

**Universidade Federal de Juiz de Fora**  
**Instituto de Ciências Exatas**  
**Programa de Pós-graduação em Física**



LEANDRO DA CONCEIÇÃO LUIZ

**Espectroscopia óptica para detecção de resíduos de  
antibióticos em leite**

Juiz de Fora  
Janeiro de 2019

LEANDRO DA CONCEIÇÃO LUIZ

**Espectroscopia óptica para detecção de resíduos de  
antibióticos em leite**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Doutor em Física.

Orientadora: Prof. Dra. Maria José Valenzuela Bell

Juiz de Fora  
Janeiro de 2019

LEANDRO DA CONCEIÇÃO LUIZ

**Espectroscopia óptica para detecção de resíduos de  
antibióticos em leite**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Doutor em Física.

Aprovada em 31 de janeiro de 2019.

BANCA EXAMINADORA

---

Professora Doutora Maria José Valenzuela Bell - Orientadora  
Departamento de Física/Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Professor Doutor Virgílio de Carvalho dos Anjos  
Departamento de Física/Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Professora Doutora Zélia Maria Da Costa Ludwig  
Faculdade de Medicina/Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Professor Doutor Leonarde do Nascimento Rodrigues  
Departamento de Física/Universidade Federal de Viçosa

---

Professora Doutora Carla Christine Lange  
Embrapa Gado de Leite

“Não há lugar para a sabedoria onde não há paciência.”

Agostinho de Hipona

## AGRADECIMENTOS

*Ao meu Criador, Àquele que me fortalece, Digno de Toda Honra e Glória. Pela Sua proteção nesta “ponte Rio-Juiz de Fora”. Fazendo este percurso pelo menos 2 vezes por mês, nestes últimos 4 anos e 10 meses, dirigi em busca do conhecimento, cerca de 42800 km, o equivalente a um pouco mais de um volta completa na Terra.*

*Aos meus pais Georgina (in memoriam) e Damião, e também ao meu irmão Adriano (in memoriam), que de muitas maneiras me apoiaram e fizeram acreditar que através da educação eu poderia ter sucesso e ser um cidadão de bem.*

*A Rafaela, com amor.*

*Ao DEFIS/UFJF, pelo empenho na minha formação, aos docentes, e principalmente, ao Sr Domingos Souza Barros de Oliveira Lopes, pelo apoio administrativo. Aos colegas Geraldo, Nayara, Ramon, Rodrigo, Roney, Thiago e Thamiris.*

*Aos meus orientadores Maria José Valenzuela Bell e Virgílio de Carvalho dos Anjos, que me acolheram de braços abertos, acreditaram em mim, e ainda aumentaram exponencialmente os meus conhecimentos em diversas áreas da Física e da vida.*

*Aos professores Marco Antônio Moreira Furtado e Paulo Henrique Fonseca da Silva, pelas dicas que foram fundamentais para o enriquecimento deste trabalho.*

*Aos colegas Jefferson e Leonarde que me apresentaram o DEFIS/UFJF, por meio do II Workshop da Pós-Graduação em Física da UFJF, e me acolheram nos primeiros meses de UFJF.*

*A Faculdade Bezerra de Araújo (FABA/RJ), que por inúmeras vezes, compreendeu e organizou os dias e horários em que leciono, para assim eu poder conciliar o meu trabalho no Rio de Janeiro com o doutorado em Juiz de Fora.*

*E a todos que, de alguma forma, tornaram possível o desenvolvimento e realização deste trabalho.*

## RESUMO

Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO/OMS), o leite e seus derivados são os alimentos mais consumidos no mundo, com 6 bilhões de consumidores. Este estudo foca na detecção de resíduos de antimicrobianos em leite através da Espectroscopia no Infravermelho Próximo com Transformada de Fourier (FT-NIR). Amostras simuladas e real foram consideradas. As amostras simuladas foram feitas adicionando os medicamentos veterinários nas amostras de leites nas seguintes concentrações: enrofloxacino 100 µg/L, oxitetraciclina 100 µg/L, e penicilina 4 µg/L. O anti-inflamatório diclofenaco sódico também foi usado. A ferramenta estatística usada para discriminar as amostras foi a Análise de Componentes Principais (PCA). Nossos resultados mostraram que, com esse procedimento experimental, é possível discriminar diferentes tipos de medicamentos dissolvidos em leite. Contudo, a metodologia foi capaz de detectar amostra real de leite em diferentes dias após a administração de cloridrato de ceftiofur que é em princípio um antimicrobiano de carência zero. A metodologia provou ser rápida e precisa dentro dos limites máximo de resíduos adotados pela Agência Europeia de Produtos Medicinais e pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento e Pecuária do Brasil.

Palavras-chaves: Leite. Infravermelho. Antibiótico. 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 food in the world with 6 billion consumers. This study focuses on detection of antimicrobial residues in milk through Fourier transform near-infrared spectroscopy. Simulated and real samples were considered. The simulated ones take into account veterinary drugs added in milk samples in the following concentrations: enrofloxacin 100  $\mu\text{g/L}$ , oxitetracycline 100  $\mu\text{g/L}$ , and penicillin 4  $\mu\text{g/L}$ . The anti-inflammatory sodium diclofenac too was used. The statistical tool used to discriminate the samples was the principal component analysis (PCA). Our results show that, with this experimental procedure, it is possible to discriminate different types of antimicrobials dissolved in milk. Moreover, the methodology was able to detect real sample milked on different days after the injection of ceftiofur hydrochloride which is in principle a zero grace period antimicrobial. The methodology proved to be fast and accurate within the maximum residue limits allowed by European Agency for Medicinal Products and Ministry of Agriculture Livestock and Food Supply from Brazil.

Keywords: Milk. Infrared. Antibiotics. Principal Component Analysis.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 MOTIVAÇÃO E FINALIDADE</b> .....	17
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	19
<b>4 CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS</b> .....	36
4.1 REGULAMENTAÇÃO PARA O LEITE.....	36
4.2 A OPERAÇÃO OURO BRANCO .....	37
4.3 MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS DE USO MAIS COMUNS EM BOVINOS.....	38
4.3.1 Grupos de Antimicrobianos de Uso Comum .....	39
4.3.1.1 <i>Aminoglicosídeo</i> .....	39
4.3.1.2 <i>Anfenicóis</i> .....	40
4.3.1.3 <i>Beta-lactâmicos</i> .....	41
4.3.1.4 <i>Macrolídeos</i> .....	42
4.3.1.5 <i>Sulfonamidas</i> .....	42
4.3.1.6 <i>Tetraciclinas</i> .....	42
4.3.1.7 <i>Enrofloxacino</i> .....	44
4.3.1.8 <i>Cloridrato de Cefotiofur</i> .....	44
4.4 LIMITE MÁXIMO DE RESÍDUOS (LMR) .....	45
4.5 O INFRAVERMELHO .....	47
4.5.1 Herschel e a descoberta do infravermelho .....	47
4.5.2 As regiões do infravermelho .....	48
4.5.3 A espectroscopia no infravermelho .....	48
4.5.3.1 <i>A espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier (FT-NIR)</i> ....	50
4.6 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) .....	53
4.7 ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA (MEV/EDS) .....	54
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	56
5.1 AMOSTRAS DE LEITE .....	56
5.2 MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS .....	57
5.3 ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS.....	58

5.4 SIMULANDO A CONTAMINAÇÃO .....	58
5.4.1 Experimentos preliminares .....	58
5.4.2 Simulando a contaminação no LMR .....	59
5.4.3 Amostras de uma situação real .....	60
5.4.4 Análise usando o Método FT-NIR .....	60
5.4.5 Análise usando o Método MEV/EDS .....	61
5.4.6. Análise Estatística dos Dados .....	61
<b>6 RESULTADOS</b> .....	<b>62</b>
6.1 EXPERIMENTO PRELIMINARES .....	62
6.1.1 Diclofenaco Sódico .....	63
6.1.2 Penicilina G e Enrofloxacino .....	65
6.2 Simulando a contaminação no LMR .....	66
6.3 Amostras contaminadas com cloridrato de ceftiofur em situação real .....	71
6.4 Análise de Componentes Principais .....	72
6.4.1 PCA referentes às medidas preliminares .....	73
6.4.2 PCA referentes às medidas das amostras simuladas .....	75
6.4.3 PCA referentes às medidas das amostras de uma situação real .....	78
6.5 Análise multielementar por meio do MEV/EDS .....	79
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	<b>84</b>
<b>8 PERSPECTIVAS</b> .....	<b>85</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>86</b>

## 1 INTRODUÇÃO

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, com 6 bilhões de consumidores. O leite contém proteínas, carboidratos, lipídeos, minerais e vitaminas, que realizam funções bioquímicas e nutricionais importantes (JENSEN, 1995). O leite mais comercializado no Brasil é o oriundo de vacas, este é produzido na glândula mamária da vaca, úbere. Estas glândulas são compostas por um grande número de células responsáveis pela secreção do leite a partir de elementos que passam do sangue para as células especializadas nas glândulas (BRITO, 2005)(RIBEIRO). No entanto, também é comum o comércio de leites de cabras e ovelhas. A tabela a seguir faz uma comparação da composição dos leites: bovino, humano, de cabra e de ovelha.

Tabela 1 – Comparação dos componentes, em percentual, dos leites bovino humano, de cabra e de ovelha.

<b>Componente</b>	<b>Bovino</b>	<b>Humano</b>	<b>Cabra</b>	<b>Ovelha</b>
Proteína	3,4	1,0	2,9	5,5
Caseína	2,8	0,4	2,5	4,6
Gordura	3,7	3,8	4,5	7,5
Lactose	4,6	7,0	4,1	4,8
Cinza	0,7	0,2	0,8	1,0

Fonte: JENNESS, 1974 *apud* JENSEN, 1995.

O leite que não é oriundo de vacas, vem sempre acompanhado de outro nome referindo àquela espécie de procedência, por exemplo: leite de cabra, leite de búfala, etc. Assim, a partir deste momento, neste trabalho o leite bovino ou de vaca, será apresentado apenas como leite.

O leite é um alimento que apresenta uma complexidade em sua composição. Mesmo com todo conhecimento adquirido ao longo de décadas, acerca dos constituintes do leite, atualmente, ainda não se tem conhecimento total da sua composição. Sendo assim, o leite contém, principalmente, em sua composição cerca de 87,1 % de água, 4,0 % de gordura, 3,3 % de proteínas, 4,6 % de lactose e 0,7 % de cinzas. A composição básica de proteínas presentes no leite são: a caseína em 78,3 %, a proteína do soro (whey protein) 19 % e outras totalizando 2,7 % (WALSTRA, 2006)(TAVANTI, 2009). No leite, ainda há peptídeos que realizam funções importantes no nosso corpo. Atualmente, a proteína do soro é muito

utilizado por atletas para fins de ganho muscular. No entanto, esta proteína, durante décadas, era a parte do leite dispensada pela indústria de alimentos. Somente a partir da década de 70, os cientistas passaram a estudar as propriedades destas proteínas. Não somente os atletas, mas também praticantes de atividades físicas, pessoas fisicamente ativas e portadores de doenças utilizam esta proteína para usufruírem de seus benefícios. Estudos recentes sustentam a teoria de que as proteínas do leite, incluindo as do soro, além de seu alto valor biológico, possuem peptídeos bioativos (PBAs), que atuam como: agentes antimicrobianos, anti-hipertensivos, reguladores da função imune, fatores de crescimento, etc. A constituição das proteínas e peptídeos do soro do leite, com seus respectivos resíduos de aminoácidos são: beta-lactoglobulina (BLG) (162 aminoácidos), alfa-lactoalbumina (ALA) (123 de aminoácidos), albumina do soro bovino (BSA) (582 aminoácidos), imunoglobulinas (Ig's), glicomacropéptídeos (GMP) (64 aminoácidos) (ALMEIDA, 2014)(HARAGUCHI, 2006).

Os sais minerais encontrados em quantidades significativas no leite são: o cálcio (Ca) e fósforo (P), que estão associados às estruturas das micelas de caseína, cloro (Cl), potássio (K), sódio (Na) e magnésio (Mg). Já em pequenas quantidades estão o ferro (Fe), alumínio (Al), bromo (Br), zinco (Zn) e manganês (Mn) (NEVES)(MORZELLE, 2016).

A lactose é o principal carboidrato do leite. Constituída por dois monossacarídeos, glicose e galactose, ela carrega funções nutricionais importantes, tais como fornecer 16,8 kJ/g de energia para a pessoa (FAO, 2003)(PEREIRA, 2012). Entretanto, deve-se ter atenção para aqueles indivíduos que têm restrição deste dissacarídeo em sua dieta, devido a sua intolerância.

Pelo fato de apresentar em sua composição diversos componentes acima citados, principalmente o cálcio, o leite é considerado uma das mais completas fontes de nutrientes para os seres humanos (PONTES NETTO, 2005). Pode-se encontrar em alimentos naturais, substâncias essenciais para um equilíbrio nutricional do homem, o cálcio, por exemplo, está presente no leite e seus derivados, além de folhas verdes. No entanto, é no leite que se tem maior biodisponibilidade. A biodisponibilidade está relacionada com a capacidade que o alimento tem de ser absorvido e utilizado no organismo. Uma porção de leite corresponde a 182 mL. Para substituir esta porção seriam necessárias três porções e meia de couve, quatro porções e meia de brócolis, duas porções e meia de repolho e quinze porções e meia de espinafre (SHILS & MOSH, 2002 *apud* ALMEIDA, 2011). O consumo de cálcio e ferro deve ser avaliado cuidadosamente, uma vez que estes nutrientes competem pelo mesmo sítio de

absorção, podendo interferir na absorção um do outro. A FAO/OMS recomenda a ingestão diária de cálcio de acordo com a faixa etária e necessidade do indivíduo, resultando, em média, numa ingestão de 1000 *mg/dia*. Estudos têm observado que uma ingestão adequada de cálcio nas faixas de maior necessidade previne doenças como: osteoporose, hipertensão, obesidade e câncer de cólon, e que a sua ausência na alimentação implica em uma diminuição da ingestão de cálcio, podendo comprometer a formação e/ou manutenção da massa óssea (ALMEIDA, 2011)(PEREIRA, 2009).

A adulteração do leite é uma prática antiga. No século XIX, a comida era frequentemente adulterada, e o leite, devido sua brancura densa, permitia a adição de água sem que alguém percebesse. Em 1870, foi verificado, em Londres, leite com cerca de 25 % de água adicionada (NATURE, 2011). No entanto, atualmente, ainda têm sido reportados adulterações no leite, principalmente em países em desenvolvimento, tais como Paquistão, Brasil, Índia e China (HANDFORD, 2016). Em 2007, no Brasil, a Polícia Federal desvendou um gigantesco esquema de fraudes na distribuição de leite UHT, constatando que 1/3 do leite consumido no Brasil não passava por fiscalização (LUIZ, 2014). Geralmente, as adulterações visam aumentar o volume e a validade do leite. No entanto, um outro problema desperta preocupação, o da contaminação do leite por medicamentos veterinários. Resíduos destes podem estar presentes, se o leite for ordenhado dentro do período de carência, e isto pode causar danos à saúde do consumidor (BRITO, 2005)(PONTES NETTO, 2005). O leite contaminado por medicamentos é considerado adulterado e impróprio para o consumo (FORSYTHE, 2002)(PONTES NETTO, 2005). Quando suas concentrações estão acima do limite máximo de resíduos (LMR), podem causar problemas de saúde, danos ao consumidor que vão desde reações alérgicas até resistência bacteriana. Um estudo realizado por Van Boeckel et al. mostrou que, entre 2000 e 2010, o consumo de antibióticos pela população mundial teve um aumento de 36 % e isto contribuiu para o surgimento de bactérias resistentes às drogas, as chamadas “super-bactérias”. Deste total, 76 % é devido, principalmente, aos países que compõem os BRICS (Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul). Parte deste aumento é devido a ingestão de produtos de origem animal contaminados com antibióticos (VAN BOECHEL, 2014). As drogas e seus metabólitos encontrados em tecidos comestíveis e/ou em leite de animais após o uso de medicação com drogas específicas é definido como resíduos de medicamentos. A presença de resíduos de antibióticos no leite tem sido, nos últimos anos, um dos maiores desafios impostos aos órgãos responsáveis pela saúde pública e

à indústria de alimentos no mundo. Tal presença é preocupante, pois podem apresentar consequências para a saúde humana, tais como reações alérgicas e tóxicas (BRITO, 2005) (PONTES NETTO, 2005). O leite contaminado por substâncias químicas, como os fármacos, é considerado adulterado e impróprio para o consumo (FORSYTHE, 2002 *apud* PONTES NETTO, 2005). Nas boas práticas em indústrias com boas reputações, utiliza-se dos kits para detecção de antimicrobianos em leite, afim de descartar os leites que porventura estejam contaminados por estes medicamentos.

Os medicamentos veterinários mais comuns são as substâncias antimicrobianas e anti-inflamatórios. Os antimicrobianos são substâncias químicas usadas para combater os microorganismos, já os antibióticos são substâncias produzidas pelo metabolismo de determinadas amostras de bactérias, fungos e actinomicetos. Os antibióticos podem ser naturais, sintéticos e semi-sintéticos. Eles são amplamente usados em tratamentos de doenças em gado leiteiro, tais como a mastite, diarreia, doenças pulmonares, também na prevenção e controle, ou para aumentar a produção e crescimento do animal (BRITO, 2005)(PONTES NETTO, 2005)(LANDERS, 2012)(HAN, 2015). As classes de antimicrobianos comumente utilizadas em animais de produção são os  $\beta$ -lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), as tetraciclina (oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina), os aminoglicosídeos (estreptomicina, neomicina e gentamicina) e as sulfonamidas (sulfametazina) (MITCHELL, 1998 *apud* ARAÚJO, 2010). O aparecimento de resíduos de antimicrobianos no leite geralmente ocorre após o tratamento de vacas em lactação por problemas de mastite, metrite ou outra doença infecciosa, sendo o tratamento para mastite o principal responsável pelos resíduos. Mesmo após a aplicação do antibiótico em somente um quarto mamário, ocorre o aparecimento de resíduos no leite nos que não foram tratados. Isto se deve à absorção do antibiótico pela corrente sanguínea, o que contamina todo o leite da vaca. Das diversas razões que levam à preocupação com resíduos de antibióticos no leite as principais são relacionadas à industrialização e as consequências para a saúde humana. Para a indústria o principal problema é a inibição de culturas lácteas sensíveis utilizadas na fabricação de queijos, iogurtes, entre outros. Também há outro problema, a formação de odores em manteiga e cremes. Já os problemas relacionados à saúde se devem à possibilidade de desenvolvimento de reações alérgicas ou tóxicas. As reações alérgicas se manifestam, geralmente, como urticária, dermatites ou rinites e asma brônquica e são relacionadas principalmente com as penicilinas. As reações tóxicas são relacionadas a alguns antimicrobianos com potencial

carcinogênico, tais como a sulfametazina e o nitrofurano. Eles também podem dar origem a alterações hematológicas em indivíduos susceptíveis. Sendo assim, não se admitem resíduos dessas substâncias no leite, sendo também proibidas para tratamento de vacas leiteiras. Sempre que um antibiótico é recomendado para tratamento de vacas em lactação ou no início do período seco, deve-se estar atento para o período de carência, que é o prazo de eliminação do antibiótico no leite, após a última aplicação. Todo o leite de vaca tratada dentro do período de carência deve ser retirado do consumo (BRITO, 2005).

Para o monitoramento, as agências controladoras utilizam uma variedade de métodos analíticos confiáveis e precisos para detectar resíduos de antimicrobianos em leite, como por exemplo, os kits para detecção de antibióticos em leite que são frequentemente usados na recepção do leite, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), a cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massa (GC-MS). Estes dois últimos, são utilizados para análise em laboratório. No entanto, elas apresentam algumas desvantagens, tais como: preparação de amostras, mão de obra qualificada, procedimentos complexos, tempo considerável para análise e alto custo. Além disso, normalmente os testes de antibióticos (kits) são específicos apenas para determinadas classes de antimicrobianos. Os métodos empregados para detecção de resíduos de medicamentos veterinários em leite tendem a priorizar a rapidez do resultado, pois é necessário promover a liberação do produto em tempo hábil para o processamento (MALUF, 2012). Técnicas espectroscópicas combinadas com métodos quimiométricos permitem analisar, interpretar e extrair informações de uma forma rápida e precisa com um mínimo de preparação de amostras.

Uma das técnicas espectroscópicas é a espectroscopia no infravermelho próximo por transformada de Fourier (FT-NIR), que consiste em uma técnica analítica, não destrutiva, rápida, confiável e precisa, que permite analisar diversos tipos de amostras, principalmente na indústria de alimentos (FERREIRA, 2013)(WILLIAMS, 2001). O infravermelho é uma radiação eletromagnética com número de ondas situado entre  $14290$  e  $200\text{ cm}^{-1}$  e frequência de  $3 \times 10^{11}$  Hz até cerca de  $4 \times 10^{14}$  Hz, no espectro eletromagnético. Ao incidir em uma molécula, esta radiação interage com os modos rotacionais e vibracionais da mesma. A absorção no infravermelho ocorre quando a frequência da radiação, multiplicada pela constante de Planck,  $E = h\nu$ , tem o mesmo valor da diferença de energia entre dois estados vibracionais, ou seja, o processo envolve uma ressonância entre a diferença de níveis de energia da molécula e a radiação eletromagnética (LUIZ, 2015).

Devido à concentração dos resíduos dos medicamentos no leite ser muito pequena, na ordem de parte por milhão (ppm), equivalente a mg/L ou parte por bilhão (ppb) que corresponde a mcg/L (ou  $\mu\text{g/L}$ ), as características espectrais fornecidas pela região NIR para este tipo de análise, bem como a avaliação simultânea de diferentes tipos de medicamentos se torna mais trabalhosa. Então, métodos de análise multivariados são usados para obter informações quali-quantitativa. Estes métodos matemáticos e estatísticos fazem parte da quimiometria. A Análise de Componentes Principais (Principal Component Analysis - PCA) é um algoritmo matemático que permite reduzir a dimensionalidade de um conjunto de variáveis de dados em um novo conjunto de variáveis, chamado de componentes principais. Isto aumenta a interpretabilidade dos dados sem perder as informações dos dados primários (JOLLIFFE & CADIMA, 2016). Técnicas espectroscópicas combinadas com métodos quimiométricos permitem analisar, interpretar e extrair informações de uma forma rápida e precisa com um mínimo de preparação de amostras.

Este trabalho trata da Espectroscopia no Infravermelho próximo por transformada de Fourier (FT – NIR) associada a análise de Componentes Principais (PCA) para detectar traços do anti-inflamatório diclofenaco sódico e dos antimicrobianos enrofloxacino, oxitetraciclina, penicilina G e cloridrato de ceftiofur em leite, dentro dos limites máximos de resíduos (LMR) permitidos pela legislação da Agência Europeia dos Medicamentos (EMA), que é adotado no Brasil pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

## 2 MOTIVAÇÃO E FINALIDADE

Nos últimos anos, houve um crescimento nas pesquisas científicas direcionadas ao controle de qualidade dos alimentos, em particular o leite. Isto está relacionado ao aumento no seu consumo, às exigências das agências reguladoras, ao desenvolvimento de equipamentos e técnicas mais modernas e precisas, etc. A análise do leite tem como principais objetivos: oferecer a confiabilidade de um alimento seguro do ponto de vista sanitário, nutricionalmente rico para o consumidor, além de, dificultar a ocorrência de fraudes na sua produção. O uso de determinados medicamentos veterinários em vacas leiteiras pode comprometer a qualidade do leite, permitindo que, por exemplo, resíduos de antimicrobiano estejam presentes no leite para consumo. Isto pode ser considerado um problema de saúde pública, pois há pessoas portadoras de alergias a princípios ativos comuns nos antimicrobianos usados em vacas, e uma vez que consumirem o leite, poderão apresentar reações alérgicas. Outros problemas ainda existem, como aqueles apresentados na seção anterior, referentes à resistência bacteriana criada nos seres humanos e o surgimento de super bactérias devido ao uso de antimicrobianos em animais (BOECKEL, 2014). A utilização inadequada de anti-inflamatórios pode levar desde hemorragias a lesões agudas gástricas, e também falência renal. O comprometimento na qualidade dos derivados do leite contaminado também pode ser um inconveniente. Órgãos Públicos se esforçam para tal fiscalização e contam com o auxílio de pesquisas adjacentes. Os métodos atuais empregados para análise de resíduos de medicamentos veterinários em leite tendem a priorizar a rapidez do resultado, pois é necessário viabilizar a liberação do lote o mais rapidamente para o processamento (MALUF, 2012). Análises espectroscópicas quando combinadas com métodos estatísticos permitem analisar, interpretar e extrair informações de uma forma rápida e precisa com um mínimo de preparação de amostras.

Tendo em vista a problemática apresentada acima, a colaboração multidisciplinar e a disponibilidade de laboratórios e pessoal, este trabalho apresentou a proposta de desenvolver uma metodologia que permite analisar a presença de resíduos de determinados medicamentos veterinários em leites de maneira rápida e precisa dentro dos LMRs pré-estabelecidos pela legislação vigente. Para isto, deve-se:

- a) fazer um levantamento dos fármacos mais comuns utilizados em rebanhos de vacas leiteiras;
- b) procurar uma técnica de análise quali/quantitativa que se adapte à proposta citada.

