.; MARQUES, T. L. P.; MORAES R. F. F.; GOMES, L. P. M.; ROIER, E. C. R.; BAËTA, B. A. Diagnóstico e controle químico das helmintoses em bovinos: revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 11, 2020.
- AMARAL, J. B. Mastite bovina e qualidade do leite nos aspectos legais e forenses— Revisão. **PUBVET**, v. 16, p. 183, 2021.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal – PAMvet. Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo, Relatório 2006–2007. Brasília, 2009.
- BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Viçosa: Ed. UFV, 2013.
- BELOTI, V.; TAMANINI, R.; NERO, L. A.; MOREIRA, M. A. S.; SILVA, L. C. C.; FAGNANI, R.; REIS, K. T. M. G. **Leite: obtenção, inspeção e qualidade**. Editora Plana: Londrina, 2015.
- BORIN, A.; FERRÃO, M. F.; MELLO, C.; MARETTO, D. A.; POPPI, R. J. Least-squares support vector machines and near infrared spectroscopy for quantification of common adulterants in powdered Milk. **Analytica Chimica Acta**, v. 579, n. 1, p. 25–32, 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999. Altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal – PNCR. Diário Oficial da União de 22 de dezembro de 1999, p.13. 1999.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC n.253, de 16 de setembro de 2003. Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinário em Alimentos de Origem Animal – PAMVet. Diário Oficial da União, Brasília: 16 set. 2003.
- BRASIL. Resolução RDC Nº 53, de 2 de outubro De 2012. Ministério Da Saúde, Agência Nacional De Vigilância Sanitária. DOU de 03/10/2012 (nº 192, Seção 1, pág. 47), 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto Nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal, 2017.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. Diário Oficial da União de 30 de novembro de 2018a.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 77, de 26 de novembro de 2018. Diário Oficial da União de 30 de novembro de 2018b.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Limites máximos de resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal – Documento de Base para Discussão Regulatória. Brasília, 2018c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº51, de 19 de dezembro de 2019. Estabelece a lista de limites máximos de resíduos (LMR), ingestão diária aceitável (IDA) e dose de referência aguda (DRfA) para insumos farmacêuticos ativos (IFA) de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal, 2019a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diretoria Colegiada. Resolução RDC Nº 328, de 19 de dezembro de 2019. Dispõe sobre a avaliação do risco à saúde humana de medicamentos veterinários e os métodos de análise para fins de avaliação da conformidade. Diário Oficial da União de 26 de dezembro de 2019b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual Instrutivo do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – PNCRC. Brasília, 2019c.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 05, de 23 de abril de 2019. Fica aprovado o plano de amostragem e os limites de referência para o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal – PNCRC de 2019 para as cadeias de carnes bovina, suína, caprina, ovina, equina, de coelho, de aves e de avestruz, de leite, pescado, mel e ovos. Diário Oficial da União de 25 de abril de 2019. Brasília, 2019d.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual Instrutivo do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – PNCRC. Brasília, 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Resultados do plano nacional de controle de resíduos e contaminantes – PNCRC**. Brasília, 2021a. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/consolidado-resultados-pncrc-2021.pdf>. Acesso em: 15 de julho de 2021.

CARDOSO, T. R. Caracterização Óptica de vidros PZABP dopados com Tm<sup>3+</sup>, Yb<sup>3+</sup> e nanopartículas de ZnTe. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2016, 91p.

CASSOLI, L. D.; SARTORI, B.; ZAMPAR, A.; MACHADO, P. F. An assessment of Fourier transform infrared spectroscopy to identify adulterated raw milk in Brazil. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, p. 480–485, 2011.

CERQUEIRA, M. M. O. P. **Manual – Uso responsável de antimicrobianos na produção de leite**. MSD Saúde Animal, 2020.

COSTA, P. A. **Aplicações da Espectroscopia de Radiação Infravermelha Próxima FT–NIR na Monitorização de Processos Farmacêuticos**. Lisboa, Portugal: Instituto Superior Técnico – Universidade Técnica de Lisboa, 2000.

COSTA, F. M.; NETTO, A. D. P. Desenvolvimento e aplicação de métodos para a determinação de Ivermectina em medicamentos de uso veterinário. **Química Nova**, v. 35, p. 616–622, 2012.

CROPP, T. A.; WILSON, D. J.; REYNOLDS, K. A. Identification of a cyclohexylcarbonyl CoA biosynthetic gene cluster and application in the production of doramectin. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 980–983, 2000.

CRUZ, A. **Química, Bioquímica, Análise Sensorial e Nutrição no Processamento de Leite e Derivados**. Grupo GEN, 2016.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PECUÁRIA E AGRICULTURA. **Produção de leite de qualidade – Módulo 1: conceitos e parâmetros de qualidade do leite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2019.