- c) preparar amostras simuladas, ou seja, contaminando-as com os medicamentos veterinários mais utilizados em vacas leiteiras.
- d) analisar e detectar a presença de resíduos (traços) em amostras de leite nos equipamentos disponíveis dos laboratórios do Grupo de Engenharia e Espectroscopia de Materiais (GE2M).
- e) baixar a concentração do princípio ativo dos medicamentos veterinários simulando a contaminação dentro dos percentuais permitidos pela legislação.
- f) analisar amostras reais de leite contaminados em vacas no período de carência.
- g) escolher uma técnica de análise estatística que se aplique ao trabalho e que esteja disponível para o laboratório.
- h) reproduzir a metodologia em outro equipamento e verificar a eficiência da detecção.
- i) divulgar o trabalho em eventos e publicá-lo em periódicos conceituados internacionalmente.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

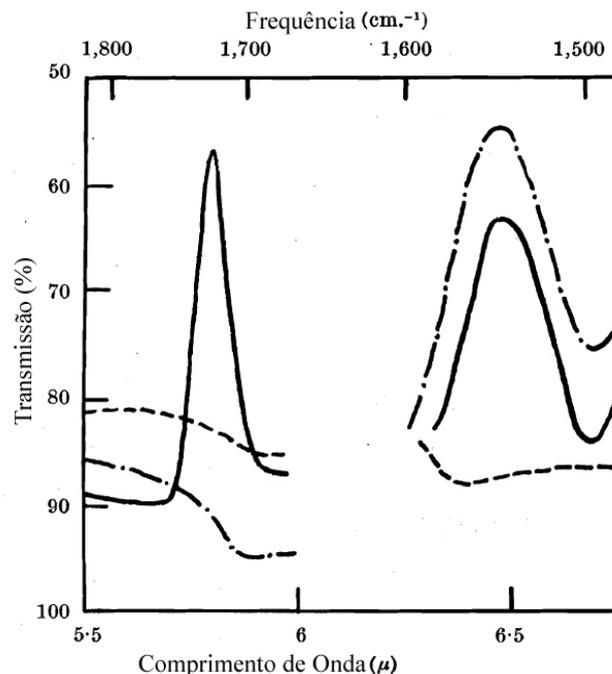
A contaminação microbiana do leite *in natura* pode ocorrer por vias endógenas, decorrentes de infecções dos animais ou por vias exógenas, com destaque para superfície exterior do úbere e dos tetos, as mãos do ordenhador, os utensílios e equipamentos de ordenha e as condições de armazenamento. Antimicrobianos podem ser detectados no leite após serem administrados pelas vias intramamária, intramuscular, intrauterina, oral e subcutânea. Além dos antimicrobianos pode-se encontrar também, no leite, resíduos de substâncias como desinfetantes e pesticidas. Na prática da agricultura moderna, medicamentos veterinários estão sendo usados em larga escala e administrados como aditivos alimentares ou através da água potável, a fim de evitar o surto de doenças. A preocupação de resíduos de antimicrobianos no leite se justifica pelos seguintes fatos: 1) consumidores podem apresentar reação alérgica à penicilina; 2) alguns nitrofuranos e sulfametazina desenvolverem tumores malignos em cobaias; o cloranfenicol pode afetar a medula óssea e causar anemia aplástica em indivíduos susceptíveis; 3) resíduos de antibióticos podem selecionar amostras resistentes de bactérias e/ou presentes nos animais; 4) pequenas concentrações de antimicrobianos podem inibir as espécies de bactérias usadas nos produtos lácteos fermentados (ARAÚJO, 2010).

A seguir será apresentada uma breve revisão, que tem como finalidade discorrer sobre os trabalhos científicos publicados que serviram como base e referência para este trabalho, mostrando a importância de um estudo científico direcionado à qualidade do leite. Primeiramente, serão abordados assuntos referentes às análises e fraudes gerais em leite, ou seja, àqueles que não estão diretamente ligados a leites contaminados com medicamentos e/ou outras substâncias que constituem adulteração.

Embora o estudo sobre a importância das características nutricionais, fraude, contaminantes, etc, em leites e seus derivados esteja no foco atual das pesquisas científicas internacionais, a realização de estudos direcionados à análise/caracterização quantitativa do leite por técnicas analíticas já vêm acontecendo há cerca de meio século. Em 1961, Goulden J. D. S apresentou seu trabalho na renomada revista *Nature*, na qual fez uma análise quantitativa do leite e outras emulsões por absorção no infravermelho. Um feixe de radiação passando através de uma emulsão pode ser atenuado por ambos os efeitos: absorção e espalhamento. Medidas quantitativas de absorção em tais sistemas são apenas confiáveis

quando os efeitos de espalhamento são produzidos em menor quantidade em comparação com aqueles de absorção. Para o leite, a razão dos índices de refração gordura/soro é aproximadamente 1,1 e desde que o diâmetro médio do glóbulo de gordura das amostras de leite homogeneizado seja de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ , efeitos de espalhamento deverão ser pequenos em comprimentos de ondas maiores que 5  $\mu\text{m}$ . Sob condições experimentais adequadas, o espectro infravermelho de amostras de leite homogeneizado mostra picos de absorção próximos de 5,8  $\mu\text{m}$ , 6,5  $\mu\text{m}$  e 9,6  $\mu\text{m}$ , estas bandas são devidas, principalmente, à gordura, proteína e lactose, respectivamente. Ao contrário das previsões dos métodos turbidimétricos para as análises de leite, a absorção no infravermelho é um método facilmente adaptável para registros contínuos de todos os três componentes. Análises de hidrocarbonetos e outras emulsões podem ser possíveis pelo uso de bandas de absorção apropriadas, e amostras de poucos milímetros podem ser analisadas. A figura 1 ilustra parte do espectro do leite homogeneizado e leite separado, o efeito de absorção negativa da lactose e proteína sendo aparente no espectro de leite separado em 5,8  $\mu\text{m}$ .

Figura 1 – Espectro de Infravermelho do leite homogeneizado versus água (linha contínua), água versus água (traços), e leite separado versus água (traços e pontos). Comprimento do percurso de aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ .



Fonte: GOULDEN, 1961.

Em 2003, Jankovská e Sustová usaram a espectroscopia FT-NIR para análise de leite. No entanto, a técnica foi usada para descrever as características físico-químicas do leite. Além disso, eles aplicaram a regressão de mínimos quadrados (PLS) para desenvolver modelos de calibração para os componentes examinados do leite. Eles analisaram cinquenta amostras de calibração com o espectrômetro FT-NIR operando no modo reflectância em números de onda variando de 4000 a 10000  $\text{cm}^{-1}$  com 100 scan. Através desses resultados, foi sugerido que a espectroscopia NIR é aplicável para uma análise rápida da composição do leite (JANKOVSKÁ, 2003).

Pode-se caracterizar o leite por meio de técnicas não invasivas, sendo assim em 2010, M. C. M. P. Brandão, A. P. Carmo, M. J. Bell et al. utilizaram a espectroscopia no infravermelho para caracterizá-lo. A determinação dos principais constituintes do leite é importante na indústria alimentícia de laticínios, para estabelecer: informações aos consumidores, controle de qualidade e o valor do leite. Economicamente é importante conhecer a gordura total e teor de proteína do leite porque o comércio deste é baseado, principalmente, nesses componentes. Como o leite é composto principalmente de água, a única diferença entre os vários tipos deveria ser a concentração de gordura. Assim, em seu trabalho, Brandão et al. estudaram a concentração de gordura em amostras de leite para indicar um modo fácil, rápido e barato para determinar esse percentual. Foram utilizados leites desnatados e integrais homogeneizados. Para estudar a relação da concentração de gordura e o espectro de absorvância, o leite foi diluído em água em determinados percentuais. Brandão et al. concluíram que o comprimento de onda de 2308 nm pode ser usado para determinar a concentração de gordura de leite. Além disso, o valor da absorvância possui dependência linear com a concentração de gordura no presente comprimento de onda e a área sob as curvas de absorvâncias tem dependência linear com a diluição de água, isto significa que os outros componentes importantes do leite diminuem linearmente com a adição de água.

No ano de 2011, T. O. Mendes utilizou a Espectroscopia no Infravermelho Médio por Transformada de Fourier FT-MIR e calibração multivariada para determinar simultaneamente os teores de gordura, proteínas e lactose, bem como adulterações por adição de água em amostras de leite. Mendes verificou a sensibilidade da espectroscopia na região do infravermelho médio para identificação e quantificação dos constituintes do leite, visto que a maioria dos trabalhos utiliza a região do infravermelho próximo. Ele ainda verificou possíveis

adulterações no leite devido à adição de água. Para determinar a quantidade de água adicionada ao leite utiliza-se a crioscopia eletrônica como técnica oficial do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), mas segundo o autor a medida do índice de refração e da densidade do leite também são indicadores de água no leite. Os métodos padrões para determinar a concentração de gordura presente no leite são o de Roesse-Gottlieb e o Butirométrico (Gerber). Já para a proteína o método padrão é o de Nitrogênio Total (Kjeldahl) e para a lactose são os de Lane-Eynon e a Cloramina-T. Para análise de proteínas, gordura e lactose o autor também sugeriu a espectroscopia usando como princípio a lei de Lambert-Beer. Os ensaios espectroscópicos foram realizados no Laboratório de Espectroscopia de Materiais utilizando o equipamento FT-MIR fabricado pela *Bruker*, modelo *Vertex 70* e um porta amostra de  $\text{CaF}_2$ . Mendes mostrou com os seus resultados que a técnica de FT-MIR, juntamente com ferramentas quimiométricas empregadas na elaboração de modelos de regressão multivariados para a previsão dos teores de gordura, proteína e lactose em amostras de leite UHT e cru, são equivalentes às metodologias oficiais de análise de leite. Ela mostrou-se bastante sensível e capaz de identificar e quantificar os constituintes principais do leite, bem como na identificação da adição de água ao leite.

Em 2013, foi reportado na *Nature India* que os pesquisadores N. Vasimalai e S. Abraham John desenvolveram um novo tipo de sensor utilizando uma modificação de nanopartículas de ouro fluorescentes que podem detectar concentrações extremamente baixas de melamina, um composto orgânico rico em nitrogênio usado para adulterar leite, e vários outros alimentos. O leite contaminado com melamina tem efeitos nocivos nos rins das crianças. A contaminação de melamina com ácido cianúrico proporciona o aparecimento de cristais insolúveis nos rins dependendo do pH da urina, o que pode provocar insuficiência renal e até mesmo a morte em seres humanos e animais. Em 2007, vários guaxinins e gatos morreram nos EUA devido à insuficiência renal pela ingestão de alimentos contaminados com melamina. No ano seguinte, em 2008, a contaminação de leite com melamina levou a casos de nefrolitíase e complicações renais em crianças na China, resultado direto do consumo do produto contaminado. Além disso, estudos em cobaias sugerem que alimentos contendo melamina podem provocar câncer de bexiga. Várias técnicas já foram desenvolvidas para detectar melamina, incluindo Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), Cromatografia Gasosa com detector de Massa Acoplado (GC-MS), espectrometria no infravermelho e espectrometria Raman, no entanto são demoradas, têm alto custo, não são

facilmente adaptáveis à detecção no local, e algumas falham para rastrear vestígios mínimos. Para desenvolver um sensor de melamina eficaz, eles sintetizaram nanopartículas de ouro fluorescentes usando o composto orgânico amino-mercapto-triazol (AMTr-AuNPs). Estes foram caracterizados por microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HR-TEM) e técnicas de espectroscopia de difração por raios X, visível-UV e fluorescência. Então usou-se estas nanopartículas para identificar traços de melamina em amostras reais, tais como leite de vaca. Foram preparadas várias amostras com variações nas concentrações de melamina e adicionou-se a elas as soluções de nanopartículas fluorescentes. Aumentando as concentrações de melamina de níveis femtomolar para picomolar aumentou-se as emissões, transformando soluções contendo nanopartículas vermelho-vinho para roxo. A solução contendo nanopartículas ficou incolor quando a melamina foi adicionada em concentrações micromolares. Em seus estudos mostrou-se que as nanopartículas podem detectar seletivamente traços de melamina, mesmo na presença de agentes interferentes comuns, tais como sódio, potássio, cálcio, glicose, sacarose, ácido ascórbico, entre outros.

A partir deste momento, discorre-se sobre trabalhos pertinentes aos estudos de leites contaminados com resíduos de medicamentos e/ou outras substâncias que constituem adulteração.

Em 1996, E. Verdon e P. Couedor usaram a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (HPLC/RF – Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography) para determinar resíduos de ampicilina em leite. Eles abordaram a importância da droga para tratamento de infecção em vacas no período de lactação. Contudo, chamam a atenção para presença de resíduos de ampicilinas no leite o que pode provocar problemas para pessoas com sensibilidade à penicilina, bem como para a indústria de processamento de leite. Em seu trabalho, eles descreveram um método para determinar resíduos de ampicilina em leites capaz de detectar 3 µg/L e quantificar até 10 µg/L da mesma. Para isto eles usaram o cromatógrafo líquido SP8800 Pump (Spectra Physics). Como padrão foi utilizada ampicilina sódica com 92,4 % como ácido-base. O método implica na extração de ampicilina contida no leite, com uma solução de ácido tricloroacético, seguido pela coluna de extração em fase sólida condicionada C<sub>18</sub>, acetilação com anidrido acético em solução aquosa (pH 8,0), em temperatura ambiente, por 3 minutos seguido pela reação com 2M, 1, 2, 4-triazol e 10<sup>-2</sup>M de solução mercúrio (II) clorido (pH 9,0) em 65 °C por 10 minutos. O limite de detecção foi medido em 3 ng/mL. Baseando-se em resultados de outros grupos de

pesquisa, o trabalho de Verdon foi aplicado com sucesso para leites contaminados, mostrando-se apropriado para uso em leite cru, desnatado, entre outros. Eles ainda sugerem modificações no procedimento experimental que permite sua aplicação em carnes.

Em 2001, G. G. F. Nascimento, V. Maestro e M. S. P Campos avaliaram a ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba (SP). Eles avaliaram 96 amostras de leite de 6 diferentes marcas, adquiridas em estabelecimentos comerciais da cidade. As coletas foram realizadas no período de sete meses e com intervalos de, pelo menos, uma semana, observando o prazo de validade. As análises foram feitas em duplicata e a leitura dos resultados ocorreu após incubação das placas a 60 °C durante 3,5 h, medindo-se os diâmetros dos halos de inibição. A determinação da concentração de resíduos de penicilina foi estimada a partir da equação de regressão, extrapolando-se as medidas em milímetros dos halos de inibição obtidos, utilizando curva padrão G potássica. Como resultado os autores obtiveram 50 % de amostra com substância antimicrobiana, e destas 1/3 apresentaram resíduos de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Os autores utilizaram o teste do qui-quadrado, que mostrou não haver diferença significativa entre as marcas de leite analisadas, em relação à presença de resíduos de antibióticos em geral. Uma das marcas apresentou 72,5 % das amostras com resíduos de penicilina e outra com 50,0 % das amostras contendo outros inibidores não identificados pela metodologia aplicada. Os autores alertaram para seus resultados, e ainda enfatizaram que, embora haja legislação que regulamente a presença destes resíduos em alimentos, não há rigor dos produtores em cumpri-la e tão pouco fiscalização eficiente dos órgãos competentes.

Em 2002, Sivakesava, S. e Irudayara, J. realizaram um estudo mostrando a viabilidade de medir tetraciclina, em níveis de ppb, em leites pelas técnicas FT-NIR e Espectroscopia no Infravermelho Médio com Transformada de Fourier (FT-MIR). Segundo os autores, o leite é um dos produtos alimentares mais regulamentados nos Estados Unidos da América (EUA). Esta atenção especial ajuda a garantir que nenhum produto inseguro ou adulterado chegue aos consumidores. Assim, métodos para garantir a segurança e qualidade são necessários. As tetraciclina são antibióticos amplamente usados na pecuária para o tratamento de infecções bacterianas e em alguns países é usado como aditivos para favorecer o crescimento de animais. A presença de resíduos de tetraciclina no leite pode provocar sintomas alérgicos em humanos, ou pode conduzir perdas na indústria de laticínio pelo fato de inibir culturas. A Espectroscopia por infravermelho combinada com quimiometria permite analisar a matéria

prima, sem método de preparação de amostras demorado. As amostras de leite cru foram obtidas da universidade Creamery. Tetraciclina hidróclorido (IBI Shelton Scientific Inc, Shelton, CT) foi usada para preparar a solução padrão (2 mg/mL na água) e armazenada em 4 °C. As medidas de FT-MIR foram realizadas usando um espectrômetro Bio Rad FTS 6000 (Cambridge, MA) equipado com um detector *deuterated triglycine sulphate* operando em resolução 8cm<sup>-1</sup>, e amplitude modulada em 2. Os dados espectrais das regiões espectrais selecionadas foram analisados com o software GRAMS 3 (Galactic Industries Corporation, Salem, NH), usando o método dos mínimos quadrados parcial (PLS). O trabalho realizado por Sivakesava mostrou o potencial da espectroscopia FT-MIR para tal finalidade, fornecendo rápida, específica, fácil e simples detecção quantitativa de resíduos de hidróclorido de tetraciclina em leite.

Em 2002, no Brasil, foi criado o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet) decorrente de um fórum de discussão promovido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), ocorrido em 2000 e 2001 [RDC nº5/2000] e com a participação de vários representantes do governo e da sociedade civil. Dentre os objetivos do PAMVet está a avaliação da ocorrência de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal, visando estimar a exposição do consumidor a estes contaminantes (ANVISA, 2005). Escolheu-se o leite bovino como a primeira matriz de análise, pelo fato do mesmo ser o alimento de origem animal mais consumido pela população brasileira, principalmente pelas crianças e idosos. Para os medicamentos veterinários escolheu-se os antimicrobianos e os antiparasitários. Para os antimicrobianos: β-lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), tetraciclinas (oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina), anfenicóis (florfenicol e tianfenicol), aminoglicosídeos (Neomicina e Estreptomicina), macrolídeos (Eritromicina), sulfonamidas. Já para os antiparasitários: avermectinas (abamectina, doramectina, ivermectina). As amostras de leite foram coletadas em pontos de venda nas capitais dos estados (Bahia, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Rondônia, Santa Catarina e São Paulo). Estes estados são responsáveis por mais de 90 % da produção nacional. As amostras foram enviadas na embalagem original para os laboratórios de análise credenciados. As análises foram realizadas com kits específicos, tais como: o ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e SNAP (*Simple and Aqueous Phase*) e/ou usando técnicas HPLC. De 2002 a 2003 foram coletadas 750 amostras de leite (87 % UHT e

13 % em pó) com 15 amostras confirmadas para tetraciclina, 150 continham resíduos de avermectina. Abamectina ou doramectina foram encontradas em 23 amostras, já em 19 amostras detectou-se simultaneamente abamectina e ivermectina. Em 2004, foram analisadas 312 amostras (281 UHT e 31 em pó) com 3 amostras positivas para  $\beta$ -lactâmicos e 15 para tetraciclina para o leite em pó, já para o leite UHT os testes mostraram 6 amostras para tetraciclina. Para os anfenicóis 22 foram positivas, sendo 13 para o leite UHT e 9 de leite em pó. Para neomicina, 36 foram positivas. Resíduos de abamectina foram encontrados em 25 amostras de leite UHT e 9 de leite em pó, doramectina em 2 amostras de leite UHT e ivermectina em 150 amostras de leite UHT e 19 amostras de leite em pó. Em 2006 e 2007 foram analisadas 615 amostras (77,2 % UHT e 22,8 % em pó), as avermectinas foram os medicamentos mais detectados nas amostras de leite positivas com um percentual de 48 % para o leite UHT e 87 % para o leite em pó, as sulfonamidas corresponderam a 8,8 % para o leite UHT e 41,2 % para o em pó. A estreptomicina teve seu percentual próximo tanto para o UHT quanto para o leite em pó, com 3,7 % e 3,6 %, respectivamente. Para a neomicina o percentual de amostras de leite positivas para a droga veterinária foi de 2,6 % para o leite UHT e 4,3 % para o leite em pó. Já as tetraciclinas foram detectadas em 1,9 % de leite UHT e em 10,8 % em leite em pó. As amostras de leite positivas para as drogas  $\beta$ -lactâmicas e anfenicóis tiveram percentuais de 0,6 % para o leite UHT, enquanto o leite em pó teve 2,1 % de positividade para os  $\beta$ -lactâmicos e 1,4 % de positividade para os anfenicóis. O maior percentual de amostras positivas para o leite em pó era esperado, uma vez que os resíduos nestes produtos se encontram concentrados.

Em 2005, D. Pontes Netto, M. O Lopes, M. C. S Oliveira et al. fizeram um levantamento dos principais fármacos utilizados no rebanho leiteiro do estado do Paraná. O Regulamento Industrial de Inspeção Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) proíbe a adição de qualquer substância química ao leite fluído destinado à alimentação humana. Diferentes tipos de antibióticos e suas combinações são utilizados nos animais e a ocorrência de resíduos nos produtos de origem animal dependerá do número de doses, do veículo, da via de aplicação, da concentração e do número de animais em tratamento. Quando presentes no leite, os resíduos de antibióticos podem causar riscos à saúde do consumidor. Estes são representados por reações alérgicas, frequentemente associadas aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (penicilina); ação carcinogênica, associada ao cloranfenicol, à sulfametazona e aos nitrofuranos, e seleção de bactérias resistentes da microbiota normal, possivelmente a

transferência dessa resistência a outras bactérias susceptíveis (COSTA, 2002 *apud* PONTES NETTO, 2005). Estima-se que aproximadamente 3,5 % das pessoas tratadas com doses terapêuticas de sulfonamidas exibem reações adversas a esses medicamentos e que mais de 10 % sejam alérgicas às penicilinas e seus metabólicos (WEAVER, 1992 *apud* PONTES NETTO, 2005). As substâncias antiparasitárias também são medicamentos de uso frequente na medicina veterinária que podem acarretar problemas no processamento tecnológico de derivado do leite. Para o gado de leite, existem diversas recomendações para a não utilização em vacas durante a lactação pela persistência do produto no leite. Em seu estudo Pontes Netto et al. pesquisaram 160 estabelecimentos comerciais, localizados em 76 municípios do Paraná. O levantamento foi realizado no período de setembro a outubro de 2003. Foi elaborada uma ficha técnica, na qual há o questionamento de quais dos três medicamentos veterinários são mais utilizados nas seguintes patologias do rebanho leiteiro: mastite, metrite, retenção de placenta, doenças respiratórias, infecções de casco, babesiose e parasitoses internas e externas. Os medicamentos veterinários identificados foram agrupados em classe farmacológica segundo uso terapêutico e frequência de citações. Através do seu levantamento, Pontes Netto et al. concluíram que os antimicrobianos e os antiparasitários são os medicamentos veterinários mais utilizados na terapêutica das patologias que acometem o rebanho leiteiro do local em estudo. A frequência das marcas comerciais por classes terapêuticas nas patologias relacionadas foi de 49,81 % para os antibióticos e 28,72 % para os antiparasitários, já para a frequência dos princípios ativos o percentual foi de 48,0 % e 22,3 %, respectivamente. As penicilinas foram os antimicrobianos com maior percentual, 38,22 %, seguida pelos aminoglicosídeos, 25,19 %, e das tetraciclina, 15,41%. Os riscos à saúde humana associados aos aminoglicosídeos estão em casos de hipersensibilidade e perda de audição. Os resíduos de antibióticos em geral, podem favorecer o surgimento de bactérias resistentes aos mesmos. Ainda foi constatado o uso indiscriminado de diversos medicamentos veterinários, uma vez que muitas das citações têm sua aplicação terapêutica incorreta ou não-autorizada.

Em 2005, M. A. V. P Brito e C. C Lange no Comunicado Técnico 44 da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) alertaram sobre a presença de resíduos de antibióticos no leite. Os autores comentam sobre a importância nutricional da composição do leite e ainda alertaram sobre medicamentos ou drogas veterinárias que são administradas no período de lactação das vacas. Um grupo muito importante de substâncias que podem estar

presentes no leite são os antimicrobianos, que são substâncias empregadas para inibir ou tornar inativos os microrganismos. Brito e Lange ainda apresentaram em seu trabalho as boas práticas para se evitar resíduos de antibióticos no leite, dentre elas pode-se destacar: o conhecimento do produtor ou encarregado pelo rebanho do medicamento aplicado, verificar se o medicamento é licenciado no MAPA; usar somente medicamentos recomendados para animais, pois os recomendados para medicina humana não há estudos sobre o período de descarte; armazenar o medicamento adequadamente, separando aqueles recomendados para os animais não-lactantes dos recomendados para lactantes; administrar adequadamente o medicamento, principalmente as intramamárias, para evitar a inoculação de outros microorganismos feto; marcar e identificar todas as vacas tratadas, as vacas tratadas devem ser separadas e ordenhadas por último, para evitar a contaminação do leite total do rebanho; descartar o leite de todos os quartos das vacas tratadas; não alterar a dosagem recomendada, pois o tratamento deve ser administrado de acordo com as recomendações da bula; entre outros.

Como já comentado acima, uma das preocupações relacionadas à ingestão de leite com resíduos de antibióticos é a possível reação alérgica aos  $\beta$ -lactâmicos, tais como a penicilina. Em 2006, Rosário, N. A e Grumach, A. S., ressaltam conhecimentos básicos sobre a penicilina, como sua importância e alergia. Desde a introdução da penicilina na terapêutica, vários estudos sobre reações alérgicas e possíveis consequências do seu uso têm sido relatados (anafilaxia aguda, urticária, anemia hemolítica, doença do soro, algumas erupções cutâneas e vasculites, etc). Entre 10 e 20 % dos indivíduos hospitalizados apresentam alergia a esta droga. As penicilinas são um grupo de antibióticos de baixíssimo custo e elevada eficácia e, portanto, de importante utilidade no tratamento e prevenção de doenças infecciosas piogênicas e suas complicações. Elas são antibióticos de primeira escolha em patologias como: pneumonia, meningite bacteriana, sífilis, etc, referendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como essencial e de incontestável utilidade, mas tem sido estigmatizado devido, principalmente, à falta de informação no que se refere a reações alérgicas. A chance de desenvolver uma reação alérgica à penicilina é de aproximadamente 2 % por tratamento. As principais manifestações clínicas da alergia à penicilina são: reações imediatas, que ocorrem até 20 minutos após a administração da mesma por via parenteral (intramuscular, intravenosa e subcutânea) e até 1 hora após a administração oral. As reações mais graves são responsáveis por 75 % das mortes por reação anafilática nos EUA; reações aceleradas,

observadas entre 1 e 72 horas após a administração de penicilina. Causam urticária ou angioedema, edema laríngeo e, em raras ocasiões, hipotensão e morte. As reações tardias são as mais comuns. Estas são verificadas após 72 horas com erupções cutâneas benignas, morbiliformes e de boa evolução. Menos frequentemente, as reações não são cutâneas, como febre, doenças do soro, anemia hemolítica imune, trombocitopenia, nefrite intersticial aguda, síndrome de Stevens-Johnson, dermatite exfoliativa, etc. Em seu trabalho os autores advertem que a hipersensibilidade à penicilina pode ser avaliada através de testes cutâneos realizados com os determinantes maior e menor, permitindo, assim evitar o choque anafilático em indivíduos alérgicos.

Visto o aumento do interesse e consumo de produtos e subprodutos de origem animal produzidos no sistema orgânico, em 2009, M. G. Ribeiro et al. realizaram um estudo para investigar a presença de microrganismos patogênicos, celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite bovino produzido no sistema orgânico. Eles abordaram a nobreza do leite pelo seu elevado valor nutricional, e também a preocupação com a qualidade e inocuidade dos produtos e subprodutos de origem animal consumidos pela população. O termo orgânico refere-se a alimentos de origem animal e vegetal produzidos sem o uso de fertilizantes, pesticidas, inseticidas, antimicrobianos, anti-parasitários, transgênicos, ou qualquer outra droga que possua resíduos nocivos à saúde humana. Conceitualmente, as propriedades orgânicas devem gerar alimentos de alta qualidade nutricional, isentos de resíduos de produtos químicos nocivos ao homem. O leite orgânico é regido pela Instrução Normativa 07 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que dentre outras, assegura a qualidade do produto. Embora a IN 07/MAPA seja de 1999, no Brasil ainda há poucos estudos voltados à avaliação da qualidade do leite orgânico, o que é, segundo o autor, diferente em âmbito internacional, pois em diversos países, as condições de qualidade microbiológica e físico-química, assim como resíduos de antimicrobianos e pesticidas no leite bovino orgânico têm sido motivo de estudos. O estudo de M.G Ribeiro et al. foi desenvolvido durante um ano em quatro propriedades rurais localizadas no interior de São Paulo. Todas as propriedades possuíam entre 10 a 40 animais em lactação. Eles utilizaram 74 vacas com mastite e 74 vacas sem mastite (controle) e as amostras de leite dos animais com e sem mastites foram coletadas no período médio de lactação. A detecção de resíduos foi realizada no leite de todos os animais utilizando-se *kit* comercial *Delvotest<sup>TM</sup>: DSM Food Specialties Dairy Ingredients*. As amostras foram coletadas e acondicionadas em frascos esterilizados e

congelados (-20 °C). Em seus estudos eles concluíram que embora tivessem encontrado alta ocorrência de mastite contagiosa no rebanho, o produto apresentou boa qualidade devido à baixa celularidade. A presença de resíduos antimicrobianos foi o fator preocupante e depreciativo do produto, devendo ser motivo de esforços dos produtores de leite orgânico no sentido de evitar a presença de qualquer tipo de resíduo nocivo que possa gerar agravos à saúde humana.

M. M. P. Araújo, em 2010, destacou a importância do Brasil como um dos principais produtores de leite no mundo. Para manter a saúde dos rebanhos leiteiros é comum o emprego de antimicrobianos para a prevenção e combate a doenças. Medicamentos veterinários são utilizados para a profilaxia e tratamento do rebanho leiteiro e devem ser prescritos por profissionais competentes. A utilização indevida, sem respeitar as indicações do receituário e o período de carência, poderá ocasionar a presença de resíduos no leite (COSTA, 2002 *apud* ARAÚJO, 2010). Em seu trabalho Araújo avaliou a eficiência dos kits Charm MRL BL/TET, SNAP beta-lactâmico e SNAP tetraciclina na detecção de resíduos de antimicrobianos utilizando 21 bases de antimicrobianos de seis classes diferentes. Ambos os kits detectaram a presença dos resíduos de antimicrobianos nas concentrações do limite máximo de resíduos. Os kits avaliados apresentaram elevada sensibilidade e especificidade na detecção de diferentes resíduos, droga como, o ceftiofur, foi detectada em elevada concentração pelos kits testados.

O estudo de resíduos de fármacos em leite bovino não se restringe somente em antibióticos, mas também em anti-inflamatórios. Em 2010, P. Gallo et al. realizaram uma análise confirmatória de fármacos anti-inflamatórios não esteroidais em leite bovino por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção de Fluorescência (HPLC-FL). Anti-inflamatórios Não Esteroidais (Non-Steroidal Anti Inflammatory Drugs – NSAIDs) são mundialmente usados em medicina veterinária, para tratamento de inflamação, dor, febre e algumas doenças respiratórias bovinas, em conjunto com antibióticos. Seu uso pode causar efeitos colaterais tóxicos, além disso, tem sido reportado que exposições a longo prazo de fenilbutazona pode provocar tumores renais em ratos e tumores em fígados de camundongos. No leite bovino os limites máximos de resíduos provisórios (Maximum Residue Limits-MRLs) para ácido tolfenâmico, meloxicam e 5-hidroxi-flunixin foram fixados em 50, 15 e 40 mg/kg, respectivamente. O uso de diclofenaco é proibido para animais produtores de leite. Segundo a Regulamentação 2377/90/EEC do Conselho Europeu não há MRLs estabelecido

para fenibutazona, flurbiprofeno, ibuprofeno, suxibutazone, vedaprofeno, ácido meclofenâmico e ácido mefenâmico. O uso generalizado dessas substâncias representa um risco potencial para os consumidores, pois seus resíduos podem entrar na cadeia alimentar. Há muitos métodos analíticos para determinar NSAID em leite por Cromatografia Líquida, mas o Conselho Europeu decidiu que a detecção com fluorescência pode ser empregada para confirmar substâncias que não sejam detectadas nas outras. Sendo assim, Gallo et al. analisaram 18 NSAIDs. Como resultado 9 dos 18 foram detectados: carprofeno, flurbiprofeno, naproxeno e vedaprofeno, ácido mefenâmico, ácidos tolfenâmicos e meclofenâmico, ácido niflúmico e 5-hidroxi-flunixinina. Mostrando assim a eficiência da HPLC com detecção com fluorescência.

Em 2012, Vieira et al. publicaram um estudo que propôs detectar resíduos de antibióticos em leite pasteurizado do tipo B. A grande maioria da população é frequentemente exposta a baixas doses destes contaminantes, resultando em efeitos a longo prazo. Para as análises de monitoramento de resíduos antimicrobianos são utilizados métodos de triagem. O ELISA é um método amplamente utilizado que permite que várias amostras sejam analisadas em um período curto de tempo, mas caso o resultado seja positivo deve-se submeter as amostras a novos testes com técnicas de maior sensibilidade e especificidade. Em seu trabalho, Vieira et al. coletaram aleatoriamente 79 amostras de leite pasteurizado do tipo B, durante o ano de 2008, e utilizaram kits ELISA para detectar os resíduos de estreptomicina, cloranfenicol,  $\beta$ -lactâmicos, tetraciclina e gentamicina. A detecção de estreptomicina e cloranfenicol foi realizada utilizando os kits ELISA (RIDASCREEN® Chloramphenicol, RIDASCREEN® Streptomycin, R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany). Para a leitura das placas foi utilizado o espectrofotômetro de leitura automática (Emax® Molecular Devices Corporation, Carlifornia, EUA) e o programa RIDA®SOFT Win (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany) para os cálculos das curvas de calibração e concentração das amostras. A detecção de  $\beta$ -lactâmicos, tetraciclina e gentamicina foi realizada utilizando os kits comerciais ( $\beta$ LSNAP® Test, Idexx Laboratories, Maine, EUA). Resíduos de antimicrobianos foram detectados em 19 % das amostras analisadas. Das amostras positivas, 40 % estavam contaminadas por cloranfenicol, 20 % por tetraciclina, 6,7 % por gentamicina, 20 % por estreptomicina e 13,3 % por  $\beta$ -lactâmicos, sendo que três amostras estavam contaminadas por mais de um tipo de antimicrobiano. Vieira et al. ainda compararam seus resultados com estudos anteriores, inclusive os analisados pelo PAMVet 2006-2007, e verificaram que houve

um aumento da contaminação por resíduos, supondo que os antibióticos estão sendo cada vez mais utilizados ou o período de carência não está sendo cumprido. Segundo os autores, os consumidores diários de leite estão ingerindo constantemente resíduos de antibióticos, o que pode ocasionar reações alérgicas, resistência bacteriana, e em casos extremos, levar a óbito. Embora os autores tenham usado um método qualitativo, o leite analisado constitui um risco para a saúde do consumidor, e a quantificação desses resíduos se torna importante.

Granella et al. realizaram um estudo, em 2013, que tinha como objetivo verificar a contaminação de leites orgânicos e convencionais por resíduos químicos. Os agrotóxicos são usados no controle químico de pragas, levando à redução do índice de doenças. Apesar dos benefícios econômicos, a intensa utilização de agrotóxicos pode oferecer risco à saúde humana. Isto tem contribuído para o crescimento do mercado de alimentos orgânicos. Entre as principais motivações dos consumidores de produtos orgânicos está a preocupação com a saúde e com o meio ambiente, pois eles acreditam adquirir um produto isento ou com baixa contaminação química. No Brasil, o leite orgânico é considerado aquele produzido em um sistema que busca otimizar o uso de recursos naturais e socioeconômicos disponíveis, sem o emprego de agrotóxicos, antibióticos ou outros insumos sintéticos e de organismos geneticamente modificados, de modo que sejam ofertados produtos saudáveis, isentos de contaminantes intencionais e se promova a proteção do meio ambiente. A contaminação do leite por agrotóxicos ou outros contaminantes pode ocorrer: a) a partir do consumo de resíduos presentes na dieta dos animais ou do contato destes com o solo, água e ar contaminado; b) pelo uso de domissanitários nos currais e estabelecimento de produção leiteira e c) pelo uso de produtos veterinários no gado leiteiro. Uma vez que os agrotóxicos são excretados pelo leite, acabam chegando até o homem por meio do consumo do leite e dos seus derivados. Cinco marcas de leites orgânicos e convencionais foram coletadas, entre 2011 e 2012, no Rio Grande do Sul, São Paulo e Distrito Federal, totalizando 56 amostras (29 orgânico e 27 convencional). As amostras foram transportadas, em suas próprias embalagens, em caixas isotérmicas, de modo que a temperatura ficasse entre 4 a 7 °C. Foram determinados 88 compostos, sendo 79 agrotóxicos e 9 antibióticos. Todos os padrões utilizados foram adquiridos de Dr. Ehrenstorfer GmbH. Para extração dos compostos e purificação do extrato, Granella et al. aplicaram o método QuEChERS modificado, já para identificação e quantificação dos resíduos eles utilizaram a Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massa em Série (LC/MS/MS). O método apresentou limite de detecção de

2 µg/L, enquanto que o limite de quantificação foi de 10 µg/L. Verificou-se que, das 56 amostras analisadas, cinco (8,9 %) foram positivas para, pelo menos, um agrotóxico, mas nenhuma das amostras detectou medicamento veterinário. A presença de resíduos de agrotóxicos em amostras de leite orgânico analisada por Granella et al. sinaliza problemas no sistema de produção, apontando à necessidade de avaliar as possíveis causas dessa contaminação, assim como a importância do contínuo monitoramento (GRANELLA, 2013).

Em 2014, pesquisadores chineses publicaram um estudo na qual examinaram leites UHT e pasteurizado para verificarem a presença de resíduos de tetraciclinas, sulfonamidas, sulfametazina e quinolonas nos mesmos, através do método ELISA. O trabalho de Zhang Y. D e al. alerta que fármacos veterinários têm sido amplamente usados em tratamento de gado leiteiro, para prevenir e controlar doenças ou promover o crescimento de vacas leiteiras. As amostras dos leites pasteurizados e UHT foram coletadas em cidades altamente povoadas da China e analisadas através de ELISA. Foram coletadas 94 amostras de leite UHT e 26 amostras de leites pasteurizados de duas marcas, em setembro de 2010. Elas foram desengorduradas por centrifugação em 3000 g e 10 °C durante 10 minutos. Foram usados os kits de teste ELISA (RIDASCREEN®, R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany) para tetraciclinas (R3503), sulfonamida (R3004), sulfametazina (R3001) e quinolonas (R3113). Como resultado, Zhang et al. encontraram uma alta ocorrência de resíduos de quinolonas e sulfonamidas e uma baixa ocorrência de contaminação de tetraciclinas e sulfametazina nas amostras do leite analisado. Nenhum resíduo de drogas veterinárias excedeu os LMRs estabelecidos pela China, União Europeia e CAC (Codex Alimentarius Commission), mas por conta das altas taxas de detecção de alguns resíduos no leite, Zhang et al. recomendam que medidas de controle devam ser rigorosamente aplicadas, a fim de manter estes resíduos em um nível seguro.

Em 2014, Van Boeckel et al. realizaram um estudo de 10 anos que relacionando o uso excessivo de antibióticos em animais com o surgimento de super bactérias em humanos. Nos E.U.A, cerca de 80 % dos antimicrobianos produzidos são administrados em animais de fazenda, bovinos, suínos e aves. Assim, algumas bactérias se tornam resistentes aos antimicrobianos, e uma vez em humanos, não há medicamento eficaz naquele momento. Ainda há o problema relacionado ao meio ambiente, pois os resíduos produzidos pelos animais contêm ainda quantidades significativas de antimicrobianos não digeridos e também

as bactérias resistentes aos mesmos. Estes podem contaminar águas, prejudicando o meio ambiente e ainda retornar ao ser humano (SPICE, 2002).

Em 2015, Moharana et al. analisaram o medicamento veterinário enrofloxacino em amostras de leite de vaca obtidas em duas cidades da Índia, Chennai e Tamilnadu. Segundo os autores, o antimicrobiano enrofloxacino é o medicamento mais utilizado na prática veterinária. Para analisar as amostras, eles usaram a HPLC de fase reversa. Com um limite de detecção de 100 ppb, eles verificaram que 8 % das amostras apresentavam valores acima do LMR (MOHARANA, 2015).

Recentemente, em 2018, Luiz et al. realizaram um estudo com o objetivo de detectar resíduos de diferentes tipos de antimicrobianos veterinários em leites. A técnica utilizada foi a espectroscopia no infravermelho próximo com transformada de Fourier FT-NIR, e as amostras de leite genuínos utilizadas foram coletadas em fazendas certificadas. O trabalho foi dividido em duas partes, a primeira simulando a contaminação nas amostras de leites genuínos com os antimicrobianos de uso mais comuns em vacas leiteiras. Já a segunda utilizou amostras reais, ou seja, com o leite coletado de uma vaca no período de carência. Primeiramente, realizou-se uma análise físico-química das amostras para certificar-se que as mesmas estavam dentro dos padrões recomendados pela legislação vigente, em seguida as amostras foram contaminadas com cada medicamento, de modo que, o princípio ativo estivesse no LMR estabelecido para cada droga. Os antimicrobianos utilizados foram: o enrofloxacino, a tetraciclina, a penicilina G e cloridrato de ceftiofur. Este último sendo para a amostra real. Após a contaminação as amostras foram analisadas no Analisador Multi Propósito FT-NIR da Bruker operando no modo reflectância entre 13500 a 3700  $\text{cm}^{-1}$ . A análise foi realizada com o leite genuíno, sem estar contaminado, e com o leite simulando a contaminação. Através dos espectros obtidos, utilizou-se a análise de componentes principais PCA para discriminar as amostras de leite genuíno das contaminadas. Os resultados mostraram que a metodologia utilizada possibilitou discriminar diferentes tipos de resíduos de antimicrobianos no leite. Ela também foi capaz de detectar resíduos do medicamento na amostra real, mesmo sendo coletada em diferentes dias e de um medicamento de carência zero. Este, não deveria deixar resíduos da droga no leite (LUIZ, 2018).

Após a revisão de literatura, averiguou-se que praticamente todos artigos tratam de resíduos de medicamentos, mas com técnicas diferentes da apresentada por este trabalho. Já o trabalho de Sivakesava S e Irudayaraj J, em 2002, utiliza princípios semelhantes, a técnica de

FT-NIR para os mesmos fins. No entanto, o mesmo relata erros de previsão concluindo que: “A técnica precisa ser utilizada para outros tipos de drogas e que o desempenho do método necessita ser confirmado com amostras de leite contaminadas de vacas tratadas”. Assim, este trabalho apresenta resultados referentes a diferentes tipos de classes de antimicrobianos e um anti-inflamatório, bem como amostras de uma situação real, complementando e distinguindo-se do excelente trabalho dos pesquisadores aqui citados.

## 4 CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS

### 4.1 REGULAMENTAÇÃO PARA O LEITE

O leite pasteurizado é o leite fluido elaborado a partir do leite cru aquecido à temperatura de 72 °C a 75 °C durante 15 a 20 s, e refrigerado à temperatura de 2 °C a 5 °C, sendo envasado em seguida. A pasteurização tem como objetivo destruir micro-organismos causadores de doenças. Embora antigamente o leite fosse classificado em 3 tipos: A, B e C, pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) através da Instrução Normativa Nº 51 de 18/09/2002 [Ministério da Agricultura Inst. Norm. 51 de 18/09/2002] é importante ressaltar que o leite é um só. A diferença estava nas exigências na ordenha: higiene e construção do estábulo. Atualmente, de acordo com as Instruções Normativas Nº 67, 76, 77 e 78 do MAPA só existe no mercado o leite do TIPO A. De acordo com esta Normativa, entende-se por Leite Pasteurizado do tipo, o leite classificado quanto ao teor de gordura em integral, semidesnatado ou desnatado, produzido, beneficiado e envasado em estabelecimento denominado "Granja Leiteira", observadas as prescrições contidas no Regulamento Técnico da mesma Normativa. A "Granja Leiteira" é o estabelecimento destinado à produção, pasteurização e envase de leite Pasteurizado tipo A para o consumo humano, podendo, ainda, elaborar derivados lácteos a partir do leite de sua própria produção. Com isto, evita-se que o leite seja transportado cru, aumentando, assim, a probabilidade de reprodução de micro-organismos nocivos à saúde [Ministério da Agricultura Inst. Norm. Nº 62 de 29/12/2011]. O leite denominado UHT, do inglês Ultra High Temperature, é entendido como o leite homogeneizado e submetido, durante 2 a 4 s, à temperatura entre 130 °C e 150 °C mediante processo térmico de fluxo contínuo e envasado assepticamente. Com este processo, elimina-se praticamente todos os microorganismos, até mesmo as bactérias inofensivas, prolongando assim o seu prazo de validade na embalagem fechada [Ministério da Agricultura, Decreto Nº 1.812, de 08/02/1996].

Em relação ao teor de gordura, os leites são classificados em: Integral (3 % no mínimo), Semidesnatado (de 0,6 % a 2,9 %) e Desnatado (0,5 % no máximo) [Ministério da Agricultura Inst. Norm. Nº 62 de 29/12/2011]. Apesar das diminuições no teor de gordura, os leites Integral, Semidesnatado e Desnatado mantêm o mesmo teor de cálcio e proteínas.

Como o leite é um alimento muito consumido, analisá-lo é de total importância tanto para os consumidores quanto para as indústrias e produtores. Alguns fatores podem afetar alcançar a qualidade do leite, são eles: a alimentação do animal, a raça, a ordenha, manejo do

bezerro, ordem da ordenha, avaliação higiênico-sanitária do leite, acidez do leite, local da ordenha, cuidados com o animal, utensílios, etc (VIEIRA, 2005).

O MAPA possui laboratórios oficiais, os Laboratórios Nacionais Agropecuários (Lanagros). Eles desempenham papel fundamental nas ações de monitoramento, controle e fiscalização de alimentos, bebidas e insumos produzidos e comercializados no Brasil. Entre suas atribuições os Lanagros realizam análises oficiais, atuam como referência nacional em assuntos laboratoriais, realizam ações de Pesquisa, Desenvolvimento & Inovação em métodos analíticos, entre outras. Os Lanagros estão localizados em todas as regiões do Brasil e estão equipados com instrumentação no estado-da-arte em química analítica (LANAGRO MAPA).

Em 2008, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) percorreu todos os estados brasileiros e o Distrito Federal, com o objetivo de propor a criação de estruturas locais do Centro Integrado de Monitoramento da Qualidade do Leite (CQuali). Segundo a agência:

*“Cada estado irá monitorar todas as marcas de leite produzidas na região. Para isso, seria preciso um planejamento entre os laboratórios oficiais, as secretarias de agricultura e a vigilância sanitária”* (ANVISA 2008).

O CQuali Leite é uma iniciativa conjunta da ANVISA, do Departamento de Proteção e Defesa do Consumidor (DPDC), do MAPA, no sentido de integrar as ações dos órgãos envolvidos no controle de alimentos e fortalecer as medidas de prevenção e combate a desvios de qualidade, incluindo irregularidades e fraudes. Embora o CQuali Leite seja composto pelos órgãos federais já citados, as ações de monitoramento da qualidade do leite requerem a articulação e cooperação de outros atores do governo federal, além dos órgãos estaduais e municipais correlatos (CQUALI LEITE, 2008 *apud* ALMEIDA, 2013).

De acordo com a ANVISA, a análise de leite é tradicionalmente executada por todos os Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACEN) que estão distribuídos nas cinco Regiões do país. Sua criação deveu-se da ocorrência de fraude no leite em 2007, a seguir.

#### 4.2 A OPERAÇÃO OURO BRANCO

Em 2007, a Polícia Federal brasileira realizou uma operação denominada “Ouro Branco”. Seu objetivo era combater crimes contra a saúde pública e relações de consumo. No entanto, ela revelou um gigantesco esquema de fraude na distribuição do leite UHT. De

acordo com a Polícia Federal, o leite era recebido dos produtores rurais e, no momento do beneficiamento, uma solução química composta por soda cáustica, ácido cítrico, citrato de sódio, sal, açúcar e água era adicionada ao produto para aumentar o volume e o prazo de validade e, com isso, aumentar a lucratividade. A cooperativa beneficiava, por dia, 120 mil litros de leite. No entanto, a fraude era realizada somente no leite longa vida integral (POLÍCIA FEDERAL). A operação expôs o nome das maiores empresas processadoras multinacionais do setor. Eles constataram que cerca de 1/3 do leite consumido no Brasil não passava por fiscalização. Além dos já citados acima, o objetivo da fraude também era disfarçar as más condições do leite (MAZON, 2016). De acordo com a ANVISA, se ingeridas em grandes quantidades, essas substâncias podem ser prejudiciais à saúde, porém, em pequena proporção, não trazem risco ao consumidor.

#### 4.3 MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS DE USO MAIS COMUM EM BOVINOS

A Farmacologia Veterinária é recente quando comparada com a humana, mas nos últimos anos há uma elevada exposição em relação aos fármacos destinados à saúde animal, seja pela procura para o bem-estar dos animais domésticos ou pelo controle e prevenção de doenças em animais produtores de alimentos e para abates, como por exemplo, os ruminantes (vacas, cabras, etc).

O uso de antimicrobiano em vacas destina-se a prevenir e tratar doenças nas mesmas. Uma das patologias mais comuns em vacas é a mastite. Ao realizar um tratamento com antimicrobianos em vacas, os mesmos irão para corrente sanguínea, a preocupação se deve ao fato do leite ser proveniente do sangue, então pode-se concluir que haverá possibilidade de haver presença de resíduos de antimicrobianos no leite. No caso do tratamento para mastite, a via mais comum da administração dos antimicrobianos é a intramamária, o que é preocupante, pois apresenta risco de contaminação pelo fato do produto ser infundido no canal teto (GUARDABASSI, 2010). No mercado há diversos antimicrobianos ( $\beta$ -lactâmicos, tetraciclina, quinolonas, anfenicóis, sulfonamidas, aminoglicosídeos, macrolídeos, etc), cada um trata a doença de maneira distinta. Os de uso mais comuns para mastite e outras infecções bacterianas são os beta-lactâmicos e as tetraciclina, porém drogas combinadas também têm sido amplamente utilizadas. A presença de resíduos de antimicrobianos no leite é problemática, pois além de poder proporcionar danos à saúde humana, não é possível “destruir” todos os antibióticos presentes no leite mesmo com a tecnologia atualmente

existente. Mesmo com o processo de pasteurização que eleva a temperatura a 100 °C durante 30 minutos, não consegue-se destruir todos os resíduos de antimicrobianos presentes no leite (ROCA, 2011).

#### 4.3.1 Grupos de Antimicrobianos de Uso Comum

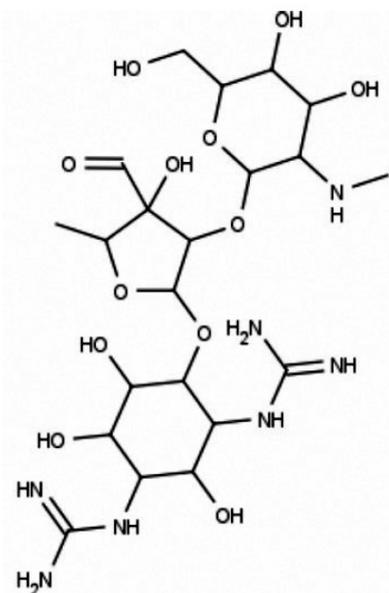
Abaixo serão listados os fármacos veterinários (antimicrobianos e antiparasitários) escolhidos pelo Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet). A escolha destes fármacos para pesquisa de seus resíduos no leite baseou-se nos seguintes critérios:

- A utilização do medicamento que possa deixar resíduos no alimento ou produto final;
- A presença de resíduos no alimento que ofereça um risco potencial à saúde humana;
- O grau de utilização na medicina veterinária/potencial de exposição do consumidor;
- A disponibilidade de metodologia analítica reconhecida internacionalmente.

##### 4.3.1.1 *Aminoglicosídeo*

É considerado um bactericida. Os aminoglicosídeos mais conhecidos são gentamicina, lincomicina, neomicina e estreptomicina. Em altas doses, os aminoglicosídeos podem ser ototóxicos e nefrotóxicos em humanos. A neomicina é indicada para prevenção e tratamento de mastite e tratamento de infecção entérica, mas a exposição excessiva deste antimicrobiano pode causar insuficiência renal, danos ao aparelho auditivo (irreversível) e no sistema labiríntico (PAMVET, 2009). A figura 2 mostra a fórmula estrutural do aminoglicosídeo estreptomicina, que apresenta fórmula molecular igual  $C_{21}H_{39}N_7O_{12}$ .