FAO/WHO, **Dairy Production and Products: Milk and Milk Products**. Disponível em: <http://www.fao.org/dairy-production-products/products/en>. 2017. Acesso em: 08 de abril de 2020.

FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: calibração multivariada. **Revista Química Nova**, n. 22, 1999.

FERRÃO, M. F.; CARVALHO, C. W.; MULLER, E. I. Determinação simultânea dos teores de cinza e proteína em farinha de trigo empregando NIR-PLS e DRIFT-PLS. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, p. 333–340, 2007.

KOWALSKI, Br R.; SEASHOLTZ, M. B. Recent developments in multivariate calibration. **Journal of Chemometrics**, v. 5, n. 3, p. 129–145, 1991.

GRISI, L., LEITE, R.C., MARTINS, J.R.S., BARROS, A.T.M., ANDREOTTI, R., CANÇADO, P.H.D., PEREZ DE LEON, A.A., PEREIRA, J.B. & VILLELA, H.S. 2014. Reassessment of potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Braz. J. Vet. Parasitol.**, 23 (2) : 150–156.

HONGYU, K.; SANDANIELO, V. R. M.; OLIVEIRA JUNIOR, G. J. . Análise de Componentes Principais: resumo teórico, aplicação e interpretação E&S – **Engineering and Science**, 2016.

JOHNSON, R.A.; WICHERN, D.W. Applied multivariate statistical analysis. Madison: Prentice Hall International, 1998. 816p.

LARKIN, P. Infrared and Raman Spectroscopy: Principles and Spectral Interpretation. Elsevier, 2017, ISBN 0128042095, 9780128042090.

LIMA, A.; BAKKER, J. Espectroscopia no infravermelho próximo para a monitorização da perfusão tecidual. **Revista brasileira de terapia intensiva**, v. 23, n. 3, p. 341–351, 2011.

LUIZ, M. M. A. et al. Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1205, n. 1–2, p. 10–16, 2008.

LUIZ, L.C. Espectroscopia óptica para detecção de resíduos de antibióticos em leite. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2019a.

LUIZ, L. C. **Curiosidades em Física das Radiações**. Rio de Janeiro: Editora Multifoco, 2019b.

LUIZ, L. C.; BELL, M. J. V.; ANJOS, V. C. FT–NIR associado a método quimiométrico para discriminar resíduos de antimicrobiano e antiparasitário no leite. *DEMETRA: Alimentação, Nutrição & Saúde*, 2020.

LUO, H.; ZHANG, J.; LIU, F.; QIN, Y. Quick detection of adulterant milk by infrared spectroscopy. *IDF World Summit Shanghai*, n.1, p.1–5, 2006.

McEVOY, J. D. G. **Contamination of animal feedingstuffs as a cause of residues in food: a review of regulatory aspects, incidence and control**. 2002.

Mc MURRY, J. *Química Orgânica*. 7. ed. norteamericana. v.1. v.2. São Paulo: Cengage Learning, p. 1141, 2012

MONTEIRO, S. G. *Parasitologia na medicina veterinária*. 2 e.d. Roca, 2017.

MORGANO, M. A.; FARIA, C. G.; FERRÃO, M. F. Determination of protein in raw coffee for NIR spectroscopy and regression PLS. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, n. 1, p. 25–31, 2005.

MOREIRA, A. M. S.. **Composições Nanoestruturadas de Avermectinas com B–Ciclodextrina: Síntese, Caracterização Físico–Química e Avaliação da Atividade Contra Larvas do *Aedes Aegypti***. 2016.

MUSHTAQ, M.; FEELY, W. F.; SYINTSAKOS, L. R.; WISLOCKI, P. G. Immobility of emamectin benzoate in solids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 44, p. 940–944, 1996.

NETTO, D. P. et al. Survey on the main veterinary medicines use in dairy cattle in the state of Paraná–Brazil. *Acta Scientiarum–Animal Sciences*, v. 27, n. 1, p. 145–151, 2005.

NETO, Benício de Barros; SCARMINIO, Ieda S.; BRUNS, Roy E. 25 anos de quimiometria no Brasil. *Química Nova*, v. 29, n. 6, p. 1401–1406, 2006.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introdução à espectroscopia**. 4 ed. São Paulo: Cengage Learning, 2015.

PEREIRA, C. G.; LUIZ, L. C.; BELL, M. J. V.; ANJOS, V. C. Near and mid infrared spectroscopy to assess milk products quality: A review of recent applications. *Journal of Dairy Research & Technology*, 3: 014, 2020. DOI: 10.24966/DRT–9315/100014

PÉREZ–COGOLLO, L. C.; RODRÍGUEZ–VIVAS, R. I.; BASTO–ESTRELLA, G. S.; REYES–NOVELO, E.; MARTÍNEZ–MORALES, I.; OJEDA–CHI, M. M.; FAVILA, M. E. Toxicidad y efectos adversos de las lactonas macrocíclicas sobre los escarabajos estercoleros: una revisión. *Revista mexicana de Biodiversidad*, 89, p.1293–1314, 2018.