Figura 2 – Estrutura química da estreptomicina (aminoglicosídeo).

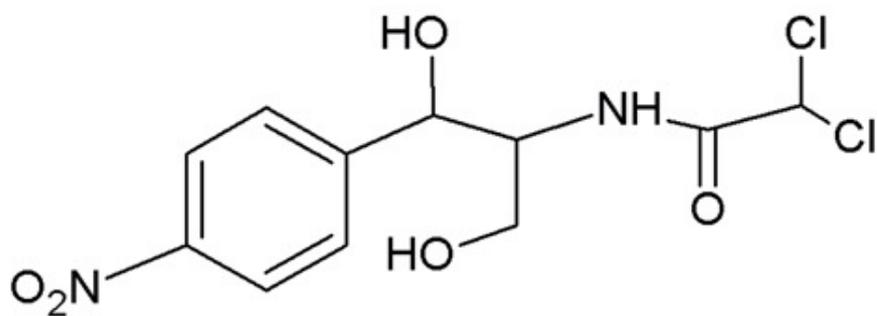


Fonte: PACHECO-SILVA, 2014.

#### 4.3.1.2 Anfenicóis

Compõem uma classe de antibióticos bacteriostáticos que inibem a síntese dos polipeptídeos bacterianos. Pertencem a este grupo o cloranfenicol, o tianfenicol e o florfenicol, que são antimicrobianos de amplo espectro, sendo ativos contra a maioria das bactérias Gram positivas e negativas, clamídias, riquetsias e micoplasmas. Dos três antimicrobianos anfenicóis o mais preocupante e relação à exposição humana é o cloranfenicol. Em 1990, a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) ratificou a sua decisão de classificar o cloranfenicol como do grupo 2A, ou seja, que existem evidências limitadas de carcinogenicidade em humanos. Em 1998, no Brasil, foi proibida a fabricação, importação, comercialização e o seu emprego em preparação farmacêutica de uso veterinário, rações e aditivos para animais cujos produtos sejam destinados à alimentação humana. Sua utilização em todo mundo tem sido reavaliada devido a sua associação com anemia aplástica em indivíduos expostos (PAMVET, 2009). A figura 3 mostra a fórmula estrutural do cloranfenicol, que possui fórmula molecular  $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ .

Figura 3 – Estrutura química do cloranfenicol (anfenicol).

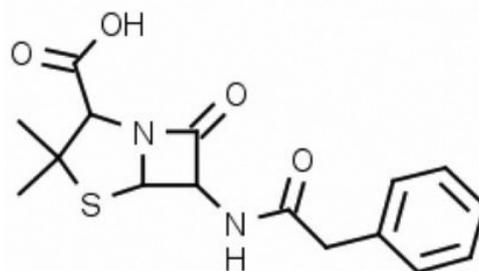


Fonte: TALERO-PEREZ, 2014.

#### 4.3.1.3 *Beta-lactâmicos*

São antibióticos que possuem o anel  $\beta$ -lactâmico em sua estrutura molecular, correspondem às penicilinas, aminopenicilinas (amoxicilina), cefalosporinas, carbapenens (imipenem) e monobactâmicos (aztreonam). A presença de  $\beta$ -lactâmicos no leite é resultado de aplicação deste antimicrobiano em gado leiteiro com intuito de tratar ou prevenir determinadas doenças. Os riscos à saúde do consumidor são representados por reações alérgicas e choque anafilático em indivíduos sensíveis a estas substâncias (PAMVET, 2009). Abaixo, na figura 4, a estrutura química do beta-lactâmico, benzilpenicilina ou penicilina G, que tem fórmula molecular  $C_{16}H_{18}N_2O_4S$ .

Figura 4 – Estrutura química do beta-lactâmico penicilina G.

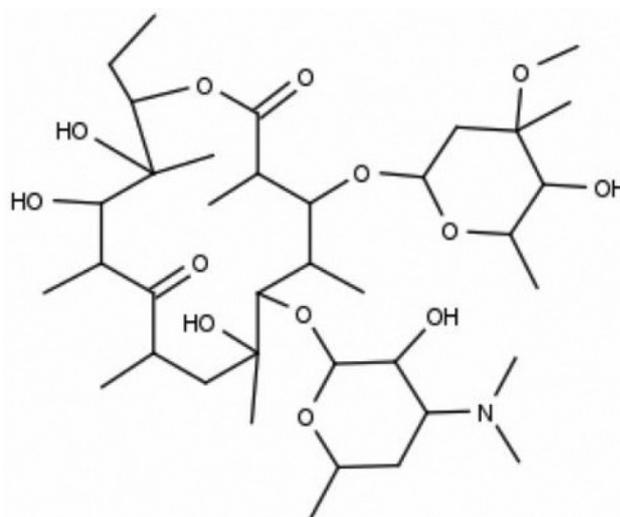


Fonte: PACHECO-SILVA, 2014.

#### 4.3.1.4 *Macrolídeos*

Pertencem a um grupo de antimicrobianos quimicamente constituídos por um anel macrocíclico de lactona, ao qual ligam-se um ou mais açúcares. Estão presentes neste grupo: azitromicina, claritromicina, eritromicina, espiramicina, miocamicina, roxitromicina, etc. A exposição contínua da eritromicina, por exemplo, além de provocar resistência bacteriana, está associada a problemas gastrintestinais graves e problemas auditivos para o consumidor (PAMVET, 2009). Na figura 5 está representada a fórmula estrutural da eritromicina, que possui fórmula molecular  $C_{37}H_{67}NO_{13}$ .

Figura 5 – Estrutura química do macrolídeo, eritromicina.

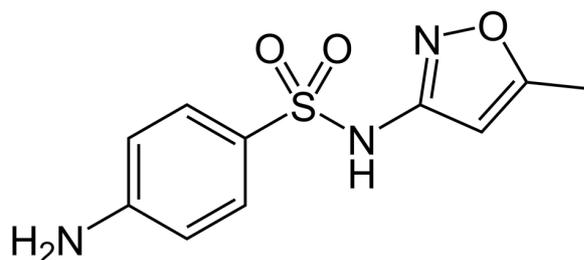


Fonte: PACHECO-SILVA, 2014.

#### 4.3.1.5 *Sulfonamidas*

São substâncias bacteriostáticas derivadas da sulfanilamina, que tem estrutura similar a do ácido para-aminobenzóico. O grupo das sulfonamidas compreende seis drogas principais: sulfanilamida, sulfisoxazol, sulfacetamida, ácido para-aminobenzóico, sulfadiazina e sulfametoxazol. A presença de seus resíduos nos alimentos preocupa em virtude do seu poder carcinogênico e pela possibilidade do desenvolvimento de resistência aos antibióticos nos seres humanos (PAMVET, 2009). A figura 6 mostra a fórmula estrutural do sulfametoxazol, uma sulfonamida que apresenta fórmula molecular  $C_{10}H_{11}N_3O_3S$ .

Figura 6 – Estrutura química do sulfametoxazol (sulfonamida).

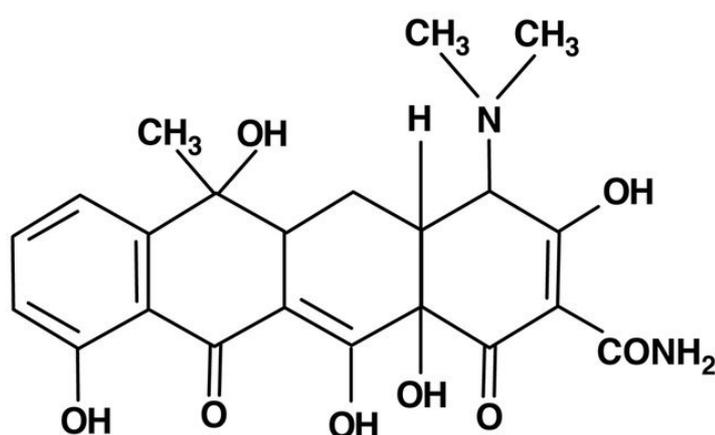


Fonte: WIKIPEDIA.

#### 4.3.1.6 Tetraciclínas

São caracterizadas pela estrutura de quatro anéis parcialmente conjugados e o grupo funcional carboxiamido e são utilizados para controlar infecções bacterianas. Por este motivo, tornou-se uma prática rotineira sua administração em vacas leiteiras saudáveis para prevenir infecções. Pertencem a este grupo a oxitetraciclina, a tetraciclina e a clortetraciclina. É comum a prática da administração de tetraciclínas em vacas leiteiras saudáveis, a fim de, prevenir infecções. Os antimicrobianos com tetraciclínas podem ocasionar reações alérgicas em humanos, comprometer o desenvolvimento ósseo de crianças, interferir na reabsorção de cálcio pelos ossos, além de provocar alteração na dentição (PAMVET, 2009). A figura 7 mostra a fórmula estrutural da tetraciclina, que apresenta fórmula molecular  $C_{22}H_{24}N_2O_8$ .

Figura 7 – Estrutura química da tetraciclina.

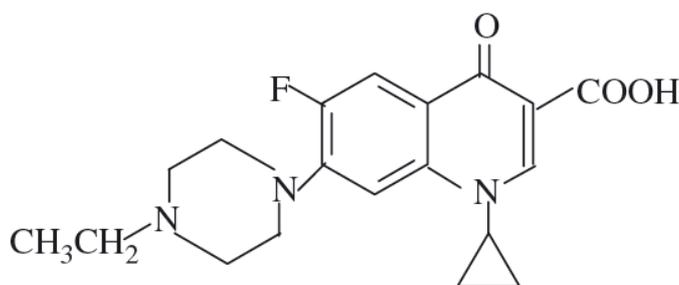


Fonte: KWIATKOWSKA, 2013.

#### 4.3.1.7 Enrofloxacino

O enrofloxacino é um antimicrobiano sintético da classe das fluoroquinolonas desenvolvido exclusivamente para uso veterinário. Ele é usado para o tratamento de várias doenças infecciosas, por exemplo, doenças do trato urinário, respiratório e da pele. O enrofloxacino mostra rápida ação bactericida. Este medicamento foi a primeira fluoroquinolona desenvolvida para aplicações veterinárias em diversas formulações, e é usada no tratamento de algumas doenças infecciosas em bovinos e também em animais domésticos (VALGAS, 2005). A figura 8 mostra a fórmula estrutural do enrofloxacino, que apresenta fórmula molecular  $C_{19}H_{22}FN_3O_3$ .

Figura 8 – Estrutura química do enrofloxacino.

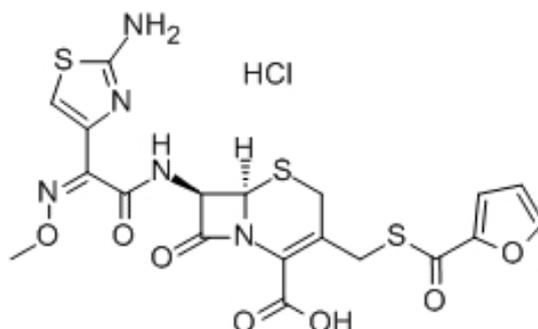


Fonte: EHMEZA, 2016.

#### 4.3.1.8 Cloridrato de Ceftiofur

O cloridrato de ceftiofur, conhecido apenas como ceftiofur, é uma cefalosporina de terceira geração, semissintética, estável à beta-lactamase e de amplo espectro, com atividade antibacteriana. Ele é indicado para o tratamento de doenças infecciosas bacterianas em bovinos e suínos causados por agentes Gram positivos e Gram negativos sensíveis ao Ceftiofur. Algumas doenças para qual ele é indicado são: pododermatite, mastite, infecção de trato urinário, pneumonia, infecção neonatal, etc. Do ponto de vista farmacocinético, as cefalosporinas de terceira geração são rapidamente absorvidas após aplicação intramuscular ou subcutânea em bovinos (PUBCHEM)(OUROFINO). A figura 9 mostra a fórmula estrutural do cloridrato de ceftiofur, que apresenta fórmula molecular  $C_{19}H_{18}ClN_5O_7S_3$ .

Figura 9 – Estrutura química do cloridrato de ceftiofur.



Fonte: ABL TECHNOLOGY.

#### 4.4 LIMITE MÁXIMO DE RESÍDUO (LMR)

O *Codex Alimentarius*, do latim “Lei ou Código dos Alimentos”, é uma coletânea de normas alimentares adotadas internacionalmente e apresentadas de modo uniforme (OPAS/OMS). Segundo ele, o resíduo de um fármaco é a fração da droga, seus metabólitos, produtos de conversão ou reação e impurezas que permanecem no alimento originário de animais tratados. Para que o alimento esteja numa margem segura para seu uso é estabelecido um período de carência no animal que está em tratamento. O período de carência é o tempo, estipulado pelo laboratório fabricante do medicamento, necessário para que não ocorram resultados positivos de resíduos de antimicrobianos depois da última aplicação em um tratamento anti-infeccioso. Vale a pena ressaltar que este período varia de produto para produto e está relacionado com a via de aplicação. Mesmo que a aplicação seja em apenas um dos tetos, pode ocorrer a presença de resíduos de antimicrobianos no leite de todos os outros, pois o medicamento é absorvido pelo sangue, chegando a todos os tetos. A concentração máxima que se permita legalmente ou que se reconheça como admissível em um alimento é definido como o Limite Máximo de Resíduos (LMR) (PAMVET, 2003). Esta concentração é expressa em mg/kg, µg/kg, mg/L ou µg/L. Também é comum o termo parte por milhão (ppm), de modo que este é equivalente a mg/L, e parte por bilhão (ppb) correspondendo a µg/L. Desta forma, o período de carência visa garantir que tais alimentos não contenham resíduos que excedem os limites máximos residuais preconizados (RIVIERE, 2011 *apud* MANGERONA, 2013). Para a determinação do período de carência do produto em

determinada matriz/tecido animal, considera-se apenas os níveis presentes nas matrizes com o decorrer do tempo e se compara estes níveis com os limites máximos permitidos para o consumo do alimento de origem animal. O importante para a definição do período de carência de um produto é a determinação do momento em que o produto não apresenta resíduos acima dos limites permitidos pelas entidades regulatórias e considerados seguros. Portanto, a avaliação do percentual de produto administrado que é eliminado via leite não se faz necessária para fins da determinação do período de carência do produto no leite. De uma maneira mais simples, pode-se dizer que se verifica o tempo em que a quantidade de resíduo é maior do que o LMR. Quando ela passa a ser menor, este tempo é o período de abaixo carência. A tabela 2 apresenta os LMR de alguns medicamentos veterinários, estabelecido pelo Codex Alimentarius e pela Agência Europeia de Medicina (EMEA) e praticado no Brasil.

Tabela 2 – Alguns medicamentos veterinários e seus respectivos LMR.

<b>Medicamento</b>	<b>LMR (ppb ou µg/L)</b>	<b>Fontes</b>
Penicilina G	4	PACHECO-SILVA, 2014.
Ampicilina	4	PAMVET, 2009. PACHECO-SILVA, 2014.
Amoxicilina	4	PAMVET, 2009. PACHECO-SILVA, 2014.
Enrofloxacino	100	PAMVET, 2009. MANGERONA, 2013.
Ciprofloxacino	100	MANGERONA, 2013.
Diclofenaco Sódico	0,1	MANGERONA, 2013
Oxitetraciclina	100	MITCHELL, 1998.
Cloridrato de Ceftiofur	100	PAMVET, 2009. EMEA, 2002

## 4.5 O INFRAVERMELHO

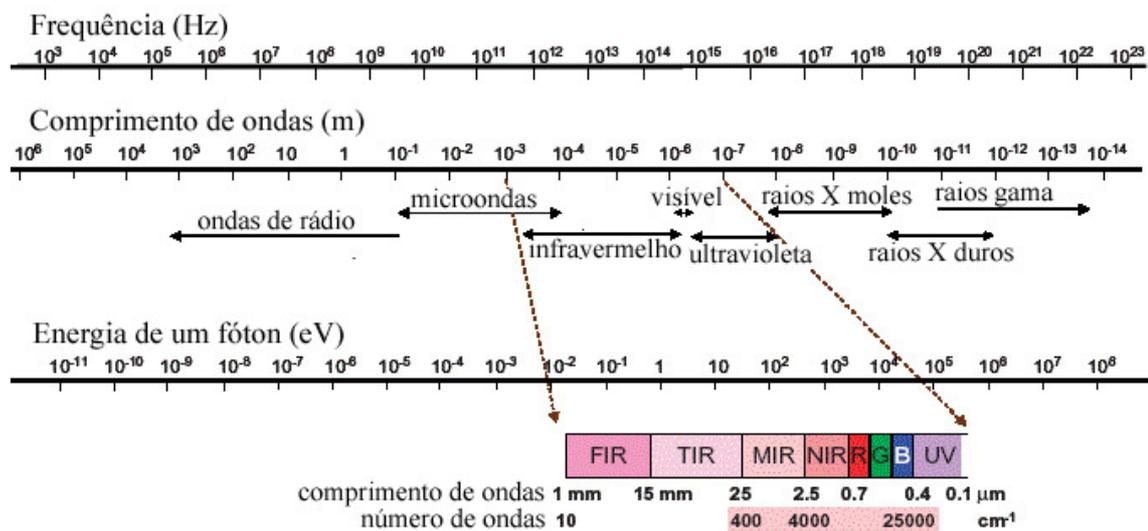
### 4.5.1 Herschel e a descoberta do Infravermelho

A região espectral do infravermelho foi primeiramente detectada em 1800, pelo músico e astrônomo anglo-germânico Sir Frederick William Herschel (1738 – 1822). Antes disto, Herschel já se destacava pela construção de telescópios com intuito de observar os céus. Em 1781, ele se torna conhecido pela sua ilustre descoberta na astronomia, o planeta Urano. Quase vinte anos depois, Herschel surpreende novamente a comunidade científica com observações que o levaria à descoberta da região do infravermelho. Ele montou um aparato com objetivo de verificar, por meio de termômetros, quanto calor “passava” por diferentes filtros coloridos que ele usava para observar a luz solar. Então Herschel notou que, filtros de cores diferentes, aparentemente, transmitiam quantidades de energia, na forma de calor, diferentes. Seu aparato era simples, porém genial. Por meio de um prisma, ele dispersou a luz solar direcionando o espectro da mesma, de modo que este espectro incidisse em termômetros para medir a temperatura de cada cor. Ao medir as temperaturas individuais da luz violeta, azul, verde, amarela, laranja e vermelha, Herschel observou que todas as cores tinham temperaturas mais altas que as que estavam além do espectro, amostra controle. Ele ainda verificou que as temperaturas das cores aumentaram da região violeta para a região vermelha do espectro. Em seguida, Herschel mediu a temperatura um pouco além da região vermelha do espectro, em uma região aparentemente sem a luz solar, foi quando surpreendentemente ele verificou que esta região apresentava a maior temperatura até então medida. Então, posteriormente, Herschel realizou diversos experimentos nesta região, além da região vermelha no espectro, e observou que estes raios eram semelhantes à luz visível, apresentando as mesmas características: reflexão, refração, absorção, transmissão, etc. Na verdade, o que Herschel descobriu era uma nova forma de radiação, além da luz vermelha, chamada de radiação infravermelha (NASA). Com seu experimento, ele demonstrou pela primeira vez que existem tipos de luz (radiação) que não são visíveis aos nossos olhos, assim como os raios X. No entanto, estes só vieram a ser descobertos pelo físico alemão Wilhelm Conrad Roentgen (1845 – 1923), quase 100 anos depois da descoberta de Herschel.

#### 4.5.2 As regiões do infravermelho

A região de frequência do infravermelho estende-se de  $3 \times 10^{11}$  Hz até cerca de  $4 \times 10^{14}$  Hz, e está situada na faixa de número de onda entre  $14290 \text{ cm}^{-1}$  e  $200 \text{ cm}^{-1}$  do espectro eletromagnético. O infravermelho pode ser subdividido de acordo com a ISO 20473 em infravermelho: próximo ( $14290 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ ), médio ( $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ ), térmico ( $400 - 200 \text{ cm}^{-1}$ ) e longínquo ( $1 - 500 \text{ cm}^{-1}$ ) (ISO, 2007 *apud* LUIZ, 2015). Neste trabalho foi utilizada a região do infravermelho próximo, ou em inglês Near Infrared (NIR). Em termos de comprimento de onda, ou frequência, o NIR é região do infravermelho mais próxima à região visível no espectro eletromagnético, daí o seu nome. A figura 10 mostra uma esquematização do espectro eletromagnético, destacando-se a subdivisão para o infravermelho acima citado.

Figura 10 – O espectro eletromagnético destacando-se as regiões do visível e infravermelho.



Fonte: VISCARRA ROSSEL, 2006. ADAPTADO PELO AUTOR.

#### 4.5.3 A espectroscopia no infravermelho

Como visto anteriormente, a região do infravermelho foi descoberta por Herschel no ano de 1800, mas somente em 1881 que o primeiro espectro de infravermelho viria a ser medido por Abney e Festing. Além de produzirem os primeiros espectros, eles também sugeriram que as absorções estavam relacionadas com a composição química das amostras analisadas (DAVIES, 2005). Por volta de 1900 William Weber Coblentz (1873 – 1962) obteve

os espectros de absorção no infravermelho de grande número de compostos orgânico em estados sólido, líquido e gasoso (SALA, 2008). A região do infravermelho próximo foi detectada antes da região do infravermelho médio (Medium Infrared, MIR), mas esta última foi a que mais ganhou ampla aceitação e recebeu constantemente progressos teóricos e experimentais. No entanto, somente em 1968 que o engenheiro Karl H. Norris desenvolveu a espectroscopia baseada no uso da luz no infravermelho próximo (LIMA, 2011)(DAVIES, 2011). Após isto, a potencialidade desta técnica foi apresentada impulsionada, principalmente, pela instrumentação envolvida: espectrofotômetros mais modernos associados à aquisição e tratamento de dados espectrais por meio de microcomputador. Assim, a espectroscopia NIR se destaca por ser uma ferramenta analítica não destrutiva que apresenta principalmente a qualidade em seus dados com uma resposta rápida (PASQUINI, 2003).

O principal objetivo da espectroscopia é estudar a interação da radiação eletromagnética com a matéria, de modo a determinar os níveis de energia de seus átomos ou moléculas, e através das medidas de transições energéticas fornecidas pelos espectros referentes, determinar as posições relativas dos níveis energéticos. De uma forma mais resumida, a espectroscopia dedica-se ao estudo da interação da radiação eletromagnética com a matéria, focando nos níveis energéticos de átomos ou moléculas. Normalmente as transições eletrônicas estão situadas na região do ultravioleta ou visível, as vibracionais na região do infravermelho e as rotacionais na região do microondas (em moléculas com átomos leves, e também no infravermelho longínquo) (SALA, 2008). Para que ocorra absorção da radiação infravermelho é necessário que se tenha uma variação do momento de dipolo elétrico da molécula, conseqüente de seu movimento vibracional ou rotacional. Desta forma, o campo elétrico alternante da radiação incidente interagirá com a molécula, dando origem aos espectros.

Os átomos que constituem uma molécula estão em constante movimento, de modo que, para um sistema com  $N$  átomos livres para se movimentarem nas três dimensões, este sistema terá  $3N$  graus de liberdades. Mesmo que estes átomos estejam ligados formando uma molécula, ainda assim, existirão  $3N$  graus de liberdade. Ou seja, três graus para a translação do centro de massa da molécula e, no caso de uma molécula não linear, três graus para a rotação da mesma em torno dos três eixos, restando  $3N-6$  graus de liberdade para as vibrações. No caso de moléculas lineares, como não há rotação em torno do eixo internuclear, restam  $3N-5$  graus de liberdade para as vibrações (PUC RIO).

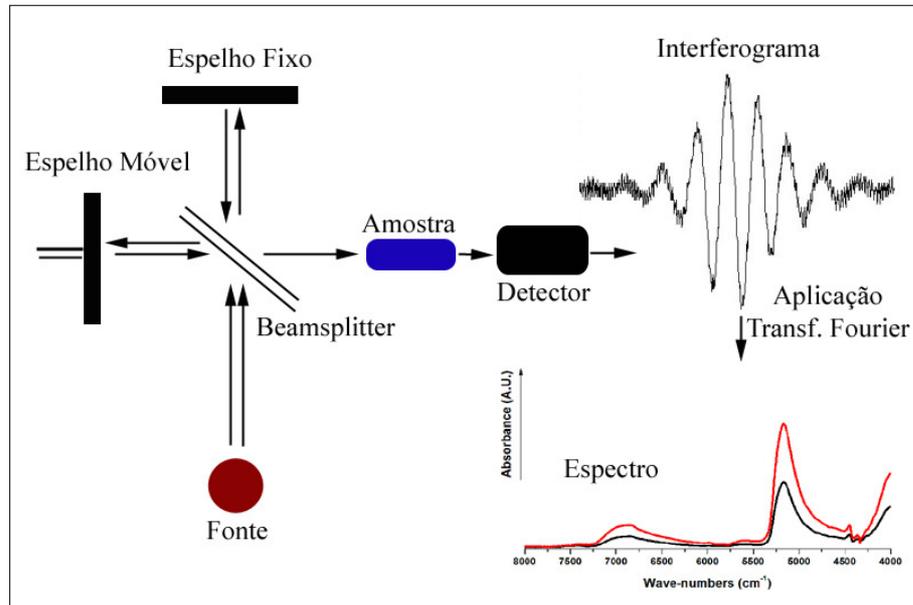
Ao incidir sobre uma molécula, a radiação infravermelha altera os modos rotacionais e vibracionais da mesma. A absorção no infravermelho ocorre quando a frequência da radiação, multiplicada pela constante de Planck, matematicamente,  $E = h\nu$ , tem o mesmo valor da diferença de energia entre dois estados vibracionais, ou seja, o processo envolve uma ressonância entre a diferença de níveis de energia da molécula e a radiação eletromagnética (LUIZ, 2015).

Atualmente há várias técnicas que permitem obter informações sobre a estrutura molecular, níveis de energia e ligações químicas de determinadas amostras. Por exemplo: Fluorescência de Raios X (X Ray Fluorescence – XRF), Difração de Raios X (X Ray Diffraction – XRD), Espectroscopia Raman, Ressonância Magnética Nuclear, a Espectroscopia no Infravermelho, entre outras.

#### 4.5.3.1 *A espectroscopia no infravermelho próximo por Transformada de Fourier (FT-NIR)*

A FT-NIR é considerada uma variação da espectroscopia no infravermelho, na qual se utilizam dois feixes com intuito de se obter um interferograma. Este, consiste em um gráfico da potência da radiação que atinge o detector num dado instante em função da distância percorrida pelo espelho móvel do interferômetro (DAMIANI, 2000). Através da mudança do caminho óptico entre os dois feixes um sinal é gerado. A figura abaixo representa um diagrama esquemático de um interferômetro de Michelson, como aquele utilizado pelos físicos norte-americano Albert Abraham Michelson (1852 – 1931) e Edward Williams Morley (1838 – 1923), em 1887, no experimento conhecido como Experiência de Michelson-Morley, que tinha como objetivo medir o movimento da Terra em relação ao éter.

Figura 11 – Esquema do FT-NIR através do interferômetro de Michelson.



Fonte: ALMEIDA, 2009. ADAPTADA PELO AUTOR.

Na figura 11, o feixe de radiação infravermelha próximo, feixe 1, atravessa um espelho semi-transparente, um divisor de feixe denominado *beamsplitter*, e segue em direção a um espelho S fixo. Este, reflete o feixe 1 novamente para o *beamsplitter*, aonde divide-se o feixe, de modo que parte vai em direção ao detector e parte vai para o espelho móvel M. Por fim, este reflete o feixe novamente para o *beamsplitter* e parte do feixe atravessa-o, indo em direção ao detector, conseguindo assim, percorrer todos os comprimentos de ondas rapidamente. O interferograma é formado pela soma de todas as ondas de diferentes amplitudes e frequências que chegam no interferômetro. As informações fornecidas pelo espectrofotômetro são convertidas, relacionando as intensidades com as respectivas frequências, através da transformada de Fourier (PERKINS, 1986 *apud* ALMEIDA, 2009).

$$I(\delta) = \int_0^{+\infty} B(\nu) \cos(2\pi\nu\delta) d\nu$$

onde  $I(\delta)$  é a intensidade do feixe,  $\nu$  é o número de onda e  $B(\nu)$  é a densidade espectral de potência (GONÇALVES, 2012)(PUC RIO).

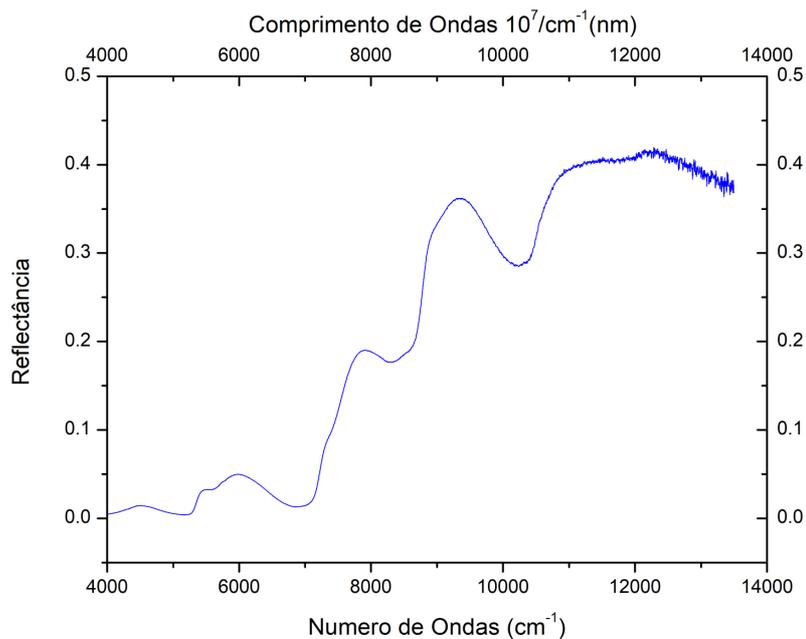
A relação entre o interferograma e o espectro é dado pela seguinte equação:

$$B(\nu) = \int_0^{+\infty} I(\delta) \cos(2\pi\nu\delta) d\delta$$

A espectroscopia FT-NIR apresenta algumas vantagens, descritas a seguir. Poucos elementos ópticos no instrumento e não há necessidade de fenda (vantagem de Jacquinot), pois a potência da radiação que chega ao detector é maior do que nos instrumentos dispersivos e maiores relações sinal/ruído são observadas. Melhores precisão e exatidão em termos de comprimento de onda. Todos os sinais de fonte alcançam o detector simultaneamente (vantagem de Fellgett ou multiplex). Isto torna possível a obtenção de todo o espectro de uma só vez e, com essa economia de tempo, é possível aumentar os *scans* para aumentar a razão sinal/ruído (PUC RIO).

A figura 12 se refere ao espectro de reflectância de FT-NIR obtido, neste trabalho, para amostra de leite.

Figura 12 – Espectro de reflectância de FT-NIR obtido para amostra de leite.



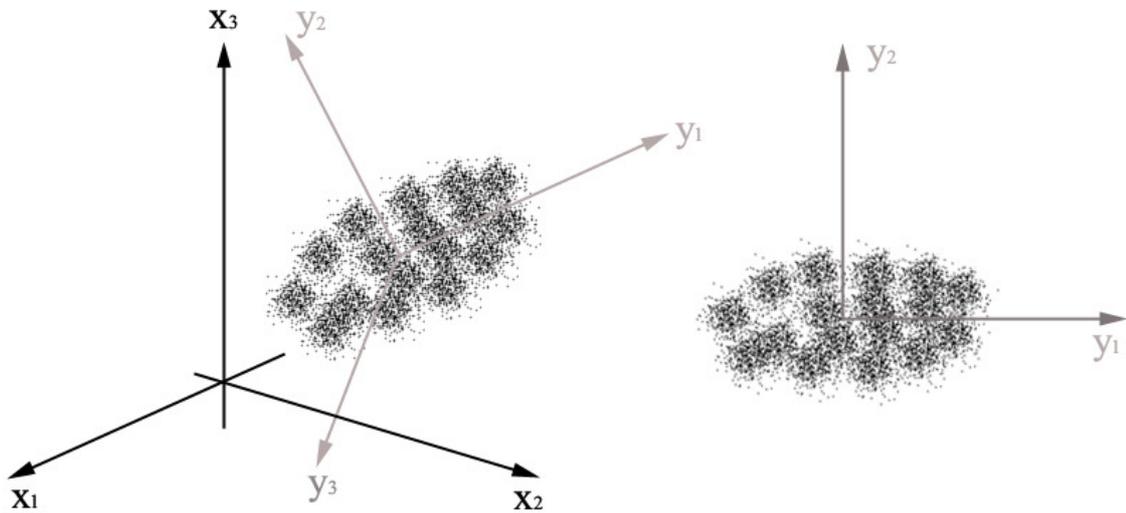
Na Figura acima, o eixo horizontal inferior representa o número de onda dentro da faixa do infravermelho próximo, já o superior corresponde ao comprimento de ondas, enquanto que o eixo vertical se refere a reflectância. Nela, devido à absorção pelos grupos O-H correspondentes à água, duas bandas, em torno de 1440 nm (6944  $\text{cm}^{-1}$ ) e 1950 nm (5128  $\text{cm}^{-1}$ ) dominam o espectro NIR. A primeira é atribuída a uma combinação de modos estiramento simétrico e antissimétrico da água, enquanto que a segunda pode ser associada a

modos de estiramento do OH. As bandas de absorção características de gordura e outros componentes do leite, como proteína e lactose, são muito fracas em comparação com as bandas de água e por isso difíceis de visualizá-las neste espectro. Mais adiante, os resultados mostrarão que o cálculo de derivadas primeiras e segundas dos espectros auxilia na discriminação de picos sobrepostos. Assim, podem ser identificadas absorções em 1160 nm ( $8620\text{ cm}^{-1}$ ), 1210 nm ( $8264\text{ cm}^{-1}$ ), 1726 nm ( $5794\text{ cm}^{-1}$ ), 2308 nm e 2354 nm ( $4333\text{ cm}^{-1}$ ) devido à absorção da ligação C-H; em 2110 nm ( $4740\text{ cm}^{-1}$ ) devido à ligação OH; e em 1992 nm ( $5020\text{ cm}^{-1}$ ), 2054 nm e em 2280 nm ( $4868\text{ cm}^{-1}$ ) devido à absorção de NH (TSENKOVA, 2000).

#### 4.6 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)

A PCA é um algoritmo matemático que permite reduzir a dimensionalidade de um conjunto de variáveis de dados em um novo conjunto de variáveis, chamado de componentes principais. Isto aumenta a interpretabilidade dos dados sem perder as informações dos dados primários (JOLLIFFE & CADIMA, 2016). Para isto, 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 os seus eixos principais têm as mesmas direções de máxima variabilidade (Figura 13). 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 expresso 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 (USP, 2010)(PAIVA, 2010).

Figura 13 – Representação da Análise de Componentes Principais, por meio dos sistemas de coordenadas.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

#### 4.7 ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é uma técnica de caracterização microestrutural capaz de produzir imagens de alta ampliação e resolução. Ela permite realizar uma análise multielementar com a adaptação de um Sistema de Espectroscopia de Energia Dispersiva (Energy Dispersive Spectroscopy-EDS) na câmara da amostra, com ele pode-se obter rapidamente informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos de uma amostra sólida. Suas aplicações são, comumente, nas áreas de: biologia, odontologia, farmácia, engenharia, química, metalurgia, física, medicina, geologia, etc (DEDAVID, 2007 *apud* LUIZ, 2015). Na MEV/EDS, os elétrons são “gerados” a partir do aquecimento de um filamento de tungstênio (W) ou de hexaboreto de lantânio ( $\text{LaB}_6$ ), por efeito termiônico. O feixe de elétrons é acelerado, aplicando-se alta voltagem, semelhante ao que ocorre num tubo de raios X convencional. Este feixe passa por lentes condensadoras, reduzindo o seu diâmetro. Em seguida, ele passa por uma lente objetiva que o focaliza sobre a amostra. Então, o feixe de elétrons interage com a região de incidência da amostra até uma profundidade que

pode variar de 1  $\mu\text{m}$  a 6  $\mu\text{m}$  e depende da natureza da mesma. É na região de incidência que irá gerar os sinais (elétrons e/ou ondas eletromagnéticas produzidas) que são detectados e utilizados para a formação da imagem e para a microanálise (SILVA, *apud* LUIZ, 2015). O feixe de elétrons ao colidir com os átomos da amostra pode arrancar elétrons da mesma, deixando o átomo energeticamente no estado excitado. Para retornar ao estado fundamental, o átomo emite energia na forma de raios X característico (LUIZ, 2018). Estes raios X são detectados por um sistema de EDS instalado na câmara de vácuo do equipamento e sua energia é característica do átomo que a emitiu. Assim, é possível traçar um histograma da sua energia, em elétron volt (eV) em função do número de fótons recebidos por segundo (contagens).

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

As análises das características físico-químicas do leite, bem como as de espectroscopia FT-NIR foram realizadas no Laboratório de Produtos e Processos (LPP) e no Laboratório de Espectrometria de Materiais (LEM), localizados no Departamento de Física da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. Já as análises de MEV/EDS foram feitas no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, IFRJ, Campus Paracambi, localizado no município de Paracambi, Rio de Janeiro, Brasil.

### 5.1 AMOSTRAS DE LEITE

Para as amostras de leite genuíno, utilizaram-se leite cru oriundo de vacas controle. Uma parte deste leite foi reservada para amostra controle, livres de medicamentos veterinários. Posteriormente uma fração deste leite foi acrescida de antimicrobianos, a fim de simular uma amostra de leite contaminado. Então, o leite cru deveria ser fornecido por fontes confiáveis. Assim, as amostras foram coletadas em duas fazendas, a primeira no Campo Experimental da Embrapa Gado de Leite, localizado no município de Coronel Pacheco, e a segunda na fazenda Pouso Alegre, no município de Rio Pomba, ambas no estado de Minas Gerais. Após a ordenha, as amostras de leite cru foram imediatamente armazenadas e mantidas refrigeradas a 5,0 ° C até a análise ser realizada aproximadamente uma hora depois.

Figura 14 – Vacas leiteiras da fazenda Pouso Alegre, um dos locais de coleta das amostras de leite controle.



Fonte: AUTOR.

## 5.2 MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS

As drogas foram selecionadas após realizar-se um levantamento bibliográfico a fim de verificar àquelas de uso frequente em patologias mais comuns em gado leiteiro. As classes escolhidas foram os anti-inflamatórios e antimicrobianos. Sendo o primeiro usado apenas para os experimentos preliminares. São eles: o anti-inflamatório diclofenaco sódico 225 mg Ourofino (período de carência, 8 dias) e os antimicrobianos: enrofloxacino Baytril® injetável 10 %, que possui 10 g de enrofloxacino em 100 mL de veículo (período de carência, 3 dias); terramicina/LA Zoetis/Pfizer® injetável, que tem 20 g de oxitetraciclina em 100 g de veículo (período de carência, 4 dias); pentabiótico reforçado com penicilinas da Zoetis/Pfizer (período de carência, 8 a 10 ordenhas). Para a amostra real, ou seja, aquela coletada de uma vaca em tratamento com antimicrobiano, foi utilizado o CeF-50 Ceftiofur Agener União, que tem 50 g de cloridrato de ceftiofur em 1 mL de veículo (carência zero). Vale a pena ressaltar que algumas indústrias não recomendam o uso de alguns antimicrobianos acima citados em vacas lactantes.

### 5.3 ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO QUÍMICA

Esta foi a primeira etapa de análise deste trabalho, sendo primordial para dar continuidade, pois nela as amostras foram submetidas às análises físico-química com a finalidade de verificar sua conformidade com os padrões estabelecidos pela legislação vigente (FAO/TPC/KEN/6611)(IN 76). Nesta etapa, em cada amostra foram verificados: crioscopia, densidade, pH, acidez, acidez (via teste de Alizarol e Dornic), gordura, proteína, lactose e sólidos (FAO)(BODENMULLER, 2010)(ROBIM, 2011). Cada medida foi feita em triplicada. Para determinar o ponto de fusão das amostras de leite utilizou-se o crioscópico eletrônico digital MK 540 Flex da ITR, a densidade foi obtida por meio do termo lactodensímetro Q 15 °C da HG Brasil, a acidez titulada foi obtida pelo método do alizarol e confirmada pela 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 da Macalé LTDA produtos para Laticínio.

### 5.4 SIMULANDO A CONTAMINAÇÃO

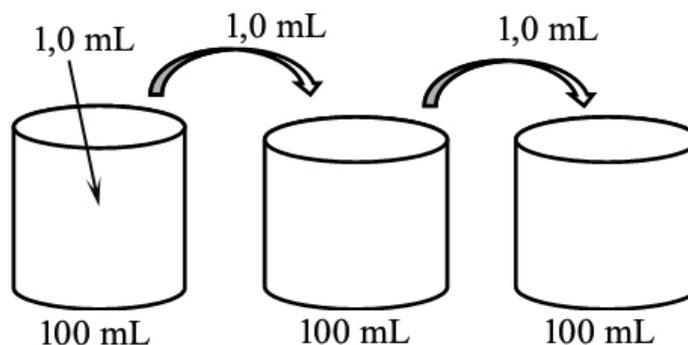
#### 5.4.1 Experimentos preliminares

Esta foi a primeira etapa das análises para fins de detecção de resíduos de medicamentos veterinários em leite. Nela, utilizou-se amostras de leite cru, leite genuíno (controle), e amostras posteriormente contaminadas com as drogas. No entanto, os percentuais da medicação no leite foram elevados quando comparados aos LMR. Isto se deveu ao fato da metodologia, inicialmente, estar sendo aprimorada. Assim, foi possível identificar por meio de uma análise visual os leites contaminados com as drogas através dos seus respectivos espectros referentes ao movimento vibracional. Para a simulação de leite contaminado com diclofenaco sódico, cada amostra foi preparada adicionando-se a medicação no leite, por meio de uma micropipeta *LabMate*, nas seguintes proporções: 0,1 e 99,9 %; 0,5 e 99,5 %; 10 e 90 %, respectivamente (LUIZ, 2014). Em seguida, simulou-se novamente a contaminação do leite cru, no entanto com outras drogas, desta vez utilizaram-se os antimicrobianos enrofloxacino e penicilina G. Neste caso, cada amostra de penicilina G foi preparada com 99,9 % de leite cru e 0,1 % do medicamento. Já para o enrofloxacino reduziu-se novamente o percentual, de modo que, cada amostra fosse simulada com 100 ppm (0,01 %) deste antimicrobiano. Esta foi uma tentativa de aproximar a contaminação dos LMR.

#### 5.4.2 Simulando a contaminação no LMR

Agora, a simulação foi feita de acordo com o princípio ativo de cada droga e não em relação ao seu volume, isto é com o fármaco, pois é sabido que a maioria dos medicamentos são constituídos de princípio ativo mais excipientes e também no caso de algumas drogas injetáveis, têm-se os veículos. Mais explicitamente, para esta simulação, na análise de dados com PCA, a discriminação do leite contaminado em  $\mu\text{g/L}$  é dada através do princípio ativo, LMR como previsto na legislação, e não através do medicamento (princípio ativo + excipientes). Para este propósito, cada medicamento utilizado (penicilina G, oxitetraciclina e enrofloxacino) foi primeiramente diluído em água destilada, e finalmente, parte desta diluição foi adicionada no leite genuíno, a fim de alcançar a concentração do princípio ativo no leite (LUIZ, 2018). A figura abaixo mostra a representação de dissolução usada para este trabalho. Suponha que deseja-se diluir 1 mL de determinado medicamento em 100 mL água destilada, a fim de, que o mesmo alcance uma concentração de 1 mg/L (1 ppm).

Figura 15 – Representação da diluição de 1 mL de determinada substância em 100 mL de água para alcançar uma concentração de 1 ppm.



Fonte: AUTOR.

Assim,

$$\frac{1}{100} \cdot \frac{1}{100} \cdot \frac{1}{100} = 1 \times 10^{-3} \times 10^{-3} = 1 \times 10^{-6} = 1 \text{ ppm}$$

Seguindo este raciocínio alcançou-se a concentração do princípio ativo de cada medicamento no leite. Os valores equivalentes seguidos pela EMEA e MAPA para os antimicrobianos e seus metabólitos são os seguintes: 100  $\mu\text{g/L}$  para o enrofloxacino, 100  $\mu\text{g/L}$

para oxitetraciclina, e 4 µg/L para penicilina G (MOHARANA, 2015)(PACHECO-SILVA , 2014)(MANGERONA, 2013).

#### 5.4.3 Amostras de uma situação real

Os resultados referentes a metodologia apresentada no 5.4.2 já se mostravam satisfatórios, tendo em vista que as amostras de leites simulando a contaminação com os medicamentos veterinários dentro dos LMR foram discriminadas daquelas com leite genuíno. No entanto, houve a necessidade de testar a metodologia em amostras reais, ou seja, aquelas em que as amostras de leite fossem ordenhadas de vacas sob tratamento medicamentoso. Primeiramente, o leite cru, genuíno, livre de medicamentos, foi coletado de uma vaca usada como controle. O antimicrobiano injetável CeF-50 Ceftiofur Agener União, foi administrado nesta vaca. Contudo, esta droga não tem período de carência. O leite foi coletado em dois dias consecutivos. Todas as amostras foram imediatamente armazenadas e mantidas sob refrigeração a 5,0 °C até a análise ser realizada, cerca de uma hora após a ordenha.

#### 5.4.4 Análise usando o Método FT-NIR

As investigações qualitativas das amostras foram realizadas com o Analisador Multi Propósito FT-NIR da *Bruker* operando no modo de refletância na faixa de 13.500 a 3.700 cm<sup>-1</sup> de números de onda com um detector Te-InGaAs e 4 cm<sup>-1</sup> de resolução. O software OPUS® versão 5.5 foi utilizado para aquisição de dados. As amostras foram colocadas em cubetas de borossilicato com 8 mm de espessura. Cada análise foi realizada em triplicata com 32 varreduras (*scans*) para amostras simuladas e controle. A figura 16 mostra o MPA FT-NIR instalado no LEM/DEFIS/UFJF.

Figura 16 – Analisador Multi Propósito FT-NIR usado para obtenção dos espectros.



Fonte: AUTOR.

#### 5.4.5 Análise usando o Método MEV/EDS

As amostras foram irradiadas com um microscópio eletrônico de varredura, sistema comercial portátil de bancada TM-3000 Hitachi High Technologies. Ele tem como características tensão de aceleração variável 5 a 15 kV, magnificação de até 30.000 vezes, sistema de EDS sem necessidade de refrigeração com nitrogênio líquido, análise elementar por raios X, além de fácil operação. Primeiro irradiou-se as amostras de leite em pó puro, em seguida, irradiou-se as amostras de leite em pó contaminadas com o antimicrobiano penicilina dentro do LMR. Foram realizadas três medidas para cada amostra, em pontos distintos, durante 300 s, com energia de 15,0 kV, magnificação de 1000 vezes.

#### 5.4.6 Análise Estatística dos Dados

O espectro de reflectância e suas respectivas derivadas de primeira ordem foram feitos e analisados com o software OriginPro® 8 SR2 v.8.0891(B891). Os autovalores foram calculados com o software BioEstat versão 5.3. Já as análises de componentes principais foram conduzidas pelo software The Unscrambler® versões 9.2 e versão X 10.3. Este último pelo Departamento de Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 6.1 EXPERIMENTO PRELIMINARES

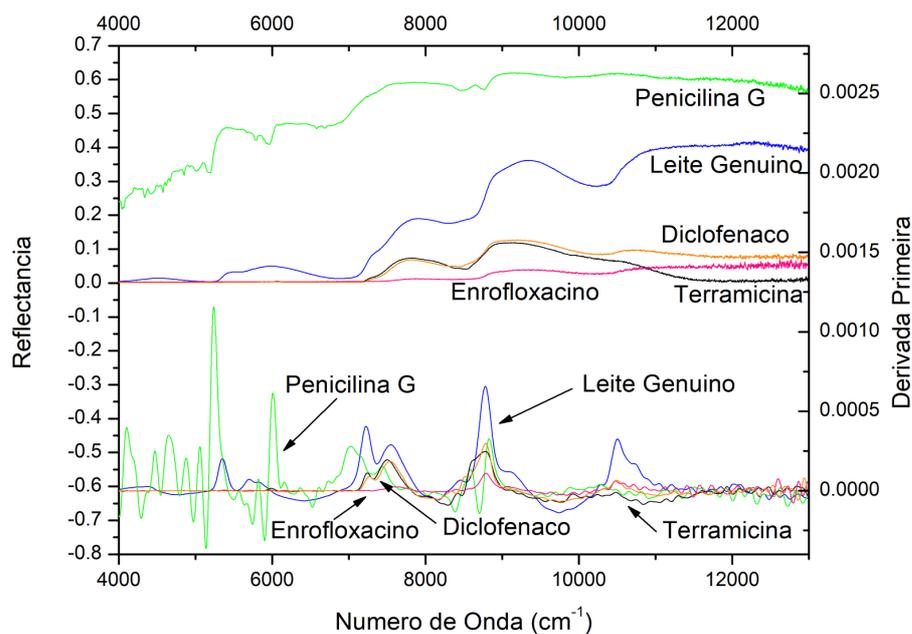
Abaixo, são apresentados os dados referentes aos experimentos iniciais com o leite cru e medicamentos veterinários, a fim de diminuir o percentual das drogas no leite até alcançar o LMR. A tabela 3 mostra os medicamentos aqui utilizados com seus respectivos LMR.

Tabela 3 – Medicamentos utilizados com seus respectivos LMR.

Medicamento	LMR (ppb ou $\mu\text{g/L}$ )	Fontes
Penicilina	4	PACHECO-SILVA, 2014. PAMVET, 2009.
Enrofloxacino	100	MANGERONA, 2013.
Diclofenaco Sódico	0,1	MANGERONA, 2013.
Oxitetraciclina	100	MITCHELL, 1998. PAMVET, 2009.
Cloridrato de Ceftiofur	100	EMEA, 2002

A figura 17 mostra os espectros de reflectância do leite genuíno e medicamentos veterinários puros.

Figura 17 – Espectro referente à amostra de leite genuíno, controle, e amostras dos medicamentos puros: diclofenaco sódico, penicilina G, oxitetraciclina (terramicina) e enrofloxacino.



Note que é possível identificar com clareza cada uma das amostras por meio de uma análise espectral. Posteriormente, verificar-se-á que, em determinados percentuais, a análise direta através dos espectros não é muito eficiente para o nosso propósito, então far-se-á o uso da derivada primeira, para que os mesmos se tornem mais distintivos. A derivada primeira, segunda, etc, aplica-se às curvas, tendo em vista que a mesma é uma taxa, uma diferença que relaciona a variação entre dois pontos. Assim, na derivada primeira, os pontos finais ficam bem destacados e coincidem com os pontos máximos da relação reflectância versus número de ondas, ou seja, onde há ocorrência de maiores variações (MUNDO QUÍMICO).

A tabela 4 mostra os resultados obtidos para as análises físico-químicas preliminares. Comparando os valores encontrados para as amostras de leite cru, com os valores de referência adotados pela legislação vigente, verifica-se que todas as amostras estão dentro do padrão aceitável para um leite de ótima qualidade. Assim, qualquer alteração nos mesmos não prejudicaria as medidas posteriores.

Tabela 4 – Resultados das características físico-químicas das amostras de leite cru.