REID, L. M.; WOODCOCK, T.; O'DONNELL, C.; DOWNEY, G. Differentiation of Apple juice samples on the basis of heat treatment and variety using chemometric analysis of MIR and NIR. *Food Research International*, v. 38, p.1109–1115, 2005.

RIBEIRO, R. A. C.; SANTOS, E. A.; MARTINS, O. A.; RAGHIANTE, F. Determinação do período de carência de doramectina a 1% em tecidos bovinos. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, v.14, n.4, p. 1–9, 2020.

ROCA, M.; VILLEGAS, L.; KORTABITARTE, M. L.; ALTHAUS, R. L.; MOLINA, M. P. Effect of heat treatments on stability of lactams in milk. **Journal of Dairy Science**, v.94, n.3, p.1155–1164, 2011.

RODRIGUES, V. S., RODRIGUES, M. H. D.; FIORAVANTE, F. C. R. C., SOUZA, A. B. B., OLIVEIRA, R. O. R. G., REIS, T. S., GARCIA, J. A. S., & FERREIRA, J. L. Eficiência de avermectinas no controle de parasitas gastrintestinais em rebanho comercial na região de Grajaú, Maranhão / Efficacy of avermectines in the control of gastrointestinal parasites in commercial flock in the region of Grajaú, Maranhão, Brazil. *Brazilian Journal of Development*, 6(10), 75936–75948, 2020.

SALA, O. Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho. 2 ed. Ed. Unesp, 2008.

SILVA, E. P.; SOUZA, J. R.; CALDAS, E. D. Resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos. **Química Nova**, v.37, n.1. São Paulo, 2014.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*, 7ª ed.; LTC: Rio de Janeiro, 2012.

SINDAN – Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal. **Mercado Brasil 2017 e Anuário, 2018**. Disponível em: <http://www.sindan.org.br/mercado-brasil-2017/>. Acesso em: 19 de novembro de 2021.

SHENG, C. et al. Determination of main fruits in adulterated nectars by ATR–FTIR spectroscopy combined with multivariate calibration and variable selection methods. **Food Chemistry**, 2018.

SHOOP, W. L.; MROZIK, H.; FISHER, M. H. Structure and activity of avermectins and milbemyctins in animal health. **Veterinary Parasitology**, v. 59, p. 139–156, 1995.

SHOOP, W. L.; EGERTON, J. R.; EARY, C. H.; HAINES, H. W.; MICHAEL, B. F.; MROZIK, H.; FISHER, M. H.; SLAYTON, L.; OSTLIND, D. A.; SKELLY, B. J.; FULTON, R. K.; BARTH, D.; COSTA, S.; GREGORY, L. M.; CAMPBELL, W. C.; SEWARD, R. L.; TURNER, M. J. Eprinomectin: a novel avermectin for use as a topical endectocide for cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 26, n. 2, p. 1237–1242, 1996.

SKOOG, A. D.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. Principles of Instrumental Analysis. Cengage Learning, 2017, ISBN 1305577213, 9781305577213.

SPISSO, B. F.; NÓBREGA, A. W.; MARQUES, M. A. S. Resíduos e contaminantes químicos em alimentos de origem animal no Brasil: histórico, legislação e atuação da vigilância sanitária e demais sistemas regulatórios. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 14, n. 6, p. 2091–2106, 2009.

SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. **Química nova**, v. 35, n. 1, p. 223–229, 2012.

SOUZA, F. A. Avaliação da capacidade carcinogênica do antiparasita ivermectina, pelo teste de detecção de tumor epitelial em células somáticas de *Drosophil melanogaster*. Dissertação (mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Medicina Veterinária, concentração: Sanidade e Produção Animal nos Trópicos. Uberaba, 2015.

SOUZA, C. M.; NICOLAU, E. S.; LAGE, M. E.; MESQUITA, A. J.; COELHO, K. O. Comparação entre três métodos analíticos para determinação de soros em leite cru refrigerado. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.70, n.2, p.606–614, 2018.

TEIXEIRA, L. S. **Métodos para determinação de avermectinas em diferentes matrizes.** 2015. 25f. Monografia (Graduação em Química). Universidade Federal de São João del-Rei, São João Del-Rei, 2015.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite.** 4 ed., Santa Maria. Editora da UFSM, 2010.

VANSCHAIK, G.; LOTEM, M.; SCHUKKEN, Y. H. Trends in somatic cells counts, bacterial counts, and antibiotic residue violations in New York State during 1999–2000. **Journal of Dairy Science**, v.85, n.4, p.782–789, 2002.

VIANA, C. C. R. Caracterização de Fórmulas infantis para Lactentes usando espectroscopia no infravermelho médio. 99 fl. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2018.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. Dairy Science and Technology, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2nd edition, 2006.