<b>Análise</b>	<b>Valores encontrados</b>	<b>Valores de referência<sup>a,b</sup></b>
Crioscopia	(0,539 ± 0,001) °H	(- 0,550 a - 0,530) °H
Acidez	(16.5 ± 0,6) °Dornic	(14 a 18) °Dornic
Densidade	(1,033 ± 0,001) g/mL	(1,029 a 1,040) g/mL
pH a 25 °C	(6,71 ± 0,02)	(6,60 a 6,80)
Gordura	(3,25 ± 0,07) %	≥ 3,00
Proteína	(3,01 ± 0,02) %	≥ 2,90
Lactose	(4,55 ± 0,06) %	≥ 4,30
Sólidos	(10,80 ± 0,12) %	≥ 8,40

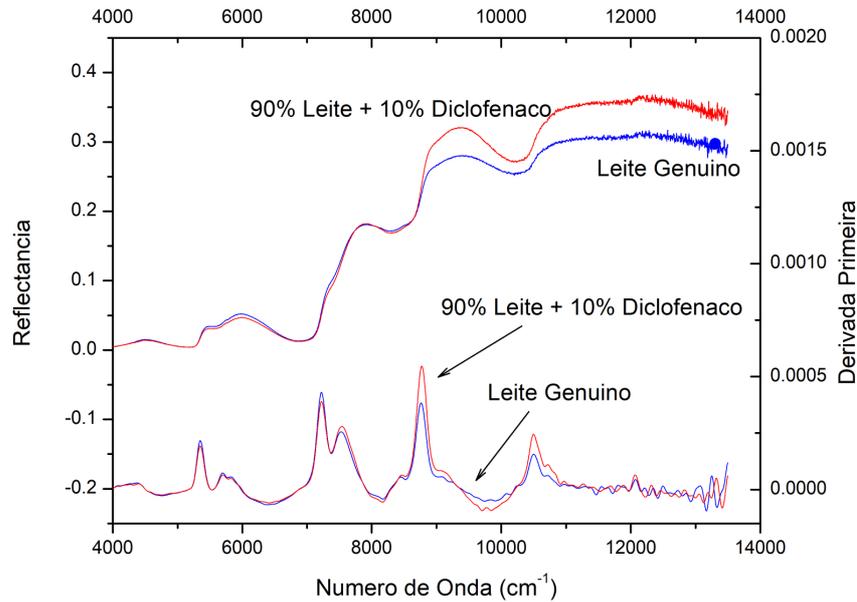
Fonte: LUIZ, 2014. <sup>a</sup>IN62; <sup>b</sup>FAO/TCP/KEN/6611

### 6.1.1 Diclofenaco Sódico

Nesta subseção são apresentados os resultados referentes à simulação de contaminação do antiinflamatório diclofenaco sódico.

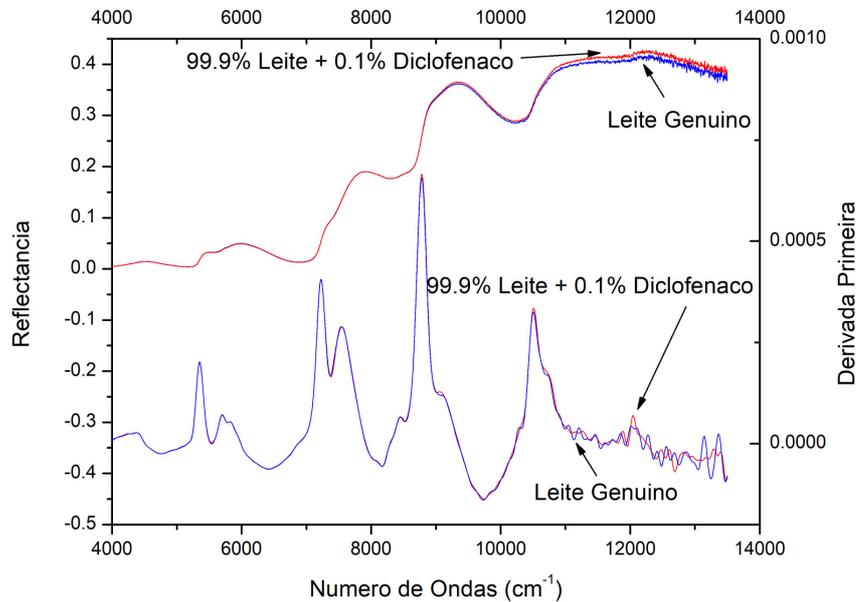
Na figura 18, o leite foi contaminado com 10 % do antiinflamatório veterinário diclofenaco sódico, este foi o início de redução do percentual da medicação. Embora o percentual seja alto, a análise espectral do mesmo serviu para acompanhar o comportamento da curva do leite contaminado, em qual faixa de número de onda havia variação.

Figura 18 – Espectro referente à amostra de leite adicionado com 10 % de diclofenaco sódico.



Na figura 19, o percentual do anti-inflamatório no leite foi reduzido correspondendo a 0,1 % da medicação. Comparado ao LMR, este percentual ainda é alto, porém observa-se que as curvas do espectro de reflectância quase se sobrepõem, devido ao maior percentual de leite. Mesmo pela derivada primeira, tal tarefa deve ser minuciosa. Isto, considerando a análise sem fitar o gráfico.

Figura 19 – Espectro referente à amostra de 99,9 % de leite adicionado de 0,1 % de diclofenaco sódico



### 6.1.2 Penicilina e Enrofloxacino

Aqui são apresentados os resultados referentes à simulação de contaminação dos antimicrobianos penicilina G, em 0,1 %, e enrofloxacino, em 0,01 % das drogas no leite.

Figura 20 – Espectro referente a 99,9 % de leite adicionado de 0,1 % de Penicilina.

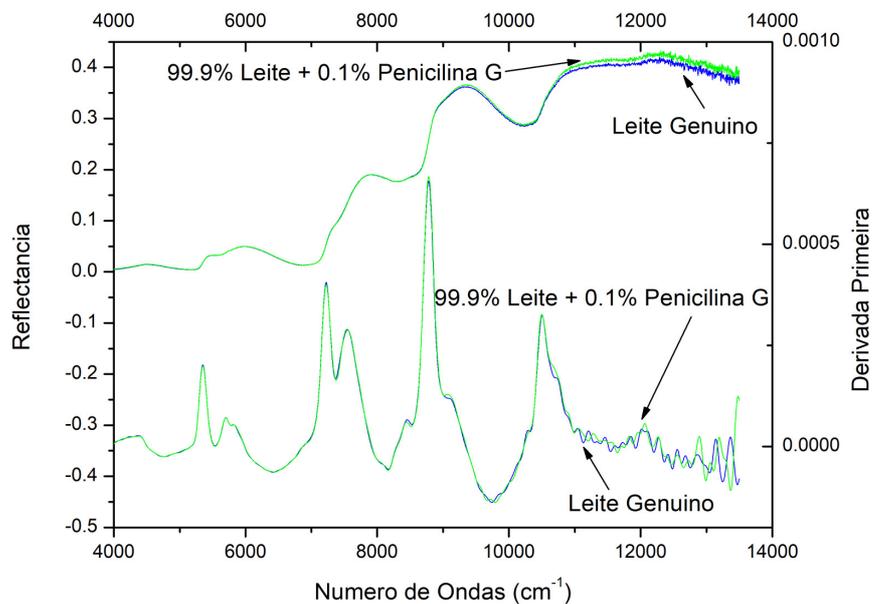
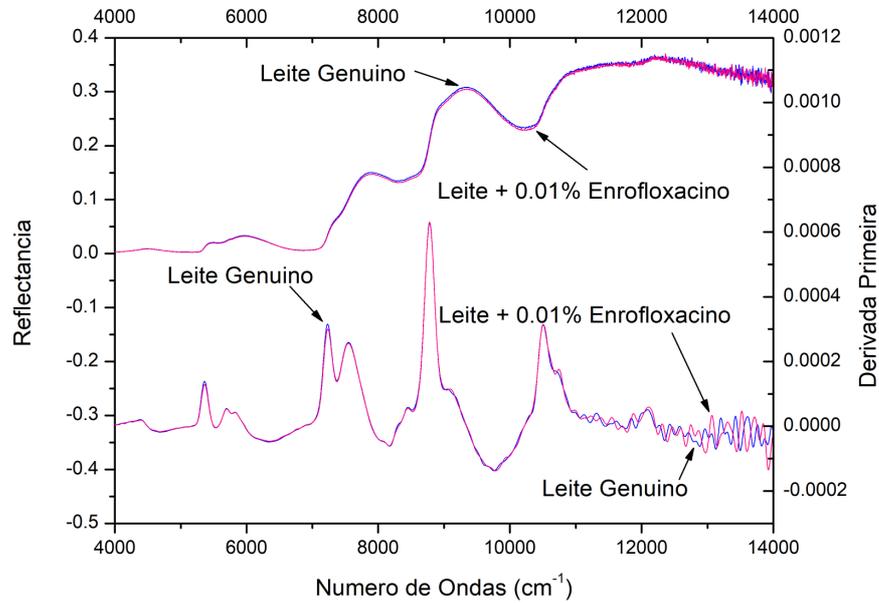


Figura 21 – Espectro referente ao leite adicionado de enrofloxacino em 0,01 % (100 ppm).



Nas figuras 20 e 21, os medicamentos são diferentes, antimicrobianos de classes distintas, e também simulou-se a diminuição dos percentuais, 0,1 % para penicilina e 0,01 % para o enrofloxacino. Ainda pode-se observar que as curvas do espectro de reflectância quase se sobrepõem e mesmo através da derivada primeira não há uma discriminação tão visível entre as curvas.

## 6.2 Simulando a contaminação no LMR

A seguir são apresentados os resultados referentes às análises de leite cru e leites simulando a contaminação por medicamentos veterinários dentro dos LMRs previstos em legislação para as drogas aqui analisadas, ver Tabela 3.

Tabela 5 – Resultados das características físico-químicas das amostras de leite cru que foi utilizado para simular as contaminações dentro do LMR.

<b>Análise</b>	<b>Valores encontrados</b>	<b>Valores de referência<sup>a,b</sup></b>
Crioscopia	(0,536 ± 0,001) °H	(- 0,550 a - 0,530) °H
Acidez	(17,3 ± 0,6) °Dornic	(14 a 18) °Dornic
Densidade	(1,031 ± 0,001) g/mL	(1,029 a 1,040) g/mL
pH a 25 °C	(6,72 ± 0,01)	(6,60 a 6,80)
Gordura	(3,65 ± 0,01) %	≥ 3,00
Proteína	(3,14 ± 0,01) %	≥ 2,90
Lactose	(4,50 ± 0,01) %	≥ 4,30
Sólidos	(11,29 ± 0,01) %	≥ 8,40

Fonte: LUIZ, 2018. <sup>a</sup>IN62; <sup>b</sup>FAO/TCP/KEN/6611

A figura 22 mostra os espectros de reflectâncias, bem como as suas derivadas primeiras, das amostras de leites genuíno e contaminados com todas as drogas usadas como amostras, dentro dos LMRs. Observa-se que, dentro da faixa de número de ondas utilizada, em uma primeira análise, torna-se uma tarefa difícil a discriminação entre as amostras, o que não é viável para a indústria de alimentos. Seria possível analisar o espectro por faixa, fitando-o, e observando qual dela tinha maior influência devido à presença do medicamento. Contudo, como iremos ver na seção 6.4, optou-se por utilizar a Análise de Componentes Principais para tal discriminação.

Figura 22 – a) Espectro de reflectância das amostras de leites genuíno e contaminados com os antimicrobianos: enrofloxacino, penicilina G e oxitetraciclina (terramicina), dentro dos LMRs.

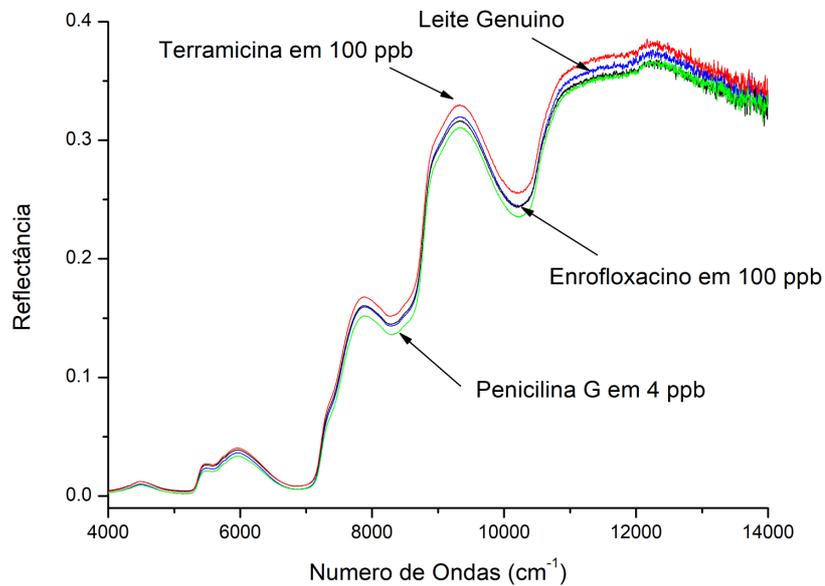
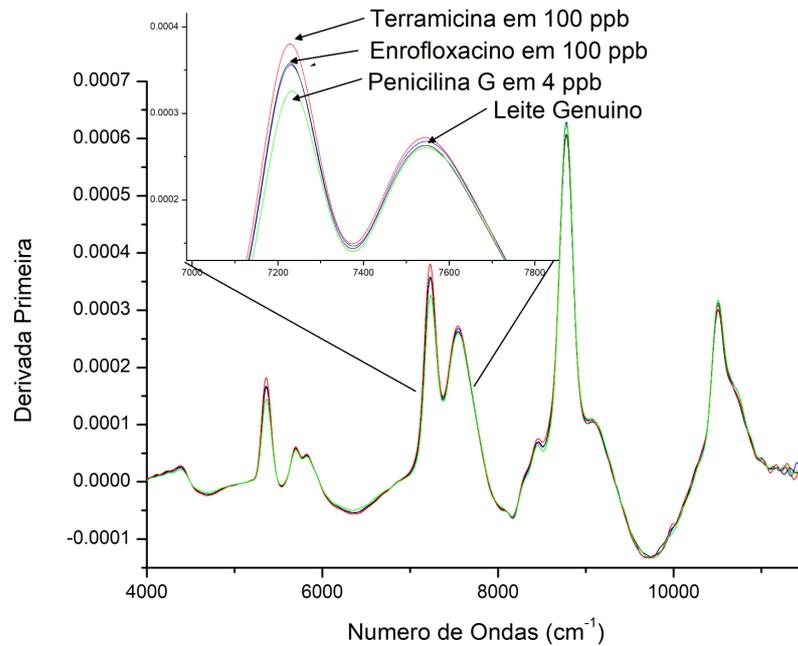


Figura 22 – b) Derivada primeira do espectro de reflectância dos leites genuíno e contaminados com os antimicrobianos: enrofloxacino, penicilina G e oxitetraciclina (terramicina), dentro dos LMRs.



Como o percentual do princípio ativo dos medicamentos veterinários são muito pequenos, nesta etapa do experimento escolheu-se calcular as variâncias explicadas e cumulativas para selecionar as componentes principais a serem utilizados. O componente principal de um conjunto de dados (dimensionalidade) é obtido por meio de uma análise que consiste em encontrar os autovalores da matriz de covariância (SANTOS, 2012). Cada autovetor possui um autovalor correspondente. Os autovetores com maiores autovalores são os principais componentes e são ordenados dos maiores para os menores, fornecendo os componentes em grau de significância (SAYAD, 2010). As tabelas 6, 7 e 8 mostram as variâncias explicadas e cumulativas para cada componente principal. Através destas variâncias que escolheu-se as componentes principais usadas para PCA.

Tabela 6 – Variâncias explicadas e cumulativas dos componentes principais de amostras de leite genuíno e contaminado dentro do LMR

<b>PC</b>	<b>Variância Explicadas (%)</b>	<b>Variância Cumulativa (%)</b>
PC1	99.9159	99.9159
PC2	0.0156	99.9315
PC3	0.0105	99.9420
PC4	0.0102	99.9522
PC5	0.0093	99.9615
PC6	0.0084	99.9699
PC7	0.0080	99.9779
PC8	0.0077	99.9857
PC9	0.0069	99.9926
PC10	0.0060	99.9986
PC11	0.0008	99.9993
PC12	0.0007	100.0000

Tabela 7 – Variâncias explicadas e acumulativas das valores médios das amostras: enrofloxacino puro, oxitetraciclina pura, penicilina pura, leite genuíno, leite adicionado de enrofloxacino e leite adicionado de tetraciclina com 100 µg/L cada e leite adicionado de penicilina em 4 µg/L.

<b>PC</b>	<b>Variância Explicadas (%)</b>	<b>Variância Cumulativa (%)</b>
PC1	81.9197	81.9197
PC2	13.6470	95.5667
PC3	3.6040	99.1707
PC4	0.8143	99.9850
PC5	0.0065	99.9915
PC6	0.0045	99.9660
PC7	0.0040	100.0000

Tabela 8 – Variâncias explicadas e acumulativas das amostras de leite genuíno e leite coletado durante dois dias depois da vaca ter sido medicada com o cloridrato de ceftiofur.

<b>PC</b>	<b>Variância Explicadas (%)</b>	<b>Variância Cumulativa (%)</b>
PC1	99.7444	99.7444
PC2	0.1629	99.9073
PC3	0.0170	99.9243
PC4	0.0153	99.9538
PC5	0.0143	99.9538
PC6	0.0137	99.9675
PC7	0.0114	99.9790
PC8	0.0109	99.9898
PC9	0.0102	100.0000

### 6.3 Amostras contaminadas com cloridrato de ceftiofur em situação real

As Tabelas 9, 10 e 11 são referentes as características físico-químicas das amostras de leite cru da vaca que foi medicada com cloridrato de ceftiofur.

Tabela 9 – Resultados das características físico-químicas das amostras de leite cru genuíno, da vaca que posteriormente seria medicada com o antimicrobiano ceftiofur.

<b>Análise</b>	<b>Valores encontrados</b>	<b>Valores de referência<sup>a,b</sup></b>
Crioscopia	(0,545 ± 0,001) °H	(- 0,550 a - 0,530) °H
Acidez	(19 ± 0,1) °Dornic	(14 a 18) °Dornic
Densidade	(1,031 ± 0,001) g/mL	(1,029 a 1,040) g/mL
pH a 25 °C	(6,59 ± 0,01)	(6,60 a 6,80)
Gordura	(3,40 ± 0,01) %	≥ 3,00
Proteína	(2,90 ± 0,01) %	≥ 2,90
Lactose	(4,25 ± 0,01) %	≥ 4,30
Sólidos	(11,4 ± 0,01) %	≥ 8,40

Fonte: LEAL, 2017. <sup>a</sup>IN62; <sup>b</sup>FAO/TCP/KEN/6611

Tabela 10 – Resultados das características físico-químicas de amostras de leite cru oriundos da vaca tratada com o antimicrobiano ceftiofur, um dia após a administração da droga.

<b>Análise</b>	<b>Valores encontrados</b>	<b>Valores de referência<sup>a,b</sup></b>
Crioscopia	(0,555 ± 0,001) °H	(- 0,550 a - 0,530) °H
Acidez	(18 ± 0,1) °Dornic	(14 a 18) °Dornic
Densidade	(1,029 ± 0,000) g/mL	(1,029 a 1,040) g/mL
pH a 25 °C	(6,63 ± 0,01)	(6,60 a 6,80)
Gordura	(3,40 ± 0,01) %	≥ 3,00
Proteína	(2,90 ± 0,01) %	≥ 2,90
Lactose	(4,25 ± 0,01) %	≥ 4,30
Sólidos	(11,4 ± 0,01) %	≥ 8,40

Fonte: LEAL, 2017. <sup>a</sup>IN62; <sup>b</sup>FAO/TCP/KEN/6611

Tabela 11 – Resultados das características físico-químicas de amostras de leite cru oriundas da vaca tratada com o antimicrobiano ceftiofur, dois dias após a administração da droga.

<b>Análise</b>	<b>Valores encontrados</b>	<b>Valores de referência<sup>a,b</sup></b>
Crioscopia	(0,555 ± 0,001) °H	(- 0,550 a - 0,530) °H
Acidez	(19 ± 0,1) °Dornic	(14 a 18) °Dornic
Densidade	(1,029 ± 0,001) g/mL	(1,029 a 1,040) g/mL
pH a 25 °C	(6,64± 0,01)	(6,60 a 6,80)
Gordura	(3,40 ± 0,01) %	≥ 3,00
Proteína	(2,90 ± 0,01) %	≥ 2,90
Lactose	(4,25 ± 0,01) %	≥ 4,30
Sólidos	(11,4 ± 0,01) %	≥ 8,40

Fonte: LEAL, 2017. <sup>a</sup>IN62; <sup>b</sup>FAO/TCP/KEN/6611

Para esta etapa do experimento, descartou-se a construção do espectro de reflectância, tendo em vista que tanto no experimento preliminar quanto no simulado em percentuais muito pequenos (ppm e ppb) a identificação espectral do leite contaminado por meio de uma visualização direta, torna-se uma tarefa árdua. Assim, os dados fornecidos pelo espectro do FT-NIR para as amostras desta etapa foram utilizados apenas para a construção da PCA.

#### 6.4 Análise de Componentes Principais

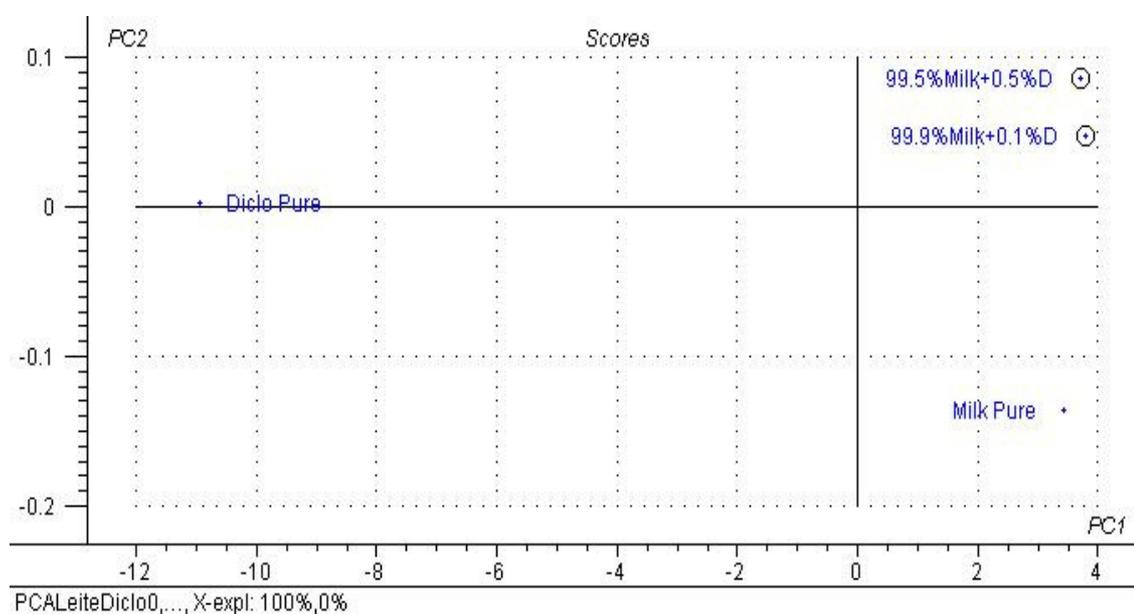
Observando-se a figura 17, referente aos espectros de reflectância dos leites genuínos e medicamentos veterinários puros, é possível identificar com clareza cada uma das amostras por meio de uma análise espectral, até mesmo sem necessidade de se verificar as derivadas primeiras referentes. Conforme as concentrações dos medicamentos nas amostras de leite vão diminuindo, tal tarefa se torna mais trabalhosa por meio da derivada primeira, ver figuras 19, 20 e 21. Em percentuais abaixo de 1 % a análise do espectro deve ser mais minuciosa pelo fato das alterações nas linhas espectrais serem muito pequenas. Em percentuais de concentração de medicamentos veterinários no leite da ordem de ppm e ppb, os espectros assim como suas derivadas primeiras apresentam-se como curvas sobrepostas, ver figura 22. Sendo assim, foi feita uma análise de componentes principais (PCA) em percentuais na qual a análise visual do espectro se tornou incompreensível.

Nas medidas preliminares realizou-se as PCAs com o espectro usando todo o número de onda e também com o gráfico fitado. No entanto, observou-se que não houve diferença na PCA, em discriminar dados com espectro fitado ou usando todos os canais.

#### 6.4.1 PCA referentes às medidas preliminares

A figura 23 mostra o gráfico dos *scores*, com os dois componentes principais (PC1 e PC2) correspondendo a 100 % da variância observada. Observa-se que os leites contaminados com resíduos de diclofenaco sódico, mesmo em percentuais pequenos, estão agrupados (marcados) na parte superior do quadrante direito, enquanto o leite pasteurizado puro no direito inferior. Esta distinção é quase que imperceptível no espectro da figura 19.

Figura 23 – Gráficos *score* da análise estatística (PCA) para as amostras de leite e diclofenaco puros, e leite com percentuais de 0,1 e 0,5 % do mesmo medicamento.



Como se trata de um experimento preliminar, apenas para verificar se a PCA se aplicava aos dados referentes ao espectro do FT-NIR em concentrações aonde a análise espectral torna-se difícil visualmente, optou-se por não diminuir mais as concentrações para a amostra de diclofenaco sódico, uma vez que as curvas das amostras de leite genuíno e leite adicionado 0,1 % de diclofenaco sódico já estavam sobrepostas. Ainda, nesta etapa do trabalho, uma tentativa de colocar o percentual de contaminação no LMR do diclofenaco sódico (0,1 ppb) seria algo improvável, visto que, na época, usou-se a micropipeta com menor volume disponível no laboratório para alcançar a concentração aqui apresentada. Posteriormente, como já citado na seção 5.4.2, uma outra metodologia foi usada, agora com os antimicrobianos, para colocar as concentrações nos LMRs.

Figura 24 – Gráfico *score* da análise estatística (PCA) para as amostras de leite e penicilina puros, e leite com percentuais de 0,1 e 0,5 % do mesmo medicamento.

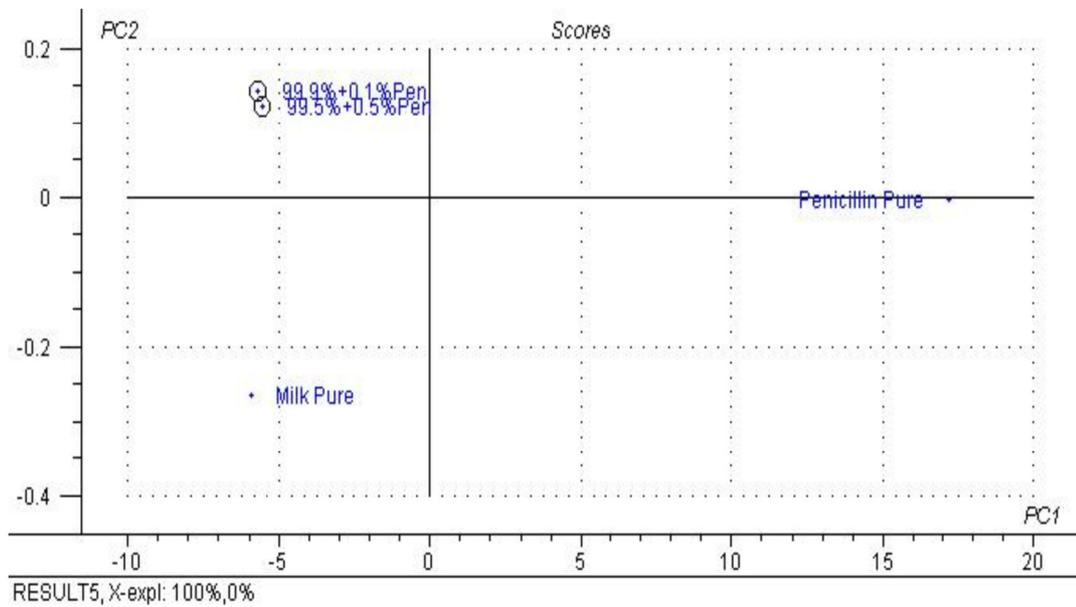
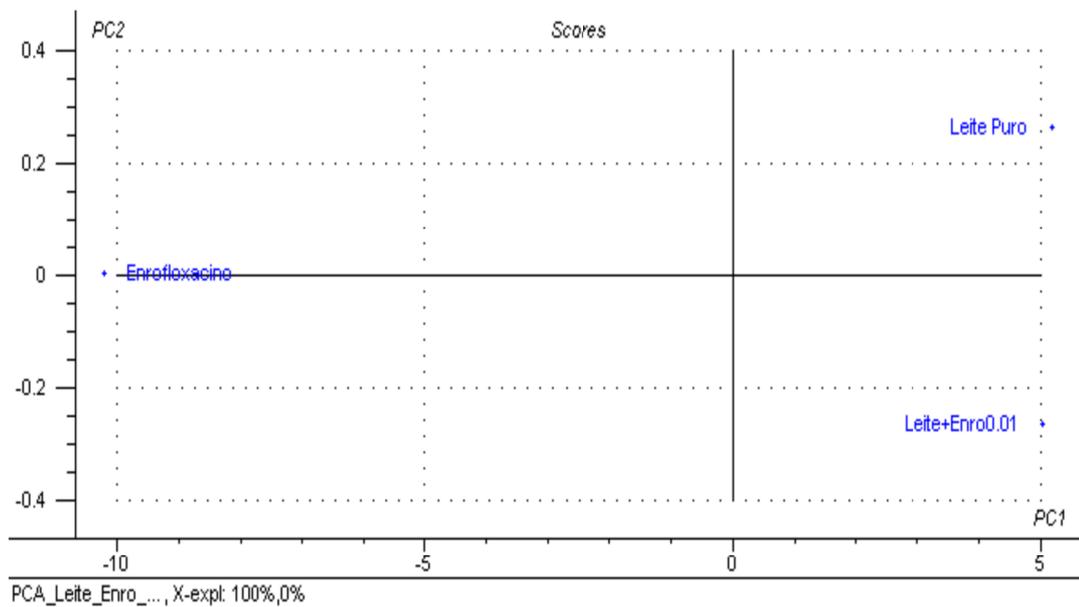


Figura 25 – Gráficos *score* da análise estatística (PCA) para as amostras de leite puro, enrofloxacino puro, e leite com 0,01 % de enrofloxacino.



#### 6.4.2 PCA referentes as medidas das amostras simuladas

Para as amostras de leites contaminadas com medicamentos dentro dos LMRs, as concentrações das drogas no leite foram sendo diminuídas gradualmente. A figura 26 mostra esta tentativa, aonde a concentração do antimicrobiano enrofloxacino foi sendo reduzido em 1 ppm (1000 ppb), 500 ppb e 120 ppb, no leite genuíno.

Figura 26 – Espectro de reflectância, com suas respectivas derivadas primeiras, das amostras de leite genuíno e contaminado com enrofloxacino em 1000 ppb, 500 ppb e 120 ppb.

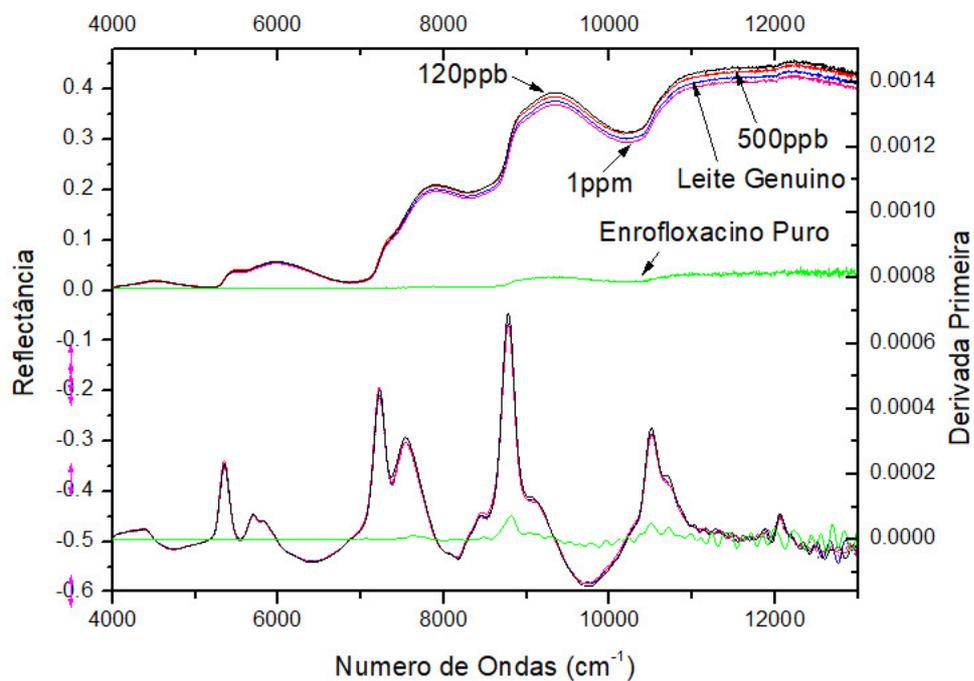
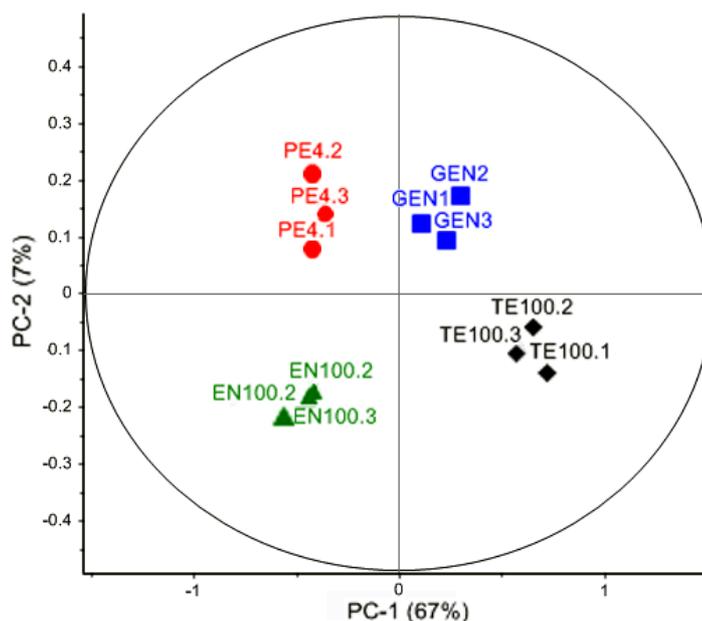


Figura 27 – Gráfico *hotelling score* da análise estatística (PCA) mostrando os dados de agrupamento (clustering) para amostras de leite genuíno, controle, GEN1, GEN2 e GEN3 (quadrado azul); leite com 100  $\mu\text{g/L}$  (100 ppb) de enrofloxacino, EN100.1, EN100.2 e EN100.3 (triângulos verdes); 100  $\mu\text{g/L}$  (100 ppb) de oxitetraciclina, TE100.1, TE100.2 e TE100.3 (losangos pretos); e leite com 4  $\mu\text{g/L}$  (4 ppb) de penicilina G, PE4.1, PE4.2 e PE4.3 (círculos vermelhos).

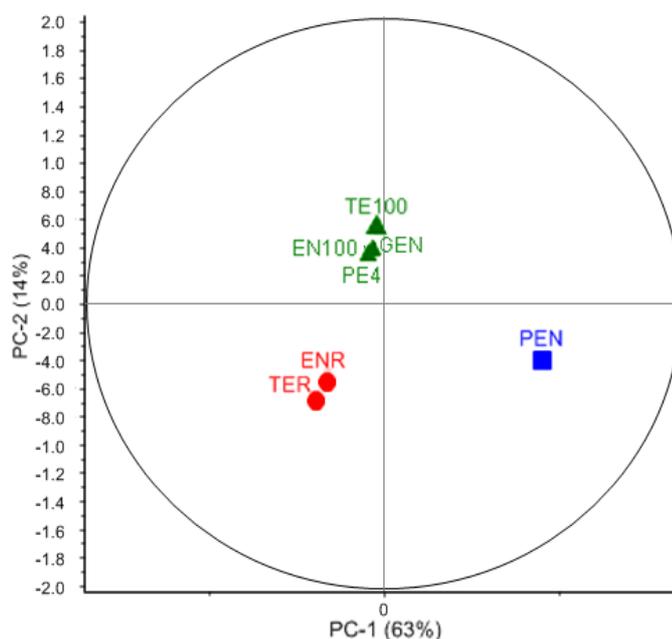


Analisando a figura 27, observa-se claramente a formação de *cluster* resultantes do alto grau de similaridade entre os grupos das amostras. Quatro grupos são apresentados, um em cada quadrante. O grupo 1 (quadrados) refere-se as amostras de leite genuíno (controle) e está localizado no primeiro quadrante. O grupo 2 está localizado no segundo quadrante (círculos). Este *cluster* representa um grupo de amostras contaminadas com 4  $\mu\text{g/L}$  de penicilina G. O terceiro quadrante contém elementos do grupo 3 que está relacionado às amostras de leite contaminadas com 100  $\mu\text{g/L}$  de enrofloxacino (triângulos), enquanto o quarto quadrante está ocupado pelo grupo 4 (losangos), contendo amostras de leite contaminadas com 100  $\mu\text{g/L}$  de oxitetraciclina. Entre os elementos dos grupos, nenhum está muito longe um do outro, descartando a presença de *outliers*. A PCA discriminou com precisão as amostras em grupos, apesar da concentração muito baixa dos antimicrobianos. Da PC1, pode-se observar que a penicilina G e o enrofloxacino têm o mesmo *score* em contraposição à oxitetraciclina e ao leite genuíno. Portanto, PC1 representa o grau de

contaminação do leite com antibióticos. Observe que o grupo de dados contendo leite genuíno está próximo do centro do eixo. Os *clusters* contaminados têm diferentes distâncias e diferentes posições do centro. Isto está relacionado ao fato de que as concentrações dos medicamentos são diferentes. Por exemplo, amostras com 100 µg/L de medicação (grupos 3 e 4) têm posição semelhante. Pelo raciocínio acima, somos levados a inferir que PC2 está relacionado à similitude do leite.

Todas as amostras analisadas até aqui para o experimento simulado foram de leite cru. Com relação aos dados dos antimicrobianos puros, pode-se verificar que o PCA também é capaz de discriminar entre eles. A figura 28 trata desse fato.

Figura 28 – Gráfico *hotelling score* da análise estatística (PCA) para valores médios de amostras: enrofloxacino pura (ENR), oxitetraciclina pura (TER), penicilina G pura (PEN), leite genuíno (GEN), leite com enrofloxacino e leite com oxitetraciclina em 100 µg/L (100 ppb) cada (EN100 e TE100) e leite com penicilina G em 4 µg/L (4 ppb).



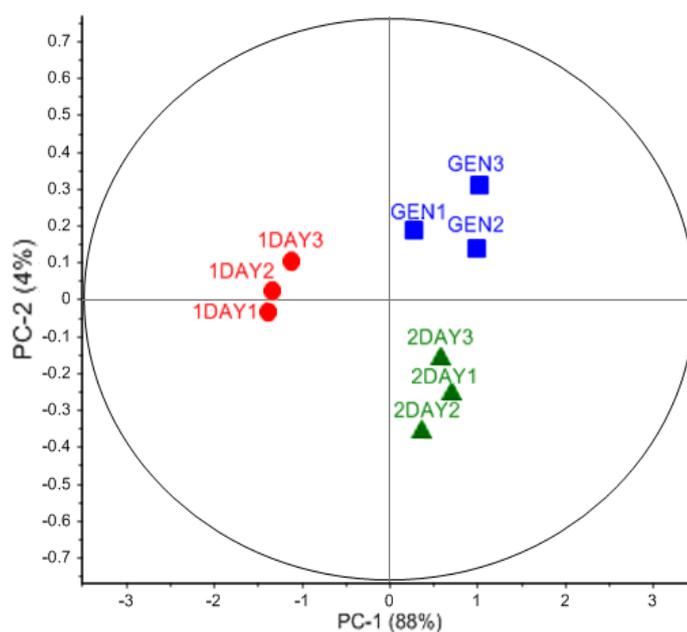
A figura 28 mostra o PCA dos valores médios dos espectros de reflectância do leite genuíno, enrofloxacino pura, oxitetraciclina pura e penicilina G pura e enrofloxacino adicionada no leite em 100 µg/L, leite com oxitetraciclina em 100 µg/L e leite com penicilina G em 4 µg/L, respectivamente. Pode-se observar que as amostras de leite (GEN) e parecidas com leite (EN100, TE100 e PE4) estão localizadas muito próximas em relação a PC1, o que

indica o grau de similaridade entre elas (formação de *cluster*). Por este motivo, as amostras dos antimicrobianos enrofloxacino (ENR), penicilina G (PEN) e oxitetraciclina (TER) estão tão distantes do grupo. A amostra de penicilina G pura é separada dos outros aglomerados porque era a única de matriz sólida (pó), enquanto os outros eram líquidos.

#### 6.4.3 PCA referentes às medidas das amostras de uma situação real

A figura 29 mostra a metodologia aplicada em uma situação real. Ela mostra dados referentes a um leite controle, sem medicação, e leite contaminado após a administração do cloridrato de ceftiofur em uma vaca durante dois dias consecutivos.

Figura 29 – Gráfico *hotelling score* da análise estatística (PCA) para amostras de leite genuíno (GEN1, GEN2 e GEN3) e leite coletado 1 dia (1DAY1, 1DAY2 e 1DAY3) e 2 dias (2DAY1, 2DAY2 e 2DAY3) após a administração do cloridrato de ceftiofur.



A formação de *clusters* foi observado para os leites genuínos (GEN1, GEN 2 e GEN3) e para o leite com um e dois dias após a administração do antibiótico (1DAY e 2DAY). Observe que os grupos GEN e 2DAY estão no mesmo PC1, mostrando a similaridade entre os grupos. Isto é devido à metabolização do antibiótico na vaca leiteira após dois dias da administração da droga. O reforço desta suposição é aparente quando comparado com uma

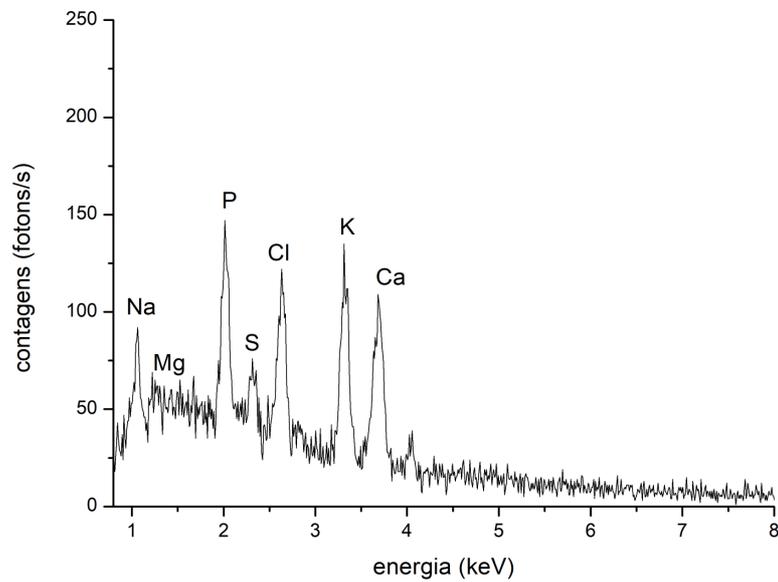
amostra ordenhada de um dia com leite genuíno. O PC2 é conectado com o tempo de ordenha, pois as medidas espectroscópicas foram realizadas após o último dia de ordenha (2 DAY).

Como o cloridrato de ceftiofur (Cef 50) é classificado como medicamento “carência zero”, é esperado que as amostras 1DAY e 2DAY, de leites após a administração da medicação, estivessem próximas às do leite genuíno, formando um único *cluster*. No entanto, formaram grupamentos separados, referentes ao primeiro e segundo dia. Considerando que a medicação foi administrada dentro da prescrição, isto mostra que o NIR foi capaz de detectar a presença de resíduos desta medicação. Uma análise qualitativa com testes imunológicos (tiras reativas) foi realizada por Leal 2017 para estas amostras, aonde verificou-se, por este método, que não havia a presença do medicamento. Sendo assim, conclui-se que o NIR detectou os resíduos do cloridrato de ceftiofur abaixo do limite de detecção das tiras reativas. A análise com NIR sugere ainda que o resultado com as tiras reativas pode ser falso-negativo, uma vez que a técnica aponta a presença do medicamento nas amostras.

#### 6.5 Análise multielementar por meio do MEV/EDS

Nas figuras 30, 31 e 32 são apresentados os espectros de energia obtidos por meio do MEV/EDS, o eixo horizontal corresponde à energia do fóton de raios X característico emitida pela amostra e registrada no detector, já o eixo vertical determina as contagens destes fótons por segundo. Esta análise serviu para verificar se a metodologia adotada neste trabalho poderia ser utilizada em um outro equipamento de espectroscopia. Ela também serviu para verificar a composição elementar das amostras de leite em pó e do antimicrobiano penicilina G.

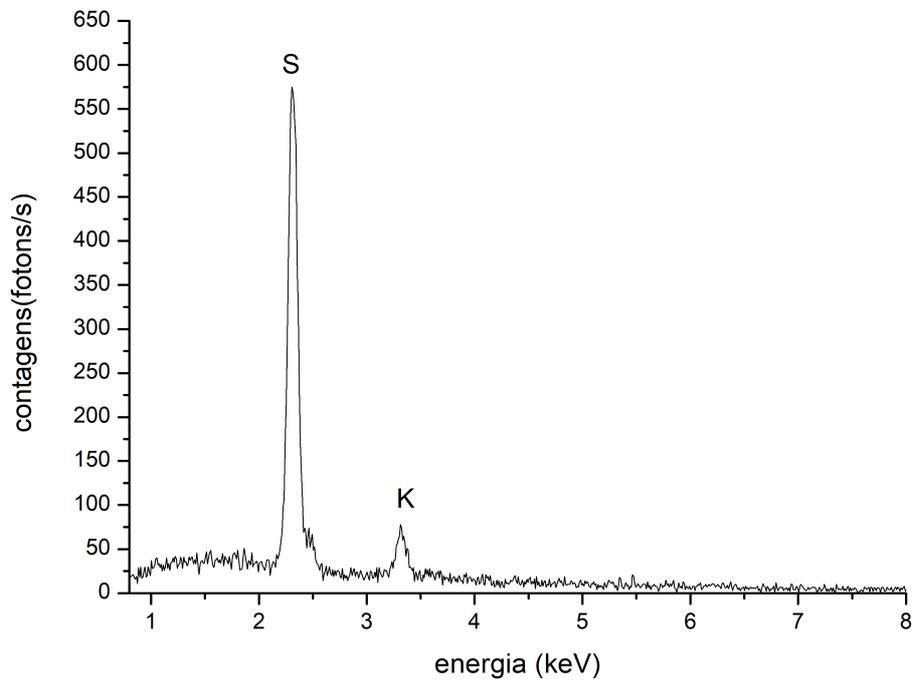
Figura 30 – Espectro com a composição elementar da amostra de leite em pó pura.



Na figura 30 pode-se observar alguns elementos que constituem os sais minerais presentes no leite, já citados na introdução deste trabalho, são eles: sódio, magnésio, fósforo, cloro, potássio e cálcio.

A figura 31 mostra a composição elementar de amostra do antimicrobiano veterinário pentabiótico (penicilina G).

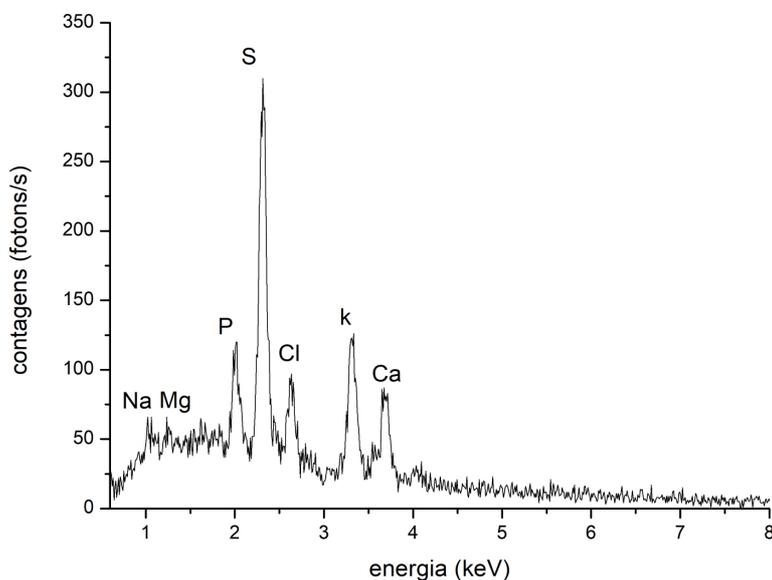
Figura 31 – Espectro com a composição elementar da amostra de penicilina G pura em 4 ppb.



Observe, na figura 31, que o pico referente a energia do enxofre se destaca, em uma intensidade (contagem) maior do que na figura 30. O enxofre faz parte da composição da penicilina G, visto que sua fórmula molecular é  $C_{16}H_{18}N_2O_4S$ . O pico de potássio se refere a benzilpenicilina potássica presente nesta droga.

Na figura 32, simulou-se a contaminação da amostra de leite em pó com o medicamento veterinário penicilina G, a fim de verificar, por meio do espectro a presença da penicilina G, devido ao alto pico de enxofre presente na mesma.

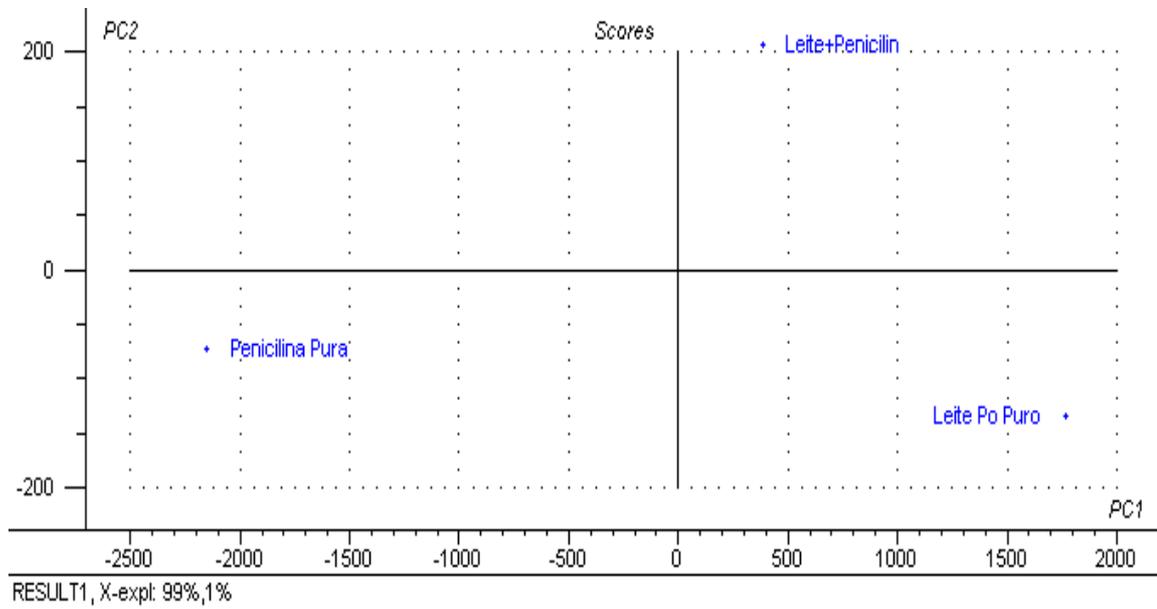
Figura 32 – Espectro com a composição elementar da amostra de leite em pó adicionado penicilina G.



Fazendo uma análise superficial, ou seja, apenas através do espectro, das figuras 30, 31 e 32, observa-se na figura 32, uma contagem maior do elemento enxofre, como já visto, este elemento caracteriza o antimicrobiano penicilina G. Ao observar a figura 32, verifica-se que este mesmo elemento se destaca na amostra de leite em pó simulando uma possível contaminação com a droga. Neste caso, foi possível verificar por meio da análise espectral. Mesmo assim, aplicou-se a PCA nos dados oriundos dos espectros do MEV/EDS, para testar a metodologia e verificar a possível identificação da amostra contaminada. A figura 33 mostra o gráfico *score* da PCA das amostras de leite em pó.

Na figura 33, as amostras de leite em pó e leite em pó contaminadas estão nos 2 quadrantes verticais, ao longo da PC1 com uma proximidade maior do que a da penicilina G pura. Isto lhe confere similaridade.

Figura 33 – Gráfico *score* da análise estatística (PCA) para amostras de leite em pó puro, penicilina G pura e leite em pó contaminado com penicilina G.



## 7 CONCLUSÕES

Este trabalho tratou da identificação das classes de medicamentos veterinários: anti-inflamatórios e antimicrobianos em amostras de leites no LMR permitido pelas agências reguladoras. As medidas preliminares serviram de ponto de partida para o estudo e adaptação da técnica, pois é sabido que as concentrações eram bastante altas, muito distante dos LMR. No entanto, o objetivo nos experimentos preliminares era a identificação, por meio do espectro de reflectância, o que aconteceu para concentrações acima de 1 %. Nos passos seguintes, simulando as contaminações dentro do LMR, a metodologia desenvolvida baseada na combinação da espectroscopia de infravermelho próximo com transformada de Fourier (FT-NIR) em conjunto com a análise de componentes principais (PCA) mostrou-se capaz de detectar traços de antibióticos de forma rápida e precisa. Pretendendo-se detectar os resíduos de medicamentos veterinários em uma situação real, a metodologia também foi aplicada para detectar o cloridrato de ceftiofur no leite de uma vaca em que a droga foi administrada. Além da detecção de traços, também pode-se acompanhar o processo de metabolização no animal. A mesma metodologia foi aplicada em uma situação com a amostra de leite em outra matriz, em pó, e com outra análise espectroscópica MEV/EDS, e se mostrou eficiente detectando a presença do antimicrobiano penicilina G na mesma, além de mostrar a composição elementar das amostras de leite pura e contaminada, já indicando a possível detecção. O NIR detectou a presença de resíduos de antimicrobianos abaixo e nos LMRs, já para o antiinflamatório diclofenaco sódico não foi possível detectar no LMR devido as limitações, na época, do equipamento para preparação da amostra. Nossos resultados demonstram claramente a potencialidade do método.

## **8 PERSPECTIVAS**

Dar prosseguimento às pesquisas desenvolvidas no GE2M, colaborando com os pesquisadores e estudantes envolvidos em projetos do grupo, a fim de contribuir para o crescimento técnico e científico do país.

Aplicar a metodologia com medicamentos antiparasitários e vermífugo.

Aplicar a metodologia em leites liofilizados.

Criar e submeter novos projetos a agências de fomentos para obter auxílio financeiro e possibilitar o ingresso de estudantes bolsistas comprometidos com as pesquisas realizadas pelo grupo.

Usar a Fluorescência de Raios X e MEV/EDS como técnicas complementares a FT-NIR, e realizar pesquisas com as mesmas direcionadas aos estudos de leites e seus derivados.

Repetir as medidas com medicamentos em uma situação real, e simular o mesmo em laboratório para fins de comparação.

Diminuir as concentrações de medicamentos no leite para encontrar o limite de detecção do equipamento de FT-NIR.

Aplicar Rede Neural Artificial à técnica.

## REFERÊNCIAS

- ABL Technology. Ceftiofur hydrochloride. Disponível em: <https://www.albtechnology.com/ceftiofur-hydrochloride-cas-103980-44-5.html>. Acesso em: 31 de janeiro de 2019.
- ALMEIDA, F. M. N. **Espectroscopia de Infravermelho Próximo com Transformada de Fourier (FT-NIR) na Caracterização de Farinhas para Alimentação Pueril**. Dissertação (Mestrado). Universidade Técnica de Lisboa, 2009.
- ALMEIDA, S. G.; MELO, L. M.; GARCIA, P. P. C. Biodisponibilidade de Cálcio Numa Dieta Isenta de leite de Vaca e Derivados. **Ensaio e Ciências: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 15, n. 3, p.XX-XX, 2011.
- ALMEIDA, C. C. **Avaliação de Suplementos Nutricionais à Base de Whey Protein**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal Fluminense, 2014.
- ALMEIDA, G. G. **Estudo Comparativo da Legislação Aplicável à Cadeia de Produção de Leite e Laticínios em Portugal e no Brasil**. Dissertação (Mestrado), Universidade Técnica de Lisboa, 2013.
- ANVISA, Qualidade do leite: Anvisa apresenta programa em todos Estados, 2008. Disponível em: <http://www6.ensp.fiocruz.br/visa/?q=node/3786>. Acesso em: 31 de janeiro de 2019.
- ARAÚJO, M. M. P. **Validação de Métodos Imunoenzimáticos para Determinação de Resíduos de Leite Antimicrobianos no Leite**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.
- BODENMÜLLER, A. F.; DAMASCENO, J. C.; PREVIDELLI, I. T. S.; SANTANA, R. G.; RAMOS, C. E. C. O.; SANTOS, G. T. Tipologia de Sistemas de Produção Baseada nas Características do Leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 8, p. 1832–1839, 2010.
- BRANDÃO, M. C. M. P.; CARMO, A. P.; BELL, M. J.; ANJOS, V. C. Characterization of Milk by Infrared Spectroscopy. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 65, n. 373, p. 30-33, 2010.
- ANVISA. **Programa de análise de resíduos de Drogas Veterinárias em Alimentos. PAMVet Relatório 2002-2003, Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo**, 2005. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/395364/PAMVet+Monitoramento+de+Res%C3%Adduos+em+Leite+Exposto+ao+Consumo+-+Relat%C3%B3rio+2006-2007/0c2b32d0-dd22-4a81-9fbc-4c4591e9d6cb>. Acesso em: 31 de janeiro de 2019.

ANVISA. **Programa de análise de resíduos de Drogas Veterinárias em Alimentos. PAMVet Relatório 2006-2007, Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo**, 2009. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/395364/PAMVet+Monitoramento+de+Res%C3%Adduos+em+Leite+Exposto+ao+Consumo+-+Relat%C3%B3rio+2006-2007/4777c371-e5b5-42e0-9c3f-43670009a802>. Acesso em: 31 de janeiro de 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 5/2000. Institui Grupo de Trabalho, Disponível em:

<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=17465&word=>

BRITO, M. A. V. P.; LANGE, C. C. Resíduos de Antibióticos no Leite. **Comunicado Técnico 44**, Embrapa, Juiz de Fora, Dezembro de 2005.

COSTA, E. O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA, H.S. *et al.* **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**, p. 442-455, 2002.

CQUALI LEITE, Monitoramento da Qualidade do Leite. Disponível em:

<http://www.cquali.gov.br>. Acesso em: 31 de janeiro de 2019.

DAMIANI, F.; TATSCH, P. J. Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Unicamp. 2000.

Disponível em: <http://www.dsif.fee.unicamp.br/~furio/IE607A/FTIR.pdf>. Acesso em: 31 de janeiro de 2019.

DAVIES, M. C. An Introduction to Near Infrared Spectroscopy. **NIR news**, v. 16, n. 7, p. 9-11, 2005.

DAVIES T. Happy 90th Birthday to Karl Norris, Father of NIR Technology. **NIR news**, v. 22. Issue 4. p. 3-16, 2011.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia Eletrônica de Varredura: Aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. Porto Alegre: EDUPUCRS; 2007. 60p.

RIBEIRO, M. T.; CARVALHO, A. C. Ordenha e Refrigeração. Embrapa. Disponível em: [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01\\_70\\_21720039240.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_70_21720039240.html). Acesso em: 31 de janeiro de 2019.

EMEA. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines and Inspections. Committe for Veterinary Medicinal Products. Ceftiofur. 2002.

EHMEZA, N.; ELMAJDOUB, A.; EL-MAHMOUDY, A. Comparative Pharmacokinetics and Absolute Bioavailabilities of Two Enrofloxacin Generic Preparations After Single Intracrop Bolus Administrations to Broiler Chickens. **Int. Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 4, n. 2, p.115-122, 2016.

FERREIRA, D. S.; PALLONE, J. A. L.; POPPI, R. J. Fourier transform near-infrared spectroscopy (FT-NIRS) application to estimate Brazilian soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] composition. **Food Research International**, v. 51, p. 53-58, 2013.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS (FAO), **Milk Analysis**, Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-au135e.pdf>. Acesso em: 31 de janeiro de 2019.

FAO/TCP/KEN/6611 Project, Milk Testing and Quality Control, Milk Processing Guide Series V2.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS (FAO). **Food Energy-Methods of Analysis and Conversion Factors**. Chapter 3, Rome: Food and Agriculture Organization of United Nations, 2003.

FAO/WHO, **Dairy Production and Products: Milk and Milk Products**. Disponível em: <http://www.fao.org/dairy-production-products/products/en/>. Acesso em: 31 de janeiro de 2019.

FOLHA. Soda é misturada no leite há 2 anos, dizem funcionários da Coopervale. 25/10/2007. **Folha On Line**. Disponível em: <http://www1.folha.uol.com.br/folha/cotidiano/ult95u339611.shtml>. Acesso em: 31 de janeiro de 2019.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

GALLO, P.; FABBROCINO, S.; DOWLING, G.; SALINI, M.; FIORI, M.; PERRATA, G.; SERPE, L. Confirmatory Analysis of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Bovine Milk by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. **Journal of Chromatography**, v. 1217, Ed. 17, 2010.

GLOBO. Dezoito acusados de fraude em leite em 2007 são condenados em MG. 10/02/2012. **Globo On Line**. Disponível em: <http://g1.globo.com/minas-gerais/triangulo-mineiro/noticia/2012/02/dezoito-acusados-de-fraude-em-leite-em-2007-sao-condenados-em-mg.html>. Acesso em: 31 de janeiro de 2019.

GRANELLA, V.; VENTORINI, C. G.; PIGATTO, G. M.; NÖRNBERG, J. L.; COSTABEBER, I. H. Resíduos de Agrotóxicos em Leites Pasteurizados Orgânicos e Convencionais. **Semina: Cienc. Agrárias**, v. 34, n. 4, p. 1731-1740, 2013.

GONÇALVES, T. M. **Caracterização de filmes finos obtidos por deposição de vapor químico assistido a plasma (PECVD) e deposição e implantação iônica por imersão em plasma (PIHD)**. Dissertação (Mestrado), UNESP, Sorocaba, 2012.

GOULDEN, J. D. S. Quantitative Analysis of Milk and Other Emulsions by Infra-Red Absorption. **Nature** **191**, p.905-906, 1961.

GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. **Guia de Antimicrobianos em Veterinária**, Artmed editora S.A, 2010.

HAN, R. W.; ZHENG, N.; YU, Z. N. et al., Simultaneous determination of 38 veterinary antibiotic residues in raw milk by UPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 181, p. 119–126, 2015.

HANDFORD, C. E.; CAMPBELL, K.; ELLIOTT, C. T. Impacts of milk fraud on food safety and nutrition with special emphasis on developing countries. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 1, p. 130–142, 2016.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C.; PAULA, H. Proteínas do Soro do Leite: Composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Rev. Nutr**, v. 19, n. 4, 2006.

IN 76. Instrução Normativa Número 76, 26 de novembro de 2018. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

ISO 5764:2009 (IDF 108: 2009), International Dairy Federation, Milk - Determination of freezing point - Thermistor cryoscope method (Reference Method), International Standard, ISO 5764-IDF 108, Brussels, Belgium: International Dairy Federation, 2009.

JANKOVSKÁ, R.; ŠUSTOVÁ, K.: Analysis of cow milk by near-infrared spectroscopy. **Czech J. Food Sci**, v. 21, p. 123-128, 2003.

JENNESS, R. The composition of milk. In: LACTATION (B. L. Larson and V.R. Smith, eds.), v. 3, pp. 3-107. **Academic Press**, New York, 1974.

JENSEN, R. G. Handbook of Milk Composition. Chapter 1, **Food Science and Technology**, 1995.

JOLLIFFE, I. T.; CADIMA, J. Principal Component Analysis: a review and recent developments. **Philosophical Transactions Series A, Mathematical, physical and engineering sciences**, v. 374, n. 2065, 2016.

LANDERS, T. F.; COHEN, B.; WITTUM, T. E.; LARSON, E. L.; A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. **Public Health Reports**, v. 127, n. 1, p. 4–22, 2012.

LANAGRO, Laboratórios Nacionais Agropecuários: Rede LANAGRO. MAPA. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/lanagros>. Acesso em: 31 de janeiro de 2019.

LEAL, N. L. **Comparação entre Testes FT-NIR e Imunoteste Co Métodos Analíticos Para Detecção de Traços de Antibióticos e Leite Cru no Tempo Zero de Carência**. Dissertação (Mestrado), UFJF, 2017.

LIMA, C. M. **Estudo da Solubilidade de Compostos de Urânio do Ciclo do Combustível em LPS**. Tese (Doutorado), PUC-Rio, 2008.

LIMA, A.; BAKKER, J. Espectroscopia no Infravermelho Próximo para a Monitorização da Perfusão Tecidual. **Rev. Bras. Ter Intensiva**, v. 23, n. 3, p. 341-351, 2011.

LUIZ, L. C. **Curiosidades em Física das Radiações**. Rio de Janeiro: Editora Multifoco, 2018.

LUIZ, L. C.; VARELLA, C. S. F.; SILVA, D. D. M.; BRANDÃO, D. L.; BATISTA, R. T.; FREITAS, R. P. Utilizando Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) para Comparação de Medicamentos Genéricos e Similar com o seu Referência. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 19, n. 3, p. 179-186, 2015

LUIZ, L. C.; BELL, M. J. V.; ROCHA, R. A.; LEAL, N. L.; ANJOS, V. C. Detection of Veterinary Antimicrobial Residues in Milk through Near-Infrared Absorption Spectroscopy. **Jornal of Spectroscopy**, v. 2018, p. 1-6, 2018.

MANGERONA, A. M.; MOZZER, O. D.; VIEIRA, R.; DIAS, C. R.; CAPPELINI, D. R. Comparação do período de carência em tecidos e leite bovino após administração de enrofloxacino e diclofenaco sódico (Quinotril Plus®) em diferentes vias parenterais, **A Hora Veterinária**, a. 33, n. 196, 2013.

KWIATKOWSKA, B.; MASLINSKA, M.; PRZYGDZKA, M.; DMOWSKA-CHALABA, J.; DABROWSKA, J.; SIKORSKA-SIUDEKA, K. Immune system as a new therapeutic target for antibiotics. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 4, p. 91-101. 2013.

MALUF, R. S.; RIBEIRO, A. B. Resíduos de Antibióticos em Leite. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 1, p. 30-44, 2012.

MAZON, M. S. O mercado do leite e agricultores: a qualidade em questão. **Política & Sociedade**, v. 15, n. 33, 2016.

MENDES, T. O. **Espectroscopia FT-MIR e calibração multivariada para determinação simultânea dos teores de gordura, proteínas e lactose e adulterações por adição de água em amostras de leite**, Dissertação (Mestrado), UFJF, 2011.

MITCHELL, J. M.; GRIFFITHS, M.W.; MCEWEN, S. A.; MCNAB, W. B.; YEE, A.J. Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. **Journal Food Prot**, v. 61, n. 6, p.742-756, 1998.

MOHARANA, B.; VENKATESH, P. K.; PREETHA, S. P.; SELVASUBRAMANIAN, S. Quantification of enrofloxacin residues in milk sample using RP-HPLC. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 10, p. 1443-1450, 2015.

MORZELLE, M. C. **Composição Química do Leite**. Notas de Aula, ESALQ/USP, 2016.

MUNDO QUÍMICO. Derivada Primeira e Derivada Segunda em Titulações. Disponível em: <https://mundoquimico.com.br/derivada-primeira-e-derivada-segunda-em-titulacoes/>. Acesso em: 31 de janeiro de 2019.

NASA. National Aeronautics and Space Administration. Herschel Discovers Infrared Light. A Classroom Activity. Disponível em: <https://spaceplace.nasa.gov/review/posters/herschel/Herschel-ir-activity.pdf>. Acesso em 31 de janeiro de 2019.

NASCIMENTO, G. G. F.; MAESTRO, V.; CAMPOS, M. S. P.; Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. **Rev. Nutr.**, v. 14, n. 2, p. 119-124, 2001.

NASCIMENTO, W. W. G.; OLIVEIRA, M. A. L.; FURTADO, M. A. M.; ANJOS, V. C.; BELL, M. J. V. Development and Optimization of an Alternative Methodology for Detection of Milk Adulteration by Water. **Journal of Food Science and Engineering**, v. 3, p. 363-370, 2013.

NEVES, V. A.; SOUZA, K. A. F. D. **Análise de alimentos: pesquisa dos componentes do leite**. Experimentos de Bioquímica. UNESP.

PAIVA, A. L. C.; TEIXEIRA, R. B.; YAMAKI, M.; MENEZES, G. R. O.; LEITE, C. D. S.; TORRES, R. A. Análise de componentes principais em características de produção de aves de postura. **Rev. Brasileira de Zootec**, v. 39, n. 2, p. 285-288, 2010.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS/OMS), Higiene dos Alimentos - Textos Básicos, Termo de Cooperação nº 37, Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Food and Agriculture Organization of the United Nations. Brasília: Organização Pan-Americana de Saúde, 2006. Disponível em:

[http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/alimentos/codex\\_alimentarius.pdf](http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/alimentos/codex_alimentarius.pdf). Acesso em: 31 de janeiro de 2019.

OUROFINO. LACTOFUR: Antimicrobiano Injetável à base de Ceftiofur para bovinos e suínos. Bula. Disponível em:

<https://www.ourofinosaudeanimal.com/produtos/downloads/887/>. Acesso em: 31 de janeiro de 2019.

PASQUINI, C. Near Infrared Spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 14, n. 2, p. 198-219, 2003.

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

PUBCHEM Compound Database. National Center for Biotechnology Information. Ceftiofur Hydrochloride. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9937686>. Acesso em: 31 de janeiro de 2019.

PEREIRA, M. C. S.; BRUMANO, L. P.; KAMIYAMA, C. M.; PEREIRA, J. P. F.; RODARTE, M. P.; PINTO, M. A. O. Lácteos com baixo teor de lactose: uma necessidade para portadores de má digestão da lactose e um nicho de mercado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 389, p. 57-65, 2012.

PEREIRA, G. A. P.; GENARO, P. S.; PINHEIRO, M. M.; SZEJNFELD, V. L.; MARTINI, L. A. Cálcio Dietético – estratégias para otimizar o consumo. **Rev. Bra. Reumatol**, v. 49, n. 2, p.164-80, 2009.

PERKINS, W. D. Fourier Transform-Infrared Spectroscopy – Instrumentation. **Journal Chemometrics**. p. A5-A10. 1986

POLÍCIA FEDERAL, Justiça condena acusados de adulterar leite presos na operação Ouro Branco. Disponível em: <http://www.pf.gov.br/agencia/noticias/2012/marco/justica-condena->

acusados-de-adulterar-leite-presos-na-operacao-ouro-branco-. Acesso em: 31 de janeiro de 2019.

PONTES NETTO, D.; LOPES, M. O.; OLIVEIRA, M. C. S.; NUNES, M. P.; MACHINSKI JUNIOR, M.; BOSQUIROLI, S. L.; BENATTO, A.; BENINI, A.; BOMBARDELLI, A. L. C.; VEDOVELLO FILHO, D.; MACHADO, E.; BELMONTE, I. V.; ALBERTON, M.; PEDROSO, P. P.; SCUCATO, E. S. Levantamento dos principais fármacos utilizados no rebanho leiteiro do Estado do Paraná. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 27, n. 1, p. 145-151, 2005.

PUC RIO. Espectroscopia no Infravermelho. Certificação Digital N 0114349/CA. Disponível em: [https://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/4432/4432\\_4.PDF](https://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/4432/4432_4.PDF). Acesso em: 31 de janeiro de 2019.

RIBEIRO, M. G.; GERALDO, J. S.; LANGONI, H.; LARA, G. H. B.; SIQUEIRA, A. K.; SALERNO, T.; FERNANDES, C. Microrganismos patogênicos, celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite bovino produzido no sistema orgânico. **Pesq. Vet. Bras**, v. 29, n. 1, p. 52-58, 2009.

RIVIERE, J. E. **Comparative Pharmacokinetics. Principles, Techniques & Applications**. 2ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 2011.

ROBIM, M. S. **Avaliação de Diferentes Marcas de Leite UAT Comercializadas no Estado do Rio de Janeiro e o Efeito da Fraude por Aguagem na Fabricação, Composição e Análise Sensorial de Iogurte**, Dissertação (Mestrado), Universidade Federal Fluminense, 2011.

ROCA, M.; VILLEGAS, L.; KORTABITARTE, M. L.; ALTHAUS, R. L.; MOLINA, M. P. Effect of Heat Treatments on Stability of Beta-Lactams in Milk. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 3, p. 1155-1164, 2011.

ROSARIO, N. A.; GRUMACH, A. S. Alergia a Beta-Lactâmicos na Clínica Pediátrica: uma abordagem prática. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 5, suppl, p.181-188, 2006.

SANTOS, R. E. Principal Component Analysis Applied to Digital Image Compression. **Einstein**, v. 10, n. 2, p. 135-139, 2012.

SAYAD, S. **Principal Component Analysis**, University of Toronto, Canada, 2010.

SILVA, D. Microscopia Eletrônica de Varredura, Notas de Aula. Unicamp. Disponível em: <http://www.ige.unicamp.br/site/aulas/186/MevAula1.pdf>. Acesso em: 31 de janeiro de 2019.

SIVAKESAVA, S.; IRUDAYARA, J. Rapid Determination of Tetracycline in Milk by FT-MIR and FT-NIR Spectroscopy. **Journal of Dairy Science**, v. 85, Issue 3, p. 487-493, 2002.

SHILS, M. E.; MOSH, J. A. O. **Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença**. 9.ed. São Paulo: Editora Manole, 2002.

TALERO-PEREZ, Y.; MEDINA, O. J.; ROZO-NUNEZ, W. Técnicas analíticas contemporáneas para la identificación de residuos de sulfonamidas, quinolonas y cloranfenicol. **Univ. Sci. Bogotá**, v.19, n. 1, p 11-28, 2014.

TAVANTI, V. K.; BASSI, L. G.; FERREIRA, G. C. C. et al. Composição e a capacidade de coagulação de leites de vacas holandesas e girolandas. **Revista do Instituto de Laticínio Candido Tostes**, v. 370, n. 64, p. 5-9, 2009.

TSENKOVA, R.; ATANASSOVA, S.; ITOH, K.; OZAKI, Y.; TOYODA, K. Near Infrared Spectroscopy for Biomonitoring: Cow Milk Composition Measurement in a Spectral Region from 1,000 to 2,400 nanometers. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 3, p. 515-522, 2000.

SPICE, B. Drugs for Chickens Blamed for Harder to Treat Food Poisoning. **Pittsburgh Post Gazette**. 2002.

VALGAS, S. **Desenvolvimento de um Novo Sistema de Liberação Controlada do Fármaco Enrofloxacin a partir de Microesferas de Malonilquitosana a ser Aplicado em Medicina Veterinária Florianópolis**, Tese (Doutorado), UFSC, 2005.

VASIMALAI, N.; ABRAHAM JOHN, S. Picomolar Melamine Enhanced the Fluorescence of Gold Nanoparticles: Spectrofluorimetric Determination of Melamine in Milk and Infant Formulas Using Functionalized Triazole Capped Gold Nanoparticles. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 42, 2013.

USP, Universidade de São Paulo. Curso de Reconhecimento de Padrões – Dedução de Componentes Principais, 2010.

- VERDON, E.; COUEDOR, P. Determination of Ampicillin Residues in Milk by Íon-Pair Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography After Precolumn Derivatization. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 14, p. 1201-1207, 1996.
- VIEIRA, L. C.; KANEYOSHI, C. M.; FREITAS, H. Criação de Gado Leiteiro na Zona Bragantina – Qualidade do Leite. **Embrapa Amazônia Oriental**, n. 2, 2005.
- VIEIRA, T. S. W. J.; RIBEIRO, M. R.; NUNES, M. P.; MACHINSKI JUNIOR, M.; PONTES NETTO, D. Detecção de Resíduos de Antibióticos em amostras de leite Pasteurizado do Estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 791-796, 2012.
- VISCARRA ROSSEL, R. A.; WALVOORT, D. J. J.; MCBRATNEY, A. B.; JANIK, L. J.; SKJEMSTAD, J. O. Visible, Near Infrared, Mid Infrared or Combined Diffuse Reflectance Spectroscopy for Simultaneous Assessment of Various Soil Properties. **Geoderma**, v. 131, p. 59-75, 2006.
- VAN BOECKEL, T. P.; GANDRA, S.; ASHOK, A.; CAUDRON, C.; GRENFELL, B. T.; LEVIN, S. A.; LAXMINARAYAN, R. Global Antibiotic Consumption 2000 to 2010: an Analysis of National Pharmaceutical Sales Data. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 14, n.8, p. 742-750, 2014.
- WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy Science and Technology**, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2nd edition, 2006.
- WEAVER, L. D. Antibiotic Residues in Milk and Meat Perceptions and Realities. **Vet. Med**, p. 1222-1228, 1992.
- WILLIAMS, P.; NORRIS, K. **Near-Infrared Technology: In the Agricultural and Food Industries**. American Association of Cereal Chemists, St.Paul, Minn. 2nd. USA. p.296. 2001.
- ZHANG, Y. D.; ZHENG, N.; HAN, R. W.; ZHENG, B. Q.; YU, Z. N.; LI, S. L.; ZHEG, S. S. Occurrence of Tetracyclines, Sulfonamides, Sulfamethazine and Quinolones in Pasteurized Milk and UHT Milk in China's Market. **Food Control**, v. 36, p. 238 - 242, 2014.